ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
National Hellenic Research Foundation

Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΠΜΣ «Ογκολογία: Από την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία»

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΠΑΦΙΤΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Διερεύνηση υπογραφών έκφρασης miRNA προς διαστρωμάτωση ασθενών με γλοιοβλάστωμα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

Postgraduate Programme in Oncology: From Oncogenesis to Therapy

PARASKEVI BAFITI

BIOLOGIST

Deciphering miRNA signatures toward patient stratification in glioblastoma multiforme

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΠΑΦΙΤΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Διερεύνηση υπογραφών έκφρασης miRNA προς διαστρωμάτωση ασθενών με γλοιοβλάστωμα

Επιβλέπουσα

Θεοδώρα Κατσίλα, Ερευνήτρια Γ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Θεοδώρα Κατσίλα, Ερευνήτρια Γ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Αλέξανδρος Πίντζας, Ερευνητής Α, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Χρήστος Τσατσάνης, Καθηγητής, Τμήμα Κλινικής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανακάλυψης Βιοδεικτών και Μεταφραστικής Έρευνας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών το χρονικό διάστημα 2019-2020, υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Γ' κας. Θεοδώρας Κατσίλα.

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσά μου, κα. Θεοδώρα Κατσίλα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική της καθοδήγηση, τις υποδείξεις της, την επιμονή της, τη συμπαράστασή της, τη συνεχή υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον Ερευνητή Α', κ. Αλέξανδρο Πίντζα και τον Καθηγητή, κ. Χρήστο Τσατσάνη για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας και την άψογη συνεργασία.

Η συλλογή των δειγμάτων και η ανοσο-ιστοχημική ανάλυση έλαβε χώρα στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, σε συνεργασία με την Καθηγήτρια, κα. Βασιλική Ζολώτα, τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Καρδαμάκη, τον Επικ. Καθηγητή Βασίλειο Παναγιωτόπουλο και την κα. Ιωάννα Γρυπάρη. Τους ευχαριστώ εγκάρδια.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου που με στήριξαν με κάθε τρόπο σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα **5**

Περιεχόμενα Πινάκων **8**

Περιεχόμενα Εικόνων **9**

Συντμήσεις και ξενόγλωσσοι όροι **10**

Περίληψη **13**

Abstract **14**

1. Εισαγωγή **15**

1.1. Γνωρίζοντας το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα 16

1.1.1. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Επίπτωση και παράγοντες κινδύνου 16

1.1.2. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Ταξινόμηση/ Μοριακοί υπότυποι 19

1.1.3. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Παθοφυσιολογία και μοριακοί μηχανισμοί 22

1.1.4. Το μικροπεριβάλλον του όγκου: σύσταση και ρόλος 25

1.1.5. Κύρια μονοπάτια και καταρράκτες σηματοδότησης 26

1.1.5.i. Το μονοπάτι τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinases, RTKs)/Ras/PI3K 27

1.1.5.ii. Τα p53- και RB-μονοπάτια 28

1.1.5.iii. Το Wnt-μονοπάτι 29

1.1.6. Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2* 31

1.1.7. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Διάγνωση 32

1.1.8. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Θεραπευτική Προσέγγιση 35

1.1.8.i. Χειρουργική εκτομή 36

1.1.8.ii. Ακτινοθεραπεία 36

1.1.8.iii. Χημειοθεραπεία-Ακτινοθεραπεία 38

1.1.8.iv. Ανθεκτικότητα στη θεραπεία 40

1.2. Ιατρική ακριβείας και βιοδείκτες 43

1.2.1. Τα miRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες 46

1.2.2. Τα miRNA ως βιοδείκτες στο γλοιοβλάστωμα 48

1.2.2.i Οι miRNA υπογραφές ως βιοδείκτες στο γλοιοβλάστωμα 50

1.2.3. Τα miRNA που μελετήθηκαν για τη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου και τη διαστρωμάτωση ασθενών 53

1.2.3.i. hsa-miR-20a 53

1.2.3.ii. hsa-miR-21 55

1.2.3.iii. hsa-miR-10a 57

1.2.4. Οι μεταβολομικές μελέτες ως εργαλείο της ιατρικής ακριβείας 58

1.3. Σκοπός μελέτης 61

2. Υλικά και Μέθοδοι 62

2.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση και εξόρυξη δεδομένων κειμένου 63

2.2. Συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη 64

2.3. Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση 65

2.4. Πειραματική διαδικασία μελέτης miRNAs 68

2.4.1. Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος 68

2.4.2. Αντίστροφη μεταγραφή 71

2.3.3. Ενίσχυση και ανίχνευση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR, RT-PCR).....73

2.3.4. Υπολογισμός επιπέδων έκφρασης των miRNA υπό μελέτη 75

2.4. Στατιστική Επεξεργασία.....76

3. Αποτελέσματα..... 79

3.1 .Ευρήματα εξόρυξης δεδομένων και κειμένου 80

3.2. Ευρήματα ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης.....81

3.3. Προσδιορισμός της miRNA υπογραφής 81

4. Συζήτηση 88

5. Συμπεράσματα-Μελλοντικές Προοπτικές 94

6. Βιβλιογραφία..... 96

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: *Στοιχειομετρία αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής σε τελικό όγκο 20μl* 72

Πίνακας 2: *Στοιχειομετρία αντίδρασης RT-PCR με τελικό όγκο αντίδρασης τα 25 μl* 74

Πίνακας 3: *Τα στάδια της RT-PCR κατά την εφαρμογή της μεθόδου στην παρούσα εργασία* 74

Πίνακας 4:*Εύρος τιμών της έκφρασης των miRNA υπό μελέτη στον πληθυσμό των ασθενών* 83

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: *Απομόνωση ολικού RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNA) με το miRNeasy FFPE Kit της Qiagen* 71

Εικόνα 2: *Στάδια Αντίστροφης Μεταγραφής miRNA* 72

Εικόνα 3: *Τα στάδια της RT-PCR (αρχή της μεθόδου)* 75

Εικόνα 4:*Διάγραμμα τύπου Venn ως προς τα ευρήματα εξόρυξης δεδομένων και κειμένου* 80

Εικόνα 5:*Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-20a και SNORD96a* 82

Εικόνα 6:*Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-21 και SNORD96a* 82

Εικόνα 7:Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-10a και SNORD96a 83

Εικόνα 8: *Ct τιμές για το SNORD96a σε ποικίλους ανθρώπινους ιστούς (200ng) με χρήση των miSCript II RT kit και miSCript HiSpec ρυθμιστικού διαλύματος, όπως στην παρούσα εργασία* 84

Εικόνα 9: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α στους ασθενείς της μελέτης* 85

Εικόνα 10: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α στους ασθενείς της μελέτης (υψηλού έναντι χαμηλού κινδύνου)* 86

Εικόνα 11: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α ανά ασθενή της μελέτης (η γκρίζα ζώνη αντιστοιχεί στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου με ολική επιβίωση >12 μηνών)* 87

Συντμήσεις και ξενόγλωσσοι όροι

^{11}C-MET: ^{11}C-μεθυλ-μεθειονίνη

^{18}F-FDG: ^{18}F-2-φλουορο-2-δεόξυ-D-γλυκόζη

^{18}F-FDOPA: 3,4-διυδρόξυ-6-[18F]-φλουορο-L-φαινυλαλανίνη

^{18}F-FET: O-(2-[18F]-φλουοροαιθυλ)-L-τυροσίνη

2-hydroxyglutarate, 2-HG: 2-υδροξυγλουταρικό

3' untranslated region, 3' UTR: 3' αμετάφραστη περιοχή

5-ALA: 5-αμινο-αμινοβουλινικό οξύ

acidic nuclear phosphoprotein-32 family member-A, ANP32A: μέλος-Α της οικογένειας όξινων πυρηνικών φωσφοπρωτεϊνών-32

antigen retrieval: αντιγονικός επίτοπος

Big Data: δεδομένα μεγάλου όγκου

blood brain barrier, BBB: αιματοεγκεφαλικός φραγμός

bovine serum albumin, BSA: διάλυμα λευκωματίνης βόειου ορού

cancer stem cells, CSCs: καρκινικά βλαστικά κύτταρα

chimeric antigen receptor T-cells, CAR-T cells: Τ-λεμφοκύτταρα φέροντα χιμαιρικό υποδοχέα αντιγόνου

clinical target volume, CTV: όγκος κλινικού στόχου

computed tomography, CT: αξονική τομογραφία

cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKN: κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς κινασών

distilled water, dH2O: αποσταγμένο νερό

dose sculpture: ρύθμιση δόσης

epidermal growth factor, EGFR: υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

epithelial mesenchymal transition, EMT: επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή

ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

European Association of Neuro-Oncology, EANO: Ευρωπαϊκή Ένωση Νευρο-Ογκολογίας

European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC: Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Έρευνα και Θεραπεία του Καρκίνου

European Society Medical Oncology, ESMO: Ευρωπαϊκή Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας

exportin-5, XPO5: εξπορτίνη-5

External Beam Radiation Therapy, EBRT: ακτινοθεραπεία εξωτερικής δέσμης

Forkhead box protein M1, FoxM1: μεταγραφικός παράγοντας FoxM1

Formalin-fixed paraffin-embedded,FFPE: μονιμοποιημένο ιστολογικό δείγμα σε φορμαλίνη/παραφίνη

glial fibrillary acidic protein, GFAP: ινώδης όξινη πρωτεΐνη της γλοίας

glioblastoma multiforme, GBM: πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

glioma CpG island methylator phenotype, G-CIMP: φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδων CpG στο γλοίωμα

glioma stem cells, GSCs: καρκινικά βλαστικά κύτταρα γλοιώματος

Grade: βαθμός κακοήθειας

gradient eco, GRE: ακολουθία ανάδειξης αιμορραγικών στοιχείων και αποτιτανώσεων

gross tumor volume, GTV: αρχικός συνολικός όγκος του νεοπλάσματος

guanosine diphosphate, GDP: διφωσφορική γουανοσίνη

guanosine triphosphate, GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη

H_2O_2: υπεροξείδιο
HCl: υδροχλωρικό οξύ
HCMV: κυτομεγαλοϊός
high-resolution melting, HRM: ανάλυση υψηλής διακριτικότητας τήξης
hypoxia induced factor-1α, HIF-1α: επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1α
Intensity-modulated radiotherapy, IMRT: ακτινοθεραπεία πεδίων διαμορφούμενης έντασης
interferon-γ, IFN-γ: ιντερφερόνη-γ
Interleukin 13 Receptor Subunit Alpha 2, IL13Ra2: υποδοχέας-α2 της ιντερλευκίνης-13
interleukin-10, IL-10: ιντερλευκίνη-10
interleukin-6, IL-6: ιντερλευκίνη-6
isocitrate dehydrogenase, IDH: ισοκιτρική δεϋδρογονάση
Karnofsky Performance Scale, KPS: κλίμακα λειτουργικής κατάστασης Karnofsky
Leucine-rich repeat binding in FLII interacting protein-1, LRRFIP1: FLII-αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη-1 πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης
long non-coding RNA, lncRNA: μακρύ μη κωδικό RNA
magnetic resonance imaging, MRI: απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
major histocompatibility complex, MHC: μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
mismatch repair, MMR: μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA
mitogen activated protein kinase, MAPK: μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών
multidrug resistance protein-1, MDR1: πρωτεΐνη πολυ-φαρμακευτικής αντίστασης-1
NAOH: υδροξείδιο του νατρίου
natural killer cells, NK: κύτταρα φυσικοί φονείς
neural stem cells, NSCs: νευρικά βλαστικά κύτταρα
not otherwise specified, NOS: χωρίς εκτίμηση
oligodendrocyte progenitor cells, OPCs: προγονικά ολιγοδενδροκύτταρα
oncomiRs: miRNA με δράση ογκογονιδίου
phosphatase and tensin homolog, PTEN: ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης
phosphoenolpyruvic acid, PEP: φωσφοενολοπυρουβικό οξύ
PKD Buffer: ρυθμιστικό διάλυμα πέψης πρωτεϊνάσης Κ
planning target volume, PTV: προγραμματισμένος όγκος για ακτινοβόληση
platelet-derived growth factor alpha, PDGFRA: αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
pleomorphic adenoma gene-like-2, PLAGL-2: πρωτεΐνη κωδικοποίησης πρωτεΐνης δακτύλου ψευδαργύρου
positron emission tomography, PET: ποζιτρονιακή τομογραφία
programmed cell death protein 4, PDCD4: πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
Programmed death-ligand 1, PD-L1: προσδέτης προγραμματισμένου θανάτου
progression free survival, PFS: επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου
prostaglandin-E, PGE1: προσταγλανδίνη-Ε
R-2-hydroxy-glutarate, R-2-HG: R-2-υδροξυγλουταρικό
Real time PCR, RT-PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
receptor tyrosine kinases, RTKs: υποδοχέας τυροσινικών κινασών
reversion inducing cysteine rich protein, RECK: πρωτεΐνη επαγόμενης αναστροφής πλούσιας σε κυστεΐνη
RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

RNA-induced silencing complex, RISC: RNA-σύμπλοκο επαγωγής αποσιώπησης
S-2-hydroxy-glutarate, S-2-HG: S-2-υδροξυγλουταρικό
search strings: ανεξάρτητες αναζητήσεις
spourty RTK signaling antagonist 2, SPRY2: ανταγωνιστής σηματοδότησης RTK 2
subventricular zone, SVZ: υποκοιλιακή ζώνη
SWI/SNF related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, number 4, SMARCA4: ρυθμιστής χρωματίνης εξαρτώμενος από την ακτίνη/ υποοικογένειας Α/ νούμερο 4
T1-weighted: σταθμισμένη ακολουθία T1w
T2-Fluid Attenuation Inversion Recovery, T2-FLAIR: ακολουθία με καταστολή του σήματος του νερού
T2-weighted: σταθμισμένη ακολουθία T2w
temozolomide, TMZ: τεμοζολομίδη
The Cancer Genome Atlas, TCGA: η σύμπραξη TCGA του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ην. Πολιτειών
TICE: T1-ακολουθία ενισχυμένης αντίθεσης
tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2: ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνάσων-2
transforming growth factor-β, TGF-β: μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β
tris buffered saline,TBS: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα τρομεθαμίνης
tumor-associated macrophages, TAMs: μακροφάγα του όγκου
tumor-treating fields, TTFields: πεδία θεραπείας όγκων
tumour infiltrating lymphocytes, TILs: λεμφοκύτταρα νεοπλασματικής προέλευσης
tumour microenvironment, TME: μικροπεριβάλλον του όγκου
US Food and Drug Administration, FDA: Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
vascular endothelial growth factor, VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
Volumetric Modulated Arc Therapy, VMAT: ογκομετρικά διαμορφούμενη τοξοειδή ακτινοθεραπεία
World Health Organization, WHO: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΑΚΘ: ακτινοθεραπεία
ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα
ΧΜΘ: χημειοθεραπεία

Περίληψη

Τα κακοήθη γλοιώματα συνιστούν έναν περίπλοκο κλινικό φαινότυπο και χρήζουν βέλτιστης λήψης αποφάσεων. Παρά το γεγονός ότι αποτελούν τον πιο συχνό τύπο πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου, τα γλοιώματα χαρακτηρίζονται από υψηλή ετερογένεια, όσον αφορά την παθοφυσιολογία τους, αλλά και την απόκριση στη θεραπεία. Σημαντικά, η ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο της νόσου αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στη διαστρωμάτωση των ασθενών.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αλληλεπίδραση γονιδιώματος-περιβάλλοντος κατέχει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την εξέλιξη των γλοιωμάτων και ειδικότερα, στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Εστιάζοντας, λοιπόν, στη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου, η παρούσα εργασία διερευνά μία υπογραφή έκφρασης microRNA (hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-10a) προς χαρτογράφηση της ετερογένειας των ασθενών και τη διαστρωμάτωσή τους.

Κατόπιν εξόρυξης δεδομένων και κειμένου, τα ευρήματά μας συνηγορούν πως τα επιλεγμένα microRNA ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και συμμετέχουν στη παθοφυσιολογία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος. Ακολούθησε ανοσο-ιστοχημική ανάλυση των ιστοπαθολογικών παρασκευασμάτων ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (n=37) για επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους (TGFb-RII, hMSH2 και EphA8) των προαναφερθέντων miRNA και αποτίμηση της έκφρασης των hsa-miR-20a, hsa-miR-21 και hsa-miR-10a με αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Συνολικά, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-20a, hsa-miR-21 και hsa-miR-10a, ευρήματα που υποστηρίχθηκαν από την ανοσο-ιστοχημική ανάλυση, ενδεικτικά και της ετερογένειας της νόσου. Η συσχέτιση μοριακών-κλινικών δεδομένων οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε δύο διακριτές ομάδες, υψηλού και χαμηλού κινδύνου, αντικατοπτρίζοντας παράλληλα τους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη δριμύτητα της νόσου. Η υπογραφή υπό μελέτη δύναται να συμβάλει υποστηρικτικά στη λήψη αποφάσεων στην κλινική.

Abstract

Malignant gliomas constitute a complex disease phenotype that demands optimum decision-making. Despite being the most common type of primary brain tumors, gliomas are highly heterogeneous when their pathophysiology and response to treatment are considered. Such inter-individual variability also renders optimum patient stratification extremely difficult.

Recent evidence highlight that the gene-environment interplay becomes of fundamental importance in oncogenesis and progression of gliomas. For glioblastoma multiforme, in particular, genotype-to-phenotype associations are critical.

Herein, we put emphasis on a microRNA signature (hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-10a) to map the inter-individual variability of glioblastoma multiforme patients toward optimum patient stratification.

Data and text mining reported a key role for hsa-miR-20a, hsa-miR-21 and hsa-miR-10a in the regulation of gene expression in glioblastoma pathophysiology. Next, immunohistochemistry analysis of FFPE tissue samples of glioblastoma multiforme patients (n=37) was performed for TGFb-RII, hMSH2 and EphA8. microRNA expression levels were determined by RT-qPCR.

hsa-miR-20a, hsa-miR-21 and hsa-miR-10a were up-regulated. Such findings are further supported by our immunohistochemistry analysis for TGFb-RII, hMSH2 and EphA8. Molecular-clinical correlations were drawn to classify high- vs. low-risk patients, shedding light to the molecular mechanisms involved in disease progression. This microRNA signature (hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-10a) may further empower evidence-informed decision-making in clinical practice.

1. Εισαγωγή

Ο γενικός όρος «γλοίωμα» χρησιμοποιείται, συχνά, για να περιγράψει τους πρωτογενείς όγκους εγκεφάλου και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), ακολουθείται κατηγοριοποίηση με βάση την προέλευση των κυττάρων που πυροδοτούν την νόσο (πιο συγκεκριμένα, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα). Με βάση το βαθμό κακοήθειας (Grade), οι όγκοι Grade I εμφανίζονται, κυρίως, στην παιδική ηλικία και ακολουθούν τα χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα (Grade II). Στους όγκους Grade III/IV κατατάσσονται το αναπλαστικό αστροκύττωμα, το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα, το αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα και το αναπλαστικό επενδύμωμα, ενώ το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ανήκει στα νεοπλάσματα Grade IV/V. Τα γλοιώματα αποτελούν τους πιο συχνά εμφανιζόμενους όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), σε ποσοστό που υπολογίζεται ίσο προς το 45,2% όλων των κακοηθών όγκων του εγκεφάλου και το 80% όλων των πρωτογενών κακοηθών όγκων του εγκεφάλου, με ετήσια επίπτωση ~3-5/100.000, ενώ περισσότερα από 10.000 καινούργια περιστατικά διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο (Stupp et al., 2014, Hanif et al., 2017).

1.1. Γνωρίζοντας το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

1.1.1. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Επίπτωση και παράγοντες κινδύνου

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι ο πιο κακοήθης και ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος πρωτογενών αστροκυττωμάτων και αποτελεί μια γενετικά και φαινοτυπικά ετερογενή ομάδα όγκων. Ο όρος «πολύμορφο γλοιοβλάστωμα» (glioblastoma multiforme, GBM) εισήχθη πρώτη φορά από τον Cushing στο δεύτερο μισό του δέκατου ένατου αιώνα, ενώ η πρώτη χειρουργική επέμβαση σε ασθενή με γλοιοβλάστωμα πραγματοποιήθηκε στη Βιέννη το 1904 (Urbańska et al., 2014). Ο όρος «πολύμορφο» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει

την πολύμορφη εικόνα των νεοπλασματικών κυττάρων που παρατηρούνταν σε μία βιοψία ή σε διαφορετικές βιοψίες παρόμοιας προέλευσης (Stoyanov et al., 2018).

Παρά την ποικιλία των σύγχρονων πολύτροπων θεραπειών στο πεδίο τη ογκολογίας, γενικότερα, αλλά και ειδικότερα έναντι του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, το τελευταίο αποτελεί μία θανατηφόρα ασθένεια με εξαιρετικά φτωχή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, η επίπτωση είναι 3,19 περιστατικά στα 100.000 ανθρωπο-έτη με την πενταετή επιβίωση να φτάνει μόλις το 4-5% και το ποσοστό επιβίωσης στα 2 έτη κλινικών μελετών να εκτιμάται ίσο προς 26-33% (Batash et al., 2017). Η επιβίωση είναι αντίστροφα συνδεόμενη με την ηλικία, καθώς παρατηρείται ότι αρχικά το ποσοστό των ασθενών που επιβιώνουν για 5 έτη από τη διάγνωση κυμαίνεται στο 5%, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 2% σε ασθενείς 65 ετών και άνω.

Εμφάνιση γλοιοβλαστώματος μπορεί να παρατηρηθεί, τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά, με το μεγαλύτερο ποσοστό των περιστατικών να παρατηρείται στο ηλικιακό εύρος των 75-84 ετών. Παρατηρείται, επίσης, μια υπεροχή της επίπτωσης στους άντρες, καθώς επίσης γεωγραφικά η επίπτωση είναι υψηλότερη στους Καυκάσιους, ειδικότερα σε αυτούς που κατοικούν σε βιομηχανικές περιοχές (Urbańska et al., 2014, Wirsching et al., 2016). Για την εμφάνιση του γλοιοβλαστώματος στις γυναίκες υπάρχει η υπόθεση της συμμετοχής των φυλετικών ορμονών στην ανάπτυξή του, ενώ δεν θεωρούνται υψηλού κινδύνου οι γυναίκες σε μετα-εμμηνοπαυσιακή φάση.

Οι μόνοι καθιερωμένοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση γλοιοβλαστώματος στο γενικό πληθυσμό είναι η έκθεση σε ακτινοβολία κατά την παιδική ηλικία και η γενετική προδιάθεση. Δεδομένα μιας εκτεταμένης αναδρομικής μελέτης δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης γλοιωμάτων στον παιδιατρικό πληθυσμό μετά από έκθεση σε θεραπευτική ενδοκρανιακή ακτινοβολία, που εξαρτάται, βέβαια, από την ηλικία του

ασθενή, αλλά και τη δόση της ακτινοβολίας. Εντούτοις, υπάρχουν στοιχεία συσχέτισης με την έκθεση σε ακτινοβολία, τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά. Σημαντικά, ένα ποσοστό των ασθενών με γλοιοβλάστωμα της τάξης του 1% μπορεί να συσχετιστεί με κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 και 2, του συνδρόμου Turcot, του συνδρόμου Li Fraumeni, της πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας τύπου IIA, του κληρονομικού μη πολυποδισιακού καρκίνου του παχέος εντέρου/ σύνδρομο Lynch και του συνδρόμου Gorlin-Gotz. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι ένας τραυματισμός με πρόκληση εγκεφαλικού αιματώματος μπορεί να πυροδοτήσει την εμφάνιση γλοιοβλαστώματος. Σε κάθε περίπτωση, οι προαναφερθέντες παράγοντες μπορούν να αιτιολογήσουν την εμφάνιση της νόσου μόνο σε ένα μικρό υποσύνολο των ασθενών (Urbańska et al., 2014, Wirsching et al., 2016, Hanif et al., 2017, Weller et al., 2019).

Μελέτες ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως συνοψίζονται στη βιβλιογραφική ανασκόπηση των Omuro και DeAngelis (Omuro and DeAngelis, 2013), έχουν ταυτοποιήσει επιρρεπείς γονιδιακές παραλλαγές σε πλήθος κυτταρογενετικούς τόπους, όπως οι 20q13.33 (*RTEL*), 5p15.33 (*TERT*), 9p21.3 (*CDKN2BAS*), 7p11.2 (*EGFR*), 8q24.21 (*CCDC26*) και 11q23.3 (*PHLDB1*), που, ωστόσο, φαίνεται να παρουσιάζουν ασθενή συσχέτιση με τα γλοιώματα και πιο πιθανό είναι να αντικατοπτρίζουν μοριακούς υποτύπους και όχι παράγοντες κινδύνου για την ασθένεια. Ιοί, όπως ο ανθρώπινος κυτομεγαλοϊός (HCMV), έχουν επίσης θεωρηθεί υπεύθυνοι για ορισμένες περιπτώσεις πολύμορφου γλοιοβλαστώματος. Ο HCMV οδηγεί σε συγγενή εγκεφαλίτιδα και πολυ-οργανικές αλλαγές, ενώ παρουσιάζει τροπισμό για τα κύτταρα της γλοίας. Καθώς προϊόντα των γονιδίων του ιού αλληλεπιδρούν με κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια, που εμπλέκονται στον κακοήθη φαινότυπο του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, μπορεί να θεωρηθεί ότι ο HCMV κατέχει ογκορυθμιστικό ρόλο, αν και

δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι ο ιός μπορεί να αποτελέσει τον πυροδοτικό μηχανισμό ανάπτυξης του όγκου.

Συμπερασματικά, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η ανάπτυξη πολύμορφου γλοιοβλαστώματος αποτελεί σποραδικό φαινόμενο (Wirsching et al., 2016)

1.1.2. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Ταξινόμηση/ Μοριακοί υπότυποι

Όσον αφορά την κλινική κατηγοριοποίησή του, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα διαχωρίζεται σε δύο κλινικές μορφές, το πρωτογενές, το οποίο αποτελεί την κοινή μορφή και τυπικά, αναπτύσσεται *de novo* σε διάστημα 3-6 μηνών σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και το δευτερογενές. Το τελευταίο προέρχεται από προϋπάρχον χαμηλής κακοήθειας αστροκύττωμα σε νεότερους ασθενείς (Alifieris and Trafalis, 2015). Μελέτες στον παιδιατρικό πληθυσμό, όπως περιγράφονται σε ενδελεχή βιβλιογραφική ανασκόπηση (Aldape et al., 2015), προτείνουν μία επιπλέον κατηγορία που βασίζεται σε σωματικές μεταλλάξεις του *H3F3A,* κυρίως τις K27M ή G24R/G34V, που οδηγούν στην αντικατάσταση αμινοξέων της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης και εντοπίζονται κυρίως σε δύο θέσεις στην ουρά της ιστόνης.

Σημειώνεται, εδώ, πως η κατηγοριοποίηση των όγκων εγκεφάλου βασιζόταν, αρχικά, στην ιστογένεση, σύμφωνα με την μικροσκοπική εικόνα και την ομοιότητα μεταξύ των διαφορετικών αναφερόμενων κυττάρων προέλευσης και το στάδιο διαφοροποίησης. Σε αυτά τα πλαίσια, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται από χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλασματικά αστροκύτταρα και παρουσιάζει, μακροσκοπικά, μεγάλη ετερογένεια, με χαρακτηριστικά, όπως η πολυεστιακή αιμορραγία, η νέκρωση και οι κυστικές, αλλά και ζελατινώδεις περιοχές. Παρατηρούνται διαφορές, επίσης, στην μορφή

του όγκου, ανάλογα με την τοπολογία του. Ιστολογικά, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα προσομοιάζει το αναπλαστικό αστροκύττωμα, δηλαδή όγκους με πλειόμορφους πληθυσμούς κυττάρων, που ποικίλουν από μικρά χαμηλής διαφοροποίησης κύτταρα μέχρι μεγάλα πολυπύρηνα με πολυεστιακή νέκρωση και έντονη μιτωτική λειτουργία. Χαρακτηριστικό αποτελεί και ο πολλαπλασιασμός αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Hanif et al., 2017).

Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του WHO, το 2007, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα περιλάμβανε δύο διακριτούς κλινικο-παθαλογικούς φαινοτύπους, το μεγαλοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα και το γλοιοσάρκωμα. Επισημαίνεται πως στην κατηγοριοποίηση του WHO, το 2016, προστέθηκε το επιθηλιώδες γλοιοβλάστωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλα επιθηλιακά κύτταρα με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Αναφορικά με τα πρότυπα διαφοροποίησης, παρατηρείται το γλοιοβλάστωμα μικρών κυττάρων, το γλοιοβλάστωμα με ολιγοδενδρογλοιωματικά στοιχεία και το γλοιοβλάστωμα με προγονικά νευρωνικά στοιχεία (Reni et al., 2017).

Η διερεύνηση της γενετικής βάσης της ογκογένεσης στους όγκους εγκεφάλου συνέβαλε στην περαιτέρω κατηγοριοποίηση του γλοιοβλαστώματος, με τη διάκρισή του σε εκείνο που χαρακτηρίζεται από την ισοκιτρική δεϋδρογονάση (isocitrate dehydrogenase, IDH), αγρίου τύπου και συναντάται στο 90% των περιπτώσεων έναντι εκείνου με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH* ή/και το γλοιοβλάστωμα χωρίς εκτίμηση (not otherwise specified, NOS).

Κάνοντας τη συσχέτιση με τις κλινικές μορφές που αναφέρθηκαν παραπάνω, το γλοιοβλάστωμα με IDH-αγρίου τύπου αντιστοιχεί συχνότερα στο πρωτογενές ή *de novo* γλοιοβλάστωμα και ορίζεται από μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου *TERT*, την έλλειψη του γονιδίου *PTEN* και την ενίσχυση του γονιδίου *EGFR.* Μάλιστα, η πρωτεϊνική παραλλαγή EGFRvIII, με ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης, συναντάται να έχει σημαντικό

ρόλο στη νόσο (Batash et al., 2017). Στον αντίποδα, το δευτερογενές GBM παραλληλίζεται με τη νόσο, παρουσία *IDH*-μεταλλάξεων, ενώ εντοπίζονται, συχνά, μεταλλάξεις στα *TP53*, *PDGFA* και *CDKN2A,* καθώς και μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *MGMT*. Το δευτερογενές GBM, επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι εντοπίζεται συχνότερα στον πρόσθιο λοβό του εγκεφάλου και αναπτύσσεται, συνήθως, από το διάχυτο WHO grade II αστροκύττωμα ή το αναπλαστικό αστροκύττωμα (Reni et al., 2017). Η εξέλιξη των γλοιωμάτων χαμηλής κακοήθειας σε όγκους υψηλής κακοήθειας φαίνεται να σχετίζεται με την απενεργοποίηση του γονιδίου *RB* και την αυξημένη ενεργότητα της λιγάσης HMD2. Έτσι, το πρωτογενές και δευτερογενές GBM μπορεί να μην μπορούν να διακριθούν ιστολογικά, τόσο εύκολα, ωστόσο το γενετικό και επιγενετικό τους προφίλ διαφέρει σε σημαντικό βαθμό (Alifieris and Trafalis, 2015).

Με βάση την μοριακή ετερογένεια του γλοιοβλαστώματος, η σύμπραξη TCGA (The Cancer Genome Atlas, TCGA) του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ην. Πολιτειών διέκρινε τον όγκο σε τέσσερις μοριακούς υποτύπους: κλασσικό, μεσεγχυματικό, προνευρωνικό και νευρωνικό. Η συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση βασίζεται στην ταξινόμηση του Verhaak, παράλληλα στην ταξινόμηση του Phillips, οπότε και συμπεριλαμβάνεται ο πολλαπλασιαστικός υπότυπος και ο υπότυπος, εμπλουτισμένος με δείκτες για νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs). Οι κύριες διαφορές των τεσσάρων υποτύπων βασίζονται σε στοιχεία που αφορούν, αρχικά, στον κλασσικό υπότυπο, όπως η ενίσχυση του *EGFR*, η απώλεια ετεροζυγωτίας LOH10, το προφίλ έκφρασης των αστροκυττωματικών κυττάρων και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των *Notch1* και *SHH* (και των πρωτεϊνών αυτών). Ο μεσεγχυματικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *NF1*, μεταλλάξεις στα *PTEN* και *TP53*, αυξημένη έκφραση των *MET* και *CH13L1*, ενώ σημαντικός είναι ο ρόλος του μονοπατιού σηματοδότησης NF-kB. Στον προνευρωνικό υπότυπο συναντάται εστιακή ενίσχυση του

υποδοχέα του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (platelet-derived growth factor alpha, PDGFRA), μεταλλάξεις στα *TP53* και *IDH1* με ολιγοδενδροκυτταρικό προφίλ έκφρασης. Αυτός ο υπότυπος εμφανίζεται, κυρίως, σε νεότερες ηλικίες και διαιρείται περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες, παρουσία ή απουσία νησίδων CpG (glioma CpG island methylator phenotype, G-CIMP), σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά πρότυπα μεθυλίωσης, τα οποία συνδέονται άμεσα με το προφίλ μεταλλάξεων των IDH1/2. Τέλος, ο νευρωνικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό προφίλ έκφρασης νευρικών εγκεφαλικών κυττάρων και δείκτες αστροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων (Phillips et al., 2006, Verhaak et al., 2010, Aldape et al., 2015, Sasmita et al., 2018).

1.1.3. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Παθοφυσιολογία και μοριακοί μηχανισμοί

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα συναντάται, κυρίως, στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, τα υποσκηνίδια του εγκεφαλικού στελέχους και την παρεγκεφαλίδα, πρωτίστως, στο παιδιατρικό γλοιοβλάστωμα και είναι εξωδερμικής προέλευσης.

Ο όγκος αναπτύσσεται στην *trans* περιοχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood brain barrier, BBB), μέσω του οποίου παρεμποδίζεται η μεταφορά πολικών και μεγάλου μοριακού βάρους ουσιών από την κυκλοφορία του αίματος προς τον νευρικό ιστό. Ο BBB συνίσταται από ενδοθηλιακά κύτταρα, αστροκύτταρα, περικύτταρα και παρακείμενους νευρώνες, τα οποία διατηρούν την ακεραιότητά του, εκφράζουν πρωτεΐνες ισχυρών διασυνδέσεων και αποτρέπουν την παρακυτταρική διήθηση. Διαταραχές στην ομαλή λειτουργία του BBB μπορούν να συσχετιστούν με την ύπαρξη κακοηθών γλοιωμάτων, καθώς η ταχεία ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων οδηγεί σε δημιουργία συνθηκών υποξίας και επακόλουθη αγγειογένεση, η οποία, τελικά, προκαλεί αλλαγές στην έκφραση των υδατοπορινών, που

συγκαταλέγονται στα συστατικά του BBB, όπως και δομικές αλλαγές στα αγγεία του φραγμού, που, εν τέλει, οδηγούν στην εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος (Urbańska et al., 2014, Ozdemir-Kaynak et al., 2018, Silantyev et al., 2019).

Εξωκρανιακές μεταστάσεις του γλοιοβλαστώματος διαμέσου του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ή του αίματος είναι σπάνιες. Οι βιολογικές ερμηνείες που δίνονται σε αυτό το γεγονός αφορούν την απουσία λεμφαγγειακού συστήματος στον εγκέφαλο και την σπονδυλική στήλη, το πυκνό και συμπαγές περιβάλλον των εγκεφαλικών φλεβών, που εμποδίζει τη διείσδυση των νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς και την απουσία του κατάλληλου στρώματος σε άλλα όργανα, που δύναται να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση αυτών των κυττάρων. Εντούτοις, αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιστατικά μεταστάσεων με στόχο τον σπλήνα, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τα οστά, το πάγκρεας, το λεπτό έντερο, τους λεμφαδένες και το δέρμα (Lun et al., 2011). Συνηθέστερα, συναντώνται ενδοκρανιακές μεταστάσεις, οι οποίες παρατηρούνται στο 60-90% των περιπτώσεων σε απόσταση 2 cm από το πρωτογενές νεόπλασμα, στο ίδιο ή και στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια (Goryaynov et al., 2015).

Μορφολογικά, τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά του γλοιοβλαστώματος είναι ο υψηλός βαθμός αγγειογένεσης και οι νεκρωτικές περιοχές (Urbańska et al., 2014).

Αναφορικά με την κυτταρική προέλευση, με βάση δεδομένα που προκύπτουν από επιφανειακούς κυτταρικούς μάρτυρες, τη μορφολογία, τα προφίλ γονιδίων, αλλά και πειράματα στο γενετικό υπόβαθρο ζωικών μοντέλων, θεωρείται ότι το GBM προέρχεται, είτε από NSCs, είτε από NSC-προερχόμενα αστροκύτταρα ή προγονικά ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocyte progenitor cells, OPCs) στην υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ). Όγκοι προερχόμενοι από διαφορετικές γενεαλογίες κυττάρων παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά σε μοντέλα GBM, συμπεραίνοντας ότι η κυτταρική προέλευση μπορεί να

συμβάλει καθοριστικά στο μοντέλο ανάπτυξης του όγκου και να καθορίσει και τον μοριακό του υπότυπο (Yao et al., 2018). Για τον μετασχηματισμό κακοήθειας και ειδικότερα στο γλοιοβλάστωμα, απαιτείται η ύπαρξη προκαθορισμένου γενετικού υποβάθρου (απώλεια των *TP53*, *NF1* και *PTEN*) σε συγκεκριμένο πληθυσμό βλαστικών κυττάρων της SVZ.

Λαμβάνοντας υπόψη αποτελέσματα πολλών μελετών, όπως συνοψίζονται σε πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση (Gimple et al., 2019), υποστηρίζεται το μοντέλο καρκινικών βλαστικών κυττάρων στο γλοίωμα (glioma stem cells, GSCs), όπου ένας μικρός πληθυσμός GSCs προέρχεται από μετασχηματισμένα SVZ-προερχόμενα νευρικά βλαστικά κύτταρα και διατηρεί την ετερογένεια του όγκου. Τα GSCs, ενώ έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό τον σχηματισμό σφαιρών, δεν αποτελεί εξ' ορισμού απαραίτητο στοιχείο για τον προσδιορισμό τους. Συνοπτικά, τα απαραίτητα λειτουργικά κριτήρια που πρέπει να πληρούν, ώστε να χαρακτηριστούν ως GSCs είναι η διατήρηση της ικανότητας αυτοανανέωσης, ο ανελλιπής πολλαπλασιασμός και η ικανότητα πυροδότησης της ανάπτυξης του όγκου. Επιπρόσθετα, συχνά φερόμενα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τη συχνότητα εμφάνισης στον όγκο, την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορες κυτταρικές γενεαλογίες, αλλά και την έκφραση επιφανειακών μαρτύρων βλαστικών κυττάρων (όπως οι CD133, CD15/SSEA-1, CD44, A2B5, L1CAM και CD49f (Lathia et al., 2015).

Γενικά, σε κάθε τύπο καρκίνου η γενετική αστάθεια και ο υψηλός μεταλλακτικός ρυθμός συμβάλουν στο να χαρακτηρίζεται ένας όγκος «ετερογενής». Ως αποτέλεσμα, το γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται από ενδο-νεοπλασματική ετερογένεια, που έγκειται στις διαφορές που εντοπίζονται σε επίπεδο κυττάρου στον ίδιο όγκο και ορίζεται από την παρουσία πολλών διαφορετικών κυτταρικών υπο-πληθυσμών, που μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία των GSCs, καθώς και από δια-νεοπλασματική ετερογένεια, λόγω των διαφορετικών υποτύπων με τους οποίους συναντάται (Anjum et al., 2017).

1.1.4. Το μικροπεριβάλλον του όγκου: σύσταση και ρόλος

Εξετάζοντας το μικροπεριβάλλον του γλοιοβλαστώματος (tumour microenvironment, TME), αυτό αντιπροσωπεύει τα μη καρκινικά κύτταρα στο εσωτερικό του όγκου και περιλαμβάνει φυσιολογικά και ενεργοποιημένα αστροκύτταρα, ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού, μικρογλοία/μακροφάγα, λεμφοκύτταρα νεοπλασματικής προέλευσης (tumour infiltrating lymphocytes, TILs), αγγειακά περικύτταρα, GSCs και ενδοθηλιακά κύτταρα, που παράγουν πρωτεϊνικά και μη μακρομόρια για την υποστήριξη της ανάπτυξης του όγκου. Συνολικά, το μικροπεριβάλλον είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη της περιεγραμμένης νέκρωσης και της ισορροπίας μεταξύ καρκινικών μη βλαστικών και καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Schiffer et al., 2019). Παρά το γεγονός ότι είχε επικρατήσει για αρκετά χρόνια η άποψη ότι το ΚΝΣ αποτελεί περιβάλλον αποκλεισμένο από το ανοσολογικό σύστημα, πλέον, φαίνεται ότι επικρατεί μία αλληλεπίδραση μεταξύ της άμεσης και προσαρμοστικής ανοσίας. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός μπορεί να γίνει διαπερατός σε καταστάσεις τραυματισμού, φλεγμονής ή κατά την ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος, διευκολύνοντας, έτσι, την είσοδο κυττάρων του ανοσοποιητικού (Wilcox et al., 2018).

Τα μακροφάγα του όγκου (tumor-associated macrophages, TAMs), που προέρχονται από τα μονοκύτταρα του νωτιαίου μυελού ή τη μικρογλοία, που εδράζεται στο ΚΝΣ, αντιδρούν διαφορετικά στις βλάβες του εγκεφάλου, επιτελώντας διαφορετικές λειτουργίες. Αν και σε *in vitro* πειράματα, παρατηρείται M2-πολικότητα στα μακροφάγα, η κατηγοριοποίηση τους σε M1/M2 δεν είναι ξεκάθαρη *in vivo*. Πριν τον επαναπρογραμματισμό των TAMs, τα κύτταρα του όγκου στρατολογούν κύτταρα μικρογλοίας, μέσω της παρακρινικής έκκρισης χυμοκινών (Morisse et al., 2018).

Γενικά, το μικροπεριβάλλον του γλοιοβλαστώματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών, που εκκρίνονται από τα κύτταρα του όγκου, τη μικρογλοία

και τα TAMs. Μέσω αυτών των παραγόντων, όπως η ιντερλευκίνη-6 (interleukin-6, IL-6), η ιντερλευκίνη-10 (interleukin-10, IL-10), ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β, TGF-β) και η προσταγλανδίνη-Ε (prostaglandin-E, PGE1), αναστέλλονται ο άμεσος και προσαρμοστικός ανοσολογικός μηχανισμός, με καταστολή των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer, NK), της ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των Τ-κυττάρων, με την επαγωγή της απόπτωσης των Τ-κυττάρων και την απορρύθμιση της έκφρασης του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) (Brown et al., 2018).

1.1.5. Κύρια μονοπάτια και καταρράκτες σηματοδότησης

Η ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος δεν ακολουθεί μια καλά καθορισμένη αλληλουχία γεγονότων, αντιθέτως, είναι αποτέλεσμα ενός περίπλοκου δικτύου διαφόρων γενετικών, επιγενετικών και μοριακών παρεκκλίσεων, που οδηγούν σε θεμελιώδεις αλλαγές σε μείζονα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αρχικά, αναλύσεις των πολυάριθμων γενετικών παρεκκλίσεων, που εντοπίζονται σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, οδήγησαν στην ομαδοποίηση των γονιδιωματικών αλλαγών σε τρία κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια: α) το μονοπάτι τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinases, RTKs)/Ras/PI3K, το οποίο εντοπίζεται τροποποιημένο στο 88% των GBM, β) το p53-μονοπάτι με παρεκκλίσεις στο 87% των GBM και γ) το RB-σηματοδοτικό μονοπάτι, που συναντάται περίπου στο 78% των GBM (Aldape et al., 2015).

1.1.5.i. Το μονοπάτι τυροσινικής κινάσης (receptor tyrosine kinases, RTKs)/Ras/PI3K

Στους επιφανειακούς υποδοχείς RTKs προσδένονται αυξητικοί παράγοντες και επάγουν τον διμερισμό και τη διαμόρφωση των υποκείμενων υποδοχέων, οδηγώντας σε διασταυρούμενη φωσφορυλίωση των τυροσινικών περιοχών, με αποτέλεσμα την πυροδότηση καθοδικών καταρρακτών σηματοδότησης.

Η σηματόδοτηση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGFR) επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση όλων των κυτταρικών τύπων του ΚΝΣ. Στο γλοιοβλάστωμα, το EGFR-μονοπάτι σηματοδότησης μπορεί να ενεργοποιηθεί, είτε λόγω υπερέκφρασης του προσδέτη, είτε του υποδοχέα. Σύνηθες φαινόμενο αποτελεί η υψηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου *EGFR*, που συνοδεύεται από μεταλλάξεις στον εξωτερικό τομέα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, το φαινόμενο της έλλειψης, που οδηγεί στην πρωτεϊνική παραλλαγή EGFRvIII, θεωρείται ότι αποτελεί μεταγενέστερο γεγονός της ενίσχυσης. Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς συμβολής αυτής της μετάλλαξης στην ογκογένεση είναι η αναδιαμόρφωση του περιβάλλοντος του όγκου μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών, όπως των SOX9- και FOXG1-μονοπατιών.

Παρόμοιο συμβάν παρατηρείται για τον PDGFRA, η υπερέκφραση του οποίου μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη και μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Η αυξημένη ενεργοποίηση του Ras-μονοπατιού μπορεί να προκύψει, τόσο από μεταλλάξεις στο ίδιο το *Ras*, αλλά και λόγω της υπερενεργοποίησης ανοδικών παραγόντων, όπως ο EGFR. Η πρωτεΐνη Ras είναι μία G-πρωτεΐνη, που ανιχνεύεται σε δύο μορφές, την απενεργοποιημένη κατάσταση, στην οποία προσδένει διφωσφορική γουανοσίνη (guanosine diphosphate, GDP) και την ενεργή, που προσδένεται με τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate, GTP). Στην ενεργή της κατάσταση, μέσω ενός καταρράκτη των ενεργοποιούμενων από τα

μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (mitogen activated protein kinase, MAPK), η Ras προωθεί την ανάπτυξη του όγκου, επεμβαίνοντας στον κυτταρικό κύκλο, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων.

Το μονοπάτι PI3K/PTEN/Akt πυροδοτείται, επίσης, από αλληλεπιδράσεις υποδοχέων-αυξητικών παραγόντων. Στο γλοιοβλάστωμα, το ογκοκατασταλτικό *PTEN*, το οποίο αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της PI3K, που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης, είναι συχνά απενεργοποιημένο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K (Rajasekhar et al., 2003, Aldape et al., 2015, Hanif et al., 2017). Επιπλέον, η απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού *NF1*, το προϊόν του οποίου αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή των σηματοδοτικών μονοπατιών Ras και mTOR, συσχετίζεται με την ανάπτυξη του μεσεγχυματικού φαινοτύπου του γλοιοβλαστώματος.

1.1.5.ii. Τα p53- και RB-μονοπάτια

Το μονοπάτι του p53 έχει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη, κυρίως, του δευτερογενούς γλοιοβλαστώματος. Το *TP53* έχει ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόκριση στην καταστροφή του DNA, ο κυτταρικός θάνατος, η κυτταρική διαφοροποίηση και η νεο-αγγειογένεση. Στα φυσιολογικά κύτταρα λειτουργεί ένας αυτό-ρυθμιζόμενος βρόγχος ανατροφοδότησης μεταξύ της ενεργοποίησης του *TP53* και του αναστολέα του, *MDM2*. Η ενίσχυση του *MDM2* συναντάται σε ποσοστό μικρότερο του 10% των περιστατικών γλοιοβλαστώματος, αποκλειστικά στο πρωτογενές γλοιοβλάστωμα (Ohgaki and Kleihues, 2007, Aldape et al., 2015).

Σχετικά με το μονοπάτι του ρετινοβλαστώματος, όταν η RB είναι υποφωσφορυλιωμένη, προσδένεται στον μεταγραφικό παράγοντα E2F, αποτρέπεται η μεταγραφή γονιδίων, που

σχετίζονται με τη μίτωση και ο κυτταρικός κύκλος παραμένει στο σημείο ελέγχου G1/S. Η αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKN). Ορισμένα γλοιοβλαστωματικά κύτταρα αποτρέπουν αυτήν την αρνητική ρύθμιση, μεθυλιώνοντας τον υποκινητή του *RB* και οδηγώντας σε αποσιώπηση του γονιδίου (Knudsen and Wang, 2010).

Η μη φυσιολογική σηματοδότηση των παραπάνω μονοπατιών, πέρα από τις μεταλλάξεις των γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα σε αυτά, μπορεί να οφείλεται και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Η γενωμική υπομεθυλίωση συμβάλλει στη γενετική αστάθεια και την υπερέκφραση πρωτο-ογκογονιδίων, ενώ η λειτουργική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να συσχετιστεί με την υπερ-μεθυλίωση των υποδοχέων τους. Η ανάλυση των μοτίβων διαφορικής μεθυλίωσης όλου του γονιδιώματος οδήγησε στην ταυτοποίηση 104 υπο-μεθυλιωμένων και 524 υπερ-μεθυλιωμένων περιοχών στο γλοιοβλάστωμα (Zhang et al., 2011). Ανάμεσα σε πολλούς, βρίσκονται υπερ-μεθυλιωμένοι οι υποκινητές των *CDKN2A*, *RB*, *PTEN* και *TP53* .

1.1.5.iii. Το Wnt-μονοπάτι

Το μονοπάτι Wnt, το οποίο είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη σηματοδότηση σημαντικών κυτταρικών μονοπατιών (Notch, Hedgehog και EGFR), συμβάλλει στην εξέλιξη και την επιθετικότητα του γλοιοβλαστώματος. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού Wnt, που διαμεσολαβείται από τη β-κατενίνη, σχετίζεται με τον σχηματισμό και τη διατήρηση των GSCs. Η φυσιολογική αυτή ενεργοποίηση οφείλεται, κυρίως, στην υπερέκφραση των υποδοχέων και των προσδετών του μονοπατιού, παρά σε μεταλλάξεις

των μορίων του μονοπατιού. Η ενεργοποίηση Wnt/β-κατενίνης είναι, επίσης, απαραίτητη για την παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs) από διαφοροποιημένα κύτταρα. Το επίπεδο ενεργοποίησης του μονοπατιού δεν επηρεάζεται μόνο από τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων με τους προσδέτες τους: ο μεταγραφικός παράγοντας FoxM1 (Forkhead box protein M1, FoxM1) αλληλεπιδρά με τη β-κατενίνη και με τον STAT3, προωθώντας την ανανέωση των GSCs. Παράλληλα, πρωτεΐνες με αυξημένα επίπεδα έκφρασης, όπως η πρωτεΐνη κωδικοποίησης πρωτεΐνης δακτύλου ψευδαργύρου (pleomorphic adenoma gene-like-2, PLAGL-2) και ο υποδοχέας του FZD-4 (Frizzled Class Receptor 4), επιδρούν στο Wnt-μονοπάτι, ενισχύουν την ανοχή του όγκου στην ακτινοβολία και την έκφραση του *VEGFA*, προάγοντας την αγγειογένεση και τη νεο-αγγειογένεση. Οι όγκοι του γλοιοβλαστώματος είναι εξαιρετικά αγγειοβριθείς, λόγω της υπερ-ενεργοποιημένης αγγειογένεσης, που αποτελεί βασική διεργασία για την παροχή οξυγόνου στον όγκο. Οι μηχανισμοί για τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση των GSCs σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα. Παράλληλα, η απορρύθμιση του εναλλακτικού Wnt -μονοπατιού αυξάνει τη διηθητική ικανότητα του όγκου (Ricci-Vitiani et al., 2010, Tompa et al., 2018, Rajakulendran et al., 2019).

Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial mesenchymal transition, EMT) είναι μία προγραμματισμένη διαδικασία στην οποία τα επιθηλιακά κύτταρα, μέσω γενετικού αναπρογραμματισμού, αποκτούν φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αλλαγές στην αρχιτεκτονική και τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους ή με την εξωκυττάρια μήτρα. Η μετατροπή αυτή διαμεσολαβείται από τα μονοπάτια Wnt, Notch και TGF-β. Με την απόκτηση του EMT φαινοτύπου, τα GSCs αποκτούν βλαστικές και μεσεγχυματικές ιδιότητες, που αποτελούν σήμα κατατεθέν στο υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να διαταράσσουν

την ακεραιότητα της εξωκυττάριας μήτρας, μέσω της υπερπαραγωγής μεταλλοπρωτεασών, με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν στους διακυττάριους χώρους με τη βοήθεια μορίων προσκόλλησης (Cheng et al., 2012, Tompa et al., 2018).

1.1.6. Τα γονίδια IDH1 και IDH2

Διακρίνοντας το πρωτογενές από το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα, παρατηρείται πλήθος χαρακτηριστικών μεταλλάξεων. Ενδεικτικά, κατά τη διεργασία της γένεσης του δευτερογενούς γλοιοβλαστώματος παρατηρούνται μεταλλάξεις του *ATRX*, απώλεια των *TP53* και *RB*, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, καθώς και μεταλλάξεις στον υποκινητή του *TERT*. Σε κάθε περίπτωση, ένα από τα πρώιμα γεγονότα, αν όχι το εναρκτήριο, στην γένεση των γλοιωμάτων είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* ή *IDH2*.

Η οικογένεια των IDH αποτελείται από τρία ισοένζυμα, που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό στη διαδικασία της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης. Το IDH1 βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στα περοξεισώματα, ενώ το IDH2 στα μιτοχόνδρια και σχηματίζουν υποχρεωτικά ομοδιμερή, με συμπαράγοντα το $NADP^+$. Πέρα από τη βιοσύνθεση των κεντρικών μεταβολιτών στον κύκλο του κιτρικού οξέος, το μονοπάτι IDH1/2 αποτελεί το κύριο μονοπάτι για την κυτταρική παραγωγή NADPH στους περισσότερους ιστούς, μαζί με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η κατάλυση που πραγματοποιούν αυτά τα δύο ένζυμα οδηγεί στην παραγωγή ενός ανάλογου του NADPH, το οποίο αποτελεί ρυθμιστή των κυτταρικών μηχανισμών άμυνας έναντι στο οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα η απώλεια λειτουργίας των IDH1/2 να οδηγεί σε καταστροφή του DNA και γενωμική αστάθεια.

Σε δείγματα όγκων γλοιοβλαστώματος, οι μεταλλάξεις του *IDH1* έχουν συσχετιστεί με τη διπλάσια μείωση των επιπέδων $NADP^+$, που εξαρτώνται από την IDH-ενεργότητα και σε σημαντική μείωση στη συνολική παραγωγή NADPH (Dang et al., 2016). Οι *IDH*- μεταλλάξεις οδηγούν σε μια αυξημένη νεομορφική ενεργότητα, όπου το α-κετογλουταρικό μετατρέπεται σε R-2-υδροξυγλουταρικό (R-2-hydroxy-glutarate, R-2-HG), αντί για το ρακεμικό εναντιομερές του, S-2-υδροξυγλουταρικό (S-2-hydroxy-glutarate, S-2-HG). Τα αυξημένα επίπεδα του 2-HG έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα-1α (hypoxia induced factor-1α, HIF-1α) και κατ' επέκταση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) και ταυτόχρονα, επηρεάζουν την ωρίμανση του κολλαγόνου, που οδηγεί σε ελλαττωματικές βασικές μεμβράνες (Sasaki et al., 2012).

Οι κοινές κυτταρογενετικές παρεκκλίσεις μεταξύ των δύο τύπων γλοιοβλαστώματος, όπως η απώλεια του χρωμοσωμικού βραχίονα 10q και το κέρδος του χρωμοσωμικού βραχίονα 7q, προτείνουν τη συμμετοχή αρκετών κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών (Korshunov et al., 2019).

1.1.7. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Διάγνωση

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στη διαχείριση του γλοιοβλαστώματος είναι η εύρεση αποτελεσματικών διαγνωστικών στρατηγικών. Το σύνηθες φαινόμενο στην κλινική πράξη είναι η διάγνωση της ασθένειας, όταν έχει ήδη εξελιχθεί και είναι προχωρημένου σταδίου, με τις κύριες διαγνωστικές μεθόδους για τον εντοπισμό των γλοιωμάτων να

βασίζονται στην νευρολογική εκτίμηση και τα νευροαπεικονιστικά εργαλεία (Silantyev et al., 2019).

Η κλινική εικόνα των ασθενών δεν παρουσιάζει ειδικότητα και παρατηρείται εκδήλωση ποικίλων νευρολογικών συμπτωμάτων, όπως κεφαλαλγίες λόγω αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, αδυναμία κινητικών λειτουργιών, ναυτία, έμετος, απώλεια γνωστικών λειτουργιών και κρίσεις επιληψίας (Reni et al., 2017). Σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (European Society Medical Oncology, ESMO) και την Ευρωπαϊκή Ένωση Νευρο-ογκολογίας (European Association of Neuro-Oncology, EANO), πραγματοποιείται απεικόνιση του εγκεφάλου με μαγνητικό συντονισμό (magnetic resonance imaging, MRI), καθώς διαθέτει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στον εντοπισμό μικρού μεγέθους όγκων και παρά το γεγονός ότι τα γλοιώματα διαθέτουν ικανότητα διήθησης, δεν παρατηρούνται, συχνά, απομακρυσμένες μεταστάσεις, οπότε και προτείνεται να προηγείται της βιοψίας και του χειρουργείου (Stupp et al., 2010, Weller et al., 2017).

Οι ασθενείς υποβάλλονται, συνήθως, σε αξονική τομογραφία (computed tomography, CT) και στη συνέχεια, με την ταυτοποίηση ύπαρξης όγκου, αποκλείοντας την αιμορραγία, ακολουθεί MRI, εφαρμόζοντας, αρχικά, τα βασικά μεθοδολογικά μοντέλα: σάρωση σταθμισμένης ακολουθίας T2w (T2-weighted), ακολουθία με καταστολή του σήματος του νερού (T2-Fluid Attenuation Inversion Recovery, T2-FLAIR), ακολουθία ανάδειξης αιμορραγικών στοιχείων και αποτιτανώσεων (gradient eco, GRE), σάρωση σταθμισμένης ακολουθίας T1w (T1-weighted) και T1-ακολουθία ενισχυμένης αντίθεσης (TICE) (Shukla et al., 2017).

Η ποζιτρονιακή τομογραφία (positron emission tomography, PET) είναι μία μέθοδος πυρηνικής ιατρικής, η οποία λόγω της διαθεσιμότητας πληθώρας σημασμένων αμινοξέων, κατέχει εξέχουσα θέση στον τομέα της διάγνωσης, καθώς έχει την ικανότητα να καλύψει

ελλείψεις, που προκύπτουν από την εφαρμογή της MRI και αφορούν στη σταδιοποίηση, τη διαφορική διάγνωση, την έκταση του όγκου κ.ά. Ο πιο κοινός PET ραδιοανιχνευτής είναι η ^{18}F-2-φλουορο-2-δεόξυ-D-γλυκόζη (^{18}F-FDG). Η χρήση της ^{18}F-FDG επιτρέπει τον προσδιορισμό της επιθετικότητας του όγκου και τη διάκριση των γλοιωμάτων υψηλής κακοήθειας από εκείνα χαμηλότερης κακοήθειας. Ωστόσο, ο εν λόγω ραδιοανιχνευτής είναι χρήσιμος μόνο στα αρχικά στάδια της διάγνωσης, ενώ οι αμινοξικοί ανιχνευτές παρέχουν υψηλότερη ειδικότητα. Για τον προσδιορισμό του γλοιοβλαστώματος έχουν χρησιμοποιηθεί πλήθος αμινοξικοί ανιχνευτές, όπως η ^{11}C-μεθυλ-μεθειονίνη (^{11}C-MET), η O-(2-[18F]-φλουοροαιθυλ)-L-τυροσίνη (^{18}F-FET) και η 3,4-διυδρόξυ-6-[18F]-φλουορο-L-φαινυλαλανίνη (^{18}F-FDOPA) (Chen and Silverman, 2008, Kratochwil et al., 2014).

Παράλληλα, η διάγνωση του γλοιοβλαστώματος απαιτεί την ιστολογική, μοριακή και γενετική μελέτη του ιστού, που παρέχεται από την εκτομή του όγκου ή από βιοψία, όπως περιεγράφηκε στην ταξινόμηση του όγκου (Le Rhun et al., 2019). Στερεοτακτική βιοψία πραγματοποιείται σε ασθενείς με πολυεστιακή νόσο, αλλά και στους όγκους, που είναι μη χειρουργήσιμοι. Ανοσοϊστοχημικά για την επιβεβαίωση της πρώιμης διάγνωσης, παρατηρείται η παρουσία της ινώδους όξινης πρωτεΐνης της γλοίας (glial fibrillary acidic protein, GFAP), η οποία αποτελεί κύρια ινώδη πρωτεΐνη των ώριμων αστροκυττάρων και αποτελεί τον πιο ειδικό σημαντή για φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η αυξημένη κακοήθεια όγκων με αστροκυτταρική προέλευση σχετίζεται με απουσία της έκφρασης της GFAP, που υποδηλώνει παρουσία αδιαφοροποίητων καρκινικών κυττάρων (Urbańska et al., 2014). Επιπλέον, γίνεται διάκριση του κλασσικού γλοιοβλαστώματος, που δε φέρει IDH1/2-μεταλλάξεις και παράλληλα, προτείνεται τα γλοιώματα που δε χαρακτηρίζονται από αυτές και δεν πληρούν τα ιστολογικά κριτήρια του γλοιοβλαστώματος, αλλά ένα τουλάχιστον από κριτήρια, όπως η ενίσχυση του *EGFR*, το κέρδος του

χρωμοσώματος 10, σε συνδυασμό με απώλεια του χρωμοσώματος 7 ή *TERT*-μεταλλάξεις, να αντιμετωπίζονται ως γλοιοβλάστωμα. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς άνω των 75 ετών με IDH-αγρίου τύπου γίνεται διερεύνηση του προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT* (Le Rhun et al., 2019).

1.1.8. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: Θεραπευτική Προσέγγιση

Η αξιολόγηση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα και το θεραπευτικό πλάνο πρέπει να καθορίζονται από εξειδικευμένη διεπιστημονική ομάδα, που περιλαμβάνει νευροχειρουργούς, παθολόγους ογκολόγους και ακτινοθεραπευτές, όπως επίσης και έναν εξειδικευμένο παθολόγο και νευροακτινολόγο (Stupp et al., 2014). Η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικά μέσα, οι στοχευμένες μοριακές θεραπείες ή η ανοσοθεραπεία αποτελούν τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές. Μέχρι σήμερα, αν και οι διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν μπορούν να οδηγήσουν στην ίαση, υπάρχουν υποομάδες ασθενών, που ωφελούνται από αυτές.

Τα κύρια χαρακτηριστικά του όγκου, που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας, είναι η ταχεία ανάπτυξη και διήθηση, η κλωνική ετερογένεια και η αγγειογένεση, που οδηγούν στην ανάπτυξη ενός υποξικού και ανοσοκατεσταλμένου μικροπεριβάλλοντος . Παρά την διεξαγωγή πληθώρας κλινικών μελετών, ο προσδιορισμός και σχεδιασμός της πιο αποτελεσματικής θεραπείας είναι αρκετά σύνθετος, λόγω της έλλειψης κατάλληλης ομάδας ελέγχου, της μεροληψίας στην επιλογή των ασθενών, τον μικρό αριθμό συμμετεχόντων και εξίσου σημαντικά, την ετερογένεια της ασθένειας. Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητο να σταθμίζονται εξ’ αρχής παράγοντες, όπως το μέγεθος και η τοπολογία του όγκου, η ηλικία και η λειτουργική κατάσταση του ασθενή, με βάση την κλίμακα Karnofsky (Karnofsky

Performance Scale, KPS), η νευρολογική λειτουργία, προηγούμενες θεραπείες, τα πρότυπα υποτροπής, αλλά και προγνωστικοί παράγοντες (Hottinger et al., 2016).

1.1.8.i. Χειρουργική εκτομή

Το πρώτο βήμα στο θεραπευτικό πλάνο αποτελεί η χειρουργική εκτομή του όγκου, με τη χρήση μικρο-χειρουργικών τεχνικών, αποσκοπώντας στην επίτευξη ευρείας εκτομής του όγκου, με την ολική εκτομή τις περισσότερες φορές να είναι ακατόρθωτη, λόγω της διηθητικότητας του γλοιοβλαστώματος και της τοπολογίας αυτού. Η τελευταία μπορεί να περιλαμβάνει περιοχές ελέγχου του λόγου, της κίνησης και των αισθήσεων. Έτσι, ακόμα και η ριζική εκτομή του όγκου δεν μπορεί να θεωρηθεί θεραπεύσιμη, καθώς καρκινικά κύτταρα διεισδύουν στον περιβάλλοντα εγκέφαλο. Βελτίωση των ποσοστών ολικής εκτομής και στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression free survival, PFS) έχει παρατηρηθεί, όταν γίνεται χρήση φθορίζουσας σήμανσης του όγκου με 5-αμινο-αμινοβουλινικό οξύ (5-ALA) για την καθοδήγηση του χειρουργείου. Το εύρος της εκτομής πρέπει να επιβεβαιώνεται με MRI αυξημένης αντίθεσης εντός 24-72 ωρών από το χειρουργείο. Παρά το γεγονός ότι το μέγεθος του υπολειπόμενου όγκου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, δεν έχει εξακριβωθεί κατά πόσο το εύρος της εκτομής μπορεί να βελτιώσει την έκβαση ή αν οι όγκοι, που υπόκεινται σε ολική εκτομή, οδηγούν σε λιγότερο κακοήθη πορεία (Stupp et al., 2014, Davis, 2016, Weller et al., 2019).

1.1.8.ii. Ακτινοθεραπεία

Μετά το πέρας ικανού χρονικού διαστήματος για την επούλωση του χειρουργικού τραύματος, μπορεί να ξεκινήσει η ακτινοθεραπεία (ΑΚΘ), σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία

(ΧΜΘ), που έχει ως σκοπό να στοχεύσει εκλεκτικά τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα, που έχουν διηθήσει τον περιβάλλοντα φυσιολογικό νευρικό ιστό. Με βάση την αναδρομική ανάλυση τριών κλινικών μελετών προτείνεται μία σχέση δόσης-απόκρισης μεταξύ των 50 και 60 Gy, έπειτα από προσπάθειες κλιμάκωσης των δόσεων, με τη χρήση συμβατικής ακτινοθεραπείας, ακτινοθεραπείας πεδίων διαμορφούμενης έντασης, βραχυθεραπείας και ακτινοχειρουργικής, καταλήγοντας σε ακτινοβόληση εξωτερικής δέσμης (External Beam Radiation Therapy, EBRT), δόσης 60 Gy, χορηγούμενης σε 30 συνεδρίες, υποδεικνύοντας όφελος στην επιβίωση, χωρίς σημαντική αύξηση της τοξικότητας (Hau et al., 2016).

Η υποκλασματοποιημένη ΑΚΘ με βιολογικώς ισάξια δόση των 40 Gy σε 15 συνεδρίες των 2,67 Gy έχει καθιερωθεί ως επιλογή για τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και περιορισμένο προσδόκιμο ζωής, βάσει προγνωστικών παραγόντων, καθώς μειώνει το συνολικό διάστημα υποβολής του ασθενή στη θεραπευτική διαδικασία. Αυτή η κατηγορία ασθενών, στην περίπτωση που ο όγκος παρουσιάζει μεθυλίωση στον υποκινητή του *MGMT*, είναι δυνατό να μην υποβληθεί σε ΑΚΘ και να ακολουθήσει μόνο μετεγχειρητική ΧΜΘ (Weller et al., 2019).

Το ακτινοθεραπευτικό πλάνο σχεδιάζεται με βάση τον αρχικό συνολικό όγκο του νεοπλάσματος (gross tumor volume, GTV), που οδηγεί στον σχεδιασμό του κλινικού στόχου (clinical target volume, CTV). Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου (European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC), προτείνεται το όριο 2-5 cm για τον CTV και 3-5 mm για τον προγραμματισμένο όγκο για ακτινοβόληση (planning target volume, PTV), έτσι, ώστε να μεταφερθεί η συνολική προκαθορισμένη δόση. Εναλλακτικά, με βάση τις T2 και FLAIR ακολουθίες στη μετεγχειρητική MRI, πραγματοποιείται σχεδιασμός με μεγαλύτερο αρχικό όγκο, που λαμβάνει 46 Gy και μία επιπλέον φάση, με μικρότερα όρια όγκου («boost phase»), που

λαμβάνει 14 Gy. Η βραχυθεραπεία, σε συνδυασμό με υπερθερμία, έχει εξεταστεί για την αντιμετώπιση της υποξίας, όμως, το ποσοστό τοξικότητας δεν αποδείχθηκε αποδεκτό, αν και φάνηκε να αυξάνεται η επιβίωση, συγκριτικά με την συμβατική ΑΚΘ.

Η χρήση της PET με ραδιοσημασμένα αμινοξέα φαίνεται ότι μπορεί να προσφέρει σημαντικά στον σχεδιασμό του ακτινοθεραπευτικού πλάνου (Gzell et al., 2017, Mann et al., 2018).

Επιπλέον, άλλες τεχνικές, όπως η ακτινοθεραπεία πεδίων διαμορφούμενης έντασης (Intensity-modulated radiotherapy, IMRT) και η ογκομετρικά διαμορφούμενη τοξοειδή ακτινοθεραπεία (Volumetric Modulated Arc Therapy, VMAT), έχουν κερδίσει μια θέση στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος. Η IMRT αποτελεί μία μέθοδο σχεδιασμού, που βελτιστοποιεί την κατανομή της ακτινοβολίας, χρησιμοποιώντας ανάστροφες ή προοπτικές τεχνικές για τη διαμόρφωση της χορηγούμενης δέσμης, ώστε να καθίσταται εφικτή η γλυπτική της δόσης (dose sculpture), με τρόπο τέτοιο, ώστε η υψηλής έντασης ακτινοβολία να καλύπτει τις πάσχουσες περιοχές, ενώ η χαμηλής έντασης, μόνο, να διαχέεται στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς. Έτσι, η IMRT πλεονεκτεί, όταν η τοπολογία του όγκου δυσκολεύει το σχεδιασμό του πλάνου, όπως στις περιοχές κοντά στο εγκεφαλικό στέλεχος, αλλά και στην προστασία παρακείμενων δομών, όπως ο ιππόκαμπος και το οπτικό χίασμα και πιθανώς, μειώνοντας την καθυστερημένη τοξικότητα (Gzell et al., 2017).

1.1.8.iii. Χημειοθεραπεία-Ακτινοθεραπεία

Ως πρώτη γραμμή θεραπείας, κατά τη διάρκεια της ΑΚΘ, η πλειοψηφία των ασθενών λαμβάνει τεμοζολομίδη (TMZ) ως χημειοθεραπευτικό και ακολουθούν επιπλέον 6 κύκλοι συντήρησης, με θετική επίπτωση στη μέση επιβίωση, αύξησης από τους 12 στους 15 μήνες, συγκριτικά με την πραγματοποίηση, αποκλειστικά, ΑΚΘ. Η TMZ είναι ένα αλκυλιωτικό μέσο

του DNA που στοχεύει τη γουανίνη στις θέσεις O^6 και N^7, εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA, με αποτέλεσμα την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Η TMZ δρα ως προφάρμακο, (μετατρέπεται σε ενεργό μεταβολίτη, μέσω μη ενζυματικού μονοπατιού) και η χορήγησή της (75 mg/m^2 για περισσότερες από 7 εβδομάδες) οδηγεί στη μείωση της δράσης του ενζύμου MGMT, που είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση του DNA (Anjum et al., 2017). Ο μεθυλιωμένος υποκινητής του *MGMT* έχει καθιερωθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης για την απόκριση στην TMZ, ωστόσο, μόνο στους πρόσφατα διαγνωσμένους ασθενείς.

Επιπροσθέτως, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (US Food and Drug Administration, FDA) έχει εγκρίνει ως πρώτης γραμμής θεραπεία και τα βιο-αποσυντιθέμενα πολυμερή, που περιλαμβάνουν το αλκυλιωτικό μέσο καρμουστίνη (ανήκει στις νιτροζουρίες) και εμφυτεύονται στο στρώμα του όγκου, μετά την εκτομή. Η εν λόγω επιλογή, συγκριτικά με την TMZ, υστερεί (Omuro and DeAngelis, 2013). Τα πεδία θεραπείας όγκων (tumor-treating fields, TTFields), κάνοντας χρήση του μηχανισμού των εναλλασσόμενων ηλεκτρικών πεδίων για τη διακοπή της κυτταρικής μείωσης, που οδηγεί στην απόπτωση των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων, έχουν λάβει έγκριση από τον FDA για χρήση στους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα στα αρχικά στάδια της νόσου, αλλά και στην περίοδο υποτροπής. Τα δεδομένα κλινικής μελέτης φάσης 3 (EF-14 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00916409) έδειξαν ότι η προσθήκη της μεθόδου στη θεραπεία συντήρησης με TMZ οδηγεί σε σημαντικό κλινικό πλεονέκτημα στην επιβίωση των ασθενών με πρόσφατη διάγνωση γλοιοβλαστώματος. Ειδικότερα, η προσθήκη της μεθόδου TTFields στο θεραπευτικό πλάνο προσφέρει αύξηση στη μέση επιβίωση χωρίς υποτροπή και στη μέση συνολική επιβίωση σε νεότερους ασθενείς, με παρουσία μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MGMT*, πιο ευμενείς προγνωστικούς παράγοντες και απουσία προόδου της νόσου, μετά την αρχική ΧΜΘ-ΑΚΘ (Mehta et al., 2017, Ornelas et al., 2019).

1.1.8.iv. Ανθεκτικότητα στη θεραπεία

Εξετάζοντας τα διαφορετικά πρότυπα υποτροπής μετά από το χειρουργείο, την ακτινοθεραπεία ή την χημειοθεραπεία, φαίνεται ότι το 80-90% των υποτροπών παρατηρείται κατά τη διάρκεια της αρχικής θεραπείας. Μετά τη μελέτη του γενετικού προφίλ του όγκου, φάνηκε ότι οι υποτροπές παρουσιάζουν διαφορετικά γενετικά χαρακτηριστικά, συγκριτικά με τον πρωτοπαθή όγκο, που πιθανώς οδηγεί και σε ανοχή στη θεραπεία (Von Neubeck et al., 2015).

Η υποβολή του ασθενή σε δεύτερη χειρουργική εκτομή αποτελεί μία επιλογή που έχει ως σκοπό την κυτταρομείωση, την ανακούφιση των συμπτωμάτων, που προκαλούνται, λόγω της μάζας του όγκου ή την ενημέρωση των ιστολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών, ωστόσο, δεν προσφέρει όφελος στην επιβίωση και συνήθως, στην πλειοψηφία των ασθενών δεν ενδείκνυται, λόγω της τοπολογίας του όγκου, της εξάπλωσης της νόσου και της πενιχρής λειτουργικής κατάστασης του ασθενή (Omuro and DeAngelis, 2013).

Η ποικιλία μηχανισμών αποφυγής των γλοιοβλαστωματικών κυττάρων από τη θεραπευτική πίεση αντανακλά και την περιορισμένη αποτελεσματικότητα της TMZ. Οι επιλογές για τη χημειοθεραπεία διάσωσης περιλαμβάνουν την μπαβασιζουμάμπη και την επαναδοκιμή TMZ, την καρβοπλατίνα ή άλλα αλκυλιωτικά μέσα (νιτροζουρίες) (Tosoni et al., 2016).

Η μπαβασιζουμάμπη χρησιμοποιείται, συχνά, ως μονοθεραπεία στις υποτροπές του γλοιοβλαστώματος ή συνδυαστικά με TMZ, στην πρώτη γραμμή θεραπείας. Είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1, που συνδέεται εκλεκτικά με υψηλή συγγένεια στον VEGF και ουδετεροποιεί τη βιολογική του δράση, καταστέλλοντας τα μονοπάτια που εξαρτώνται από αυτόν, καθώς το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αποτελεί έναν από τους πιο αγγειογενείς όγκους. Οι μηχανισμοί δράσης της μπαβασιζουμάμπης συναντώνται σε πολλά επίπεδα και μπορεί να περιλαμβάνουν την αναστολή της

αγγειογένεσης του όγκου, την άμεση επίδραση στον υποδοχέα, που εκφράζεται από τα γλοιοβλαστωματικά κύτταρα, τη διαταραχή του μικροαγγειακού περιβάλλοντος των γλοιωματικών βλαστικών κυττάρων και τη βελτίωση της αγγειακής λειτουργίας. Ωστόσο, η μπαβασιζουμάμπη έχει, κυρίως, επίδραση στην παρουσία οιδήματος και όχι άμεση αντικαρκινική δράση, η οποία φαίνεται να ενισχύεται σε συνδυασμό με επανακτινοβόληση (Kim et al., 2018).

Η πλειοψηφία των κλινικών μελετών εστιάζει σε εγγενείς στόχους στο γλοιοβλάστωμα που εμπλέκονται σε ογκογονικά σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, του κυτταρικού κύκλου και επαγωγής της απόπτωσης. Τα μόρια EGFRvIII, PI3K/AKT/mTOR, BRAF και PARP αποτελούν προκλινικούς και κλινικούς θεραπευτικούς στόχους (Le Rhun et al., 2019, Mooney et al., 2019). Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον του ΚΝΣ προσφέρει την ευκαιρία της διερεύνησης διάφορων ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων. Πρώιμες κλινικές μελέτες, όπως περιγράφονται αλλού (Rand et al., 2000), προχώρησαν σε συστημική ή ενδο-νεοπλασματική χορήγηση κυτοκινών, με την ιντερφερόνη-γ (interferon-γ, IFN-γ) να είναι η πιο υποσχόμενη, εμφανίζοντας αντι-πολλαπλασιαστική, αντι-αγγειογενετική και προ-αποπτωτική δράση και ταυτόχρονα, δυνατότητα αύξησης της αντιγονοπαρουσίασης, μέσω απορρύθμισης των MHC I/II, καθώς και διαμεσολάβηση της διήθησης κυττάρων του ανοσοποιητικού. Εντούτοις, η IFN-γ οδήγησε και στην επαγωγή της έκφρασης του προσδέτη προγραμματισμένου θανάτου (Programmed death-ligand 1, PD-L1) και την ανοσο-διαφυγή. Αυτά τα δεδομένα, πιθανώς, εξηγούν την αποτυχία αυτών των προσπαθειών και τη στροφή του ενδιαφέροντος σε πιο στοχευμένες προσεγγίσεις. Αρχικά, για τη στόχευση του ανοσολογικού συστήματος του γλοιοβλαστώματος διερευνώνται οι εμβολιασμοί κατά του όγκου, που επιτυγχάνονται με διάφορους τρόπους. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει τη χορήγηση ογκο-ειδικών αντιγόνων ή συνδυασμό αυτών, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν

σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για έκθεση στα Τ-κύτταρα και πυροδότηση της ανοσολογικής απόκρισης. Η δεύτερη μέθοδος αφορά τον εμβολιασμό δενδριτικών κυττάρων, κατά τον οποίο πραγματοποιείται συλλογή αυτόλογων δενδριτικών κυττάρων, που εκτίθενται στα αντιγόνα του ασθενή *ex vivo* και επαναχορηγούνται. Πολλά εμβόλια βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης και σε πρώιμα στάδια κλινικών μελετών (Brown et al., 2018). Ένα από τα πιο επιτυχημένα παραδείγματα ανοσοθεραπείας, εν γένει, αποτελεί η στόχευση της ισορροπίας των ενεργοποιητικών και ανασταλτικών σημάτων, αναφορικά με την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού είναι μονοκλωνικά αντισώματα, που αναστέλλουν τη λειτουργία των ρυθμιστών ή μιμούνται τους προσδέτες τους. Οι αναστολείς του PD-1 (νιβολουμάμπη, πεμπρολιζουμάμπη), του PD-L1 (ατεζολιζουμάμπη, δουρβαλουμάμπη, αβελουμάμπη) και του CTLA-4 (ιπιλιμουμάμπη) έχουν αδειοδοτηθεί για χρήση σε πολλά είδη νεοπλάσματος, ενώ η νιβολουμάμπη χρησιμοποιείται σε όγκους με ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (mismatch repair, MMR) και αυξημένη μικροδορυφορική αστάθεια, ανεξάρτητα από την ιστολογική προέλευση του όγκου (Wilcox et al., 2018). Στο γλοιοβλάστωμα, η έκφραση του PD-L1 συναντάται σε ποσοστό 88-100% των περιπτώσεων. Ιδιάζουσας σημασίας, επίσης, είναι η μικρογλοία και τα TAMs στο TME. Η εφαρμογή ανοσοθεραπευτικών μέσων, εντούτοις, δεν έχει δείξει βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, με εξαίρεση μεμονωμένα περιστατικά όγκων με υψηλό μεταλλακτικό φορτίο (Le Rhun et al., 2019).

Τα Τ-λεμφοκύτταρα φέροντα χιμαιρικό υποδοχέα αντιγόνου (chimeric antigen receptor T-cells, CAR-T cells) έχουν παρουσιάσει σημαντική αντι-γλοιωματική δράση σε προκλινικά μοντέλα και η χρήση τους με στόχο τον EGFRvIII, τον HER2 και τον υποδοχέα-α2 της ιντερλευκίνης-13 (Interleukin 13 Receptor Subunit Alpha 2, IL13Ra2) έχει επιδείξει ασφάλεια

και αντι-νεοπλασματική δράση σε ορισμένους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα. Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης θεραπείας δεν είναι δυνατόν να κριθεί ολοκληρωτικά, αναλογιζόμενοι ακόμα βασικά εμπόδια, όπως η ετερογενής έκφραση αντιγόνων και το ανασοκατεσταλμένο μικροπεριβάλλον του όγκου (Stepanenko and Chekhonin, 2018).

Τέλος, αναφορικά με την ανοσοθεραπεία με βάση τους ιούς, αυτή περιλαμβάνει τη μεταφορά γονιδίων φλεγμονωδών κυτοκινών στα νεοπλασματικά κύτταρα, την αναστολή ανασοκατασταλτικών γονιδίων του όγκου και τη μεταφορά γονιδίων αντιγόνων του όγκου σε εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Αρχικά, οι κλινικές δοκιμές εστίασαν στην περιστασιακή κυτταροτοξικότητα και τους ογκολυτικούς ιούς, που είχαν την ικανότητα επαγωγής δευτερογενούς ανασολογικής απόκρισης. Πολλές θεραπείες με βάση τους ιούς χρησιμοποιούν μεθόδους ενδοπαρεγχυματικής, ενισχυμένης με θερμότητα, μεταφοράς του φορέα στη χειρουργική κοιλότητα και βρίσκονται σε φάση I/II κλινικών μελετών (Seyhan and Carini, 2019).

1.2. Ιατρική ακριβείας και βιοδείκτες

Καθώς διασχίζουμε την εποχή των Μεγάλων Δεδομένων (Big Data), η αντίληψη και η αντιμετώπιση των ογκολογικών νοσημάτων και ειδικότερα του γλοιοβλαστώματος, διέρχονται από το επίπεδο του κυττάρου και εστιάζουν στο μοριακό υπόβαθρο και στη συνέχεια, στο συστημικό επίπεδο, στοχεύοντας στη βέλτιστη διαχείριση της νόσου και τη διαστρωμάτωση των ασθενών, με σκοπό την εξατομικευμένη αντιμετώπιση και την ιατρική ακριβείας. Ο στόχος, σε κάθε περίπτωση, είναι η αύξηση της επιβίωσης και η βελτιωμένη παρακολούθηση των ασθενών στην πορεία της νόσου. Για την επίτευξη του στόχου

χρειάζεται ο σχεδιασμός μίας στρατηγικής, που να περιλαμβάνει την ικανότητα ανίχνευσης της νόσου σε πρώιμο στάδιο, την ικανότητα επιτήρησης των θεραπευτικών επιδράσεων και την ικανότητα εντοπισμού των πιθανών υποτροπών. Ο συνδυασμός των γνώσεων του κλινικού φαινοτύπου με το μοριακό προφίλ παρέχει τη δυνατότητα εντοπισμού του αιτιολογικού δικτύου της νόσου, όπου μία γενωμική περιοχή επηρεάζει, αντίστοιχα, το μεταγραφικό, πρωτεϊνικό και μεταβολικό επίπεδο.

Η χρήση των βιοδεικτών είναι το εργαλείο για τον εντοπισμό, έμμεσα, των κλινικών καταληκτικών σημείων με αντικειμενικό τρόπο. Η ενσωμάτωση και η βέλτιστη εφαρμογή των βιοδεικτών και των συνοδών διαγνωστικών στην κλινική πράξη αποτελεί το μέσο για την μετατόπιση από την εμπειρική ιατρική στην εξατομικευμένη ιατρική, όπου ο κάθε ασθενής, ξεχωριστά, λαμβάνει την κατάλληλη θεραπεία στην κατάλληλη δόση τη σωστή στιγμή (Figueroa and Carter, 2017, Seyhan and Carini, 2019).

Ο ιδανικός καρκινικός βιοδείκτης καλείται να είναι δεκτικός για ανάλυση, εύκολα ανιχνεύσιμος με απλές αναλυτικές μεθόδους και ικανός να παρέχει ακριβή πληροφορία, τόσο για την παρουσία, όσο και για την επικινδυνότητα της ασθένειας. Ιδανικά, ο καρκινικός βιοδείκτης πρέπει να διαθέτει 100% ειδικότητα και ευαισθησία, επαρκή χρόνο ημιζωής για ανίχνευση, τη δυνατότητα να αντικατοπτρίζει δυναμικά το φορτίο της νόσου και τελικά, να είναι οικονομικά συμφέρων, έτσι, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη (Silantyev et al., 2019). Είναι γνωστό ότι η απόκριση σε μία συγκεκριμένη θεραπεία ποικίλει λόγω της ετερογένειας του πληθυσμού, με ασθενείς με ικανοποιητική ή μη ανταπόκριση στη θεραπεία, ιδίως, όταν αναφερόμαστε σε έναν τύπο καρκίνου, όπως το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, που επιβάλλει να αναλογιστούμε, παράλληλα και την ετερογένεια της ίδιας της νόσου, που εντοπίζεται σε πολλαπλά επίπεδα (μοριακό, μορφολογικό, κυτταρικό, κλινικό, λειτουργικό) (Saenz-Antoñanzas et al., 2019).

Με την μοριακή ταξινόμηση των όγκων του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος, από τον WHO το 2016 και τη συσχέτιση του μοριακού υποβάθρου του όγκου με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του, η ανάλυση των γενετικών παραμέτρων στα ιστολογικά δείγματα βιοψιών των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, αποτελεί σημαντικό μέρος της τελικής διάγνωσης και του σχεδιασμού του βέλτιστου θεραπευτικού πλάνου (Siegal, 2016).

Ειδικότερα, ένα σύνολο κλινικά σημαντικών γενετικών βιοδεικτών για τα γλοιώματα, αναλύονται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Ανάμεσα σε αυτούς τους βιοδείκτες, οι πιο αντιπροσωπευτικοί είναι: η εικόνα μεταλλάξεων των *IDH1/2*, η μεθυλίωση του υποκινητή του *MGMT*, η συν-απαλοιφή των 1p/19q χρωμοσωμικών βραχιόνων και η απώλεια του *ATRX.* Με τη χρήση εξελιγμένων μοριακών μεθόδων και τεχνικών, όπως για παράδειγμα η άμεση αλληλούχηση, η ανάλυση υψηλής διακριτικότητας τήξης (high-resolution melting, HRM), η ανοσοϊστοχημεία κ.ά., δίνεται η δυνατότητα ταυτοποίησης της παρουσίας/απουσίας μεταλλάξεων με σημαντική θεραπευτική, προγνωστική και πειραματική αξία (Silantyev et al., 2019). Αναφορικά με την ανάλυση βιοδεικτών στα βιολογικά υγρά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αξιόπιστος και αντιπροσωπευτικός βιοδείκτης για το γλοιοβλάστωμα, που να μπορεί να ταυτοποιηθεί στον ορό του αίματος ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Το βασικό πρόβλημα που προκύπτει στην ανάλυση κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων, είτε ελεύθερων, είτε δεσμευμένων σε εξωκυττάρια κυστίδια, αφορά την χαμηλή συγκέντρωση και διαθεσιμότητα στη συστημική κυκλοφορία, σε συνδυασμό με την χαμηλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Παράλληλα, η ενσωμάτωση της υγρής βιοψίας ως διαγνωστικό μέσο προϋποθέτει την αντιμετώπιση των τεχνικών προκλήσεων, όπως η επιλογή του κατάλληλου τύπου βιολογικού υγρού, της μεθόδου συλλογής του, της τεχνικής ανίχνευσης, καθώς και την επιλογή του

κατάλληλου εσωτερικού συστήματος ελέγχου, με σκοπό τη σύγκριση των μελετών που αφορούν την υγρή βιοψία και ως επακόλουθο, την κρίση της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων. Σίγουρα η υγρή βιοψία αποτελεί μία λιγότερο επεμβατική μέθοδο, συγκριτικά με την κλασσική βιοψία και με την αντιμετώπιση των παραπάνω προκλήσεων, μπορεί να αποτελέσει συνοδό διαγνωστικό της ιστολογικής βιοψίας, με σκοπό την επιβεβαίωση της διάγνωσης, την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της απόκρισης στη θεραπεία (Figueroa and Carter, 2017, Huang et al., 2018, Zachariah et al., 2018, Silantyev et al., 2019).

Σήμερα, η αναζήτηση βιοδεικτών στο γλοιοβλάστωμα εξακολουθεί να συγκεντρώνει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

1.2.1. Τα miRNA ως καρκινικοί βιοδείκτες

Τα microRNA (miRNA) βρίσκονται, συχνά, απορυθμισμένα στον καρκίνο, λόγω γενετικών, επιγενετικών και μεταγραφικών μηχανισμών. Η μη φυσιολογική έκφραση των miRNA μπορεί να συσχετιστεί, τόσο με την καρκινογένεση, όσο και με την εξέλιξη της νόσου και την μετάσταση (Melo and Esteller, 2011). Πληθώρα μελετών έχει δείξει την απορυθμισμένη έκφραση miRNA στο γλοιοβλάστωμα, μεταξύ των οποίων διακρίνονται δύο συστηματικές βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Møller et al., 2013, Shea et al., 2016), όπου συνοψίζονται τα ευρήματα περί διαφορικής έκφρασης των miRNA στο γλοιοβλάστωμα: 256 miRNA υπερεκφρασμένα και 95 miRNA υποεκφρασμένα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό.

Τα miRNA είναι μικρά, μη κωδικά, ενδογενή μόρια RNA (περίπου 17-22 νουκλεοτιδίων), που ρυθμίζουν σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο τη γονιδιακή έκφραση. Τα περισσότερα κωδικά γονίδια των miRNA εντοπίζονται σε ιντρόνια, ενώ υπάρχουν και άλλα που μεταγράφονται

από ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες ή σε συμπλέγματα. Συνολικά, τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ως pri-miRNA και στη συνέχεια, μετατρέπονται σε pre-miRNA από το ένζυμο RNAάση III, Drosha, που βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με τα μόρια DGCR8 ή Pasha. Το pre-miRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα από την εξπορτίνη-5 (exportin-5, XPO5) και μετατρέπεται σε ώριμο δίκλωνο μόριο από το σύμπλοκο της Dicer. Ο ένας κλώνος του miRNA (κλώνος-οδηγός) ρυθμίζει τους στόχους του, καθώς ενσωματώνεται στο RNA-σύμπλοκο επαγωγής αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC), κατευθύνοντάς το στην 3’ αμετάφραστη περιοχή (3’ untranslated region, 3’ UTR) του mRNA-στόχου. Τα miRNA, είτε κατατέμνουν άμεσα τα mRNA-στόχους, είτε αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση, ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας που παρουσιάζουν με τις 3’ UTR (Lin and Gregory, 2015).

Αναλογιζόμενοι ότι τα miRNA στοχεύουν συγκεκριμένα mRNA, ρυθμίζοντας την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων, είναι φανερό ότι έχουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση, η απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα και η διαμόρφωση της κυτταρικής ταυτότητας (Croce and Calin, 2005, Kloosterman and Plasterk, 2006). Στον καρκίνο, τα miRNA, στοχεύοντας τα mRNA ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριφέρονται ως ογκοκατασταλτικά ή ως ογκογονίδια, αντίστοιχα, ενώ παράλληλα, σε ένα γενικότερο πλαίσιο, φαίνεται ότι η έκφραση των miRNA στα καρκινικά κύτταρα είναι κατεσταλμένη, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό, υποδεικνύοντας ότι η κατανόηση και ο χαρακτηρισμός του βασικού μηχανισμού βιογένεσης των miRNA οδηγεί στην εύρεση μεταλλάξεων στα βασικά μόρια του μηχανισμού βιογένεσης, που συμβάλλουν στον καρκινικό φαινότυπο και κατ’ επέκταση, στην ταυτοποίηση των ρυθμιστικών μονοπατιών και της σηματοδότησης, που έχουν το έλεγχο των διαφορετικών υποσυνόλων miRNA (Lee and Dutta, 2009, Lin and

Gregory, 2015). Επιπλέον, η διαφορική έκφραση των miRNA στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οφείλεται σε έλλειμα ή ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα εν λόγω miRNA, τα οποία, συχνά, χαρτογραφούνται σε εύθραυστες χρωμοσωμικές περιοχές, παρουσία υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων, καθώς και στη δράση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο p53 (Calin et al., 2004, He et al., 2007, Lujambio et al., 2007).

1.2.2. Τα miRNA ως βιοδείκτες στο γλοιοβλάστωμα

Στο γλοιοβλάστωμα, η δράση των miRNA συμβάλλει στη διαμόρφωση των περισσότερων βιολογικών του χαρακτηριστικών. Αρχικά, μεγάλος αριθμός miRNA έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών RTK, κυρίως των PI3K/Akt και Ras/MAPK, επιδρώντας, τόσο σε επίπεδο υποδοχέα, όσο και στα επιμέρους βασικά μόρια των μονοπατιών, με αποτέλεσμα τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των νεοπλασματικών κυττάρων (Yu et al., 2018). Ενδεικτικά, miRNA με δράση ογκογονιδίου (oncomiRs), όπως τα hsa-miR-17-5p (Li and Yang, 2012) και hsa-miR-19a/b (Jia et al., 2013), στοχεύοντας το ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης (phosphatase and tensin homolog, PTEN), αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού PI3K/Akt, προωθούν την ανάπτυξη του όγκου (Haddadi et al., 2018). Εκτός από την ενίσχυση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, miRNA, όπως το hsa-miR-10b, που βρίσκεται υπό θετική ρύθμιση στο γλοιοβλάστωμα, έχουν ως στόχο τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *TP53* και *RB*, συμβάλλοντας στην ικανότητα διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από σήματα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (Lin et al., 2012). Όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο, παράδειγμα αποτελούν τα hsa-miR-363 και hsa-miR-582-5p, που δρουν έναντι της απόπτωσης των GSCs, με αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξής τους (Floyd et al., 2014). Ωστόσο, υπάρχουν και miRNA, που δρουν ενάντια του κακοήθη φαινοτύπου του γλοιοβλαστώματος, όπως το miR-

205, που έχει ως στόχο τον VEGF-A, περιορίζοντας την διαδικασία της αγγειογένεσης (Yue et al., 2012).

Επιπροσθέτως, εξετάζοντας τη συμμετοχή των miRNA στην ανοσοδιαφυγή των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, ένα παράδειγμα αποτελεί ο ρόλος των hsa-miR-181a/b. Η στρατολόγηση των TAMs από κύτταρα γλοιώματος, που φέρουν στην επιφάνειά τους την κυτοκίνη VCAM-1, οδηγεί στην αυξημένη έκκριση TNF-α. Τότε ο TNF-α, μέσω των αρνητικά ρυθμισμένων hsa-miR-181a/b, ενεργοποιεί το μονοπάτι PP2A/SP-1. Το ενεργοποιημένο μονοπάτι αυξάνει την έκφραση του EGFR, ο οποίος ενισχύει την έκφραση του VCAM-1, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού JAK/STAT3. Αυτός ο βρόγχος ανατροφοδότησης ενισχύει την κατάσταση ανοσοκαταστολής στο γλοιοβλάστωμα (Liu et al., 2017).

Παράλληλα, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η ταυτοποίηση συγκεκριμένων miRNA μπορεί να συμβάλλει στην πρόβλεψη της ανοχής του γλοιοβλαστώματος έναντι της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας. Ένας σημαντικός αριθμός miRNA (hsa-miR-181b, hsa-miR-125b, hsa-miR-20a, hsa-miR-132, hsa-miR-138, hsa-miR-135b) ρυθμίζει μέσω διαφορετικών μηχανισμών και γονιδίων-στόχων, που συμμετέχουν σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης, την ανοχή των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος στο χημειοθεραπευτικό τεμοζολομίδη, ενώ τα hsa-miR-370-3p, hsa-miR-198, hsa-miR-181d και hsa-miR-603 φάνηκε να αυξάνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην τεμοζολομίδη, στοχεύοντας την MGMT (Yu et al., 2018).

Σχετικά με την ακτινοευαισθησία του όγκου, miRNA, όπως τα hsa-miR-26a και hsa-miR-100, ενισχύουν την ευαισθησία των κυττάρων έναντι της ακτινοβολίας, στοχεύοντας το *ATM,* γονίδιο που συμμετέχει στον μηχανισμό επιδιόρθωσης ως απόκριση στην καταστροφή του DNA, ενώ το hsa-miR-101 ενισχύει την ανοχή του γλοιοβλαστώματος στην ακτινοθεραπεία (Ng et al., 2010, Guo et al., 2014, Tian et al., 2016).

1.2.2.i Οι miRNA υπογραφές ως βιοδείκτες στο γλοιοβλάστωμα

Όπως φανερώνεται από τα δεδομένα που παρατίθενται παραπάνω, τα miRNA εμπλέκονται σε πολλαπλά επίπεδα στους μοριακούς μηχανισμούς, που συμμετέχουν στη παθοφυσιολογία του γλοιοβλαστώματος. Η αντιπροσωπευτική διαφορική έκφραση των miRNA στη νόσο και η μοναδικότητα των υπογραφών miRNA, όσον αφορά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα στους ιστούς και στα βιολογικά υγρά και τη διατήρηση των ιδιοτήτων τους επί μονιμοποιημένου ιστολογικού δείγματος σε φορμαλίνη/παραφίνη (Formalin-fixed paraffin-embedded,FFPE), καθιστά δυνατή τη χρήση υπογραφών miRNA ως βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης και διαστρωμάτωσης των ασθενών στην κλινική πράξη. Παράλληλα, η χρήση νέων τεχνολογιών ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης επιτρέπει την αντιμετώπιση προκλήσεων, όπως το μικρό μέγεθος των μορίων ή την παρουσία κοινών αλληλουχιών (de Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

Διερευνώντας, αρχικά, συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης miRNA μεταξύ υποομάδων ασθενών με γλοιοβλάστωμα, η μελέτη του Henriksen και συν. (Henriksen et al., 2014) ανέδειξε ότι ένα πρότυπο ομαδοποίησης 161 miRNA με διαφορική έκφραση, μπορεί να ορίσει δύο ομάδες ασθενών με γλοιοβλάστωμα με βάση τα κλινικο-παθολογικά τους δεδομένα, διακρίνοντας τους ασθενείς με μακράς διάρκειας επιβίωση έναντι εκείνων με μικρής διάρκειας επιβίωση. Μελετώντας, επίσης, την επιβίωση, η Srinivasan και συν. (Srinivasan et al., 2011) αναφέρουν εφτά miRNA υπογραφές, ενδεικτικές κινδύνου, με τα hsa-miR-31 και hsa-miR-222 να υποεκφράζονται και τα hsa-miR-146b, hsa-miR-148a, hsa-miR-193a και hsa-miR-200b να υπερεκφράζονται, ενώ τα υπερεκφραζόμενα hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a χαρακτηρίζονται ως «προστατευτικά» σε ασθενείς με χαμηλή ή ενδιάμεση επιβίωση. Ο Nivazi και συν. (Niyazi et al., 2016) ταυτοποίησαν και επικύρωσαν

μία υπογραφή τεσσάρων miRNA (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-615-5p), που συμβάλλει στη διαστρωμάτωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, που υποβάλλονται σε χειρουργική εκτομή και χημειο-ακτινοθεραπεία με ευμενή ή φτωχή πρόγνωση, ανεξάρτητα από το πρότυπο μεθυλίωσης του *MGMT*. Σε συγκρίσιμη με την παραπάνω μελέτη, ο Sana και συν. (Sana et al., 2014) εισάγουν μία υπογραφή έξι miRNA (hsa-miR-31, hsa-miR-224, hsa-miR-432, hsa-miR-454, hsa-miR-672 και hsa-miR-885-5p), που υποδεικνύει υπεροχή στην πρόβλεψη της κλινικής έκβασης των ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Li και συν. (Li et al., 2014), υπογραφές miRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για κάθε έναν από τους πέντε μοριακούς υπότυπους του γλοιοβλαστώματος, όπως ορίζονται από τα μεταγραφομικά τους πρότυπα. Μία ακόμα υπογραφή, αποτελούμενη από πέντε miRNA (hsa-miR-222, hsa-miR-145, hsa-miR-132, hsa-miR-129 και hsa-miR-221), υπαγορεύεται ως προγνωστικό εργαλείο από την Cheng και συν. (Cheng et al., 2015) για ασθενείς με γλοιοβλάστωμα που παρουσιάζουν μεθυλίωση του υποκινητή του *MGMT*, με στόχο την ταυτοποίηση εκείνων των ασθενών, που θα παρουσιάσουν το μεγαλύτερο όφελος έπειτα από τη χορήγηση αλκυλιωτικών χημειοθεραπευτικών μέσων.

Τα μοντέλα συνδυαστικού σκορ miRNA έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς υπερέχουν σε ακρίβεια, συγκριτικά με τους μοναδιαίους βιοδείκτες. Παράδειγμα αποτελεί η καθιέρωση από τον Yuan και συν. (Yuan et al., 2017) του μοντέλου προγνωστικού σκορ, στο οποίο εμπεριέχονται τρία miRNA (hsa-miR-222, hsa-miR-302d, hsa-miR-646), με βάση τα αποτελέσματα σάρωσης μικροσυστοιχιών miRNA σε κοορτή ασθενών με γλοιοβλάστωμα με μεγάλο δειγματοληπτικό χώρο (n=5.630) (Yuan et al., 2017, Yan et al., 2020). Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν αναδείξει ένα μοναδικό miRNA ως προγνωστικό παράγοντα για

το γλοιοβλάστωμα, το ιδανικό προγνωστικό μοντέλο θεωρείται ότι περιλαμβάνει ένα συνδυασμό μορίων miRNA (Yu et al., 2018).

Αναλογιζόμενοι τις παραπάνω μελέτες, η ταυτοποίηση υπογραφών miRNA, στους καρκινικούς ιστούς ασθενών με γλοιοβλάστωμα, φαίνεται ότι αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της επιβίωσης ελευθέρας-προόδου και ολικής επιβίωσης, όπως και για την επιλογή της κατάλληλης και πιο αποτελεσματικής θεραπευτικής προσέγγισης, εξατομικευμένα για κάθε ασθενή. Συμπληρωματικά, η ταυτοποίηση miRNA στα περιφερειακά σωματικά υγρά των ασθενών, χωρίς της απαίτηση χειρουργικής εκτομής ή βιοψίας, ίσως αποδειχθεί χρήσιμη στην πρόβλεψη της υποτροπής και επανεμφάνισης της νόσου (Areeb et al., 2015).

Ένα μέρος της αμφισβήτησης της αξιοπιστίας, αναφορικά με την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNA, πιθανά να οφείλεται στην έλλειψη επαρκούς κατανόησης των μοριακών μηχανισμών, που υποδεικνύουν την απελευθέρωση miRNA από τα καρκινικά κύτταρα, τη διέλευση μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και την πορεία τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Συμπεριλαμβάνοντας το ρόλο των εξωσωμάτων σε αυτούς τους μηχανισμούς, το προφίλ έκφρασης των miRNA στα εξωσώματα μπορεί να συμπεριληφθεί στους πιθανούς βιοδείκτες για την παροχή πληροφοριών σχετικά με το βαθμό κακοήθειας και την πρόγνωση (Saadatpour et al., 2016, Huang et al., 2018). Ενδεικτικά, στα αποτελέσματα της μελέτης του Akers και συν. (Akers et al., 2013) αναφέρονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-21 στα εξωσώματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

1.2.3. Τα miRNA που μελετήθηκαν για τη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου και τη διαστρωμάτωση ασθενών

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε μοριακή υπογραφή τριών miRNA (hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α), αποσκοπώντας στη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου και τη μοριακή διαστρωμάτωση ασθενών, βάσει πρόδρομης μελέτης κοορτής ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

1.2.3.i. hsa-miR-20a

Το hsa-miR-20a αποτελεί ένα τυπικό και ευρέως μελετημένο παράδειγμα miRNA, που προέρχεται από το σύμπλεγμα hsa-miR-17~92, το οποίο βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 13q31.3 και είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πέντε ακόμα ώριμων miRNA, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a/b και hsa-miR-92a (Zhang et al., 2018). Παρά το γεγονός ότι τα έξι ώριμα miRNA κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα hsa-miR-17~92, η ξεχωριστή νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε miRNA προσδίδει εξειδίκευση, όσον αφορά τους γονιδιακούς στόχους, με αποτέλεσμα τον έλεγχο διαφορετικών φυσιο-βιολογικών διεργασιών (Mitani et al., 2013).

Έκτος από την εκλεκτικότητα της έκφρασης των miRNA, αναφορικά με τον κυτταρικό τύπο, τόσο η έκφραση, όσο και η λειτουργία του hsa-miR-20a διαφοροποιείται μεταξύ των διαφορετικών νεοπλασιών στις οποίες συναντάται. Κατά τη διερεύνηση προτύπων έκφρασης miRNA των χαμηλής κακοήθειας γλοιωμάτων, που εξελίσσονται σε δευτερογενές γλοιοβλάστωμα, μεταξύ άλλων, το hsa-miR-20a βρέθηκε ότι υπόκεινται σε θετική ρύθμιση (Malzkorn et al., 2010). Συμπληρωματικά, στη μελέτη των Xu και συν. (Xu et al., 2018) παρουσιάζεται ο μηχανισμός έκφρασης του hsa-miR-20a στα υψηλής κακοήθειας γλοιώματα που φέρουν τη μετάλλαξη IDH1-R132H. Παρουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης, που

συναντάται συχνά στο δευτερογενές γλοιοβλάστωμα, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα επαγωγής της υποξίας (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1a), η οποία έχει ως επακόλουθο την απορρύθμιση της δραστηριότητας του c-MYC, που συνεπάγεται, τη μειωμένη έκφραση του hsa-miR-20a. Η αποκατάσταση των επιπέδων του hsa-miR-20a επαναφέρει τον αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Xu et al., 2018). Επιπροσθέτως, αναφέρεται ότι σε συνθήκες υποξίας, παρατηρείται μειωμένη έκφραση του *NKG2D,* ρυθμιζόμενη, παρουσία miRNA, μεταξύ των οποίων το hsa-miR-20a (Codo et al., 2014).

Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης έδειξαν ότι η ογκογονική έκφραση του hsa-miR-20a στο γλοιοβλάστωμα παρουσιάζει στενή συσχέτιση α. με τη φτωχή πρόγνωση για την επιβίωση μακράς διάρκειας και β. με την ένδειξη ευαισθησίας στη θεραπεία (Zhao et al., 2017). Συγκεκριμένα, προτείνεται ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος έναντι της τεμοζολομίδης, μέσω αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του *LRIG1*, που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του EGFR (Wei et al., 2015). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το hsa-miR-20a μπορεί να υποστεί αρνητική ρύθμιση, όταν το *DNMT1* υπερεκφράζεται, η οποία οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στην τεμοζολομίδη (Zhou et al., 2015).

Ένας ακόμα στόχος του hsa-miR-20a είναι ο ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνάσων-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2) στα GSCs. Στα αποτελέσματα της μελέτης των Wang και συν. (Wang et al., 2015), πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η υπερέκφραση του hsa-miR-20a διεγείρει την αυτο-ανανέωση των GSCs και μέσω της αρνητικής ρύθμισης του TIMP-2, προωθείται η διηθητική ικανότητα του γλοιοβλαστώματος. Τέλος, στους άμεσους στόχους του hsa-miR-20a συγκαταλέγονται οι STAT3 και MAPK14. Σε πρόσφατη μελέτη προτείνεται ότι το hsa-miR-20a έχει την ικανότητα ρύθμισης της κυτταρικής διεισδυτικότητας στο γλοιοβλάστωμα, μέσω του άξονα ιντερλευκίνη-6/JAK2/STAT3 του

μονοπατιού JAK/STAT, καθώς και η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του hsa-miR-20a με την PI3K (Delen et al., 2020) .

1.2.3.ii. hsa-miR-21

Το hsa-miR-21 εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 17q23.2 και συμμετέχει στην ανάπτυξη και εξέλιξη ποικίλων νεοπλασμάτων, όπως του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος κ.ά. (Masoudi et al., 2018). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι είναι το μόνο miRNA που βρίσκεται να υπερεκφράζεται σε όλους τους τύπους καρκινωμάτων, στους οποίους συναντάται. Η μελέτη των Ciafre και συν. (Ciafre et al., 2005) έδειξε ότι το hsa-miR-21 υφίσταται την πιο ισχυρή υπερ-έκφραση στο γλοιοβλάστωμα, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό. Η ταυτοποίηση γονιδίων, όπως το *TP53* και το *TGFB*, αλλά και η αποπτωτική σηματοδότηση, που υφίστανται αρνητική ρύθμιση από το hsa-miR-21, καθιέρωσαν τη λειτουργία του ως ογκογονική (Papagiannakopoulos et al., 2008).

Η λειτουργία του ογκογονικού hsa-miR-21 έχει συνδεθεί με βασικές διεργασίες στην παθοφυσιολογία του γλοιοβλαστώματος, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση και η αγγειογένεση, με αποτέλεσμα η λειτουργία του να συσχετίζεται με την πρόοδο και εξέλιξη της νόσου, την αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή, την επιθετικότητα, την μετάσταση και την υποτροπή της νόσου (Masoudi et al., 2018). Ειδικότερα, αναφορικά με το ρόλο του hsa-miR-21 στη βιολογία των GSCs, αναφέρεται ότι το hsa-miR-21, στοχεύοντας γονίδια, όπως τα *NANOG, SOX2* και *SPRY1*, προωθεί τη διαφοροποίηση των GSCs (Aldaz et al., 2013).

Επιπροσθέτως, το hsa-miR-21 συμβάλλει στη διηθητικότητα των γλοιωμάτων μέσω της αρνητικής ρύθμισης των MMP αναστολέων (RECK,TIMP3). Ωστόσο η διαφορική έκφραση του hsa-miR-21, δεν έχει συσχετιστεί με το μεταστατικό δυναμικό στο γλοιοβλάστωμα, όπως

παρατηρείται στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Ferraro et al., 2014). Σημαντικοί στόχοι του hsa-miR-21 αποτελούν, επίσης, το ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης (phosphatase and tensin homolog, PTEN), η πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4 (programmed cell death protein 4, PDCD4) και η πρωτεΐνη επαγόμενης αναστροφής πλούσιας σε κυστεΐνη (reversion inducing cysteine rich protein, RECK), υπογραμμίζοντας τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της διήθησης. Παράλληλα, η συμμετοχή του hsa-miR-21 σε μονοπάτια, όπως εκείνα του VEGF-A και του HIF-1α, επιβεβαιώνει την επίδρασή του στην αγγειογενετική διαδικασία και τη συμβολή του στην πρόοδο της νόσου.

Σύμφωνα με πρόσφατη βιοπληροφορική ανάλυση, η μειωμένη ογκογονικότητα που παρουσίασαν κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, έπειτα από απορρύθμιση του hsa-miR-21, φαίνεται να διαμεσολαβείται από τη διακοπή της αναστολής πιθανών μοριακών στόχων, όπως: το μέλος-Α της οικογένειας όξινων πυρηνικών φωσφοπρωτεϊνών-32 (acidic nuclear phosphoprotein-32 family member-A, ANP32A), ο ρυθμιστής χρωματίνης εξαρτώμενος από την ακτίνη/ υποοικογένειας Α/ νούμερο 4 (SWI/SNF related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, number 4, SMARCA4), FLII-αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη-1 πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης (leucine rich repeat binding in FLII interacting protein 1, LRRFIP1), το PTEN και ο ανταγωνιστής σηματοδότησης RTK 2 (spourty RTK signaling antagonist 2, SPRY2) . Επιπλέον, η επιμόλυνση με αναστολέα του hsa-miR-21 έχει επιδείξει σημαντική αύξηση της ευαισθησίας των κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος στην ακτινο-χημειοθεραπεία (Toraih et al., 2017).

Συνολικά, η υπερέκφραση του hsa-miR-21 σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, είτε σε συνδυασμό με άλλες μοριακές υπογραφές miRNA, είτε ανεξάρτητα, σχετίζεται με δυσμενή

πρόγνωση, κίνδυνο υποτροπής και υψηλό κίνδυνο θανάτου, καθιστώντας το hsa-miR-21 υποψήφιο βιοδείκτη διάγνωσης ή/και πρόγνωσης (Areeb et al., 2015).

1.2.3.iii. hsa-miR-10a

Το hsa-miR-10a, όπως και το hsa-miR-10b, είναι μέλη της οικογένειας hsa-miR-10 και εντοπίζονται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στον άνθρωπο. Η οικογένεια hsa-miR-10 έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένη στην εξέλιξη και στη δομή. Τα δύο αυτά μόρια, σε πολλά είδη, έχουν συσχετιστεί με τη ρύθμιση της αναπτυξιακής διαδικασίας, που αφορά το σύμπλεγμα γονιδίων *HOX*. Ειδικότερα, το hsa-miR-10a, εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q21.32 (Liu et al., 2020).

Σε πολλές μελέτες, όπως επισημαίνεται και από τους Wang και συν. (Wang et al., 2019), αναφέρεται ο ρόλος του hsa-miR-10 στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη κακοήθειας, όπως και η συμμετοχή του σε σηματοδοτικά μονοπάτια, σημαντικά στην πορεία της καρκινογένεσης, όπως το PI3K/AKT/Wnt/β-κατενίνη/mTOR. Ήδη από το 2012, κατόπιν ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος, με σκοπό την ταυτοποίηση miRNA, που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση στο γλοιοβλάστωμα έναντι φυσιολογικών νευρικών βλαστικών κυττάρων, η έκφραση του hsa-miR-10a βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στο γλοιοβλάστωμα (Lang et al., 2012).

Στα υψηλής κακοήθειας γλοιώματα, πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση του hsa-miR-10a στην 3'UTR του *EPHA8* οδηγεί σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση της E-καντχερίνης και την επαγωγή της EMT, με αποτέλεσμα την αύξηση της διηθητικής ικανότητας και κυτταρικής μετανάστευσης (Yan et al., 2015). Σε πειράματα σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, επιπλέον, τα δεδομένα υπέδειξαν πως η θετική ρύθμιση του hsa-

miR-10a οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης πολυ-φαρμακευτικής αντίστασης 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1), οδηγώντας σε αντίσταση στην τεμοζολομίδη, επάγοντας, παράλληλα, την κυτταρική βιωσιμότητα και την κυτταρική διαίρεση. Το μακρύ μη κωδικό RNA (long non-coding RNA, lncRNA) TUSC7 φάνηκε πως αναστέλει αυτή την ανοχή στην τεμοζολομίδη, μέσω στόχευσης του hsa-miR-10a (Shang et al., 2018). Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και με το lncRNA RP11-838N2.4 (Liu et al., 2016).

Τέλος, κατόπιν εκτενούς αναζήτησης σε βάσεις δεδομένων (ενδεικτικά: miRWalk2.0) και χρήσης αλγορίθμων (ενδεικτικά: miRanda, DIANA-microT-CDS), έχουν καταγραφεί αρκετοί στόχοι του hsa-miR-10a στο γλοιοβλάστωμα. Ενδεικτικά, αναφέρονται το προ-αποπτωτικό *BCL2* (Tezcan et al., 2014), το *CASP9* (κωδικοποιεί για την κασπάση-9), το ογκοκατασταλτικό *CSMD1* και το *BAI1*, που οδηγεί σε αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης (Lang et al., 2012).

1.2.4. Οι μεταβολομικές μελέτες ως εργαλείο της ιατρικής ακριβείας

Η ιατρική ακριβείας στην κλινική πράξη και στην ανάπτυξη φαρμάκων παραμένει μία πρόκληση, ενώ πλέον το ενδιαφέρον στρέφεται στην υλοποίηση καταρτισμένων μοντέλων από άποψη γνώσης και πληροφορίας (Miles and Loughlin, 2011).

Σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών και κλινικών προκλήσεων, η ιατρική ακριβείας, με επίκεντρο τον ασθενή, υπόσχεται τη δυνατότητα της βέλτιστης και αποτελεσματικότερης διαστρωμάτωσης των ασθενών, μεγιστοποίησης του θεραπευτικού οφέλους και ελαχιστοποίησης της τοξικότητας, λαμβάνοντας υπόψιν και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας προς βιώσιμες λύσεις (Kantae et al., 2017).

Οι -ομικές τεχνολογίες έχουν υπηρετήσει την φαρμακευτική έρευνα και ανάπτυξη, ειδικότερα στο πεδίο των μεταφραστικών βιοδεικτών, από τα πρώιμα στάδια έρευνας μέχρι τη κλινική πράξη. Οι μεταφραστικοί βιοδείκτες, όπως οι στοχευμένοι, οι μηχανιστικοί και οι βιοδείκτες ασθενειών, αποτελούν βασικές συνιστώσες της ενίσχυσης των προ-κλινικών μοντέλων και της ανακάλυψης νεών θεραπευτικών στόχων (Subramanyam and Goyal, 2016). Στην προσπάθεια διαστρωμάτωσης και εξατομίκευσης των θεραπευτικών στρατηγικών, ειδικά σε περίπλοκους κλινικούς φαινοτύπους, η ετερογένεια των χαρακτηριστικών που συναντάται μεταξύ των ατόμων, αποτελεί ένα από τα βασικά εμπόδια αυτής της προσπάθειας. Η ετερογένεια μεταξύ των ατόμων προέρχεται από την αλληλεπίδραση της γενετικής ποικιλομορφίας και των περιβαλλοντικών επιδράσεων (Snyderman, 2010, Bekri, 2016, Kantae et al., 2017). Διερευνώντας τις συλλογές των -ομικών δεδομένων, θεωρούμε ότι η ετερογένεια μεταξύ των ατόμων μπορεί να αποτελέσει το μέσο για την εξαγωγή της πληροφορίας, που υποδεικνύει τι είναι βιολογικά σημαντικό, συνυπολογίζοντας τα "θορυβώδη δεδομένα" (ο θόρυβος ορίζεται ως το παράδειγμα των δεδομένων που παρεκκλίνει από τα εκάστοτε μοντέλα) (Neavin et al., 2016, Altman, 2017). Με τη μοντελοποίηση και την πρόβλεψη του φαινοτύπου από γενωμικά και περιβαλλοντικά δεδομένα, ολοκληρώνεται το βήμα για τη γεφύρωση του γονότυπου με το φαινότυπο.

Το μεταβόλομα φαίνεται να αποτελεί τη βάση για τη διερεύνηση και αποσαφήνιση των φαινοτύπων, ως αναδυόμενη οντότητα της συνέργειας του γονιδιώματος με το περιβάλλον. Το προφίλ των μεταβολιτών ενός ατόμου (μεταβότυπος) αποκαλύπτει ένα σύνολο ποιοτικών ή/και ποσοτικών δεδομένων που μπορούν να διαφωτίσουν τη σχέση γονότυπου-φαινοτύπου για ένα άτομο σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Οι μεταβολομικές μελέτες περιλαμβάνουν την καθολική, ποσοτική αξιολόγηση των ενδογενών μεταβολιτών σε ένα

βιολογικό σύστημα, αλλά και των ξενοβιοτικών, προσφέροντας δυνατότητα ολιστικής χαρτογράφησης στην υγεία και την ασθένεια (Holmes et al., 2008).

Ακολουθώντας αυτή τη γραμμή διερεύνησης στο γλοιοβλάστωμα, έχουν ταυτοποιηθεί συγκεκριμένες διαφοροποιήσεις στο μεταβότυπο των καρκινικών κυττάρων, σε σύγκριση με εκείνον των φυσιολογικών κυττάρων, όπως, επίσης, κατά τη μελέτη του επιθετικού φαινοτύπου των γλοιωμάτων, υποστηρίζοντας την ταυτοποίηση υποψήφιων βιοδεικτών (Ahmed and Chinnaiyan, 2014). Διακρίνοντας ορισμένα παραδείγματα, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας φασματοσκοπίας μάζας πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του ογκομεταβολίτη 2-υδροξυγλουταρικό οξύ (2-hydroxyglutarate, 2-HG) στα γλοιώματα με IDH-1 μεταλλάξεις (Dang et al., 2009). Τα επίπεδα του ογκομεταβολίτη αυξάνουν παρουσία IDH-1 μεταλλάξεων και προάγουν την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, η ζεύξη μεταβολομικής και επιγενετικής ανάλυσης στο γλοιοβλάστωμα υπέδειξε τη συσσώρευση του φωσφοενολοπυρουβικού οξέος (phosphoenolpyruvic acid, PEP) και την ισχυρή του συσχέτιση με τον μεσεγχυματικό υπότυπο του γλοιοβλαστώματος (Ahmed and Chinnaiyan, 2014).

1.3. Σκοπός μελέτης

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εστιάζει στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, έναν πρωτοπαθή όγκο εγκεφάλου, υψηλού βαθμού κακοήθειας, με εξαιρετικά περίπλοκο φαινότυπο, τόσο σε επίπεδο παθοφυσιολογίας της νόσου, όσο και αναφορικά με την απόκριση στη θεραπεία. Αποσκοπούμε στη διερεύνηση της συσχέτισης γονότυπου-φαινότυπου, ορίζοντας υπογραφές έκφρασης miRNA, με στόχο τη βέλτιστη διαστρωμάτωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Έτερος στόχος αποτελεί η χαρτογράφηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ατόμων, μελετώντας το μεταβολομικό τους προφίλ. Για το λόγο αυτό, έγινε ζεύξη των ευρημάτων της ερευνητικής μας μελέτης με δεδομένα πρόδρομης μεταβολομικής ανάλυσης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση και εξόρυξη δεδομένων κειμένου

Με σκοπό τη διερεύνηση miRNA υπογραφών για τη διαστρωμάτωση ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και συγκεκριμένα, τη μελέτη της συσχέτισης των hsa-miR20a, hsa-miR21 και hsa-miR10a με τη δριμύτητα της νόσου και τη σχέση γονότυπου-φαινοτύπου των ασθενών, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και εξόρυξη δεδομένων και κειμένου.

Αρχικά, επιλέχθηκε ως μηχανή αναζήτησης η PubMed, που παρέχει δωρεάν πρόσβαση, κυρίως, στη βάση δεδομένων MEDLINE, με αναφορές και περιλήψεις στον τομέα των βιοεπιστημών και της βιοϊατρικής. Καθώς καθορίστηκαν τα κριτήρια αναζήτησης, κριτήρια ένταξης αποτέλεσαν η μελέτη να έχει πραγματοποιηθεί σε άνθρωπο, να είναι διαθέσιμο το πλήρες κείμενο, καθώς και η γλώσσα συγγραφής να είναι τα αγγλικά. Δε συμπεριλήφθηκαν μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πέραν της δεκαετίας και επιστημονικά περιοδικά πέραν των Q1/Q2 για το αντίστοιχο επιστημονικό πεδίο. Η αναζήτηση των πληροφοριών έγινε με τη χρήση συνδυασμού λέξεων-κλειδιών και όρων MeSH, σχετικών με το αντικείμενο προς μελέτη. Πραγματοποιήθηκαν, πιο συγκεκριμένα, τρεις ανεξάρτητες αναζητήσεις (search strings): «*GBM OR glioblastoma AND hsa-miR-20a AND biomarker*», «*GBM OR glioblastoma AND hsa-miR-21*», «*GBM OR glioblastoma AND hsa-miR-10a*». Από τις παραπάνω αναζητήσεις, βάσει των κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού, προέκυψε ένα σύνολο έγκυρων δημοσιευμένων μελετών, ίσο με n=13.

Στη συνέχεια, ακολούθησε εκτενής ανάγνωση, συμπεριλαμβάνοντας τον τίτλο, την περίληψη και το πλήρες κείμενο, των συγκεκριμένων εργασιών και δημιουργήθηκε συγκεντρωτικός πίνακας, με σκοπό την κατηγοριοποίηση των εξαχθέντων πληροφοριών από τις αποδεκτές μελέτες. Με βάση την παραπάνω διαδικασία, μία ερευνητική εργασία απορρίφθηκε, καθώς δεν εξυπηρετούσε το σκοπό της παρούσας μελέτης, με αποτέλεσμα το

σύνολο των τελικών εργασιών προς περαιτέρω επεξεργασία να είναι n=12. Ειδικότερα, καταγράφηκαν για κάθε miRNA υπό μελέτη, τα υποψήφια γονίδια/πρωτεΐνες-στόχοι, αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια με συμμετοχή στην παθοφυσιολογία του γλοιοβλαστώματος και τη δριμύτητα της νόσου.

Ακολούθησε η χρήση του εργαλείου εξόρυξης δεδομένων και κειμένου PolySearch2 (http://polysearch.ca/), που παρέχει τη δυνατότητα έρευνας πιθανής συσχέτισης μεταξύ ποικίλων βιοϊατρικών οντοτήτων (Liu et al., 2015). Το συγκεκριμένο εργαλείο αξιοποιεί όλη τη διαθέσιμη πληροφορία από τις συλλογές ελεύθερων κειμένων, καθώς και 14 ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων βιολογικού περιεχομένου, όπως οι UniProt, DrugBank και HMDB, κάνοντας χρήση όρων MeSH και γονιδιακής οντολογίας, αλλά και βιολογικών και χημικών ταξινομιών, με σκοπό να παρέχει ένα ευρύ φάσμα πληροφορίας, με ακρίβεια. Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση, με δοθέντες όρους τα γονίδια και τα μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία συμμετέχουν τα miRNA υπό μελέτη, με βάση την πληροφορία του Πίνακα 4. Αναζητήθηκαν, στη συνέχεια, όλες οι πιθανές συσχετίσεις (γονίδια, μονοπάτια και καταρράκτες σηματοδότησης, ασθένειες, ιστοί, κ.α.), ώστε όχι μόνο να επιβεβαιωθούν τα ευρήματά μας, αλλά και να εξαχθούν πιθανές επιπρόσθετες πληροφορίες και συσχετίσεις.

2.2. Συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη

Η μελέτη αφορά ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Όλα τα δείγματα προέρχονται από άτομα ελληνικής καταγωγής και συλλέχθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, στα πλαίσια συνεργασίας με την Καθηγήτρια Βασιλική Ζολώτα, τον Καθηγητή Δημήτριο Καρδαμάκη και τον Επίκ. Καθηγητή Βασίλειο Παναγιωτόπουλο (Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών) και τη συμβολή της κας. Ιωάννας Γρυπάρη (Εργαστήριο

Παθολογικής Ανατομίας). Πραγματοποιήθηκε συλλογή βιοπτικού υλικού, μακροσκοπική εξέταση, ανοσοϊστοχημική χρώση, κατόπιν μονιμοποίησης σε φορμόλη και εγκλεισμός σε κύβους παραφίνης (formalin fixed paraffin embedded, FFPE). Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν 37 δείγματα ασθενών (FFPE δείγματα) προς απομόνωση και ανάλυση των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α.

2.3. Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση

Η ανοσοϊστοχημική δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε FFPE ιστούς, με σκοπό την παρατήρηση στο μικροσκόπιο της έκφρασης κυτταρικών αντιγόνων (ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδος) στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη, σημασμένων με χρωμογόνο.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Αποπαραφίνωση τομών: 40 λεπτά σε διάλυμα ξυλόλης
2. Εμβάπτιση τομών σε επιπλέον δύο διαλύματα ξυλόλης για την απομάκρυνση της περίσσειας παραφίνης
3. Ενυδάτωση τομών: εμβάπτιση τομών (15-20 εμβαπτίσεις των 2 δευτερολέπτων) σε διαλύματα κατιούσας βαθμίδωσης αλκοολών (100%, 100%, 96%, 80%, 70%) και αποσταγμένο νερό (distilled water, dH_2O))
4. Ανάδειξη αντιγονικού επιτόπου (antigen retrieval) με θερμική επεξεργασία: χρήση διαλύματος αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ή κιτρικού νατρίου (ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προς μελέτη αντιγόνου) και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων στα 600W για 3-5 λεπτά
5. Παραμονή των τομών εντός του διαλύματος ανάδειξης (βήμα 4) σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά

6. Αναστολή ενδογενούς υπεροξειδάσης: οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα υπεροξειδίου 3% v/v για χρονικό διάστημα 15 λεπτών, απουσία φωτός
7. Έκπλυση των τομών σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 λεπτά
8. Έκπλυση των τομών σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα τρομεθαμίνης (tris buffered saline,TBS), με 15-20 εμβαπτίσεις των 2 δευτερολέπτων, 2 φορές και παραμονή των τομών, εμβαπτισμένες στο διάλυμα TBS
9. Κατάληψη των θέσεων μη-ειδικής δέσμευσης με χρήση 3% w/v διαλύματος λευκωματίνης βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA) για 15 λεπτά
10. Δέσμευση πρωτογενούς αντισώματος: επώαση τομών με το αντίσωμα για το προς μελέτη αντιγόνο
11. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBS, με 15-20 εμβαπτίσεις των 2 δευτερολέπτων, 5 φορές
12. Δέσμευση δευτερογενούς αντισώματος: επώαση τομών με διάλυμα σημασμένου πολυμερούς DAKO EnVision^{TM} και HRP (Dako Glostrup, Denmark) για 30 λεπτά
13. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBS, με 15-20 εμβαπτίσεις των 2 δευτερολέπτων, 5 φορές
14. Ανίχνευση των συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος με χρήση χρωμογόνου. Για τη δέσμευση του χρωμογόνου χρησιμοποιείται διαμινοβενζιδίνη, DAB (Dako Company Glostrup, Denmark) για 5 λεπτά
15. Έκπλυση των τομών σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 δευτερόλεπτα
16. Χρώση αντίθεσης των πυρήνων με διάλυμα αιματοξυλίνης για 15 δευτερόλεπτα (Haematoxylin Harris Acidified, Atom Scientific, Manchester)
17. Έκπλυση των τομών σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 30 δευτερόλεπτα

18. Αφυδάτωση τομών: εμβάπτιση τομών (15-20 φορές των 2 δευτερολέπτων) σε διαλύματα κατιούσας βαθμίδωσης αλκοολών (70%, 80%, 96%, 100%, 100%)
19. Διαύγαση τομών: εμβάπτιση τομών (15-20 φορές των 2 δευτερολέπτων) σε διαλύματα ξυλόλης (2x ξυλόλη 100%)
20. Επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση κατάλληλου μέσου, διαλυτού σε ξυλόλη (DPX Mountant Low Viscosity, Atom Scientific, Manchester).

Προς επίτευξη των παραπάνω, επιπρόσθετα, παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

◊ Διάλυμα EDTA 1 mM: Σε 100ml dH_2O προστέθηκαν 0,37gr EDTA, με ρύθμιση του pH, χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου, NAOH (1N) και υδροχλωρικό οξύ, HCl (1N) σε pH=8

◊ Διάλυμα κιτρικού νατρίου 7mM: Σε 100ml dH_2O προστέθηκε ποσότητα 2,1gr κιτρικού νατρίου με ρύθμιση του pH, χρησιμοποιώντας NAOH (1N) και HCl (1N) σε pH=6

◊ Διάλυμα υπεροξειδίου, H_2O_2 3% v/v: Σε 97ml dH_2O προστέθηκε όγκος 3ml πυκνού διαλύματος H_2O_2 (30% v/v)

◊ Διάλυμα Tris-(υδροξυμεθυλ)αμινομεθανίου 50mM: Σε 1000ml dH_2O προστέθηκε ποσότητα 6,1gr Tris-(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιου, με ρύθμιση του pH, χρησιμοποιώντας NaOH (1N) και HCl (1N) σε pH=7,6

◊ Διάλυμα TBS: Σε 900ml φυσιολογικού ορού (0,9% w/v NaCl) προστέθηκαν 100ml διαλύματος Tris

◊ Διάλυμα 3%w/v BSA: Σε 9ml TBS προστέθηκαν 0,3gr BSA και μετά τη διάλυση του στερεού, συμπληρώθηκε TBS μέχρι την πλήρωση των 10ml

◊ Διάλυμα DAB: Αραίωση 1:50 DAB:Διάλυμα έκπλυσης (Dako)

2.4. Πειραματική διαδικασία μελέτης miRNAs

Αποσκοπώντας στη διερεύνηση των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α, απομονώθηκε ολικό RNA από ιστούς FFPE και πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR, RT-PCR).

2.4.1. Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος

Η απομόνωση του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρότυπου συστήματος miRNeasy FFPE Kit της Qiagen. Το miRNeasy FFPE Kit είναι ειδικά σχεδιασμένο για τη συλλογή καθαρού ολικού RNA, συμπεριλαμβανομένων των miRNA, από ιστικές τομές FFPE. Με την απομόνωση μορίων RNA, μεγαλύτερων των 18 νουκλεοτιδίων, επιτρέπεται η ανάκτηση χρήσιμων θραυσμάτων RNA. Αναλυτικά, η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Απομάκρυνση περίσσειας παραφίνης από το δείγμα με τη χρήση νυστεριού
2. Κοπή τομών πάχους 5-20μm (αν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίπτονται οι πρώτες 2-3 τομές)
3. Οι τομές τοποθετούνται άμεσα σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης των 1,5ml (ή 2ml)
4. Προστίθενται 320μl διαλύματος αποπαραφίνωσης (cat. no. 19093), οι τομές αναδεύονται σε αναδευτήρα για 10 δευτερόλεπτα, με φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό
5. Πραγματοποιείται επώαση στους 56°C για 3 λεπτά και τα δείγματα αφήνονται να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου
6. Προστίθενται 240μl ρυθμιστικού διαλύματος πέψης πρωτεϊνάσης K (PKD Buffer) και ακολουθεί ανάδευση με αναδευτήρα
7. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10,000 rpm

8. Προστίθενται 10μl πρωτεϊνάσης Κ στην κάτω, καθαρή φάση, ακολουθεί ήπια ανάδευση με τη χρήση της πιπέτας
9. Επώαση στους 56°C για 15 λεπτά και έπειτα στους 80°C για 15 λεπτά
10. Μεταφορά της κάτω, καθαρής φάσης σε νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 2ml
11. Επώαση στον πάγο για 3 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 13,500 rpm
12. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, χωρίς διαταραχή του ιζήματος
13. Προστίθενται 25μl ρυθμιστικού διαλύματος DNase Booster και 10μl διαλύματος DNase I, ακολουθεί μίξη αναστρέφοντας το σωληνάριο και ήπια φυγοκέντρηση για συλλογή του υγρού από τα τοιχώματα του σωληναρίου
14. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
15. Προστίθενται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ερυθρών κυττάρων (RBC Buffer) για την προσαρμογή των συνθηκών πρόσδεσης και ακολουθεί επιμελής μίξη
16. Προστίθενται 1750μl αιθανόλης(100%) στο δείγμα και ακολουθεί καλή ανάδευση με την πιπέτα
17. Μεταφέρονται 700μl του δείγματος, συμπεριλαμβάνοντας το ίζημα που μπορεί να έχει σχηματιστεί, σε στήλη RNeasy MinElute τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής των 2ml, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10,000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα
18. Επαναλαμβάνεται το βήμα (17) έως ότου διηθηθεί το σύνολο του δείγματος μέσω της στήλης
19. Προστίθενται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RPE στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10,000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα

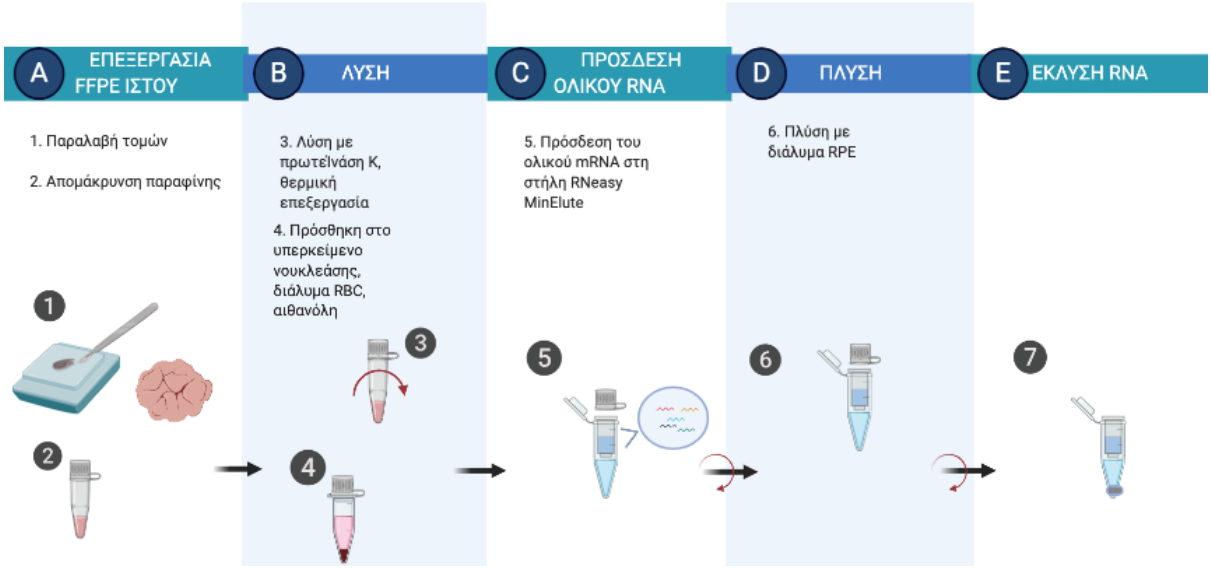
20. Προστίθενται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RPE στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 10,000 rpm προς πλύση της μεμβράνης της στήλης και απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα
21. Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2ml, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά με ανοιχτό το καπάκι της στήλης και απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα
22. Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωληνάριο συλλογής των 1.5ml, προστίθενται 14μl νερού ελεύθερο από ριβονουκλεάσες απευθείας στη μεμβράνη της στήλης και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό για την έκλυση του RNA

Στα πλαίσια της προαναφερθείσας διαδικασίας, παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

◊ Διάλυμα DNase I: Η λυοφιλιωμένη DNase I διαλύεται σε 550μl νερού ελεύθερο από ριβονουκλεάσες

◊ Διάλυμα RPE: Στο διάλυμα RPE, όγκου 11ml, προστίθενται 44ml αιθανόλης (96-100%) και ανακινείται πριν τη χρήση

Στην Εικόνα 1, αναπαρίσταται συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας απομόνωσης ολικού RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNA) με το miRNeasy FFPE Kit της Qiagen.



Εικόνα 1: *Απομόνωση ολικού RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNA) με το miRNeasy FFPE Kit της Qiagen*

2.4.2. Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) είναι η διαδικασία μετατροπής ενός μορίου RNA σε μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA (complementary DNA, cDNA). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase), ενός ενζύμου που εντοπίζεται στους ρετροϊούς.

Συγκεκριμένα, τα μόρια RNA πολυ-αδενυλιώνονται από την poly (A)-πολυμεράση και μέσω εκκινητών, πλούσιων σε θυμίνη (oligo-dT primers), πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA. Χρειάζονται, ακόμη, δεοξυριβονουκλεοτίδια, ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα και φυσικά, το υπόστρωμα. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον πάγο.

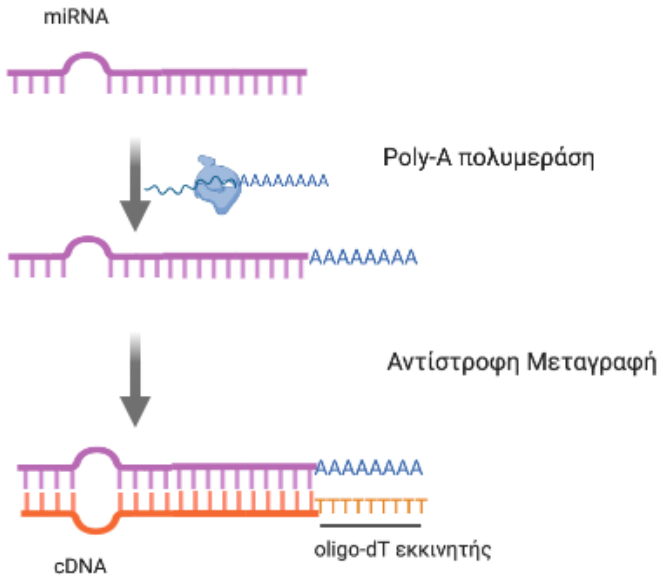
Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το miScript II RT Kit της Qiagen και επιλέχθηκε το 5x miScript HiSpec Buffer ως ρυθμιστικό διάλυμα για την ποσοτικοποίηση, αποκλειστικά, του

ώριμου miRNA. Στον Πίνακα 1, παρουσιάζεται η στοιχειομετρία της αντίδρασης για τελικό όγκο 20 μl. Απαιτείται επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 1 ώρα και στη συνέχεια, μεταφορά στους 95°C για 5 λεπτά προς απενεργοποίηση του ενζύμου. Τα προϊόντα της αντίδρασης φυλάσσονται στους -20°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

Αντιδραστήρια	**1x**
5x Ρυθμιστικό διάλυμα	4μl
10x μείγμα νουκλεοτιδίων (περιέχει και τους εκκινητές)	2 μl
Αντίστροφη μεταγραφάση	2 μl
Νερό χωρίς ριβονουκλεάσες	7 μl
Υπόστρωμα- RNA (10ng-2μg)	5 μl

Πίνακας 1: *Στοιχειομετρία αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής σε τελικό όγκο 20μl*

Στην Εικόνα 2, ακόλουθα, αναπαρίστανται τα στάδια της αντίστροφης μεταγραφής miRNA.



Εικόνα 2: *Στάδια Αντίστροφης Μεταγραφής miRNA*

2.4.3. Ενίσχυση και ανίχνευση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR, RT-PCR)

Η αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR, RT-PCR) αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους για τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης (Tian et al., 2015). Η RT-PCR επιτρέπει τη συλλογή δεδομένων κατά τη διάρκεια της PCR, συνδυάζοντας, τόσο την ενίσχυση, όσο και την ανίχνευση σε μια μόνο αντίδραση με τη βοήθεια φθοριζουσών χρωστικών.

Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι το σημείο, το οποίο αντιστοιχεί στον κύκλο, κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR έχουν υπερβεί το βασικό επίπεδο ανίχνευσης φθορισμού. Το σημείο αυτό συμβολίζεται ως C_q. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του στόχου στηρίζεται στο γεγονός πως όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA (ή cDNA) υπό μελέτη στο αρχικό δείγμα, τόσο πιο μικρός θα είναι ο αριθμός των κύκλων, που θα χρειαστούν για τη σύνθεση επαρκών προϊόντων, ώστε ο φθορισμός του δείγματος να υπερβεί το επίπεδο ανίχνευσης. Το αντίστροφο συμβαίνει για τα δείγματα με μικρότερο αριθμό των μορίων-στόχου (Bustin, 2002, Wong and Medrano, 2005).

Στην RT-PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές χρωστικές, ειδικές και μη- ειδικές. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε η μη ειδική φθορίζουσα χρωστική SYBR-Green. Οι μη ειδικές χρωστικές, όταν βρίσκονται σε διάλυμα εμφανίζουν μηδενικό ή καθόλου φθορισμό, ενώ φθορίζουν, όταν ενσωματώνονται στη διπλή αύλακα του DNA.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, με την ολοκλήρωση της αντίστροφης μεταγραφής, η μέθοδος εφαρμόστηκε με τη χρήση του miScript SYBR Green PCR Kit της Qiagen. Απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η πολυμεράση, η φθορίζουσα χρωστική (μη ειδική, SYBR Green), ένα κοινός ανάστροφος εκκινητής, ένας πρόσθιος εκκινητής, ειδικός για την αλληλουχία-στόχο του miRNA υπό μελέτη, ρυθμιστικό διάλυμα και φυσικά, το υπόστρωμα ενδιαφέροντος

(Πίνακας 2). Η τελική αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 25μl. Κάθε δείγμα, έπειτα από την αντίστροφη μεταγραφή, αραιώνεται σε 200μl νερού, χωρίς ριβονουκλεάσες (RNase-free water), ώστε η συγκέντρωση του cDNA να κυμαίνεται σε εύρος 50pg - 3ng. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση του θερμικού κυκλοποιητή CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD).

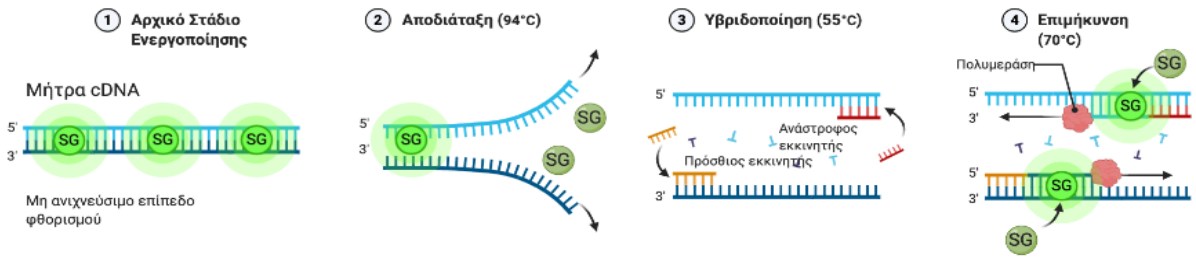
Αντιδραστήρια	**1x**
2x Μείγμα πολυμεράσης(SYBR Green)	12.5 μl
10x κοινός ανάστροφος εκκινητής	2.5 μl
10x πρόσθιος εκκινητής**,** ειδικός για το miRNA-στόχο	2.5 μl
Νερό χωρίς ριβονουκλεάσες	5 μl
Υπόστρωμα-cDNA (50pg – 3ng)	2.5 μl

Πίνακας 2: *Στοιχειομετρία αντίδρασης RT-PCR με τελικό όγκο αντίδρασης τα 25 μl*

Στον Πίνακα 3 και την Εικόνα 3, συνοψίζονται τα στάδια της RT-PCR.

Στάδιο	**Χρόνος**	**Θερμοκρασία**
Αρχικό στάδιο ενεργοποίησης	15 λεπτά	95°C
Αποδιάταξη	15 δευτερόλεπτα	94°C
Υβριδοποίηση	30 δευτερόλεπτα	55°C
Επιμήκυνση	30 δευτερόλεπτα	70°C
Τελικός αριθμός κύκλων	45	

Πίνακας 3: *Τα στάδια της RT-PCR κατά την εφαρμογή της μεθόδου στην παρούσα εργασία*



Εικόνα 3: *Τα στάδια της RT-PCR (αρχή της μεθόδου)*

2.4.4. Υπολογισμός επιπέδων έκφρασης των miRNA υπό μελέτη

Για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης των miRNA χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση αυτών μέσω κανονικοποίησης των αντίστοιχων τιμών C_q (ΔC_q), βάσει του ενδογενούς miRNA αναφοράς, SNORD96a. Το SNORD96a έχει βρεθεί να έχει σταθερή έκφραση σε πλήθος πειραματικές συνθήκες και ιστούς, συμπεριλαμβανόμενου του εγκεφαλικού ιστού (Qiagen), εξομαλύνοντας την τεχνική ετερογένεια και τα σφάλματα σύγχυσης. Το σύνολο των δειγμάτων για κάθε miRNA υπό μελέτη ελέγχθηκε στο ίδιο πείραμα, ώστε να αποφευχθούν σφάλματα σύγχυσης, παρουσία αρνητικών μαρτύρων (NTC, RTC). Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο οι τιμές Cq<37.

Αναφορικά και ως προς τα παραπάνω, η επιλογή της μεθόδου κανονικοποίησης στην παρούσα εργασία είναι ιδιάζουσας σημασίας, αν συλλογιστούμε τις απαιτήσεις των προσεγγίσεων που εστιάζουν στα miRNA ως βιοδείκτες (και την ποσοτικοποίησή τους). Αυτός είναι, άλλωστε και ο λόγος που επιλέχθηκε η RT-PCR ως μέθοδος επιλογής, δεδομένης της ευαισθησίας και ειδικότητάς της, καθώς έχει καθιερωθεί ως η μέθοδος επιλογής για την ανάλυση προκαθορισμένων miRNA (Schwarzenbach et al., 2015). Το ενδογενές miRNA αναφοράς επιλέχθηκε στον αντίποδα του εξωγενούς ή του γεωμετρικού μέσου των C_q τιμών όλων των miRNA υπό μελέτη, γιατί συνάδει με τις απαιτήσεις και το σχεδιασμό της μελέτης.

Τα εξωγενή miRNA αναφοράς, τα οποία προστίθενται στο δείγμα προς ανάλυση κατά την πειραματική πορεία εξομαλύνουν την ετερογένεια και τα σφάλματα σύγχυσης, που πηγάζουν ή σχετίζονται με τη διαδικασία της ανάλυσης και ειδικότερα, της απομόνωσης του miRNA ή/και της αντίστροφης μεταγραφής. Παράλληλα, ο γεωμετρικός μέσος των C_q τιμών όλων των miRNA υπό μελέτη έχει νόημα μόνο όταν μελετάται ένας σημαντικά μεγάλος αριθμός miRNA ή/και χρησιμοποιούνται >3 ενδογενή miRNA αναφοράς. Αναγνωρίζοντας πως δεν υπάρχουν σαφείς κατευθυντήριες συστάσεις ορθής πρακτικής, είναι σαφές πως οι διαφορετικές προσεγγίσεις κανονικοποίησης αναδύουν διαφορετικά αποτελέσματα (Faraldi et al., 2018, Faraldi et al., 2019).

2.5. Στατιστική Επεξεργασία

Η ανάλυση των δεδομένων της παρούσας εργασίας έγινε με ένα σύνολο στατιστικών μεθοδολογιών, με γνώμονα το σχεδιασμό της μελέτης και τις μεθόδους επιλογής στο επιστημονικό πεδίο, ανά περίπτωση.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis (μη παραμετρικός έλεγχος) ως έλεγχος ύπαρξης στατιστικής σημαντικότητας διαφορών ανάμεσα σε δυο ή περισσότερες κοορτές μιας ανεξάρτητης και μιας συνεχούς εξαρτώμενης παραμέτρου (Chan and Walmsley, 1997). Στην παρούσα μελέτη, εξαρτώμενη παράμετρος είναι η ολική επιβίωση. Η μη εξαρτώμενη παράμετρος αφορά το πληθυσμιακό μας δείγμα (ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα) για την miRNA υπογραφή, υπό μελέτη. Για τη δυνατότητα χρήσης του συγκεκριμένου ελέγχου απαιτείται η ισχύς κάποιων υποθέσεων. Αρχικά, η εξαρτώμενη παράμετρος χρειάζεται να μετράται σε κανονικό ή συνεχές επίπεδο. Τέτοια παραδείγματα είναι μια κλίμακα βαθμολογίας από το 0-100 ή μια κλίμακα διαβάθμισης από το

«εξαιρετικό» έως «το πολύ κακό». Η μη εξαρτώμενη παράμετρος χρειάζεται να απαρτίζεται από δυο ή περισσότερες ανεξάρτητες ομάδες. Ενδεικτικά, μια τέτοια μεταβλητή είναι η εθνικότητα και οι περαιτέρω ανεξάρτητες ομάδες είναι οι Καυκάσιοι, Ασιάτες κτλ. Επίσης, οι ομάδες υπό ανάλυση θα πρέπει να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, δηλαδή να μην υπάρχει το ίδιο δείγμα ή/ και μετρήσεις αυτού σε δυο διαφορετικές ομάδες. Τέλος, η κατανομή των δεδομένων σε κάθε ομάδα υπό μελέτη θα πρέπει να είναι παρόμοια. Εάν αυτό δεν ισχύει, τότε μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάλυση και σύγκριση μόνο μεταξύ των μέσω τιμών των διαφορετικών ομάδων.

Παράλληλα, ο συντελεστής συσχέτισης Spearman χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της σχέσης ανάμεσα στην ολική επιβίωση και την έκφραση των miRNA υπό μελέτη, διακριτά για το καθένα, αλλά και συνολικά (miRNA υπογραφή). Πρόκειται για μια μη παραμετρική στατιστική κατάταξη και χρησιμοποιείται ως μέτρο αξιολόγησης της συσχέτισης δυο μεταβλητών, μέσω μιας μονότονης συνάρτησης. Ο συντελεστής Spearman δεν είναι μέτρο γραμμικής σχέσης δυο μεταβλητών, αλλά αξιολογεί το πόσο καλά μια μονότονη συνάρτηση μπορεί να αποδώσει τη σχέση των δυο μεταβλητών, χωρίς να κάνει υποθέσεις για τη διανομή των συχνοτήτων των μεταβλητών (Hauke and Kossowski, 2011). Ο συντελεστής Spearman αποδίδεται ως το ελληνικό «ρ» ή «rs» και όσο πιο κοντά είναι στο +/- 1, τόσο πιο ισχυρή είναι η μονοτονική συσχέτιση μεταξύ των δυο μεταβλητών, είτε θετικά είτε αρνητικά.

Η ανάλυση της διακύμανσης (ή ανάλυση διασποράς) χρησιμοποιείται για τη μελέτη της σχέσης μεταξύ μιας εξαρτωμένης μεταβλητής και μιας, δυο ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Δεν απαιτείται προηγούμενη γνώση της σχέσης μεταξύ της εξαρτώμενης και των ανεξάρτητων μεταβλητών, ούτε περιορίζεται σε ποσοτικές μεταβλητές.

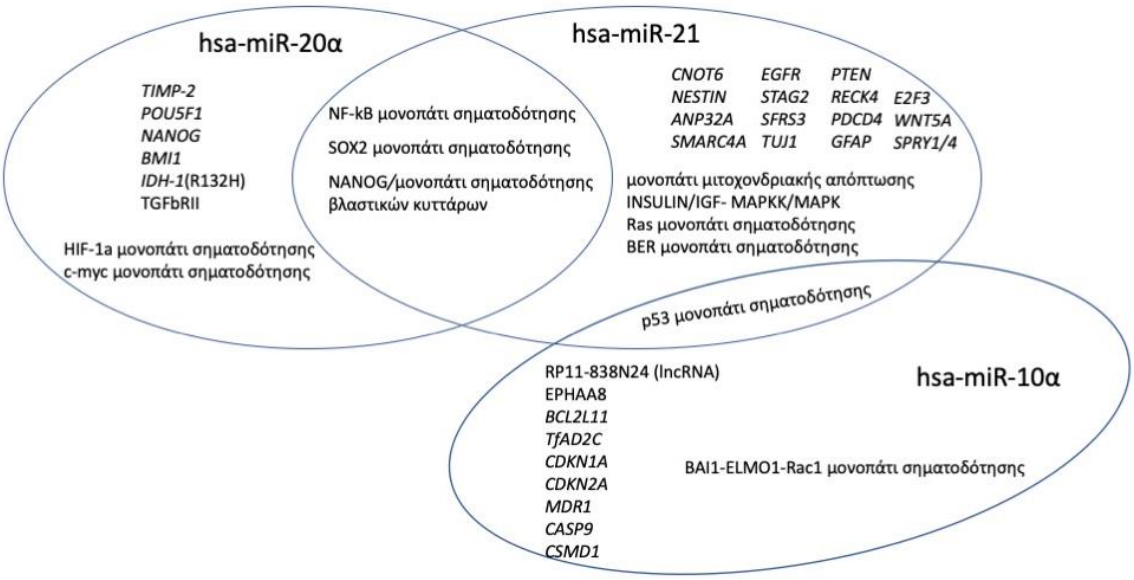
Η ανάλυση της διακύμανσης κατά δυο παράγοντες, τέλος, διερευνά την ταυτόχρονη επίδραση δυο παραγόντων (ανεξάρτητων μεταβλητών) στην εξαρτώμενη μεταβλητή. Η

εξαρτώμενη μεταβλητή λαμβάνει τιμές που εξαρτώνται από την παρουσία ή απουσία των επιπέδων δυο παραγόντων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης κατά δυο παράγοντες ή εναλλακτικά, ανάλυση διασποράς δύο κατευθύνσεων (two-way ANOVA) για την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των επιπέδων έκφρασης των miRNA υπό μελέτη και των ομάδων ασθενών υψηλού- έναντι χαμηλού-κινδύνου.

3. Αποτελέσματα

3.1 .Ευρήματα εξόρυξης δεδομένων και κειμένου

Αποσκοπώντας στη διερεύνηση miRNA υπογραφών για τη διαστρωμάτωση ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και συγκεκριμένα, τη μελέτη της συσχέτισης των hsa-miR20a, hsa-miR21 και hsa-miR10a με τη δριμύτητα της νόσου και τη σχέση γονότυπου-φαινοτύπου των ασθενών, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και εξόρυξη δεδομένων και κειμένου. Στον Πίνακα 4 συνοψίζονται τα επιβεβαιωμένα γονίδια-στόχοι (ή/και πρωτεΐνες-στόχοι) των προαναφερθέντων miRNA και τα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχουν και αναδεικνύονται ως σημαντικά.



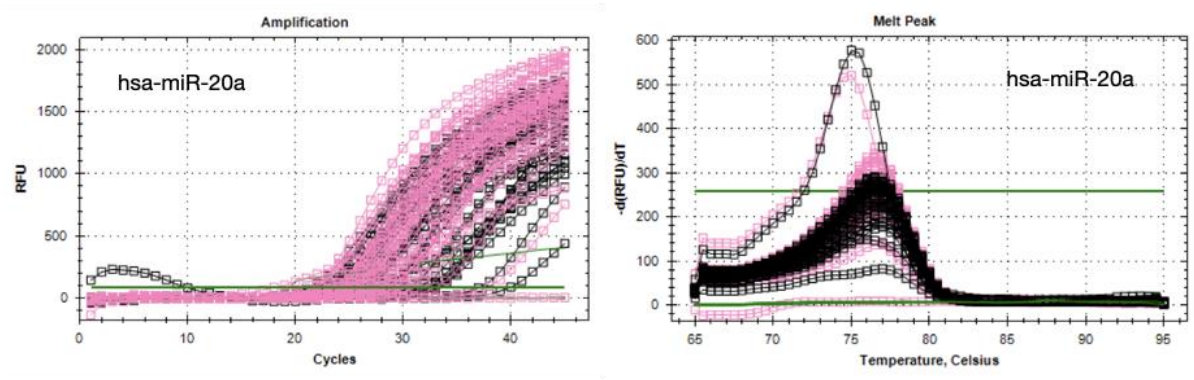
Εικόνα 4:*Διάγραμμα τύπου Venn ως προς τα ευρήματα εξόρυξης δεδομένων και κειμένου*

3.2. Ευρήματα ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης

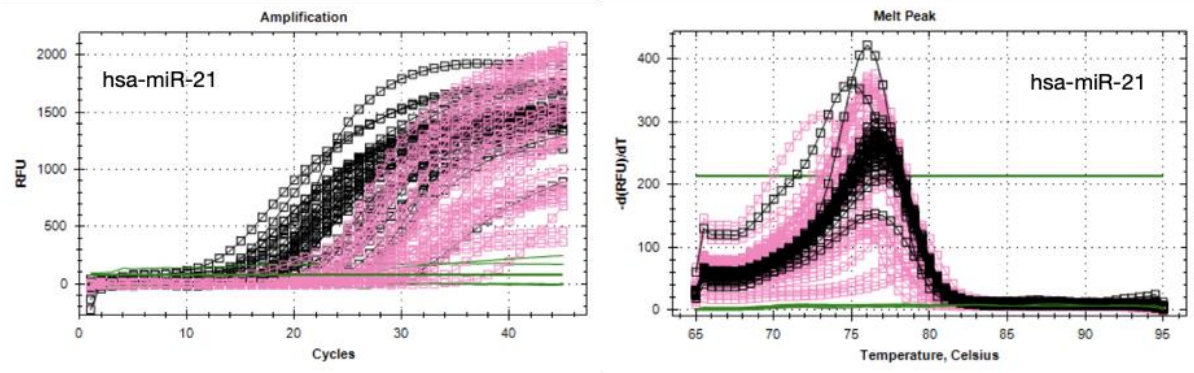
Στην παρούσα εργασία, έλαβε χώρα χρώση αιματοξυλίνης των FFPE δειγμάτων, ώστε να εξακριβωθεί το ακριβές σημείο μέγιστης πληρότητας σε νεοπλαστικά κύτταρα, καθώς έχει αποδειχθεί πως έτσι αποφεύγονται σφάλματα σύγχυσης κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των miRNA. Επιπλέον, με γνώμονα την ανάλυση για τα hsa-miR-20a, hsa-miR-21 και hsa-miR-10a, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τους πρωτεϊνικούς στόχους TGFb-RII, hMSH2 και EphA8, αντίστοιχα. Τα πρόδρομα ευρήματά μας συνηγορούν προς μειωμένη έκφραση των TGFB-RII, hMSH2 και EphA8 στα δείγματα των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, διακρίνοντας δύο ομάδες, ασθενείς χαμηλού και υψηλού κινδύνου.

3.3. Προσδιορισμός της miRNA υπογραφής

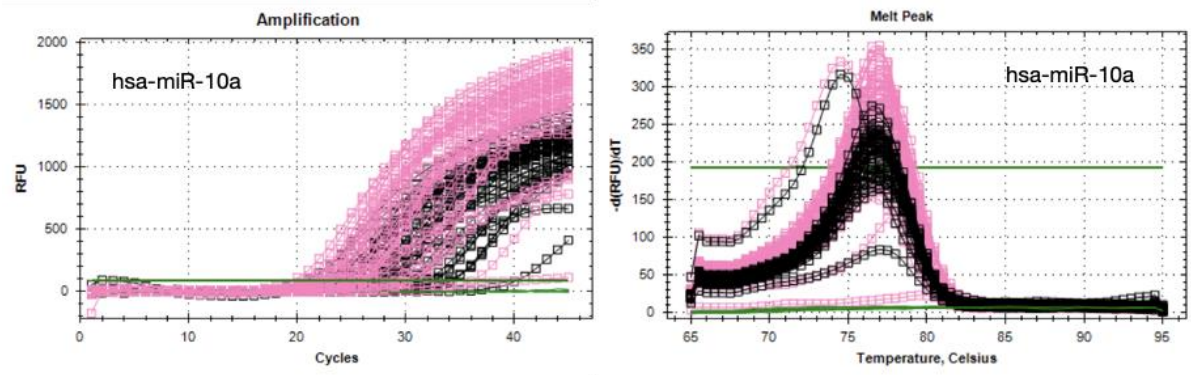
Η ενίσχυση με εφαρμογή της RT-PCR των miRNA υπό μελέτη απεικονίζεται με την γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης, όπου σημειώνεται η θέση του κατωφλίου (threshold), βάσει του οποίου υπολογίζεται ο κύκλος κατωφλίου κάθε μορίου-στόχου. Επιπρόσθετα, η ειδικότητα της αντίδρασης απεικονίζεται στην ανάλυση καμπυλών τήξης, όπου η παρουσία μοναδικής κορυφής μαρτυρά την έλλειψη παραπροϊόντων ή διμερών εκκινητών και ως εκ τούτου, την ανίχνευση μοναδικού και ειδικού προϊόντος. Ακόλουθα, παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης και τήξης της miRNA υπογραφής, αλλά και του γονιδίου αναφοράς SNORD96α (Εικόνες 5-7).



Εικόνα 5:*Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-20a και SNORD96a*



Εικόνα 6*:Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-21 και SNORD96a*



***Εικόνα 7**:Σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης, συναρτήσει του φθορισμού (RFU) με τους κύκλους της αντίδρασης (Cq) και η καμπύλη τήξης για τα hsa-miR-10a και SNORD96a*

Διακρίνεται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων για καθένα από τα μόρια υπό μελέτη, καθώς και η ειδικότητα των RT-PCR προϊόντων.

Στον Πίνακα 4, παρατίθεται η περιγραφική στατιστική ανάλυση της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α στους ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, υψηλού και χαμηλού κινδύνου.

Πληθυσμιακή Ομάδα	Μεταβλητή	Εύρος Τιμών (RQ)
Ασθενείς υψηλού κινδύνου	hsa-miR-20α	0,35-11,23
	hsa-miR-21	5,72-21.62
	hsa-miR-10α	0,45-6,01
Ασθενείς χαμηλού κινδύνου	hsa-miR-20α	0,02-3,49
	hsa-miR-21	2,45-9,06
	hsa-miR-10α	0,0002-4,09

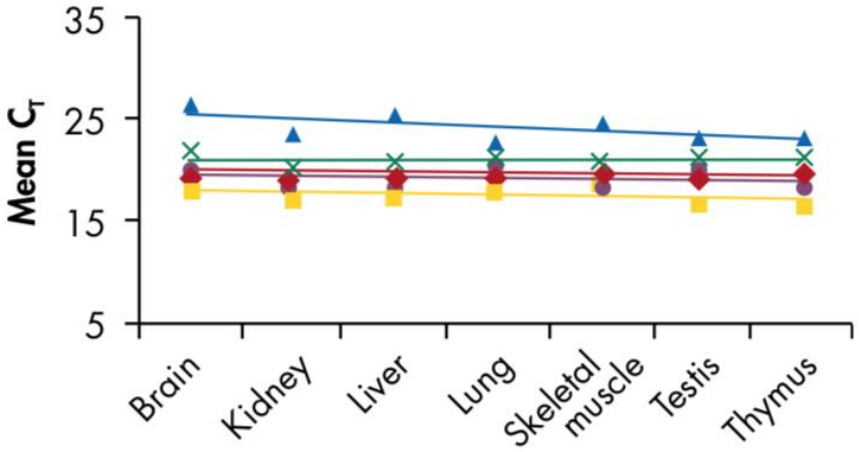
Πίνακας 4:*Εύρος τιμών της έκφρασης των miRNA υπό μελέτη στον πληθυσμό των ασθενών*

όπου RQ, αυθαίρετες μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης

Ελέγχοντας ποιοτικά τα αποτελέσματά μας, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες με χρήση σειριακών αραιώσεων πρότυπου δείγματος cDNA, καλύπτοντας έξι τάξεις μεγέθους (cDNA:

1-10^{-5}ng) για τα hsa-miR-20α, hsa-miR-21, hsa-miR-10α και SNORD96α (μετρήσεις εις τριπλούν, πρόδρομα ευρήματα). Οι πρότυπες καμπύλες αναπαριστούν τη μεταβολή της μέσης τιμής Cq ως προς το δεκαδικό λογάριθμο της ποσότητας του cDNA-υποστρώματος της αντίδρασης. Με χρήση της εξίσωσης ευθείας για καθεμία από τις προαναφερθείσες πρότυπες καμπύλες και του τύπου %E = [-1 + 10 (-1/κλίση)]×100, υπολογίστηκε η απόδοση της αντίδρασης και ο συντελεστής γραμμικότητας (r2), συνηγορώντας πως η γραμμικότητα των πρότυπων καμπυλών είναι η πρέπουσα και οι αποδόσεις των αντιδράσεων για τα hsa-miR-20α, hsa-miR-21, hsa-miR-10α και SNORD96α προσεγγίζουν το 100%.

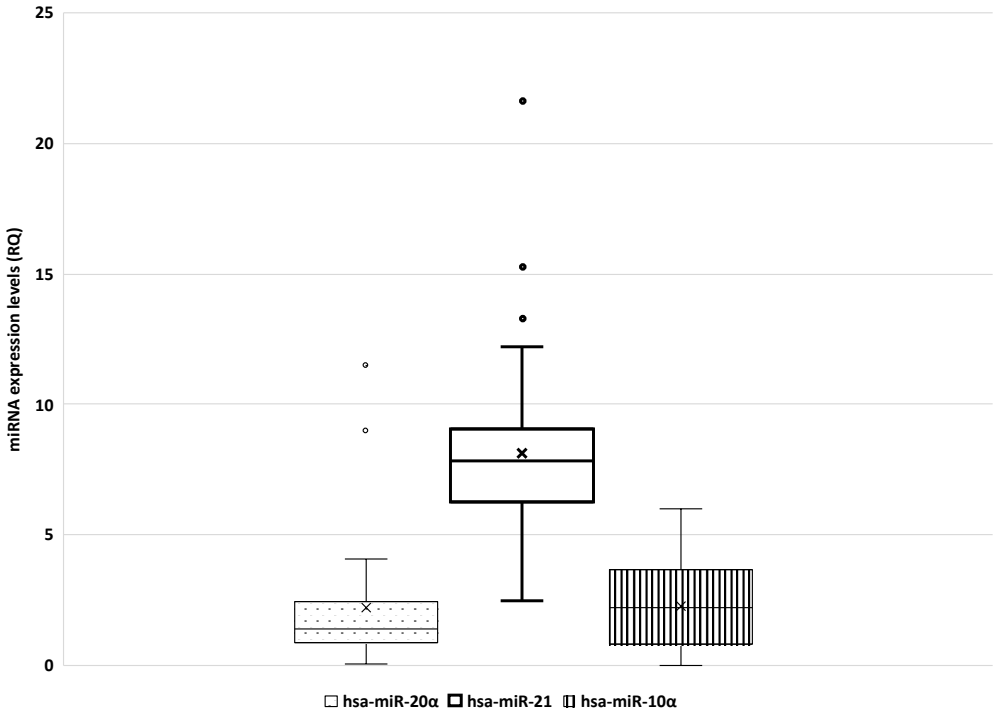
Στα αυτά πλαίσια, επιβεβαιώνοντας την επιλογή του SNORD96α ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς, η διάμεση τιμή Cq βρέθηκε να ισούται προς 23,22 ± 4,90 στα FFPE δείγματά μας, σε συμφωνία με τις τιμές από την Qiagen για τον εγκεφαλικό ανθρώπινο ιστό.



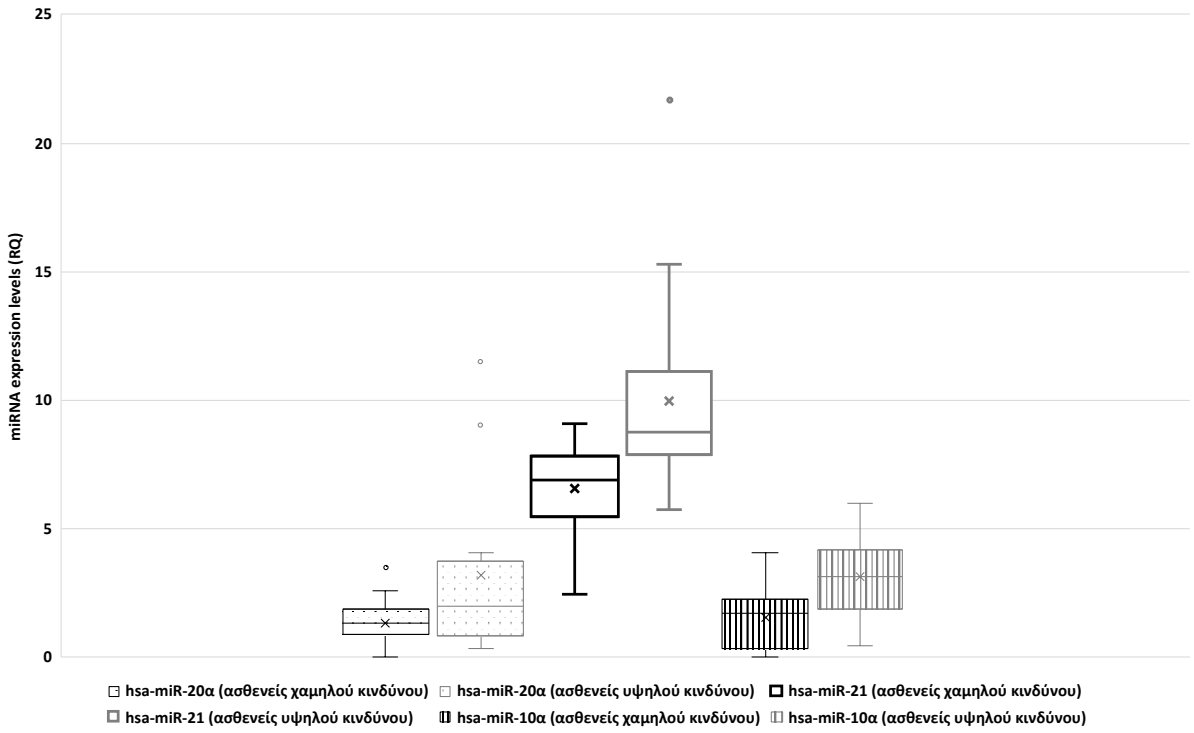
Εικόνα 8: *Ct τιμές για το SNORD96a σε ποικίλους ανθρώπινους ιστούς (200ng) με χρήση των miSCript II RT kit και miSCript HiSpec ρυθμιστικού διαλύματος, όπως στην παρούσα εργασία*

Στο ακόλουθο θηκόγραμμα (Εικόνα 9), συνοψίζονται τα επίπεδα έκφρασης για τα hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α για το σύνολο των ασθενών της μελέτης (οι έντονες

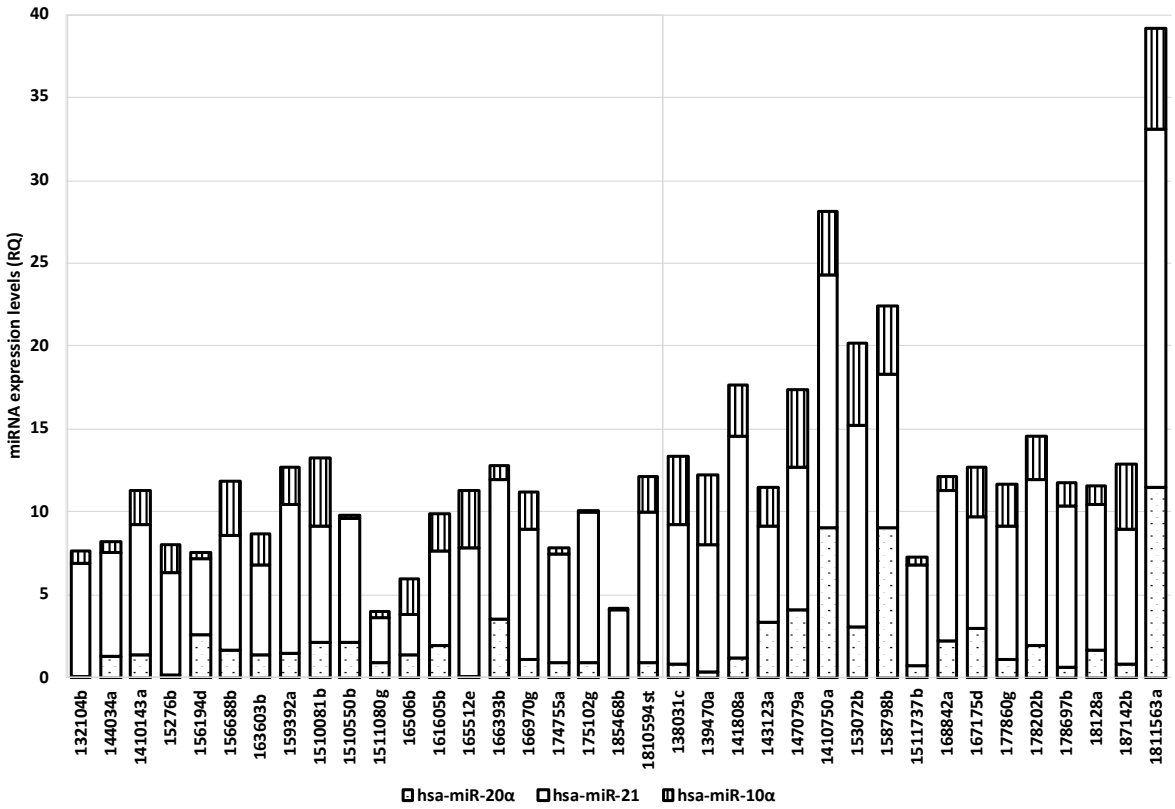
οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στη διάμεση τιμή για καθένα από τα miRNA υπό μελέτη). Όπως διαπιστώνεται, τόσο από τον Πίνακα 4, όσο και από την Εικόνα 9, η έκφραση του hsa-miR-21 υπερτερεί, συνολικά και συγκριτικά με εκείνη των hsa-miR-20α και hsa-miR-10α. Στην Εικόνα 10, αντίστοιχα, συνοψίζονται τα επίπεδα έκφρασης για τα hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α για τους ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα υψηλού κινδύνου (ολική επιβίωση < 12 μήνες), έναντι εκείνων χαμηλού κινδύνου (ολική επιβίωση > 12 μήνες). Η miRNA υπογραφή φαίνεται ικανή διαχωρισμού των ομάδων.



Εικόνα 9: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α στους ασθενείς της μελέτης*



Εικόνα 10: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α στους ασθενείς της μελέτης (υψηλού έναντι χαμηλού κινδύνου)*



Εικόνα 11: *Θηκόγραμμα της έκφρασης των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α ανά ασθενή της μελέτης (η γκρίζα ζώνη αντιστοιχεί στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου με ολική επιβίωση >12 μηνών)*

Ανά ασθενή (Εικόνα 11), απεικονίζεται η διαφορική έκφραση των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α, ενδεικτικά της χρηστικότητάς τους για την χαρτογράφηση της ετερογένειας του κλινικού φαινότυπου.

4. Συζήτηση

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ανήκει στους πρωτοπαθείς όγκους του νευρικού συστήματος και επιδεικνύει υψηλή επιθετικότητα, τόσο σε ιστολογικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο. Παρά το γεγονός ότι η τεχνολογική ανάπτυξη και οι θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν σημειώσει άλματα προόδου στον κλάδο της ογκολογίας, η δυσχέρεια ως προς την αποσαφήνιση και κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, καθώς και η έντονη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο των ασθενών, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη βέλτιστης διαστρωμάτωσης των ασθενών, με το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα να παραμένει χαμηλότερο του 20% (Mazurek et al., 2020).

Η διαστρωμάτωση των ασθενών (ή διαφορετικά, η ταυτοποίηση υπο-ομάδων ασθενών με κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με επιλεγμένες βιοχημικές, μοριακές ή απεικονιστικές μεθόδους), υπηρετώντας την εξατομικευμένη διαχείριση της νόσου, αποσκοπεί στην εκτίμηση του κινδύνου, κατευθύνοντας τη θεραπευτική στρατηγική που τελικά θα οδηγήσει στο μέγιστο κλινικό όφελος.

Σύμφωνα με πλήθος δεδομένα που επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή των miRNA σε ποικίλες φυσιολογικές, αλλά και παθολογικές διεργασίες, υποδεικνύεται η χρήση των miRNA ως διαγνωστικοί, προγνωστικοί ή προβλεπτικοί βιοδείκτες σε ποικίλες ασθένειες, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Χάρη στην πρόοδο των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, σε αυτά τα πλαίσια, έχει συλλεχθεί ένα αξιόλογο εύρος μοριακών δεδομένων που αφορούν τα πρότυπα έκφρασης miRNA σε διάφορους τύπους καρκίνου και αποσκοπούν στη συσχέτισή τους με την επιβίωση και την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν τα hsa-miR-20a**,** hsa-miR-21 και hsa-miR-10a ως miRNA υπογραφή προς διαστρωμάτωση των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.

Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης και εξόρυξης δεδομένων και κειμένου, αναδείχθηκαν τα πιο σημαντικά μόρια-στόχοι και σηματοδοτικά μονοπάτια των τριών miRNA υπό μελέτη, υποδεικνύοντας τον καίριο ρόλο τους στην παθοφυσιολογία της νόσου και τη συμμετοχή τους στην ετερογένεια του κλινικού φαινότυπου. Ενδεικτικά, οι ερευνητικές εργασίες, που επιβίωσαν των αυστηρών κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού, προσεγγίζουν, υπό διαφορετικό πρίσμα, η κάθε μία, τα hsa-miR-20a**,** hsa-miR-21 και hsa-miR-10a. Ορισμένες εργασίες, έτσι, επικεντρώνονται στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών, είτε με βάση πειραματικά δεδομένα ή βάσει βιοπληροφορικών αναλύσεων (Ujifuku et al., 2010, Aldaz et al., 2013, Wang et al., 2015, Liu et al., 2016, Toraih et al., 2017, Shang et al., 2018, Xu et al., 2018), ενώ άλλες εστιάζουν στα πρότυπα έκφρασης των μορίων με σκοπό τη συσχέτισή τους με την επιβίωση (Zhao et al., 2017), την πρόγνωση (Shi et al., 2015), την απόκριση στη θεραπεία (Tezcan et al., 2014) και τη διάγνωση (Lang et al., 2012, Visani et al., 2014). Η ετερογένεια, όσον αφορά το αντικείμενο των μελετών και η πληροφορία που συλλέχθηκε, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι και τα τρία miRNA διαθέτουν, τόσο ερευνητικό, όσο και κλινικό ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν μέλη miRNA υπογραφών, ποικίλου μεγέθους.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, η έκφραση των hsa-miR-20a, hsa-miR-21 και hsa-miR-10a είναι αυξημένη στην πλειοψηφία των δειγμάτων FFPE, των ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Η παρατηρούμενη διαφορική έκφραση των τριών miRNA συμφωνεί με τα πρότυπα έκφρασης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ειδικότερα το hsa-miR-21, όντας ευρέως μελετημένο στο γλοιοβλάστωμα, βρίσκεται πάντοτε υπερ-εκφρασμένο. Επίσης, αναφέρεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-20a βρίσκονται αυξημένα σε ιστούς γλοιοβλαστώματος, συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό (Henriksen et al., 2014). Αναφορικά με το hsa-miR-10a, τα επίπεδα έκφρασής του παρουσιάζονται αυξημένα στο γλοιοβλάστωμα, σε σύγκριση με τα γλοιώματα μικρότερου βαθμού κακοήθειας (Yan et

al., 2015). Σημαντικά, τα επίπεδα έκφρασης και των τριών miRNA κυμαίνονται σε παραπλήσιες τιμές, με μικρότερη αύξηση των επιπέδων έκφρασης να παρατηρείται στην περίπτωση του hsa-miR-10α, συγκριτικά με τα hsa-miR-20α καιhsa-miR-21. Η μικρότερη αύξηση στην έκφραση του hsa-miR-10α μπορεί να αποδοθεί σε ευρήματα, όπως το γεγονός πως αποτελεί στόχο των lncRNA TUSC7 (Shang et al., 2018) και lncRNA RP11-838N2.4 (Liu et al., 2016), καθώς τα επίπεδα έκφρασής του μειώνονται, όταν είναι αυξημένα των δύο lncRNA. Η παρατηρούμενη υπερέκφραση των hsa-miR-20α**,** hsa-miR-21 και hsa-miR-10α, μοναδιαία και συνολικά, αντικατοπτρίζει τη νοσηρότητα και τη δριμύτητα της νόσου, που χαρακτηρίζει τους ασθενείς.

Στην εικόνα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης των μοριακών στόχων των τριών miRNA, δηλαδή του TGFb-RII, που αποτελεί στόχος του hsa-miR-20α, του hMSH2, στόχος του hsa-miR-21 και του EphA8, στόχος του hsa-miR-10α, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων, φαινόμενο που μπορεί να εξηγηθεί από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων miRNA. Τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζονται από την τρέχουσα βιβλιογραφία, καθώς ο λειτουργικός ρόλος του hsa-miR-20α, όταν υπερεκφράζεται, με βάση τους επιβεβαιωμένους του στόχους, TGFb-RII και CTGF, σχετίζεται με αυξημένη αγγειογένεση και κυτταρική αύξηση (Henriksen et al., 2014). Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα του hsa-miR-21 έχουν συσχετιστεί με την αυξημένη κυτταρική διήθηση και τη μειωμένη ακτινοευαισθησία (Henriksen et al., 2014, Toraih et al., 2017). Αναφορικά με τον λειτουργικό ρόλο του hsa-miR-10α, η υπερέκφρασή του συνδέεται με την ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης, ρυθμίζοντας την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή μέσω στόχευσης του Eph8 (Yan et al., 2015).

Η ανάλυση των ευρημάτων της εργασίας ανέδειξε την τάση αυξανόμενων επιπέδων έκφρασης των miRNA σε ασθενείς με χαμηλή ολική επιβίωση, ανεξάρτητα από άλλες

παραμέτρους που σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση (ενδεικτικά, *MGMT* μεθυλίωση). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι αυτή η 3-miRNA υπογραφή, δίνει τη δυνατότητα διάκρισης των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα σε δύο διακριτές ομάδες, υψηλού και χαμηλού κινδύνου, αντικατοπτρίζοντας παράλληλα τους μοριακούς μηχανισμούς, που δυνητικά είναι υπαίτιοι της δυσμενούς έκβασης.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, παρουσιάζονται ανάλογες υπογραφές miRNA που συσχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Στη μελέτη της Barbano και συν. (Barbano et al., 2014) τα hsa-miR-21 και hsa-miR-210 συσχετίστηκαν με χαμηλά ποσοστά ολικής επιβίωσης, ωστόσο δεν προτάθηκαν ως βιοδείκτες διαστρωμάτωσης των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, αλλά ως εργαλείο για τη διάκριση του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος από τα χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα. Στον αντίποδα, η μελέτη των Li και συν. (Li et al., 2014) προτείνει μία προγνωστική υπογραφή 5-miRNA, που αφορά μόνο τον μεσεγχυματικό υπότυπο του γλοιοβλαστώματος, ενώ πρόσφατα αναδείχθηκε μία υπογραφή 23-miRNA, ειδική για την *IDH-1* μετάλλαξη, ενδεικτική ευμενούς πρόγνωσης σε ασθενείς με IDH-αγρίου τύπου. Η μελέτη των Cheng και συν. (Cheng et al., 2015), παρόμοια, προτείνει μία υπογραφή 5-miRNA, που υποδηλώνει τον κίνδυνο για τους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, που φέρουν μεθυλίωση του εκκινητή στο *MGMT.* Συγκρίσιμες εργασίες με την παρούσα μελέτη αποτελούν εκείνες των Zhang και συν. (Zhang et al., 2013), Sana και συν. (Sana et al., 2014), Hermansen και συν. (Hermansen et al., 2017), Yuan και συν. (Yuan et al., 2017) ή Srinivasan και συν. (Srinivasan et al., 2011), όπου γίνεται διερεύνηση miRNA υπογραφών για τη διαστρωμάτωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, ανεξάρτητα από άλλους προγνωστικούς παράγοντες. Μέχρι σήμερα δε συναντάται στη βιβλιογραφία υπογραφή για τη διαστρωμάτωση ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, αποτελούμενη από τα τρία miRNA που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (hsa-miR-20α, hsa-miR-21, hsa-

miR-10α). Παράλληλα, πλεονέκτημα της τρέχουσας υπογραφής συνιστά το χαμηλό επίπεδο πολυπλοκότητας (μικρός αριθμός μορίων miRNA), καθώς αποτελείται από τρία μόρια miRNA, με αποτέλεσμα η πειραματική διερεύνησή της να είναι εφικτή στην κλινική πράξη.

Από τεχνικής άποψης, η RT-PCR αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση miRNA, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και επιτρέπει την ανίχνευση πολύ χαμηλών επιπέδων έκφρασης (Schwarzenbach et al., 2015). Τα δείγματα FFPE επιλέχθηκαν, στα αυτά πλαίσια, καθώς αναφέρεται ότι αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για τη διεξαγωγή μελέτης της έκφρασης miRNA (Visani et al., 2014). Σημαντικά, έχει παρατηρηθεί ότι δε βρίσκονται διαφορές στην έκφραση των miRNA σε ιστό (fresh/frozen) και FFPE (Henriksen et al., 2014). Τέλος, επισημαίνεται ότι θα ήταν προτιμότερο η μελέτη να περιελάμβανε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, ωστόσο επιλέξαμε μία ομοιογενή κοορτή δειγμάτων, καθώς όλοι οι ασθενείς ήταν κάτοικοι της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, χειρουργήθηκαν από την ίδια χειρουργική ομάδα και η διάγνωση αφορούσε πρωτοπαθείς όγκους γλοιοβλαστώματος.

Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των miRNA είναι ακριβή και επαναλήψιμα, όπως φανερώνεται από τη συμφωνία των παρόντων ευρημάτων με τα πρόδρομα, υποδηλώνει ότι η διαδικασία είναι κλινικά εφαρμόσιμη. Η μεταβολομική πρόδρομη ανάλυση υποστήριξε, τόσο την επιλογή των hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α, όσο και των πρωτεϊνικών στόχων που προσδιορίστηκαν ανοσο-ιστοχημικά, ενώ ανέδειξε την κλινική ετερογένεια της οποίας είναι εκφραστής η εν λόγω miRNA υπογραφή. Οι μεταβολίτες, ας θυμηθούμε, αποτελούν άμεση υπογραφή της βιοχημικής κατάστασης και η μελέτη του μεταβότυπου συνιστά μία προσέγγιση αρκετά ελπιδοφόρα όσο αφορά τη διάγνωση και την πρόγνωση.

5. Συμπεράσματα-Μελλοντικές Προοπτικές

Συνοψίζοντας, στα ευρήματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των hsa-miR-20a, hsa-miR-21 και hsa-miR-10a σε δείγματα FFPE γλοιοβλαστώματος, καθώς και υποέκφραση των TGFb-RII, hMSH2 και EphA8, που αποτελούν στόχους των miRNA, αντίστοιχα. Κατά τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miRNA με τη συνολική επιβίωση των ασθενών, δόθηκε η δυνατότητα διάκρισής τους σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να υποδηλώνουν δυσμενή πρόγνωση. Συμπερασματικά, η υπογραφή hsa-miR-20α, hsa-miR-21 και hsa-miR-10α, βασιζόμενη στο μοριακό υπόβαθρο της νόσου, μπορεί να συμβάλλει στη διαστρωμάτωση ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

Μελλοντικά βήματα για την επαλήθευση της συμβολής της υπογραφής στη διαστρωμάτωση των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, αποτελεί ο ανεξάρτητος έλεγχος εγκυρότητας της υπογραφής σε δεδομένα miRNA ασθενών που ανήκουν σε ανεξάρτητη κοορτή γλοιοβλαστώματος από τη βάση δεδομένων TCGA. Επιπροσθέτως, όπως φάνηκε σε πρόδρομα πειράματα σε δείγματα-ορού ασθενών με γλοιοβλάστωμα, ο μεταβότυπος ανά ορό ασθενή συνδέεται με την ετερογένεια της νόσου και τη συνολική επιβίωση (αντι-αποπτωτικοί μεταβότυποι και μεταβότυποι που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σχετίστηκαν με μειωμένη ολική επιβίωση). Παράλληλα, η περαιτέρω μελέτη του πρωτεόματος εκτιμάται πως όχι μόνο θα επικυρώσει μηχανιστικά την εν λόγω miRNA υπογραφή, αλλά και θα οδηγήσει στην κατανόηση και ανάδειξη μοριακών στόχων και μονοπατιών, ικανών να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους και τελικά, την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για το γλοιοβλάστωμα.

6. Βιβλιογραφία

Ahmed KA and Chinnaiyan P. (2014) Applying metabolomics to understand the aggressive phenotype and identify novel therapeutic targets in glioblastoma. Metabolites 4, 740-750.
Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Skog J, Nakano I, Pingle S, et al. (2013) MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. PloS one 8,
Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G and von Deimling A. (2015) Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta neuropathologica 129, 829-848.
Aldaz B, Sagardoy A, Nogueira L, Guruceaga E, Grande L, Huse JT, et al. (2013) Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. PloS one 8,
Alifieris C and Trafalis DT. (2015) Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacology & therapeutics 152, 63-82.
Altman R. (2017) Artificial intelligence (AI) systems for interpreting complex medical datasets. Clinical Pharmacology & Therapeutics 101, 585-586.
Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, et al. (2017) Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: a review. Biomedicine & Pharmacotherapy 92, 681-689.
Areeb Z, Stylli SS, Koldej R, Ritchie DS, Siegal T, Morokoff AP, et al. (2015) MicroRNA as potential biomarkers in Glioblastoma. Journal of neuro-oncology 125, 237-248.
Barbano R, Palumbo O, Pasculli B, Galasso M, Volinia S, D'Angelo V, et al. (2014) A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. PloS one 9, e108950.
Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N and Schaffer M. (2017) Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. Current medicinal chemistry 24, 3002-3009.
Bekri S. (2016) The role of metabolomics in precision medicine. Expert Review of Precision Medicine and Drug Development 1, 517-532.
Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D and Mulholland P. (2018) Harnessing the immune system in glioblastoma. British journal of cancer 119, 1171-1181.
Bustin S. (2002) INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology 29, 23-39.
Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 2999-3004.
Chan Y and Walmsley RP. (1997) Learning and understanding the Kruskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. Physical therapy 77, 1755-1761.
Chen W and Silverman DH (2008). Advances in evaluation of primary brain tumors. Seminars in nuclear medicine, Elsevier.
Cheng W, Ren X, Cai J, Zhang C, Li M, Wang K, et al. (2015) A five-miRNA signature with prognostic and predictive value for MGMT promoter-methylated glioblastoma patients. Oncotarget 6, 29285.
Cheng W-Y, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P and Anastassiou D. (2012) A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. PloS one 7,
Ciafre S, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C-G, Sabatino G, et al. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochemical and biophysical research communications 334, 1351-1358.
Codo P, Weller M, Meister G, Szabo E, Steinle A, Wolter M, et al. (2014) MicroRNA-mediated down-regulation of NKG2D ligands contributes to glioma immune escape. Oncotarget 5, 7651.
Croce CM and Calin GA. (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell 122, 6-7.
Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 462, 739-744.
Dang L, Yen K and Attar E. (2016) IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. Annals of Oncology 27, 599-608.

Davis ME. (2016) Glioblastoma: overview of disease and treatment. Clinical journal of oncology nursing 20, S2.
de Planell-Saguer M and Rodicio MC. (2013) Detection methods for microRNAs in clinic practice. Clinical biochemistry 46, 869-878.
Delen E, Doganlar O, Doganlar ZB and Delen O. (2020) Inhibition of the Invasion of Human Glioblastoma U87 Cell Line by Ruxolitinib: A Molecular Player of miR-17 and miR-20a Regulating JAK/STAT Pathway. Turkish neurosurgery 30, 182-189.
Faraldi M, Gomarasca M, Banfi G and Lombardi G (2018). Free circulating miRNAs measurement in clinical settings: the still unsolved issue of the normalization. Advances in clinical chemistry, Elsevier. **87:** 113-139.
Faraldi M, Gomarasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G and Lombardi G. (2019) Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. Scientific reports 9, 1-13.
Ferraro A, Kontos CK, Boni T, Bantounas I, Siakouli D, Kosmidou V, et al. (2014) Epigenetic regulation of miR-21 in colorectal cancer: ITGB4 as a novel miR-21 target and a three-gene network (miR-21-ITGB4-PDCD4) as predictor of metastatic tumor potential. Epigenetics 9, 129-141.
Figueroa JM and Carter BS. (2017) Detection of glioblastoma in biofluids. Journal of neurosurgery 129, 334-340.
Floyd DH, Zhang Y, Dey BK, Kefas B, Breit H, Marks K, et al. (2014) Novel anti-apoptotic microRNAs 582-5p and 363 promote human glioblastoma stem cell survival via direct inhibition of caspase 3, caspase 9, and Bim. PloS one 9,
Gimple RC, Bhargava S, Dixit D and Rich JN. (2019) Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. Genes & development 33, 591-609.
Goryaynov S, Potapov A, Ignatenko M, Zhukov V, Protskiy S, Zakharova N, et al. (2015) Glioblastoma metastases: a literature review and a description of six clinical observations. Zhurnal voprosy neirokhirurgii imeni NN Burdenko 79, 33-43.
Guo P, Lan J, Ge J, Nie Q, Guo L, Qiu Y, et al. (2014) MiR-26a enhances the radiosensitivity of glioblastoma multiforme cells through targeting of ataxia–telangiectasia mutated. Experimental cell research 320, 200-208.
Gzell C, Back M, Wheeler H, Bailey D and Foote M. (2017) Radiotherapy in glioblastoma: the past, the present and the future. Clinical Oncology 29, 15-25.
Haddadi N, Lin Y, Travis G, Simpson AM, Nassif NT and McGowan EM. (2018) PTEN/PTENP1:'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. Molecular cancer 17, 37.
Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM and Simjee SU. (2017) Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP 18, 3.
Hau E, Shen H, Clark C, Graham PH, Koh ES and L. McDonald K. (2016) The evolving roles and controversies of radiotherapy in the treatment of glioblastoma. Journal of medical radiation sciences 63, 114-123.
Hauke J and Kossowski T. (2011) Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data. Quaestiones geographicae 30, 87-93.
He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature 447, 1130-1134.
Henriksen M, Johnsen KB, Olesen P, Pilgaard L and Duroux M. (2014) MicroRNA expression signatures and their correlation with clinicopathological features in glioblastoma multiforme. Neuromolecular medicine 16, 565-577.
Hermansen SK, Sørensen MD, Hansen A, Knudsen S, Alvarado AG, Lathia JD, et al. (2017) A 4-miRNA signature to predict survival in glioblastomas. PloS one 12, e0188090.
Holmes E, Wilson ID and Nicholson JK. (2008) Metabolic phenotyping in health and disease. Cell 134, 714-717.

Hottinger AF, Pacheco P and Stupp R. (2016) Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. Neuro-oncology 18, 1338-1349.
Huang S-w, Zhong L and Shi J. (2018) MicroRNAs as biomarkers for human glioblastoma: progress and potential. Acta pharmacologica Sinica 39, 1405-1413.
Jia Z, Wang K, Zhang A, Wang G, Kang C, Han L, et al. (2013) miR-19a and miR-19b overexpression in gliomas. Pathology & Oncology Research 19, 847-853.
Kantae V, Krekels EH, Van Esdonk MJ, Lindenburg P, Harms AC, Knibbe CA, et al. (2017) Integration of pharmacometabolomics with pharmacokinetics and pharmacodynamics: towards personalized drug therapy. Metabolomics 13, 9.
Kim MM, Umemura Y and Leung D. (2018) Bevacizumab and glioblastoma: Past, present, and future directions. The Cancer Journal 24, 180-186.
Kloosterman WP and Plasterk RH. (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. Developmental cell 11, 441-450.
Knudsen ES and Wang JY. (2010) Targeting the RB-pathway in cancer therapy. Clinical Cancer Research 16, 1094-1099.
Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, et al. (2019) Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. Neuropathology and applied neurobiology 45, 108-118.
Kratochwil C, Combs SE, Leotta K, Afshar-Oromieh A, Rieken S, Debus J, et al. (2014) Intra-individual comparison of 18F-FET and 18F-DOPA in PET imaging of recurrent brain tumors. Neuro-oncology 16, 434-440.
Lang M-F, Yang S, Zhao C, Sun G, Murai K, Wu X, et al. (2012) Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells. PloS one 7,
Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL and Rich JN. (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. Genes & development 29, 1203-1217.
Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, et al. (2019) Molecular targeted therapy of glioblastoma. Cancer treatment reviews 101896.
Lee YS and Dutta A. (2009) MicroRNAs in cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 4, 199-227.
Li H and Yang BB. (2012) Stress response of glioblastoma cells mediated by miR-17-5p targeting PTEN and the passenger strand miR-17-3p targeting MDM2. Oncotarget 3, 1653.
Li R, Gao K, Luo H, Wang X, Shi Y, Dong Q, et al. (2014) Identification of intrinsic subtype-specific prognostic microRNAs in primary glioblastoma. Journal of experimental & clinical cancer research 33, 9.
Lin J, Teo S, Lam DH, Jeyaseelan K and Wang S. (2012) MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. Cell death & disease 3, e398-e398.
Lin S and Gregory RI. (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nature reviews cancer 15, 321-333.
Liu A, Zhao H, Sun B, Han X, Zhou D, Cui Z, et al. (2020) A predictive analysis approach for paediatric and adult high-grade glioma: miRNAs and network insight. Annals of Translational Medicine 8,
Liu Y, Liang Y and Wishart D. (2015) PolySearch2: a significantly improved text-mining system for discovering associations between human diseases, genes, drugs, metabolites, toxins and more. Nucleic acids research 43, W535-W542.
Liu Y, Xu N, Liu B, Huang Y, Zeng H, Yang Z, et al. (2016) Long noncoding RNA RP11-838N2. 4 enhances the cytotoxic effects of temozolomide by inhibiting the functions of miR-10a in glioblastoma cell lines. Oncotarget 7, 43835.
Liu Y-S, Lin H, Lai S, Huang C, Huang B, Chen P, et al. (2017) MiR-181b modulates EGFR-dependent VCAM-1 expression and monocyte adhesion in glioblastoma. Oncogene 36, 5006-5022.

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. Cancer research 67, 1424-1429.
Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E and Wong ET. (2011) The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. Journal of neuro-oncology 105, 261-273.
Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, et al. (2010) Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. Brain pathology 20, 539-550.
Mann J, Ramakrishna R, Magge R and Wernicke AG. (2018) Advances in radiotherapy for glioblastoma. Frontiers in neurology 8, 748.
Masoudi MS, Mehrabian E and Mirzaei H. (2018) MiR-21: A key player in glioblastoma pathogenesis. Journal of cellular biochemistry 119, 1285-1290.
Mazurek M, Litak J, Kamieniak P, Osuchowska I, Maciejewski R, Roliński J, et al. (2020) Micro RNA Molecules as Modulators of Treatment Resistance, Immune Checkpoints Controllers and Sensitive Biomarkers in Glioblastoma Multiforme. International Journal of Molecular Sciences 21, 1507.
Mehta M, Wen P, Nishikawa R, Reardon D and Peters K. (2017) Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients. Critical reviews in oncology/hematology 111, 60-65.
Melo SA and Esteller M. (2011) Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. FEBS letters 585, 2087-2099.
Miles A and Loughlin M. (2011) Models in the balance: evidence-based medicine versus evidence-informed individualized care. Journal of Evaluation in Clinical Practice 17, 531-536.
Mitani Y, Roberts DB, Fatani H, Weber RS, Kies MS, Lippman SM, et al. (2013) MicroRNA profiling of salivary adenoid cystic carcinoma: association of miR-17-92 upregulation with poor outcome. PloS one 8,
Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M and Duroux M. (2013) A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. Molecular neurobiology 47, 131-144.
Mooney J, Bernstock JD, Ilyas A, Ibrahim A, Yamashita D, Markert JM, et al. (2019) Current approaches and challenges in the molecular therapeutic targeting of glioblastoma. World neurosurgery
Morisse MC, Jouannet S, Dominguez-Villar M, Sanson M and Idbaih A. (2018) Interactions between tumor-associated macrophages and tumor cells in glioblastoma: unraveling promising targeted therapies. Expert review of neurotherapeutics 18, 729-737.
Neavin D, Kaddurah-Daouk R and Weinshilboum R. (2016) Pharmacometabolomics informs pharmacogenomics. Metabolomics 12, 121.
Ng WL, Yan D, Zhang X, Mo Y-Y and Wang Y. (2010) Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. DNA repair 9, 1170-1175.
Niyazi M, Pitea A, Mittelbronn M, Steinbach J, Sticht C, Zehentmayr F, et al. (2016) A 4-miRNA signature predicts the therapeutic outcome of glioblastoma. Oncotarget 7, 45764.
Ohgaki H and Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. The American journal of pathology 170, 1445-1453.
Omuro A and DeAngelis LM. (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. Jama 310, 1842-1850.
Ornelas AS, Porter AB, Sharma A, Knox MG, Marks LA, Wingerchuk DM, et al. (2019) What is the Role of Tumor-treating Fields in Newly Diagnosed Glioblastoma? The neurologist 24, 71-73.
Ozdemir-Kaynak E, Qutub AA and Yesil-Celiktas O. (2018) Advances in glioblastoma multiforme treatment: new models for nanoparticle therapy. Frontiers in physiology 9, 170.
Papagiannakopoulos T, Shapiro A and Kosik KS. (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. Cancer research 68, 8164-8172.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer cell 9, 157-173.
Rajakulendran N, Rowland KJ, Selvadurai HJ, Ahmadi M, Park NI, Naumenko S, et al. (2019) Wnt and Notch signaling govern self-renewal and differentiation in a subset of human glioblastoma stem cells. Genes & development 33, 498-510.
Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X and Holland EC. (2003) Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. Molecular cell 12, 889-901.
Rand RW, Kreitman RJ, Patronas N, Varricchio F, Pastan I and Puri RK. (2000) Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma. Clinical Cancer Research 6, 2157-2165.
Reni M, Mazza E, Zanon S, Gatta G and Vecht CJ. (2017) Central nervous system gliomas. Critical reviews in oncology/hematology 113, 213-234.
Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. Nature 468, 824-828.
Saadatpour L, Fadaee E, Fadaei S, Mansour RN, Mohammadi M, Mousavi S, et al. (2016) Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. Cancer gene therapy 23, 415-418.
Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, Moreno-Cugnon L, Ruiz I, Villanua J, et al. (2019) Liquid biopsy in glioblastoma: opportunities, applications and challenges. Cancers 11, 950.
Sana J, Radova L, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, et al. (2014) Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. Carcinogenesis 35, 2756-2762.
Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio IIC, et al. (2012) D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. Genes & development 26, 2038-2049.
Sasmita AO, Wong YP and Ling APK. (2018) Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology 14, 40-51.
Schiffer D, Annovazzi L, Casalone C, Corona C and Mellai M. (2019) Glioblastoma: microenvironment and niche concept. Cancers 11, 5.
Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G and Pantel K. (2015) Data normalization strategies for microRNA quantification. Clinical chemistry 61, 1333-1342.
Seyhan AA and Carini C. (2019) Are innovation and new technologies in precision medicine paving a new era in patients centric care? Journal of translational medicine 17, 114.
Shang C, Tang W, Pan C, Hu X and Hong Y. (2018) Long non-coding RNA TUSC7 inhibits temozolomide resistance by targeting miR-10a in glioblastoma. Cancer chemotherapy and pharmacology 81, 671-678.
Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioke J, Kedir H, Dusmatova S, et al. (2016) MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. Cancer medicine 5, 1917-1946.
Shi R, Wang P-Y, Li X-Y, Chen J-X, Li Y, Zhang X-Z, et al. (2015) Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. Oncotarget 6, 26971.
Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Palmer JD, et al. (2017) Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. Chin Clin Oncol 6, 40.
Siegal T (2016). Clinical relevance of prognostic and predictive molecular markers in gliomas. Advances and technical standards in neurosurgery, Springer: 91-108.
Silantyev AS, Falzone L, Libra M, Gurina OI, Kardashova KS, Nikolouzakis TK, et al. (2019) Current and future trends on diagnosis and prognosis of glioblastoma: from molecular biology to proteomics. Cells 8, 863.

Snyderman R (2010). The role of genomics in enabling prospective health care. Essentials of Genomic and Personalized Medicine, Elsevier: 201-208.
Srinivasan S, Patric IRP and Somasundaram K. (2011) A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. PloS one 6,
Stepanenko AA and Chekhonin VP. (2018) Recent advances in oncolytic virotherapy and immunotherapy for glioblastoma: a glimmer of hope in the search for an effective therapy? Cancers 10, 492.
Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P, Iliev B, Enchev Y and Tonchev AB. (2018) Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. Medical Oncology 35, 27.
Stupp R, Brada M, Van Den Bent M, Tonn J-C and Pentheroudakis G. (2014) High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology 25, iii93-iii101.
Stupp R, Tonn J-C, Brada M, Pentheroudakis G and Group EGW. (2010) High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology 21, v190-v193.
Subramanyam M and Goyal J. (2016) Translational biomarkers: from discovery and development to clinical practice. Drug Discovery Today: Technologies 21, 3-10.
Tezcan G, Tunca B, Bekar A, Preusser M, Berghoff AS, Egeli U, et al. (2014) microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells. Cellular and molecular neurobiology 34, 679-692.
Tian T, Mingyi M, Qiu X and Qiu Y. (2016) MicroRNA-101 reverses temozolomide resistance by inhibition of GSK3β in glioblastoma. Oncotarget 7, 79584.
Tian T, Wang J and Zhou X. (2015) A review: microRNA detection methods. Organic & biomolecular chemistry 13, 2226-2238.
Tompa M, Kalovits F, Nagy A and Kalman B. (2018) Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. Neuromolecular medicine 20, 437-451.
Toraih EA, Aly NM, Abdallah HY, Al-Qahtani SA, Shaalan AA, Hussein MH, et al. (2017) MicroRNA–target cross-talks: Key players in glioblastoma multiforme. Tumor Biology 39, 1010428317726842.
Tosoni A, Franceschi E, Poggi R and Brandes AA. (2016) Relapsed glioblastoma: treatment strategies for initial and subsequent recurrences. Current treatment options in oncology 17, 49.
Ujifuku K, Mitsutake N, Takakura S, Matsuse M, Saenko V, Suzuki K, et al. (2010) MiR-195, miR-455-3p and miR-10a∗ are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. Cancer letters 296, 241-248.
Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M and Sysa P. (2014) Glioblastoma multiforme–an overview. Contemporary oncology 18, 307.
Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer cell 17, 98-110.
Visani M, De Biase D, Marucci G, Cerasoli S, Nigrisoli E, Reggiani MLB, et al. (2014) Expression of 19 microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I–III. Molecular oncology 8, 417-430.
Von Neubeck C, Seidlitz A, Kitzler H, Beuthien-Baumann B and Krause M. (2015) Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs. The British journal of radiology 88, 20150354.
Wang J, Wang A, He H, She X, He Y, Li S, et al. (2019) Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. Biomedicine & Pharmacotherapy 112, 108692.
Wang Z, Wang B, Shi Y, Xu C, Xiao H, Ma L, et al. (2015) Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. Oncogene 34, 1407-1419.

Wei J, Qi X, Zhan Q, Zhou D, Yan Q, Wang Y, et al. (2015) miR-20a mediates temozolomide-resistance in glioblastoma cells via negatively regulating LRIG1 expression. Biomedicine & Pharmacotherapy 71, 112-118.
Weller M, Le Rhun E, Preusser M, Tonn J-C and Roth P. (2019) How we treat glioblastoma. ESMO open 4, e000520.
Weller M, Van Den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. (2017) European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. The lancet oncology 18, e315-e329.
Wilcox JA, Ramakrishna R and Magge R. (2018) Immunotherapy in glioblastoma. World neurosurgery 116, 518-528.
Wirsching H-G, Galanis E and Weller M (2016). Glioblastoma. Handbook of clinical neurology, Elsevier. **134:** 381-397.
Wong ML and Medrano JF. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39, 75-85.
Xu Q, Ahmed AK, Zhu Y, Wang K, Lv S, Li Y, et al. (2018) Oncogenic MicroRNA-20a is downregulated by the HIF-1α/c-MYC pathway in IDH1 R132H-mutant glioma. Biochemical and biophysical research communications 499, 882-888.
Yan C, Kong X, Gong S, Liu F and Zhao Y. (2020) Recent advances of the regulation roles of MicroRNA in glioblastoma. International Journal of Clinical Oncology 1-8.
Yan Y, Wang Q, Yan X-L, Zhang Y, Li W, Tang F, et al. (2015) miR-10a controls glioma migration and invasion through regulating epithelial–mesenchymal transition via EphA8. FEBS letters 589, 756-765.
Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H, et al. (2018) Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. Cellular & molecular immunology 15, 737-739.
Yu W, Liang S and Zhang C. (2018) Aberrant miRNAs regulate the biological hallmarks of glioblastoma. Neuromolecular medicine 20, 452-474.
Yuan Y, Zhang H, Liu X, Lu Z, Li G, Lu M, et al. (2017) MicroRNA signatures predict prognosis of patients with glioblastoma multiforme through the cancer genome atlas. Oncotarget 8, 58386.
Yue X, Wang P, Xu J, Zhu Y, Sun G, Pang Q, et al. (2012) MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A. Oncology reports 27, 1200-1206.
Zachariah MA, Oliveira-Costa JP, Carter BS, Stott SL and Nahed BV. (2018) Blood-based biomarkers for the diagnosis and monitoring of gliomas. Neuro-oncology 20, 1155-1161.
Zhang Q, Wang Q, Sun W, Gao F, Liu L, Cheng L, et al. (2018) Change of circulating and tissue-based miR-20a in human cancers and associated prognostic implication: a systematic review and meta-analysis. BioMed research international 2018,
Zhang W, Zhang J, Yan W, You G, Bao Z, Li S, et al. (2013) Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme. Cancer 119, 814-824.
Zhang Z, Tang H, Wang Z, Zhang B, Liu W, Lu H, et al. (2011) MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. Molecular cancer 10, 124.
Zhao H, Shen J, Hodges TR, Song R, Fuller GN and Heimberger AB. (2017) Serum microRNA profiling in patients with glioblastoma: a survival analysis. Molecular cancer 16, 59.
Zhou D, Wan Y, Xie D, Wang Y, Wei J, Yan Q, et al. (2015) DNMT1 mediates chemosensitivity by reducing methylation of miRNA-20a promoter in glioma cells. Experimental & molecular medicine 47, e182-e182.