



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Nikola M. Jovanović

Analiza odabranih markera glioblastoma

Doktorska disertacija

Niš, 2021



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Nikola M. Jovanović

Analysis of selected glioblastoma markers

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Др Татјана Митровић
Редовни професор на Департману за биологију и екологију
Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов:

Анализа одабраних маркера глиобластома

Резиме:

Глиобластом (GBM) представља најагресивнији и најинвазивнији облик дифузних глиома. Најчешће се јавља као примарни тумор мозга, али може настати и прогресијом од астроцитома нижег степена малигнитета (секундарни глиобластом, око 10% GBM). Његове хистопатолошке препарате карактерише изузетна морфолошка разноврсност. Захваљујући развоју молекуларне дијагностике постигнут је значајан напредак у расветљавању етиологије ових тумора и дефинисању успешнијих видова индивидуализованих терапијских процедура. Циљ овог истраживања представљала је процена статуса мутације гена за изоцитрат-дехидрогеназу 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) и статуса метилације промоторног региона гена за O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазу *MGMT* и промоторног региона гена за хумани гликопротеин хрскавице (*CHI3L1* или *YKL*) као дијагностичких, прогностичких и предикционих фактора малигнитета код српске популације GBM пацијената. Пацијенти су оперисани на Клиници за неурохирургију Универзитетског клиничког центра у Нишу у периоду од 2013. до 2019. год. Евалуација статуса мутације *IDH1/2* вршена је директним методом секвенцирања по Сангеру, док је статус метилације *MGMT* и *CHI3L1* вршен методом конвенционалне и „Real-Time“ метилационо специфичне полимеразне ланчане реакције (MSP). Старост, степен ресекције и тип примењене помоћне хемиотерапије издвојени су као независни прогностички фактори укупног времена преживљавања пацијената оболелих од глиобластома. Такође, показана је супериорност хемиотерапијског протокола базираног на TMZ у поређењу са дериватима нитрозоуреа (PCV и BCNU). Позитиван статус *IDH1-R132H* мутације утврђен је код 6.67% (3/45) пацијената. Њих је одликовало дуже време преживљавања, позитиван статус метилације *MGMT* и *CHI3L1* и млађа старосна структура. Семи-квантитативни приступи MSP методи унапредили су њену сензитивност у евалуацији статуса метилације *MGMT* и *CHI3L1*. Време преживљавања пацијената са хиперметилованим семи-квантитативним статусом метилације *MGMT* (11.25±6.55 месеци) било је значајно дуже у односу на неметиловану групу (5.93±3.62 месеци), у оквиру *IDH-wt* хомогене кохорте GBM пацијената старијих од 50 година са извршеном максималном или парцијалном ресекцијом туморске масе. Допунско одређивање статуса метилације *CHI3L1* потенцијално увећава прогностички значај статуса метилације *MGMT*, што је неопходно додатно истражити свеобухватнијом студијом.

Научна област:

Биологија

Научна
дисциплина:

Молекуларна биологија

Кључне речи:

глиобластом, прогностички фактор, *IDH1/2* mutација, метилација *MGMT*, метилација *CH3L1*, метилационо специфична полимеразна ланчана реакција (MSP), Темозоломид

УДК:

611.81:616-006.04

CERIF
класификација:

B 007; B 220; B 726; B 790; P 320; T 490.

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: PhD Tatjana Mitrović
Full professor Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title: Analysis of selected glioblastoma markers

Abstract:

Glioblastomas (GBM) represent one of the most aggressive types of diffuse glioma. Although they usually arise as primary brain tumors, in 10% of GBM cases, they develop from low-grade astrocytomas (secondary GBM). They express striking morphological heterogeneity, which is often encountered during a histopathological examination. Due to advances in molecular diagnostics, significant progress was made in understanding the pathogenesis of tumor growth and the development of personalized therapeutic protocols. The aim of this study was to evaluate the diagnostic, prognostic, and predictive properties of the selected markers -IDH1/2 (isocitrate-dehydrogenase 1 and 2) mutation and *MGMT* (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) and *CHI3L1* (Chitinase-3-like protein 1) methylation status of the promoter regions in a Serbian population of GBM patients. Patients operated on the Neurosurgery Clinic (The University Clinical Centre of Niš, Serbia) between 2013 and 2019 were included in this study. Sanger direct sequencing was used to detect the presence of *IDH1/2* mutations in samples and conventional and Real-Time methylation-specific polymerase chain reaction methods for methylation status evaluation. Age, the extent of tumor resection, and type of adjuvant chemotherapy were recognized as independent prognostic factors in GBM patients. Furthermore, results suggested the superiority of adjuvant Temozolomide over adjuvant chemotherapy with a nitrosourea-based protocol (PCV and BCNU). *IDH1* mutation was detected in 6.67% (3/45) of patients and was associated with more prolonged overall survival, younger age, and hypermethylation of the *MGMT* and *CHI3L1* promoter. Semi-quantitative MSP approaches resulted in improved detection sensitivity of *MGMT* methylation status compared to the qualitative MSP method. Among *IDH-wt* homogenous cohort of GBM patients older than 50 years with complete/partial resection of the tumor, overall survival of patients harboring highly methylated *MGMT* was significantly longer in comparison with the unmethylated group. Complementary evaluation of *CHI3L1* promoter methylation status potentially increases the prognostic value of the *MGMT* methylation status, which should be further investigated in more comprehensive research.

Scientific Field:

Biology

Scientific
Discipline:

Molecular biology

Key Words:

Glioblastoma, prognostic factor, *IDH1/2* mutation, *MGMT* promoter methylation, *CHI3L1* promoter methylation, Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), Temozolomide

UDC:

611.81:616-006.04

CERIF
Classification:

B 007; B 220; B 726; B 790; P 320; T 490.

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР :	
Идентификациони број, ИБР :	
Тип документације, ТД :	монографска
Тип записа, ТЗ :	текстуални / графички
Врста рада, ВР :	докторска дисертација
Аутор, АУ :	Никола Јовановић
Ментор, МН :	Татјана Митровић
Наслов рада, НР :	Анализа одабраних маркера глиобластома
Језик публикације, ЈП :	српски
Језик извода, ЈИ :	енглески
Земља публикавања, ЗП :	Србија
Уже географско подручје, УГП :	Србија
Година, ГО :	2021.
Издавач, ИЗ :	ауторски репринт
Место и адреса, МА :	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО : (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	8 поглавља, 222 стр., 187 цитата, 17 табела, 104 слике, 8 прилога
Научна област, НО :	Биологија
Научна дисциплина, НД :	Молекуларна биологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО :	Глиобластом, прогностички фактор, IDH1/2 mutација, метилација MGMT, метилација CH13L1, метилационо специфична полимеразна ланчана реакција (MSP), Темозоломид
УДК	611.81:616-006.04
Чува се, ЧУ :	библиотека
Важна напомена, ВН :	Ова дисертација је део истраживања у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ИИИ 41018). Експериментални део је рађен у Лабораторији за молекуларну биологију и биотехнологију Департамента за биологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу. Неке од анализа карактеризације генетичког материјала вршене су у Лабораторији за функционалну геномику и протеомику Научноистраживачког центра за биомедицину Медицинског факултета Универзитета у Нишу и Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Истраживање је изведено у сарадњи са Центром за патологију и патолошку анатомију Клиничког центра у Нишу.

Извод, ИЗ:	Глиобластом (GBM) представља најагресивнији и најинвазивнији облик дифузних глиома. Најчешће се јавља као примарни тумор мозга, али може настати и прогресијом од астроцитоме нижег степена малигнитета (секундарни глиобластом, око 10% GBM). Његове хистопатолошке препарате карактерише изузетна морфолошка разноврсност. Захваљујући развоју молекуларне дијагностике постигнут је значајан напредак у расветљавању етиологије ових тумора и дефинисању успешнијих видова индивидуализованих терапијских процедура. Циљ овог истраживања представљала је процена статуса мутације гена за изоцитрат-дехидрогеназу 1 и 2 (<i>IDH1</i> и <i>IDH2</i>) и статуса метилације промоторног региона гена за O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазу <i>MGMT</i> и промоторног региона гена за хумани гликопротеин хрскавице (<i>CHI3L1</i> или <i>YKL</i>) као дијагностичких, прогностичких и предикционих фактора малигнитета код српске популације GBM пацијената. Пацијенти су оперисани на Клиници за неурохирургију Универзитетског клиничког центра у Нишу у периоду од 2013. до 2019. год. Евалуација статуса мутације <i>IDH1/2</i> вршена је директном методом секвенцирања по Сангеру, док је статус метилације <i>MGMT</i> и <i>CHI3L1</i> вршен методом конвенционалне и „Real-Time“ метилационо специфичне полимеразне ланчане реакције (MSP). Старост, степен ресекције и тип примењене помоћне хемиотерапије издвојени су као независни прогностички фактори укупног времена преживљавања пацијената оболелих од глиобластома. Такође, показана је супериорност хемиотерапијског протокола базираног на TMZ у поређењу са дериватима нитрозоуреа (PCV и BCNU). Позитиван статус <i>IDH1-R132H</i> мутације утврђен је код 6.67% (3/45) пацијената. Њих је одликовало дуже време преживљавања, позитиван статус метилације <i>MGMT</i> и <i>CHI3L1</i> и млађа старосна структура. Семи-квантитативни приступи MSP методи унапредили су њену сензитивност у евалуацији статуса метилације <i>MGMT</i> и <i>CHI3L1</i>. Време преживљавања пацијената са хиперметилираним семи-квантитативним статусом метилације <i>MGMT</i> (11.25±6.55 месеци) било је значајно дуже у односу на неметиливану групу (5.93±3.62 месеци), у оквиру <i>IDH-wt</i> хомогене кохорте GBM пацијената старијих од 50 година са извршеном максималном или парцијалном ресекцијом туморске масе. Допунско одређивање статуса метилације <i>CHI3L1</i> потенцијално увећава прогностички значај статуса метилације <i>MGMT</i>, што је неопходно додатно истражити свеобухватнијом студијом.
Датум прихватања теме, ДП:	13.05.2019.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан: Члан: Члан: Члан, ментор:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Nikola Jovanović
Mentor, MN :	Tatjana Mitrović
Title, TI :	Analysis of selected glioblastoma markers
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2021
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 222 p., 187 references, 17 tables, 104 pictures, 8 appendixes
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Molecular biology
Subject/Key words, S/KW :	Glioblastoma, prognostic factor, <i>IDH1/2</i> mutation, <i>MGMT</i> promoter methylation, <i>CHI3L1</i> promoter methylation, Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), Temozolomide
UC	611.81:616-006.04
Holding data, HD :	library
Note, N :	This dissertation is a part of the research performed within the Project of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (III 41018). The experimental part of the research was conducted in laboratories of Department for Biology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš. Some of the experiments were performed at the Department of biochemistry of the Faculty of Medicine, University of Niš and Laboratory for Molecular Biomedicine of the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade.

Abstract, AB :	Glioblastomas (GBM) represent one of the most aggressive types of diffuse glioma. Although they usually arise as primary brain tumors, in 10% of GBM cases, they develop from low-grade astrocytomas (secondary GBM). They express striking morphological heterogeneity, which is often encountered during a histopathological examination. Due to advances in molecular diagnostics, significant progress was made in understanding the pathogenesis of tumor growth and the development of personalized therapeutic protocols. The aim of this study was to evaluate the diagnostic, prognostic, and predictive properties of the selected markers -IDH1/2 (isocitrate-dehydrogenase 1 and 2) mutation and <i>MGMT</i> (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) and <i>CHI3L1</i> (Chitinase-3-like protein 1) methylation status of the promoter regions in a Serbian population of GBM patients. Patients operated on the Neurosurgery Clinic (The University Clinical Centre of Niš, Serbia) between 2013 and 2019 were included in this study. Sanger direct sequencing was used to detect the presence of <i>IDH1/2</i> mutations in samples and conventional and Real-Time methylation-specific polymerase chain reaction methods for methylation status evaluation. Age, the extent of tumor resection, and type of adjuvant chemotherapy were recognized as independent prognostic factors in GBM patients. Furthermore, results suggested the superiority of adjuvant Temozolomide over adjuvant chemotherapy with a nitrosourea-based protocol (PCV and BCNU). <i>IDH1</i> mutation was detected in 6.67% (3/45) of patients and was associated with more prolonged overall survival, younger age, and hypermethylation of the <i>MGMT</i> and <i>CHI3L1</i> promoter. Semi-quantitative MSP approaches resulted in improved detection sensitivity of <i>MGMT</i> methylation status compared to the qualitative MSP method. Among <i>IDH-wt</i> homogenous cohort of GBM patients older than 50 years with complete/partial resection of the tumor, overall survival of patients harboring highly methylated <i>MGMT</i> was significantly longer in comparison with the unmethylated group. Complementary evaluation of <i>CHI3L1</i> promoter methylation status potentially increases the prognostic value of the <i>MGMT</i> methylation status, which should be further investigated in more comprehensive research.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	13.05.2019.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Tatjani Mitrović, na prijateljskom pristupu, ukazanoj podršci i neumornom entuzijazmu tokom svih godina studija i istraživačkog rada.

Veliko hvala na strpljenju i neprocenjivoj pomoći u savladavanju laboratorijskih veština i principa istraživanja.

Realizacija ove teze ne bi bila moguća bez velikodušne podrške profesorki Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu - prof. dr Dušice Pavlović i prof. dr Tatjane Jevtović-Stoimenov kojima dugujem ogromnu zahvalnost na ukazanom poverenju i prilici za saradnju. Takođe, veliko hvala Žaklini Šmelcerović na uloženom trudu i pomoći oko spektrofotometrijskih analiza uzoraka.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Vesni Nikolov, rukovodiocu Klinike za neurohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu na prepoznavanju značaja ovog istraživanja i velikom trudu oko organizacije skladištenja bioloških uzoraka i prikupljanja kliničkopatoloških podataka. Posebnu zahvalnost dugujemo i neurohirurgu prof. dr Aleksandru Kostiću i osoblju Klinike za neurohirurgiju koje je učestvovalo u ovom istraživanju.

Veliko hvala prof dr. Sonji Pavlović, naučnom saradniku i prof. dr. Valentini Đorđević, višem naučnom savetniku sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na srdačnom gostoprimstvu prilikom posete Institutu i sticanju izuzetno vrednog iskustva u laboratorijskom radu. Takođe, hvala kolegama dr Bojanu Ristivojeviću, dr Jeleni Kostić i dr Mileni Radmilović Ugrin na uloženom velikom trudu prilikom sekvenciranja uzoraka.

Zahvalnost dugujem i dr Nataši Vidović i prof. dr Miljanu Krstiću Centru za patologiju i patološku anatomiju, Kliničkog centra u Nišu na pribavljanju vrednih patohistoloških uzoraka čime je značajno uvećana naučna vrednost dobijenih rezultata.

Hvala dragim kolegama, profesorima i komentorima dr Vladimiru Cvetkoviću, dr Jeleni Vitorović i prof. dr Svetlani Tošić na kolegijalnosti, svakodnevnoj podršci i razumevanju tokom svih godina druženja i zajedničkog rada u laboratoriji. Takođe, hvala svim kolegama, profesorima i prijateljima sa PMF-a na sjajnoj saradnji.

Veliko hvala mojim roditeljima Slađani i Miši i sestri Kristini na ljubavi, podršci i ohrabrivanju koju mi bezuslovno pružaju celog života. Hvala i dragoj braći Jovanu i Marku na iskrenom i vrednom prijateljstvu.

Najveću zahvalnost dugujem supruzi Mariji na neizmernoj podršci, ljubavi i strpljenju i malom Ukiju što mu (još uvek) nisam dosadio.

Nikola

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta “Preventivni, terapijski i etički pristup pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije” (Evidencioni broj III 41018) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i ugovora 451-03-9/2021-14/200124 o finansiranju naučno-istraživačkog rada Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, u 2021. godini.

Baba Vinki

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Etiologija i faktori rizika GBM	2
1.2. Incidenca GBM	3
1.3. Klinička slika GBM	7
1.4. Dijagnostičke metode	8
1.4.1. Magnetna rezonantna tomografija	8
1.4.2. Histopatološka dijagnostika	11
1.5. Terapijske procedure	14
1.5.1. Hirurška resekcija	14
1.5.2. Stupp protokol i komplementarne terapijske procedure GBM	15
1.5.3. Prognostički faktori GBM	16
1.5.4. Terapija recidiva GBM	17
1.6. Biologija GBM	18
1.6.1. Glija ćelije	18
1.6.2. Klase glija ćelija	19
1.6.3. Prekursori glija ćelija	20
1.6.4. Adultna neurogeneza	21
1.6.5. Histološka podjela astrocita	22
1.6.6. Uloge astrocita u fiziološkim procesima	23
1.6.7. Funkcije astrocita u modulaciji moždane aktivnosti	23
1.6.8. Uloga astrocita u kontroli cirkadijalnog ritma	24
1.7. Astroцитi i patološka stanja	25
1.7.1. Reaktivna astrogliozna	25
1.7.2. Astroцитi i tumori mozga	26
1.7.3. Glioblastomi – ćelijsko poreklo	28
1.7.3.1. Teorija dediferencijacije	29
1.7.3.2. Teorija matičnih ćelija kancera	30
1.8. Komunikacija GBM ćelija sa mikrosredinskim činiocima	32
1.8.1. Ekstracelularne vezikule GBM	34
1.8.2. Interakcija mikroglije i GBM	35
1.8.3. Limfociti i GBM	35
1.8.4. Interakcija neuralnih progenitora i GBM	36
1.8.5. Vaskularna niša i GBM	36
1.8.6. Mikrosredinski uslovi u SVZ i GBM	37
1.8.7. Imunosupresivna mikrosredina u astrocitomima i “reaktivni astrociti”	39
1.8.8. Proliferacija i invazija GBM	40
1.8.9. Vazookluzija i nekroza kod GBM	42
1.9. Molekularna biologija GBM	44
1.9.1. Molekularna dijagnostika i klasifikacija GBM	44
1.9.2. WHO klasifikacija GBM	48
1.9.3. Molekularni podtipovi GBM i proneuralno-mezenhimalna tranzicija	49
1.9.4. Klinički najznačajnija genetička i molekularna obeležja GBM	50
1.9.5. IDH1/2 mutacije	51
1.9.5.1. D-2HG kao onkometabolit	53

1.9.5.2. Uloga <i>IDH1</i> mutacije u gliomogenezi	54
1.9.6. Hipermetilacija promotornog regiona <i>MGMT</i>	56
1.9.6.1. Evaluacija metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i> u kliničkoj praksi.....	58
1.9.6.2. Kombinacija <i>IDH-R132H</i> i statusa metilacije <i>MGMT</i>	59
1.9.7. Metode detekcije metilacije <i>MGMT</i> promotornog regiona	60
1.9.7.1. Metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija	63
1.9.7.2. Kvantitativna metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija (qMSP).....	66
1.9.8. Status metilacije protein 1 nalik hitinazi 3 (<i>CHI3L1</i>).....	69
1.9.8.1. <i>CHI3L</i>	69
1.9.8.2. Uloga <i>CHI3L1</i> u patološkim stanjima i tumorima	70
1.9.8.3. Uloga <i>CHI3L1</i> u GBM	70
1.9.8.4. Funkcija <i>CHI3L1</i> u matičnim ćelijama GBM u zavisnosti od statusa metilacije promotora <i>MGMT</i>	72
1.9.8.5. Hipermetilacija promotornog regiona <i>CHI3L1</i>	73
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	75
3. MATERIJAL I METODE	76
3.1. Biološki materijal.....	76
3.1.1. Pacijenti – kliničkopatološki parametri.....	76
3.1.2. Uzorci tumora	78
3.1.3. Oligonukleotidi	79
3.2. Izolacija genomske DNK	79
3.2.1. Izolacija DNK iz FF uzoraka tumora.....	79
3.2.2. Izolacija genomske DNK iz FFPE isečaka tumora	80
3.2.3. Izolacija genomske DNK iz leukocita periferne krvi zdrave osobe	80
3.2.4. Dodatno prečišćavanje DNK izolata	81
3.3. Kvantifikacija i provera kvaliteta DNK izolata	81
3.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija i određivanje kvaliteta DNK izolata	81
3.3.2. Provera kvaliteta DNK izolata metodom agarozne gel-elektroforeze	81
3.4. Evaluacija statusa <i>IDH1/2</i> mutacije.....	82
3.4.1. Amplifikacija <i>IDH1/2</i> fragmenata PCR metodom.....	82
3.4.2. Detekcija prisustva <i>IDH1/2</i> mutacija metodom sekvenciranja po Sangeru	82
3.5. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i>	83
3.5.1. Bisulfitna konverzija DNK.....	83
3.5.2. Analiza konvencionalnom MSP metodom.....	83
3.5.2.1. Kvalitativna analiza konvencionalnom MSP metodom	84
3.5.2.2. Semi-kvantitativna analiza konvencionalnom MSP metodom	84
3.5.3. Real-Time MSP (qMSP) evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i>	86
3.6. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>CHI3L1</i>	88
3.7. Statistička obrada podataka.....	88
4. REZULTATI.....	89
4.1. Korelacija epidemioloških karakteristika pacijenata i ukupnog preživljavanja (OS)	89
4.1.1. Starosne grupe pacijenata.....	90
4.1.2. Pol pacijenata.....	91
4.2. Korelacija stepena resekcije tumora i ukupnog preživljavanja (OS)	93

4.3. Korelacija vrste adjuvantne hemioterapije i ukupnog preživljavanja (OS)	94
4.4. Analiza molekularnih markera glioblastoma	96
4.4.1. Kvalitet i integritet izolata genomske DNK	96
4.4.1.1. DNK izolacija iz FF uzoraka	96
4.4.1.2. DNK izolacija iz FFPE uzoraka	96
4.4.2. Evaluacija statusa mutacije <i>IDH1-R132H</i>	97
4.4.2.1. Provera uspešnosti amplifikacije <i>IDH1</i>	97
4.4.2.2. Sekvenciranje <i>IDH1</i>	98
4.4.3. Evaluacija statusa mutacije <i>IDH2-R172</i> i <i>IDH2-R140</i>	99
4.4.3.1. Provera uspešnosti amplifikacije <i>IDH2</i>	99
4.4.3.2. Sekvenciranje <i>IDH2</i>	100
4.4.4. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i>	102
4.4.4.1. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i> u FF uzorcima	102
4.4.4.1.1. Optimizacija uslova <i>MGMT</i> PCR reakcije za MSP analizu FF uzoraka	102
4.4.4.1.2. MSP analiza FF uzoraka – masovni PCR	105
4.4.4.2. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i> kao prognostičkog faktora GBM	107
4.4.4.2.1. Kvalitativni MSP	107
4.4.4.2.2. Semi-kvantitativni MSP	110
4.4.4.2.2.1. “M/U” kvantifikacija signala metilacije	110
4.4.4.2.2.2. “PMR” kvantifikacija signala metilacije	113
4.4.4.3. MSP analiza FFPE uzoraka	116
4.4.4.3.1. Optimizacija uslova <i>MGMT</i> MSP reakcije	116
4.4.4.3.2. MSP analiza – masovni PCR	120
4.4.4.3.3. Kvalitativna MSP analiza	122
4.4.4.3.4. Semi-kvantitativna MSP analiza	124
4.4.4.4. Real-time MSP (qMSP) evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>MGMT</i>	127
4.4.4.4.1. Semikvantitativni qMSP – ΔC_t metoda	127
4.4.4.4.2. Kvantitativni qMSP – PMR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metoda	134
4.4.4.5. Kombinovana evaluacija statusa promotornog regiona <i>MGMT</i> na osnovu MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata	140
4.4.4.6. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>CHI3L1</i>	143
4.4.4.7. Uticaj različitih kombinacija statusa metilacije <i>MGMT</i> i <i>CHI3L1</i> na ukupno vreme preživljavanja GBM pacijenata	146
5. DISKUSIJA	150
5.1. Demografski i klinički prognostički faktori GBM	150
5.1.1. Starost i pol pacijenata	150
5.1.2. Stepen resekcije tumora (EOR)	152
5.1.3. Vrsta adjuvantne hemioterapije	153
5.2. Analiza molekularnih markera GBM	154
5.2.1. Kvalitet i integritet izolata genomske DNK	154
5.2.2. Evaluacija statusa mutacije <i>IDH1/2</i>	155
5.2.3. Evaluacija statusa metilacije <i>MGMT</i> promotornog regiona	158
5.2.3.1. Konvencionalna MSP analiza FF uzoraka	158
5.2.3.1.1. Kvalitativni MSP	159
5.2.3.1.2. Semi-kvantitativni MSP	160

5.2.3.1.3.	Semi-kvantitativna evaluacija na osnovu M/U odnosa intenziteta fluorescencije MSP produkata	160
5.2.3.1.4.	“PMR1” i “PMR2” semi-kvantifikacija signala metilacije	161
5.2.3.2.	Kvalitativni MSP FFPE uzoraka	162
5.2.3.3.	Semi-kvantitativni MSP FFPE uzoraka	163
5.2.3.4.	qMSP evaluacija statusa metilacije promotornog regiona MGMT	164
5.2.3.4.1.	Semikvantitativni qMSP – ΔC_t metoda	164
5.2.3.4.2.	Kvantitativni qMSP – PMR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metoda	165
5.2.3.5.	Sumarna analiza evaluacije statusa promotornog regiona MGMT	168
5.2.4.	Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona <i>CHI3L1</i>	171
6.	ZAKLJUČCI	174
7.	LITERATURA	176
8.	PRILOZI	202
	LISTA SKRAĆENICA	202
	IZVOD	212
	SUMMARY	213
	BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA	215
	BIOGRAFIJA	215
	BIBLIOGRAFIJA	217
	IZJAVE AUTORA	220

1. UVOD

Glioblastomi predstavljaju najčešći i najagresivniji oblik difuznih glioma, tumora mozga koje odlikuje visok stepen infiltracije u zdravo tkivo sa pratećom nekrozom. Zbog ekstenzivne varijabilnosti u intratumorskoj morfologiji ovih tumora, njihov raniji naziv glasio je “Multiformni glioblastom”. WHO (*World Health Organisation*, eng. - Svetska zdravstvena organizacija) je u klasifikaciji tumora CNS-a iz 2007. godine isključila termin “multiformni” iz naziva ovog tumora, zbog otkrića specifičnih i retkih histološki monomorfičnih oblika. Međutim, široko zastupljeni akronim “GBM” ostao je u upotrebi i nakon 2007. godine.

Uprkos značajnom napretku u razumevanju biologije GBM i usavršavanju terapijskih procedura, srednje vreme preživljavanja pacijenata nije se značajno promenilo i iznosi svega 14.6 meseci (Stupp i sar. 2005). Višedecenijski napor istraživača rezultovao je značajnim, ali suštinski neznatnim napretkom koji se odnosi na odlaganje pratećih komplikacija i poboljšanje kvaliteta života pacijenata. Zahvaljujući sumornim prognostičkim odlikama i pravilu da se recidivi sa fatalnim ishodom neizbežno javljaju nakon inicijalnog tretmana, lečenje GBM predstavlja jedan od najvećih izazova savremene medicine.

Najveći udeo zabeleženih GBM slučajeva zauzimaju tzv. primarni GBM (oko 90%) koji se pojavljuju *de novo*, odnosno bez prethodno uočenih lezija tumora nižeg stepena maligniteta. Za razliku od njih, sekundarni GBM koji se pojavljuju u 10% zabeleženih slučajeva GBM nastaju progresijom difuznih glioma nižeg stepena maligniteta (gradusa) - difuznih astrocita ili anaplastičnih astrocita (Stupp i sar., 2014). Iako su ovi podtipovi GBM morfološki veoma slični entiteti, njihovu progresiju i proliferaciju diktiraju zasebni molekularni mehanizmi patogeneze, koji su usloveli konstruisanje različitih pristupa njihovoj terapiji.

1.1. Etiologija i faktori rizika GBM

Prema trenutnim saznanjima, nastanak GBM je spontan proces koji nije uslovljen prisustvom naslednih genetskih faktora. U prilog tome govori činjenica da svega 1% opisanih slučajeva GBM predstavlja familijarnu formu tumora sa registrovanim gliomima kod bliskih srodnika pacijenta (Urbańska i sar., 2014). Određene genetske bolesti i nasledni poremećaji poput tuberozne skleroze, Tarkotovog sindroma, multiple endokrine neoplazije tipa IIA i neurofibromatoze tipa I povezane su sa povećanim rizikom od nastanka GBM (Urbańska i sar., 2014). Takođe, povrede glave poput potresa mozga mogu biti predispozicija za nastanak GBM.

Genetička pozadina razvoja GBM povezana je sa deregulacijom G1/S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i brojnim izmenama u naslednom materijalu GBM ćelija - gubitka genetičkog materijala unutar q kraka hromozoma 10, amplifikacije *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*, eng. - receptor za epidermalni faktor rasta), *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*, eng. - receptor fibroblastnog faktora rasta 2), *IRS2* (*insulin receptor substrate 2*, eng. - supstrat insulinskog receptora 2) i *AKT3* (*AKT serine/threonine kinase 3*, eng. - AKT serin/treonin kinaza 3) gena, zatim mutacije u genima *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*, eng. - homolog fosfataze i tenzina), *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*, eng. - inhibitor ciklin-zavisne kinaze 2A), *TP53* (*tumor protein P53*, eng. - tumor protein 53), *PARK2* (*parkinson protein 2*, eng. - parkinson protein 2), *RTPRD* (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta*, eng. - tirozin-fosfatazni receptor delta) i *NF1* (*neurofibromin 1*, eng. - neurofibromin 1) (Urbańska i sar., 2014).

Neki od virusa, poput HCMV (*Human Cytomegalovirus*, eng. - humani citomegalovirus) povezani su sa povećanim rizikom obolevanja od GBM. Ovaj virus je odgovoran za izazivanje kongenitalnog encefalitisa i multiorganske disfunkcije kod imunokompromitovanih pacijenata, a otkriveno je da pokazuje tropizam ka glijalnim ćelijama. Proteini koje kodira genom ovog virusa aktiviraju intraćelijske signalne puteve i spomenutu deregulaciju G1/S kontrolne tačke, indukujući procese mitogeneze, mutageneze, apoptoze, inflamacije i angiogeneze. Pored deregulacije ćelijskog ciklusa, HCMV izaziva poremećaje u funkciji monocita i glijalnih ćelija (Cobbs i sar., 2011; Urbańska i sar., 2014).

Izloženost visokim dozama jonizujućeg zračenja predstavlja jedan od fizičkih faktora rizika razvijanja tumora GBM, dok se u potencijalno opasne hemijske agense ubrajaju pesticidi,

policiklična aromatična jedinjenja i ratvarači. Smatra se da je izloženost teškim metalima i elektromagnetnom zračenju takođe jedan od faktora rizika za obolevanje od GBM (Spinelli i sar., 2009). Veruje se da korišćenje mobilnih telefona (nejonizujuće zračenje) ne povećava rizik od nastanka GBM, ali nema pouzdanih podataka o uticaju njihovog dugoročnog korišćenja. Osobe zaposlene u industriji gume i petrohemijskoj industriji predstavljaju rizičnu grupu za razvijanje ovog oblika tumora (Spinelli i sar., 2009; Urbańska i sar., 2014).

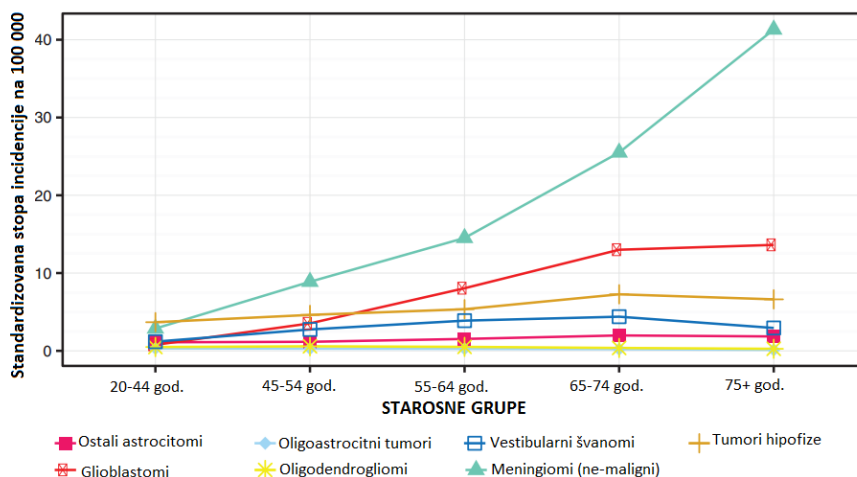
U moguće faktore rizika ubrajaju se nivo polnih hormona (kod žena) odnosno postmenopauza, zatim indeks telesne mase (BMI indeks) i visina pacijenta (Urbańska i sar., 2014).

1.2.Incidenca GBM

Prema najnovijoj publikaciji CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*, eng. - Centralni registar za tumore mozga Sjedinjenih Američkih Država), koja obuhvata statističku obradu registrovanih slučajeva tumora mozga u periodu od 2013. do 2017. god., na teritoriji SAD je u 2020. godini zabeleženo 83.830 slučajeva primarnih, odnosno 24.970 malignih tumora mozga (Ostrom i sar. 2020).

Glioblastom, tip difuznog glioma visokog stepena maligniteta i standardizovane stope incidencije 3.23 za populaciju od 100.000 ljudi, čini 57.7% glioma i 14.5% svih tumora mozga (Ostrom i sar. 2020).

U zavisnosti od demografskih karakteristika pacijenata, stopa incidencije za GBM značajno varira. Kod muškaraca je ova stopa veća nego kod žena. Takođe, ova bolest se dva puta češće javlja kod belaca u odnosu na Afroamerikance. Stopa incidencije progresivno raste u zavisnosti od starosne grupe. Vrednost stope incidencije dostiže maksimum u populaciji starijoj od 75 godina (Slika 1) (Ostrom i sar. 2015).



Slika 1. Standardizovana stopa incidencije nekih tipova glioma na populaciju od 100 000 ljudi za više starosnih grupa (preuzeto iz rada Ostrom i sar., 2015)

Iako tumor mozga predstavlja najčešći oblik tumora koji se javlja kod dece i adolescenata (0-19 godina), GBM čini izuzetno mali udeo (2,9%) u odnosu na ostale tipove tumora mozga koji su karakteristični za ovu starosnu grupu (Ostrom i sar. 2020).

Ovaj tip kancera mozga karakteriše izuzetno niska stopa preživljavanja. U periodu od 1995. do 2012. godine zabeleženo je 33.204 slučajeva na teritoriji SAD. Statističkom obradom podataka dobijenih iz ovog uzorka izračunate su sledeće stope preživljavanja (tabele 1 i 2) (Ostrom i sar. 2015).

Tabela 1 – Relativne stope preživljavanja pacijenata obolelih od GBM (1995.-2012. god.) (Ostrom i sar. 2015).

Relativna stopa preživljavanja	%
Jednogodišnja stopa	37,2
Dvogodišnja stopa	15,2
Trogodišnja stopa	8,8
Četvorogodišnja stopa	6,3
Petogodišnja stopa	5,1
Desetogodišnja stopa	2,6

Tabela 2 – Uzasno specifične relativne stope preživljavanja pacijenata obolelih od GBM u SAD (1995.-2012. god.) (Ostrom i sar. 2015).

Starosna grupa	1-god (%)	2-god. (%)	5-god. (%)	10-god. (%)
0-19	57,1	32,9	17,7	12,9
20-44	67,6	37,6	17,9	10,4
45-54	54,7	22,7	6,5	3,3
55-64	43,2	15,7	4,1	1,5
65-74	26,2	8,9	2,1	0,8
75+	11,0	3,3	0,9	/

Primarne GBM odlikuje kraće srednje vreme preživljavanja (9,9 – 15 meseci) u odnosu na sekundarne GBM (24 – 31 mesec). Takođe, pacijenti oboleli od primarnog glioblastoma su u proseku značajno stariji (~62 godine) od pacijenata obolelih od sekundarnog GBM (~44 godine) (Ferlay i sar, 2019).

Incidenca malignih tipova glioma na teritoriji Evrope približna je vrednostima dobijenim u SAD i iznosi 3-5/100.000 pri čemu je takođe prisutan uzrasno specifični trend rasta incidencije (Stupp i sar., 2014).

Na teritoriji Evrope je u 2012. godini registrovano oko 57.000 slučajeva tumora mozga i 45.000 smrtnih slučajeva prouzrokovanih njima (Ferlay i sar, 2019).

Stopa preživljavanja malignih tumora mozga kod odraslih pacijenata, dijagnostikovanih između 2000. i 2007. godine na teritoriji 28 evropskih država, istražena je od strane evropskog registra za rak ili EURO CARE (*European Cancer Registry*, eng.). Pritom su u statističku obradu podataka uključivani podaci dobijeni iz 86 registara širom Evrope (ne uključujući Republiku Srbiju) završno sa 31. decembrom 2008. godine. Od ukupno 83.458 registrovanih slučajeva malignih tumora mozga, čak jednu polovinu činili su glioblastomi (41.229 slučajeva). Uzasno specifične petogodišnje stope preživljavanja pacijenata približne su vrednostima dobijenim u pomenutom istraživanju u SAD (tabela 3) (Visser i sar., 2015).

Tabela 3 – Uzasno specifične petogodišnje relativne stope preživljavanja pacijenata obolelih od glioblastoma multifforme u Evropi (2000.-2007. god.) levo (Visser i sar., 2015) i SAD desno (Ostrom i sar. 2015.).

Starosna grupa	5-god (%)	Starosna grupa	5-god. (%)
(Evropa)		(SAD)	
15-44	14,2	20-44	17,9
45-54	5,6	45-54	6,5
55-64	3,3	55-64	4,1
65-74	2,2	65-74	2,1
75+	1,5	75+	0,9

Takođe, uzrasno specifične jednogodišnje i petogodišnje relativne stope preživljavanja gotovo su identične u Evropi (37,0% i 6,3%) i SAD (37,2% i 5,1%). Uključivanje temozolomida u terapiju GBM i drugih malignih tumora mozga započeto je 2005. godine (najpre u SAD), a kako je navedena studija obuhvatala period između 2000. i 2007. godine, njegov doprinos u poboljšanju lečenja pacijenata vidljiv je u vidu porasta relativnih stopa preživljavanja nakon 2005. godine.

Srbija je na četvrtom mestu prema stopi incidencije (7,5) raka mozga u Evropi (Ferlay i sar, 2019).

Prema izveštaju br. 17 „Registra za rak u Centralnoj Srbiji“, broj novoobolelih osoba od raka za 2014. godinu iznosio je ukupno 27.867 (14.582 muškaraca i 13.285 žena). Od toga je 350 (4,3%) muškaraca i 291 (3,8%) žena obolelo od nekog oblika raka mozga. U Nišavskom okrugu oboleo je 21 muškarac i 19 žena. Standardizovana stopa incidencije raka mozga na 100.000 stanovnika u Centralnoj Srbiji za 2015. godinu iznosi 8 za muškarce i 10,9 za žene. Vrednost ove stope u Nišavskom okrugu iznosi 6,2 za muškarce i 5,1 za žene. Između 18 upravnih okruga u centralnoj Srbiji ističe se Pirotski okrug za koji je zabeležena izuzetno visoka standardizovana stopa incidencije raka mozga (16,3 za muškarce i 22,0 za žene) (Milijuš i Živković, 2017).

Broj umrlih osoba od raka u centralnoj Srbiji u 2015. godini iznosio je ukupno 15.003 (8.713 muškaraca i 6.371 žena). Od raka mozga preminulo je 266 muškaraca i 224 žene, a samo u Nišavskom okrugu 14 muškarca i 16 žena. Standardizovana stopa mortaliteta od raka mozga na 100.000 stanovnika u centralnoj Srbiji iznosi 5,9 za muškarce i 4,2 za žene. U Nišavskom okrugu ova vrednost iznosi 4,6 za muškarce i 4,0 za žene (Milijuš i Živković, 2017).

Od 60 pacijenata kod kojih je ustanovljen tumor mozga, hospitalizovanih između oktobra 2011. godine i februara 2015. godine na Klinici za neurohirurgiju Kliničkog Centra u Beogradu, histopatološkom analizom ustanovljeno je 26 slučajeva GBM i 34 slučaja tumora mozga nižeg stepena maligniteta (Stojsavljević i sar., 2015).

Ovakav udeo pacijenata obolelih od GBM ukazuje na visok stepen zastupljenosti GBM u okviru registrovanih slučajeva malignih tumora mozga u Srbiji.

Prosečna starost pacijenata kod kojih je dijagnostikovana GBM iznosila je $55,38 \pm 14,020$ što je približno prosečnoj starosti pacijenata na teritoriji SAD i Evrope (Stojsavljević i sar., 2015).

1.3. Klinička slika GBM

Uobičajeni inicijalni simptom koji se pojavljuje kod pacijenata obolelih od GBM predstavlja glavobolja koja nastaje usled povišenog intrakranijalnog pritiska. Ona je najčešće praćena vrtoglavicom, mučninom i nagonom za povraćanjem, kao i poremećajem vida. Pored toga, karakteristična je i pojava fokalnih ili generalizovanih neuroloških poremećaja u zavisnosti od lokalizacije i veličine tumora (učestali epileptični napadi, sinkope, ataksije itd.). U najčešće simptome vezane za GBM ubrajaju se i različiti vidovi kognitivnih disfunkcija (poremećaji memorije, pažnje, prostorne orijentacije, umanjene jezičke sposobnosti i otežano izvršavanje uobičajenih dnevnih aktivnosti) koji nastaju kao posledica lokalizacije tumora unutar dominantne hemisfere cerebruma. U tabeli 4. prikazani su karakteristični simptomi za tumore mozga visokog maligniteta (Sanli i sar., 2010; Urbańska i sar., 2014).

Tabela 4 - Uobičajeni klinički pokazatelji i simptomi GBM i procenat pacijenata kod kojih se oni manifestuju (Sanli i sar., 2010)

Klinički pokazatelji i simptomi	Procenat
Glavobolja	56
Gubljenje pamćenja	35
Kognitivne disfunkcije	34
Motorički deficit	33
Govorno-jezički poremećaji	32
Epileptični napadi	32
Poremećaji ličnosti	23
Poremećaji vida	22
Mučnina i povraćanje	13
Senzorni deficit	13
Edem optičkog diska	5

Pored toga, u kliničkoj praksi postoji veliki broj primera neuobičajenih simptoma koji se ispoljavaju kod pacijenata obolelih od GBM (tabela 5) (Sanli i sar., 2010).

Tabela 5 – Neuobičajeni klinički pokazatelji i simptomi GBM (Sanli i sar., 2010)

Neuobičajeni klinički pokazatelji i simptomi
Muzikogena epilepsija
Refleksna epilepsija
Sindrom stranog akcenta
Alodinija
Hiperseksualnost
Pareza
Otagija
Hipoestezija
Anoreksija

Zbog navedenih nespecifičnih simptoma, pacijentima sa GBM se može pogrešno dijagnostikovati neki vid infekcije, inflamatorni proces, bolest cirkulatornog ili imunološkog sistema (Urbańska i sar., 2014). Prisustvo atipičnih simptoma kod pacijenta može biti uzrok velikih poteškoća u prepoznavanju GBM i postavljanju pravilne dijagnoze. Jedan takav primer predstavlja slučaj pacijenata obolelog od GBM čiji su simptomi (peckanje, pareza i hipoestezija šake) najpre uputili na kompresivnu neuropatiju usled uklještenja ulnarnog nerva. Tek nakon hirurške intervencije ustanovljeno je da je postavljena dijagnoza bila neodgovarajuća, usled pogoršanja stanja pacijenta. Još jedan takav primer predstavlja GBM pacijent čiji su nespecifični simptomi uključivali otalgiju uz bilatelarni gubitak sluha bez prisustva zujanja u ušima (Sanli i sar., 2010).

Zbog navedenih poteškoća i nepostojanja nedvosmislenih simptoma kod pacijenata koji upućuju na GBM, pacijenti čiji simptomi ne jenjavaju nakon prvobitne terapije upućuju se na neki od neninvanzivnih vidova dijagnostike, najčešće MRI (*magnetic resonance imaging*, eng. - magnetna rezonantna tomografija) kojom se utvrđuje eventualno prisustvo glioblastoma, najčešće u cerebralnim hemisferama.

U retkim slučajevima glioblastomi mogu biti lokalizovani u moždanom stablu ili kičmenoj moždini (Gee i sar., 2012; Lakhan i sar., 2009).

Takođe, ukoliko su pacijenti stariji od 40 godina i imaju promene u neurološkom statusu, to može ukazati na mogućnost GBM.

1.4. Dijagnostičke metode

1.4.1. Magnetna rezonantna tomografija

Nakon izvršenog neurološkog pregleda i konstatovanja prisustva navedenih simptoma i kliničkih pokazatelja kod pacijenta, potencijalno prisustvo tumora ispituje se najpre nekom od metoda neinvanzivne dijagnostike. Jednu od takvih metoda predstavlja CT (*computed tomography*, eng. - kompjuterizovana tomografija). Međutim, primenom ove metode može doći do previda postojanja manjih tumora, glioma nižeg stepena maligniteta iz kojih bi se mogao razviti glioblastom (Lobera, 2017).

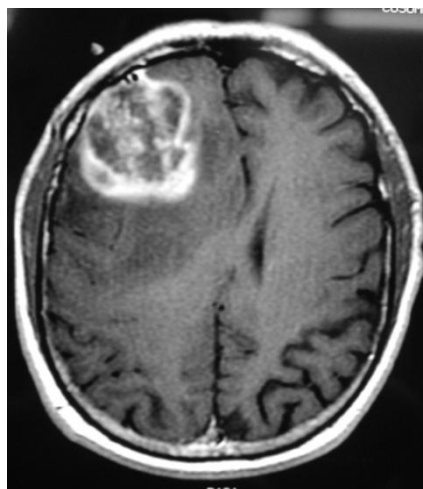
Znatno veća senzitivnost u detekciji tumora postiže se primenom Magnetne rezonantne tomografije koja predstavlja osnovnu metodu u dijagnostici GBM (Slika 2) (Lobera, 2012; Urbańska i sar., 2014).



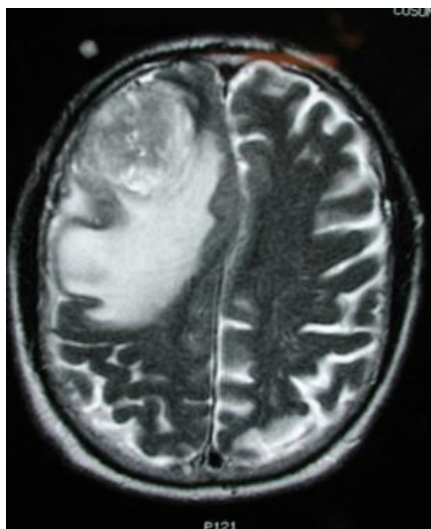
Slika 2. Uređaj za magnetnu rezonantnu tomografiju

(preuzeto sa <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/glioma/diagnosis-treatment/diagnosis/dxc-20129507>)

Rezultat primene MRI predstavljaju tomogrami na kojima se gliomi uočavaju kao lezije dijametra oko 4cm, pri čemu su one uočljive kao hipointenzivne lezije na T1W snimcima (*T1-weighted sequences*, eng. - T1-mereni snimci) ili hiperintenzivne lezije na T2W snimcima (*T2-weighted sequences*, eng. - T2-merenim snimcima) usled produženog vremena relaksacije. Na Slici 3 i Slici 4 prikazani su tomogrami pacijenta obolelog od GBM (Lobera, 2012; Stosić-Opinčal i sar., 2005; Upadhyay i sar., 2011; Urbańska i sar., 2014).



Slika 3. Tomogram T1W snimka MRI dobijene primenom paramagnetnog kontrastnog sredstva (gadolinijuma) na kome se uočava rastući tumor u desnom frontalnom režnju (preuzeto sa <http://emedicine.medscape.com/article/340870-overview#showall>, Autor: George Jallo, MD)



Slika 4. Tomogram T2W snimka MRI koji predstavlja leziju prikazanu i na prethodnoj slici, na kome je uočljiv edem i pomicanje mediosagitalne linije. Ovakav prikaz ukazuje na gliom visokog maligniteta ((preuzeto sa <http://emedicine.medscape.com/article/340870-overview#showall>, Autor: George Jallo, MD)

U konvencionalne MRI tehnike ubrajaju se prekontrastni i postkontrastni MRI u T1W tehnici snimanja, MRI u T2W tehnici snimanja i ili FLAIR tehnici snimanja (*fluid-attenuated inversion recovery*, eng.- MRI sa prevladavanjem signala cerebrospinalne tečnosti oporavkom inverzije). Iako se njihovom primenom sa velikom sigurnošću može utvrditi prisustvo tumora, ove tehnike karakteriše ograničena senzitivnost (72,5%) i specifičnost (65%) u razlučivanju tipova glioma (niskogradusnih od visokogradusnih) (Sui i sar., 2016).

Primenom perfuzione scintigrafije mozga, magnetne rezonantne spektroskopije i difuzionog tenzorskog “imaging”-a postiže se bolji rezultat u određivanju tipa glioma (Sui i sar., 2016; Upadhyay i sar., 2011).

Međutim, i pored usavršavanja navedenih metoda neinvanzivne dijagnostike tumora, metoda biopsije tkiva predstavlja primarni način klasifikacije i određivanja stadijuma glioma, odnosno uspostavljanja definitivne dijagnoze.

1.4.2. Histopatološka dijagnostika

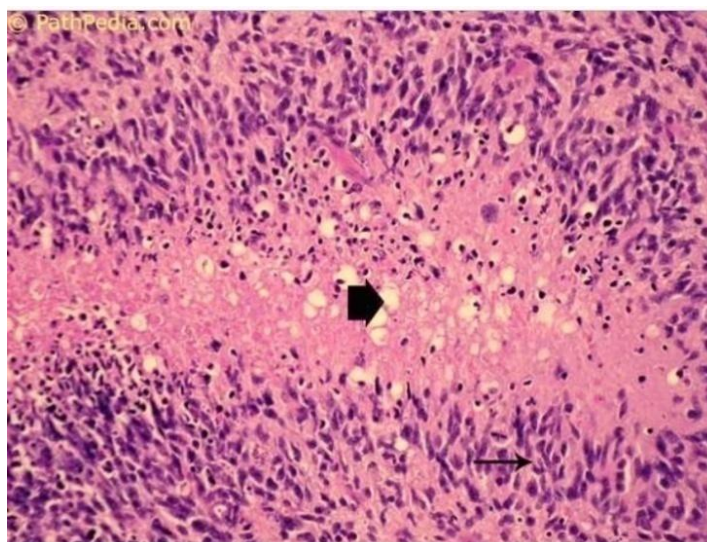
Biopsija tkiva predstavlja histopatološko ispitivanje hirurški odstranjenog tumora ili njegovog dela primenom histoloških, citoloških i histohemijskih metoda. U slučajevima pri kojim je hirurško odstranjivanje glioma izuzetno rizično, uzorkovanje tkiva izvršava se aspiracijom pomoću igle (Urbańska i sar., 2014).

Osnovne histopatološke karakteristike GBM koje se utvrđuju metodom biopsije tumora predstavljaju heterogene ćelijske populacije sa proliferirajućim fibroznim ćelijama, gemistocitima i sporadičnim džinovskim tumorskim ćelijama.

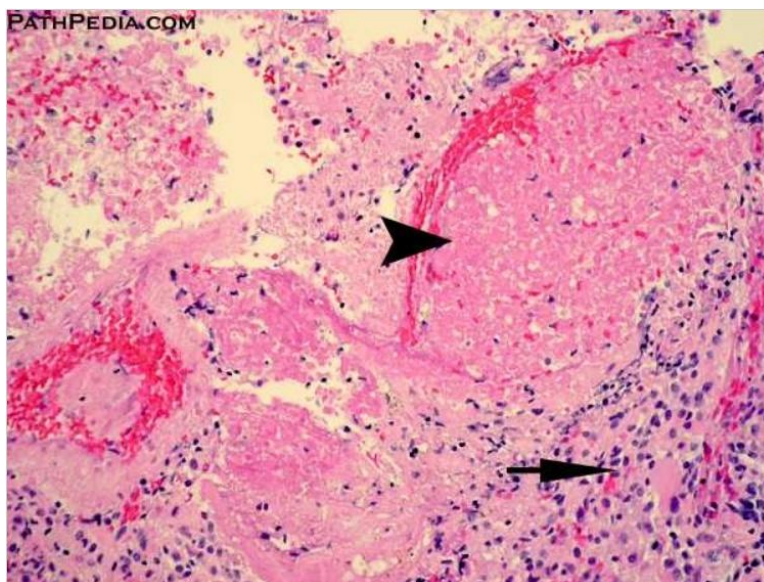
Najznačajnije obeležje GBM predstavlja prisustvo nekroznog tkiva koje može biti okruženo vijabilnim glijalnim ćelijama tumora. Uočeno je da je za sekundarni GBM karakterističan niži stepen nekroze tkiva, kao i to da je najčešće lokalizovan u čeonom režnju.

Drugo značajno obeležje GBM predstavlja mikrovaskularna proliferacija (MVP), koja uključuje i endotelijalnu hipertrofiju, endotelijalnu hiperplaziju i glomeruloidna telašca, pri čemu su višeslojni klasteri ćelija proliferirajućeg endotelijuma udruženi sa glatkim mišićnim ćelijama i pericitima (Al-Hussaini, 2013).

Na Slikama 5-8 prikazani su histološki preparati na kojima se uočavaju navedene karakteristike GBM.

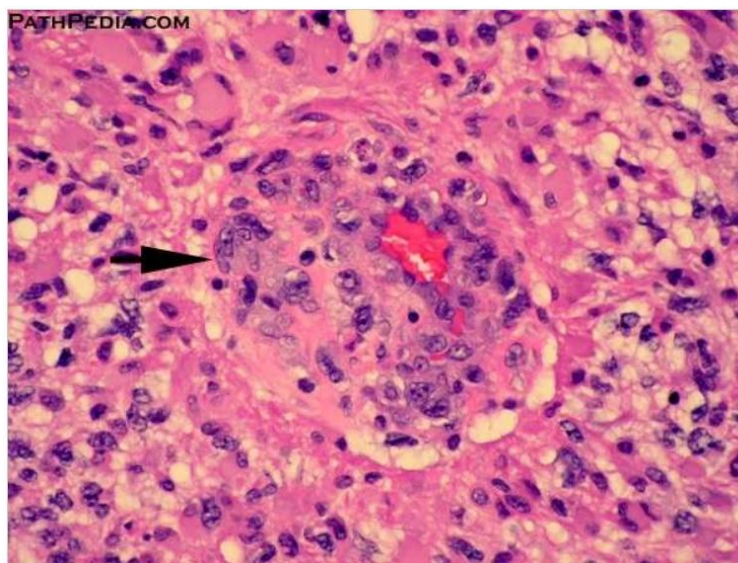


Slika 5. Histološki preparat tumora GBM na kome je uočljivo nekrozno tkivo (središnja oblast ružičaste boje na koju ukazuje deblja strelica) okruženo palisadno raspoređenim ćelijama tumora (tanja strelica). (preuzeto sa [http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_\(gbm\).aspx](http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_(gbm).aspx))



Slika 6. Velike nekrotne oblasti u mozgu nastale usled GBM, uočavaju se na tomogramima u vidu lezija koje su uokvirene svetlijom linijom (u vidu prstena). Stereotaktičnom biopsijom može se utvrditi postojanje nekroznih žarišta koja mogu biti okružena vijabilnim tumorskim ćelijama. Ukoliko se ne utvrdi prisustvo ovakvih vijabilnih tumorskih ćelija, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je pacijent oboleo od GBM. Sa druge strane, visokogradusna glijalna neoplazma (strelica u donjem desom uglu) i obilna tumorska nekroza (vrh strelice u centralnom delu slike) nedvosmisleno ukazuju na glioblastom.

(preuzeto sa [http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_\(gbm\).aspx](http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_(gbm).aspx))

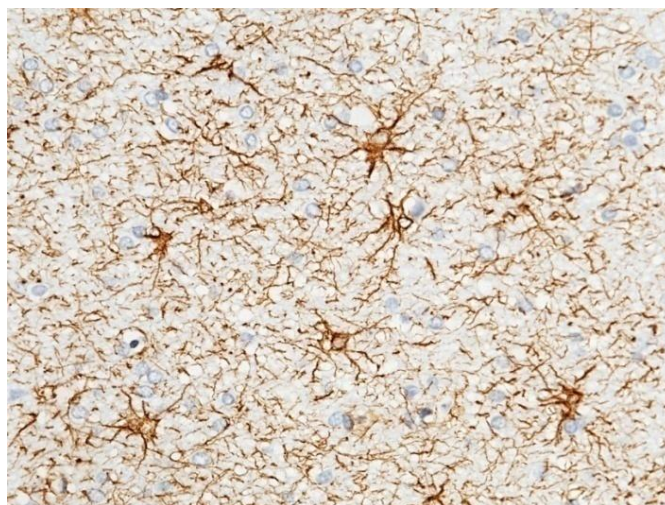


Slika 7. Glomeruloidna vaskularna proliferacija sa krupnim GBM ćelijama.

[http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_\(gbm\).aspx](http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/brain_and_cord/glioblastoma_(gbm).aspx))

Nakon postavljanja histološke dijagnoze na osnovu identifikovanja morfoloških karakteristika GBM, imunohistohemijskom metodom vrši se potvrda primarne dijagnoze na osnovu kvantifikacije i detekcije specifičnih proteina – biomarkera za glijalne ćelije centralnog nervnog sistema kao što su GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, eng. - glijalni fibrilarni kiseli protein)^a, vimentin (*vimentin*, eng.)^b, S-100b (*S-100 calcium binding protein*, eng. - S-100 kalcijum vezujući protein B), protein MBP (*maltose binding protein*, eng. - vezivanja maltoze)^c i p53 tumor-supresorni proteini. Nizak nivo navedenih proteina i visok nivo Ki-67^d antigena, CD34 antigena, citokeratina i drugih proteina koji su povezani sa povećanjem proliferativne aktivnosti i inhibicije apoptoze, zajedno predstavljaju osnovne imunohistohemijske karakteristike GBM i malignih glioma (Pavlova i sar., 2014).

Na Slici 8 i Slici 9 prikazan je rezultat primene imunohistohemijske metode u detekciji GFAP proteina u normalnom i tumorskom humanom moždanom tkivu.



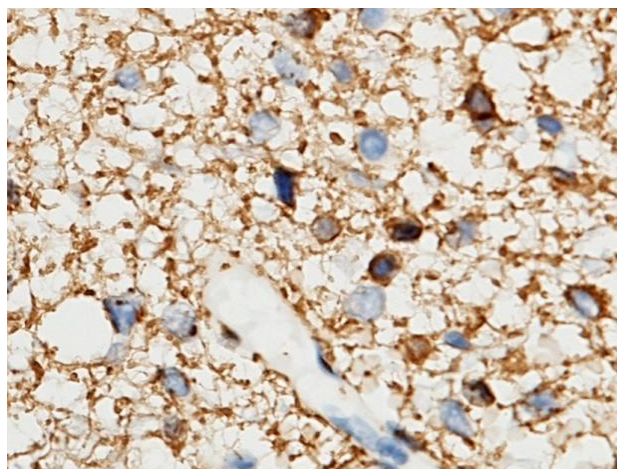
Slika 8. Imunohistohemijska detekcija GFAP proteina u normalnom humanom moždanom tkivu
(preuzeto sa <http://www.sinobiological.com/GFAP-Antibody-g-12306.html>)

^a GFAP protein čija molekulska masa iznosi 50 kD, predstavlja najzastupljeniji intermedijarni filament zrelih astrocita i glavni marker niskogradusnih astrocitoma

^b Vimentin predstavlja intermedijarni filament tipa III koji ekspiriraju mezenhimalne ćelije

^c MBP protein predstavlja marker oligodendrocita

^d KI-67 antigen predstavlja marker ćelijske proliferacije. Naziv je dobio po početnim slovima grada u kojem je otkriven (Kiel, nem.) i rednom broju klona sa mikrotitar ploče iz koje je izolovan.



Slika 9. Imunohistohemijska detekcija GFAP proteina u moždanom tkivu zahvaćenim gliomom
(preuzeto sa <http://www.sinobiological.com/GFAP-Antibody-g-12306.html>)

1.5. Terapijske procedure GBM

1.5.1. Hirurška resekcija

Primarni terapijski pristup u lečenju GBM, kao i ostalih tipova malignih tumora mozga predstavlja hirurška resekcija tumora. Hirurškoj resekciji prethodi analiza opšteg zdravstvenog stanja pacijenta, odgovarajuća neurofiziološka evaluacija kao i primena neke od spomenutih tehnika „imaging“-a. Takođe, ukoliko stanje pacijenta to dozvoljava, primenjuju se antiepileptici i kortikosteroidni lekovi u cilju regulisanja cerebralnog edema i intrakranijalne hipertenzije (Fernandes i sar., 2017). Cilj hirurške intervencije predstavlja maksimalna resekcija tumorske mase, uzorkovanje tkiva za patohistološku dijagnostiku, zatim poboljšanje uslova za primenu komplementarnih vidova terapije, odlaganje pogoršanja zdravstvenog stanja odnosno poboljšanje kvaliteta života pacijenta (Fernandes i sar., 2017). Najbitniji predikcioni parametar povezan sa procedurom hirurške resekcije jeste EOR^e (*extent of resection*, eng. - stepen resekcije tumora) pri čemu je totalna resekcija tumora udružena sa primenom radioterapije i terapije Temozolomidom povezana sa najdužim očekivanim vremenom preživljavanja pacijenata (Fernandes i sar., 2017; Stupp i sar., 2005). Evaluacija EOR se izvodi postoperativnim MRI snimanjem u roku od 72h od hirurškog odstranjivanja.

1.5.2. „Stupp protokol“ i komplementarne terapijske procedure GBM

Trenutni standardni protokol lečenja pacijenata sa novodijagnostikovanim GBM nazvan je „Stupp protokol“ po imenu autora studije iz 2005. godine kada je protokol uspostavljen (Stupp i sar., 2005). Uticaj njegove primene na poboljšanje vremena preživljavanja pacijenata dokazan je kliničkim ispitivanjima EORTC 26951 (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, eng. - Evropska organizacija za istraživanje i terapiju kancera) i NCIC (*National Cancer Institute of Canada*, eng. - Kanadski nacionalni institut za kancer) (Le Rhun i sar., 2015; Stupp i sar., 2005). Terapijska procedura se sastoji od maksimalne moguće resekcije tumorske mase kombinovane sa terapijom alkilirajućim agensom Temozolomidom ($75\text{mg}/\text{m}^2/\text{dan}$ tokom šest nedelja) i radioterapijom (60 Gy u 30 frakcija), nakon čega se u šest ciklusa na svakih 28 dana primenjuje pomoćna terapija Temozolomidom ($150\text{--}200\text{ mg}/\text{m}^2/\text{dan}$) po 5 dana zaredom (standard 5/28 TMZ ili sdTMZ) (Stupp i sar., 2005). Postradioterapijska terapija Temozolomidom povezana je sa produženjem OS (*overall survival*, eng. - ukupno vreme preživljavanja) sa 12.1 na 14.6 meseci kao i produženjem PFS (*progression free survival*, eng. - vreme preživljavanja bez progresije bolesti) (Stupp i sar., 2005). U Srbiji je terapija temozolomidom kao standard uvedena 2011. godine, dok je raniji standardni tretman bio zasnovan na primeni alkilirajućih agenasa derivata nitrozuree, lomustina i karmustina (CCNU^f/BCNU^g) (Ilić, 2018).

Dopunski vid terapije novodijagnostikovanih GBM mogu predstavljati biorazgradivi implantirani karmustina^h (BCNU) u vidu takozvanih „wafer“-a (kolačić, srp.) prečnika 1.45cm i debljine 1mm, kojima se oblaže mesto resekcije tumora (*tumor bed*, eng.). (Fernandes i sar., 2017, Le Rhun i sar. 2015). Po sastavu BCNU predstavlja lipofilni DNK-alkilirajući agens, derivat nitrozuree koji je našao primenu u lečenju glioblastoma i astroglioma zbog sposobnosti prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru (Fernandes i sar., 2017). Gliadel, biopolimerni BCNU implant u vidu „wafer“-a, odobren je od strane FDA (*United States Food and Drug Administration*, eng. - Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država) kao primarni vid

^f 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, eng.

^g Bis-chloroethylnitrosourea, eng.

^h Carmustine, eng.

tretmana GBM. Međutim, korisnost njegove upotrebe i uticaj na vreme preživljavanja GBM pacijenata pokazali su se upitnim (Fernandes i sar., 2017, Le Rhun i sar. 2015).

Kako se GBM odlikuje izraženom vaskularizacijom, jednu od atraktivnih terapeuskih strategija predstavlja antiangiogena terapija. Bevacizumab (BEV) monoklonsko antitelo koje vezuje VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*, eng. - vaskularni-endotelijalni faktor rasta A), odobren je od strane FDA kao monoterapija za recidive GBM. Kod novodijagnostikovanih GBM, pokazano je da njegova primena u kombinaciji sa terapijom temozolomidom i radioterapijom rezultuje poboljšanjem OS i PFS vremena preživljavanja pacijenata (Fernandes i sar., 2017, Le Rhun i sar. 2015). Mehanizam delovanja BEV zasniva se na inhibiciji biološke aktivnosti VEGF-A i njegove interakcije sa VEGF receptorom, čime se izaziva smanjenje endotelijalne proliferacije i vaskularizacije tumora (Fernandes i sar., 2017).

1.5.3. Prognostički faktori GBM

Unapređenje klasifikacije glioma i definisanje molekularnih podtipova GBM olakšalo je identifikaciju agresivnijih tipova GBM u kliničkoj praksi, kao i predviđanje šablona pojave recidiva GBM. To je otvorilo mogućnost definisanja ciljane terapije koja se oslanja i na molekularne parametre GBM, tzv. „personalizovane“ terapije prilagođene svakom pacijentu ponaosob (Chaul-Barbosa i sar., 2019). Tako se u najvažnije prognostičke faktore GBM pored starosti pacijenta, neurološkog statusa i stepena resekcije ubrajaju i status mutacije *IDH1/2* (*Isocitrate dehydrogenase 1 and 2*, eng. - izocitrat dehidrogenaza 1 i 2) i status metilacije promotornog regiona *MGMT* (*O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*, eng. - *O⁶-metilguanin-DNK transferaza*) koji prema dosadašnjim saznanjima predstavljaju najvažnije molekularne markere GBM (Zhang i sar., 2013). Uprkos ovakvom napretku, GBM recidivi (rGBM) se gotovo neizbežno javljaju nakon inicijalne terapije. Kako trenutno ne postoje standardni protokoli terapije rGBM, a srednje vreme preživljavanja pacijenata sa rGBM iznosi svega 9 meseci, pronalaženje adekvatne terapije predstavlja jedan od najvećih izazova u neuroonkologiji (Chaul-Barbosa i sar., 2019).

1.5.4. Terapija recidiva GBM

Reoperacija rGBM, usled otežanog definisanja granica tumorske lezije u cilju bezbedne resekcije i visokog morbiditeta predstavlja opciju kod svega 20%-30% rGBM pacijenata (Chaul-Barbosa i sar., 2019). Iako je hirurška resekcija novodijagnostikovanih GBM jasno povezana sa produženjem vremena preživljavanja, za rGBM postoje oprečni podaci (Chaul-Barbosa i sar., 2019). Reoperacija GBM povezana je sa značajnim produženjem vremena preživljavanja kod pacijenata sa nemetilovanim promotornim regionom *MGMT*, zbog čega se preporučuje uzimanje u obzir statusa metilacije *MGMT* prilikom odlučivanja o izvođenju reoperacije (Pala i sar., 2018).

Uprkos nepostojanju standarda terapije rGBM, hemioterapija predstavlja najčešći vid terapije rGBM i oslanja se na primenu alkilirajućih agenasa poput lomustina, karmustina (*lomustine and carmustine*, eng.) i temozolomida u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT*, kao i ant-VEGF terapije „bevacizumab“-om (Pala i sar., 2018).

Kao alternativna opcija terapije rGBM sa pozitivnim efektima pokazali su se različiti vidovi reiradijacije, poput FSRT (*fractionated stereotactic radiotherapy*, eng. - frakcionisana stereotaktična radioterapija), HFSRT (*hypofractionated stereotactic radiotherapy*, eng. - hipofrakcionisana stereotaktična radioterapija), RSR (*stereotactic radiosurgery*, eng. - stereotaktična radiohirurgija) koje se najčešće kombinuju sa nekim vidom hemioterapije, najčešće terapijom Temozolomidom ili ant-VEGF terapijom (bevacizumab) (Pala i sar., 2018).

Jedan od nedavno razvijenih sistema terapije rGBM predstavlja elektromagnetna terapija tumora koja se zasniva na generisanju pulsirajućeg električnog polja (*Alternating Electric Fields*, eng.) niskog intenziteta i frekvencije od 200 kHz u cilju generisanja TTF (*Tumor-Treating Fields*, eng. - tumor-tretirajuća polja). Uređaj „Optune“ sistem (Novocure, St. Helier, Jersey Isle, UK), prvobitno nazvan NovoTTF-100A, generiše TTF koji prodiru kroz ćelijsku membranu izazivajući zaustavljanje ćelijskog ciklusa i smrt ćelija kancera (slika 10).



Slika 10. Uređaj „Optune“ sistem (Novocure, St.Helier, Jersey Isle, UK) (preuzeto sa <https://www.optune.com/hcp/therapy/system>)

Obećavajući pristup terapiji GBM predstavlja imunoterapija, odnosno razvijanje antitumorskih vakcina. Jedan od prvih peptida korišćenih za razvoj antitumorske vakcine za GBM predstavlja EGFRvIII (*epidermal growth factor receptor variant III*, eng. - receptor epidermalog faktora rasta, varijanta 3) specifičnog za GBM ćelije. Terapija onkolitičnim virusima koji selektivno inficiraju i uništavaju ćelije raka takođe predstavlja jedan od atraktivnih savremenih pristupa u terapiji GBM. (Chaul-Barbosa i sar., 2019; Wollmann i sar., 2012).

1.6. Biologija GBM

Shvatanje o jednostavnoj ulozi glija ćelija kao metaboličke i fiziološke potpore neurona je proteklih decenija drastično izmenjeno zbog čega se savremeno razumevanje biologije i geneze glioblastoma oslanja na otkrića složenih funkcija različitih grupa glija ćelija i fenomen adultne neurogeneze.

1.6.1. Glija ćelije

Saznanja o raznovrsnoj funkciji glija ćelija i njihovih fizioloških karakteristika razbila su dugo važeće shvatanje o neuronima kao jednim i glavnim modulatorima viših moždanih funkcija.

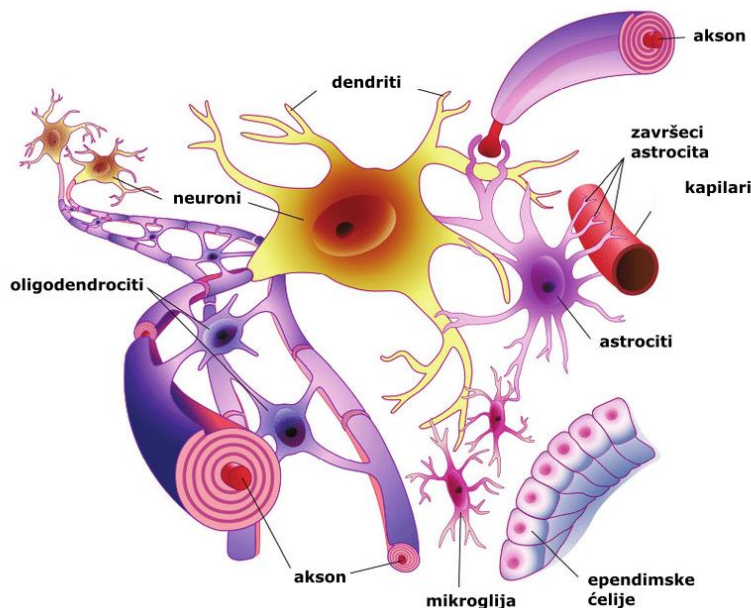
U radu iz 2001 godine Haydon je predstavio dokaze za hipotezu koja govori o važnoj ulozi glija ćelija u modulaciji sinaptičke aktivnosti mozga (Haydon, 2001). Uočeno je da glija ćelije predstavljaju aktivne činioce u prenošenju nervnog impulsa, a ne prostu potporu neuronima. Otkriće da ova grupa ćelija poseduje osobine identične neuronima – sposobnost

odgovora na transmitere, integraciju ulaznog signala i ekskreciju transmitera odnosno slanje signala na veliku udaljenost, dovela je glija ćelije u žižu interesovanja neurobiologije. Glavnu razliku u odnosu na neurone predstavlja njihova neosetljivost na električnu ekscitaciju i znatno manja brzina prenošenja signala koja iznosi nekoliko mikrometara po sekundi (neuroni prenose signal brzinom od 120 metara po sekundi). Međutim, otkriće da glija ćelije preko gliotransmitera komuniciraju sa neuronima otvorilo je nova pitanja o njihovoj potencionalnoj ulozi u višim moždanim funkcijama, ali i patološkim stanjima. Od tada, otkrivene su i objašnjene najrazličitije funkcije glija ćelija, poput njihove uloge u procesuiranju bola ili regulacije procesa inflamacije (Goldman i sar., 2010; Haydon, 2001; Milligan i sar., 2009; Park i sar., 2020; Voskuhl i sar., 2009).

1.6.2. Klase glija ćelija

Glija ćelije su podeljene u dve klase: makrogliju i mikrogliju. Makroglija obuhvata dve grupe ćelija: astrocite (astrogliju) i oligodendrocite (oligodendrogliju).

Astrociti su jako brojni i prema nekim izvorima petostruko nadmašuju broj neurona (Sofroniew i sar., 2009). Iako primarno obezbeđuju trofičku, metaboličku i strukturnu podršku neuronima, oni su i usko povezani sa sinapsama neurona, često obavijajući završetke aksona. Pored toga, oni komuniciraju sa endotelijalnim ćelijama koje čine zidove kapilara. Astrociti međusobno komuniciraju preko propusnih veza (*gap junctions*, eng.). Oni su veza između neurona međusobno, neurona i kapilara, kao i astrocita međusobno. Prožimajuća mreža astrocita se može posmatrati kao jedinstveni sistem koji konstantno registruje signale iz okoline i odgovara na njih kroz interakciju sa odgovarajućim grupama ćelija CNS (Pekny i sar., 2014). Slika 11.



Slika 11. Prikaz interakcije glavnih tipova ćelija u CNS-u (preuzeto iz rada Wichert, 2009.)

Pokazano je da su astrociti osjetljivi na brojne neurotransmitere: glutamat, histamin, acetilholin, ATP, GABA (*gamma aminobutyric acid*, eng – gama aminobuterna kiselina), noradrenalin. Oni izazivaju intracelularno variranje Ca^{2+} signala, koji se može širiti između astrocita poput talasa. Inozitol-3-fosfat predstavlja sekundarni glasnik koji orkestrira otpuštanje jona Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa (endoplazmatičnog retikuluma), a njega produkuje aktivirana PLC (*phospholipase C*, eng. – fosfolipaza C), koju aktiviraju određeni G-protein spregnuti receptori. Kako su astrociti povezani preko koneksona (spregnutih veza), inozitol-3-fosfat i ATP mogu preko njih prelaziti iz jedne u drugu ćeliju šireći signal podstaknut unutarćelijskim variranjem Ca^{2+} . Ovaj signal rezultuje ekstraćelijskim oslobađanjem glutamata kao transmitera koji modulira aktivnost neurona (Haydon, 2001).

Oligodendrociti su zaduženi za mijelinizaciju (izolaciju aksona) unutar centralnog nervnog sistema i predstavljaju ekvivalente Švanovim ćelijama perifernog nervnog sistema.

1.6.3. Prekursori glija ćelija

Kao i neuroni, sve glija ćelije centralnog nervnog sistema (CNS) potiču od matičnih ćelija neuralne ploče. Ove ćelije su mitotički aktivne i njihov broj varira tokom ontogeneze. One se u ranim stupnjevima embriogeneze dele „simetrično“ što znači da deoba rezultuje formiranjem dve nove matične ćelije. Kako razviće napreduje, one počinju sa asimetričnom

deobom pri kojoj se formiraju neuroni (neurogena faza) od neuroepitalijalnih ćelija u ventrikularnoj zoni. Oko midgestacijske faze, matične ćelije ventrikularne zone prestaju sa produkcijom neurona i otpočinju produkovanje progenitornih ćelija astrocita i oligodendrocita. Smatra se da su mogući okidači za takvu transformaciju neurogeneze u gliogenezu transkripcioni faktor Sox9 (*sex determining region Y-box 9*, eng. - transkripcioni faktor 9 srodan testis determinišućem faktoru SRY) i aktivacija Notch¹ signalnog puta.

Prvi korak u nastanku glija ćelija jeste tripotentna prekursora ćelija koja se razvija iz neuroepitalijalnih matičnih ćelija. Direktno od njih, pored oligodendrocita, mogu proisteći dve različite populacije astrocita – tip 1 i tip 2. Nastanak astrocita tipa 2 moguć je i preko intermedijerne bipotentne progenitorske ćelije pod nazivom oligodendrocit/astrocit tip-2 progenitorska ćelija (Bradl, 2006).

Radijalna glija, populacija samoobnavljajućih ćelija CNS u embrionalnom CNS-u, prva je grupa ćelija koja se može jasno razlikovati od neuropitelijalnih matičnih ćelija. Ova grupa ćelija najpre produkuje progenitore neurona, da bi u kasnijim stupnjevima razvica produkovala prekursore astroglije i oligodendroglije. Transkripcioni faktori koji regulišu ovu tranziciju su NFA1 (*nuclear factor A1*, eng. – nuklearni faktor A1) i Olig2 (*Oligodendrocyte transcription factor 2*, eng. – oligodendrocitni transkripcioni faktor 2) (Hegedus i sar., 2007).

1.6.4. Adultna neurogeneza

Dugo je važno uverenje da se ljudi rađaju sa ograničenim brojem nervnih ćelija i da moždano tkivo adulta ne poseduje sposobnost regeneracije i produkcije novih neurona. Međutim, počevši sa eksperimentima sredinom XX veka koji su uključivali autoradiografsko obeležavanje [³H]-timidinom ćelija mozga i kičmene moždine odraslog pacova, neurogeneza u mozgu odraslih jedinki sisara je nedvosmisleno potvrđena (Zhang i sar., 2019). Produkciju astrocita u postnatalnom moždanom tkivu izvršavaju multipotentne prekursorne ćelije smeštene u subventrikularnoj zoni (SVZ). Oni takođe mogu nastati iz radijalnih glija ćelija koje su mitotički aktivne, nakon što ove ispune svoju ulogu supstrata za migraciju progenitorskih ćelija neurona (Bradl, 2006).

¹ Termin „notch“ (eng. zasek, rečka) uveo je Tomas H. Morgan pri identifikaciji alela 1917. koji su povezani sa pojavom zaseka na krilima jedinki *Drosophila melanogaster*.

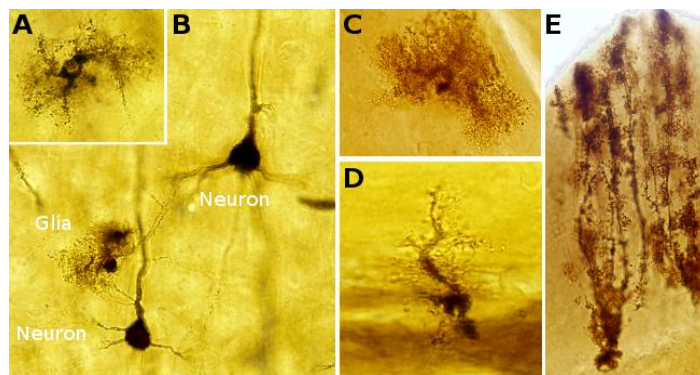
1.6.5. Histološka podela astrocita

Astrociti imaju važnu funkciju u fiziologiji mozga, ali i brojnim patofiziološkim stanjima. Astroglija zauzima čak 50% ukupne zapremine CNS. Iako je fiziološka funkcija astrocita raznolika, astrociti se prema klasičnoj histološkoj podeli mogu svrstati u dve velike grupe: fibrozne i protoplazmatične astrocite. Ova podela se zasniva na njihovim morfološkim karakteristikama i lokalizaciji u sivoj (fibrozni astrociti) odnosno beloј masi (protoplazmatični astrociti). Poseban oblik astroglije u cerebelumu čini Bergman-ova glija. Takođe, brojne grupe specijalizovanih ćelija CNS-a poput pituicita, tanicita, ependimalnih ćelija i Milerovih glija ćelija ispoljavaju zajedničke osobine sa astrocitima. (Levison i Goldman, 1993).

Fibrozne astrocite odlikuje „zvezdasta“ morfologija koja podrazumeva brojne cilindrične nastavke koji se radijalno simetrično prostiru od some, često dodirujući kapilare svojim krajevima (slika 12). Nastavci bogati intermedijernim filamentima se daleko prostiru, uz sporadična grananja. Jedro je ovalnog oblika sa ravnomerno raspoređenim hromatinom, a citoplazma sadrži nasumično raspoređene granule glikogena (Levison i Goldman, 1993).

Protoplazmatični astrociti se odlikuju složenijom morfologijom. Njihovi nastavci su izuzetno razgranati i često formiraju membranozne slojeve kojima obavijaju nastavke i ćelije neurona. Jedra su sferična, a u poređenju sa fibroznim astrocitima sadrže manje intermedijernih filamenata i gušće raspoređene organele (Levison i Goldman, 1993).

Podtip astrocita označen kao Bergmanova glija smešten je u kori malog mozga (cerebellum). Tela ovih ćelija smeštena su u sloju Purkinjevih ćelija, od njih se pruža nekoliko dugačkih nastavaka kroz molekularni sloj sive mase završavajući se na glija ćelijama ovojnice i velikim krvnim sudovima (Levison i Goldman, 1993).



Slika 12. Tipovi astrocita (glija ćelija) **A, C i D.** Astrociti unutar tkiva mozga **B.** Razlika u veličini neurona i glija ćelija **A i C.** protoplazmatični astrociti **D.** fibrozni astrociti **E.** Bergmanova glija u cerebelumu (preuzeto sa <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/astrocito.php>)

1.6.6. Uloge astrocita u fiziološkim procesima

Iako navedena morfološka podela predstavlja histološki standard, ona je pojednostavljena u poređenju sa raznovrsnošću fiziološke funkcije astrocita. Njihova funkcija i uloga varira u zavisnosti od njihove pozicije i stupnja u razviću jedinke (Pekny i sar., 2014). Neke od njihovih najbitnijih uloga jesu održavanje homeostaze jona i krvno-moždane barijere, zatim formacija sinapsi i njihovo uklanjanje, kontrola protoka krvi kroz cerebrum i recikliranje neurotransmitera, regulacija ekscitotoksičnosti glutaminske kiseline i oksidativnog stresa (Levison i Goldman, 1993).

Funkcija ćelija astroglije u održavanju homeostaze vode i usvajanja glukoze iz krvotoka izvršava se zahvaljujući akvaporin-4 kanalima i transporterima glukoze koji su smešteni u završecima nastavaka koji su u kontaktu sa krvnim sudovima. Glukoza se u ovim ćelijama skladišti u vidu glikogena ili iskorišćava za produkciju mlečne kiseline. Glutamat se reciklira uz pomoć GLAST transportera (*glutamate aspartate transporter*, eng. - transporter glutamin sintaze), koji se po usvajanju u ćeliju konvertuje u glutamin. Glutamin i laktat koje ćelije astroglije sekretuju podstiču aerobni metabolizam neurona i sinteze gama-aminobuterne kiseline. Astroglija omogućava uspostavljanje i održavanje krvno-moždane barijere sekrecijom Shh (*Sonic hedgehog*, eng.) i dugih bioreaktivnih proteina, kao i hemokina sposobnih da regrutuju ćelije imunog sistema, limfocite i monocite. Efikasnost sinaptičkog prenošenja signala ćelije protoplazmične astroglije poboljšavaju regeneracijom kalijumovih kanala i transportera neurotransmitera, kao i otpuštanjem gliotransmitera poput d-serina i purina, koji utiču na ekscitabilnost hiljada sinapsi smeštenih u neposrednoj okolini (Zhang i sar., 2013).

1.6.7. Funkcije astrocita u modulaciji moždane aktivnosti

Uvreženo je mišljenje da je aktivnost neurona ono što reguliše ponašanje jedinke. Međutim, pokazano je da astrociti ispoljavaju sposobnost moduliranja aktivnosti neurona i ponašanja in vivo. Kako jedan astrocit može ostvarivati i do dva miliona kontakata sa neurosinapsama preko svojih nastavaka, ekskrecijom neuro-modulirajućih signala oni mogu vršiti izmenu elektrofizioloških svojstava okolnih neurona, utičući na više moždane funkcije koje regulišu ponašanje. Zbog rastućeg broja dokaza o velikom transkripcionom, translacionom, morfološkom i funkcionalnom diverzitetu astrocita širom različitih regiona mozga, hipoteza o

uticaju astrocita na moždanu aktivnost je sve prihvatljivija (Park i sar., 2020). Pokazano je da astrociti smešteni u hipokampusu, malom mozgu i neokorteksu ispoljavaju odgovor na senzorne stimuluse kao i neuromodule poput acetilholina i norepinefrina (Lines i sar., 2020). Njihova sposobnost selektivnog jačanja sinapsi smatra se ključnom u formiranju dugotrajne memorije (Kol i sar., 2020; Lines i sar., 2020).

1.6.8. Uloga astrocita u kontroli cirkadijalnog ritma

Jedna je od nedavno otkrivenih funkcija astrocita jeste kontrola cirkadijalnog ritma (dnevno-noćni ritam, ciklus budnosti i spavanja) kod sisara. Održavanje pravilnog cirkadijalnog ritma regulišu transkripcioni faktori koji se ciklično produkuju pod kontrolom neurona smeštenih u maloj regiji hipotalamusa pod nazivom suprahijazmična jezgra (SCN). Specijalizovana grupa ganglionarnih ćelija retine direktno detektuje svetlost i signal sprovodi do SCN. Ove ćelije, nezavisne od retinalnih fotoreceptora, neophodne su za detekciju svetlosti kao „ulaznog signala“ i takozvano fotičko usklađivanje cirkadijalnog ritma (Weaver i Emery, 2013). Brojna ispitivanja fizioloških procesa cirkadijalnog ritma orijentisala su se uglavnom na SCN neurone i eksprimiranje transkripcionih faktora poput BMAL1 (*brain and muscle ARNT-like 1*, eng. i CLOCK (*Circadian locomotor output cycles protein kaput*, eng.) po principu povratne sprege. Iako malobrojna, ispitivanja uloge astrocita u cirkadijalnom ritmu dokazala su da astrociti takođe ritmično eksprimiraju cirkadijalne oscilatore, poput oscilatora BMAL1. Pored toga, astrociti poseduju sposobnost registrovanja cirkadijalnih signala kroz interakciju sa SCN neuronima, odašiljući gliotransmitere kao odgovor. Štaviše, astrociti SCN regiona ne samo da ispoljavaju komplementarnu aktivnost neuronima, već predstavljaju glavnu kariku u regulisanju dnevno-noćnog ponašanja jedinke. Na to upućuje otkriće da disfunkcionalna ekspresija cirkadijalnih transkripcionih faktora u astrocitima narušava cirkadijalni ritam miševa, bez obzira na funkcionalnost neurona SCN regije. (Brancaccio i sar., 2019; Tso i sar., 2017).

Homeostaza spavanja je pod direktnim uticajem akumulacije adenoizina. Održavanje stanja budnosti koje je poznato dejstvo kofeina, objašnjava se time što je on antagonist receptora za adenozin. Pretpostavljalo se da je akumulirani adenozin poreklom iz neurona. Međutim, nekoliko studija je potvrdilo astrocite kao njegov izvor. Poznato je da je jedan od najpoznatijih gliotransmitera Adenozin-trifosfat (ATP). Eksperimentalnim onesposobljavanjem SNARE

kompleksa (soluble NSF attachment receptor, eng.) koji diriguje egzocitozu u astrocitima postignuto je veštačko isključivanje gliotransmisije u mozgu miševa. Kao rezultat, utvrđeno je da astrociti utiču na rast nagona za spavanjem i prateće kognitivne posledice putem signalnog puta koji uključuje A1 receptore (Halassa i sar., 2009).

1.7. Astrociti i patološka stanja

1.7.1. Reaktivna astroglioza

Reaktivna astroglioza se može definisati kao karakteristična i evolutivno konzervisana odbrambena reakcija ćelija astroglije na patološke pojave koje pogađaju CNS. Ona je povezana sa brojnim patološkim stanjima: traumatskim povredama mozga, ishemijskim oštećenjem, neuroinflamacijom i neurodegeneracijom, kao i primarnim i sekundarnim tumorima CNS.

„Reaktivni astrociti“ ispoljavaju niz morfoloških i funkcionalnih promena koje imaju za cilj regulaciju akutnog stresa, smanjenja oštećenja tkiva i održanja homeostaze. Sa druge strane, ukoliko adaptivna transformacija astrocita istrajava, ona može biti veoma štetna. Pokazano je da takozvani „maladaptivni“ reaktivni astrociti ispoljavaju niz negativnih nuspojava poput sprečavanja mehanizama neuroplastičnosti i regenerisanja moždanih funkcija (Pekny i sar., 2014).

Najupečatljivije odlike „reaktivnih astrocita“ predstavljaju hipertrofija ćelijskih nastavaka i povišena produkcija GFAP, glavne komponente intremedijernih filamenata astrocita. Pored toga, njih odlikuje izmenjena ekspresija glutamin sintetaze (GS), enzima zaduženog za konverziju glutamata u glutamin. Izmenjena ekspresija GS je region-specifična i nije korelisana sa povećanjem ekspresije GFAP, zbog čega ovaj marker astrocita ne može služiti i kao marker reaktivne astroglioze.

Aktivaciju astrocita mogu pokrenuti brojni citokini, poput TGF- α (*transforming growth factor alpha*, eng. - transformišući faktora rasta alfa), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*, eng. - cilijarni neurotrofični faktor), IL-6 (*interleukin 6*, eng. - interleukin 6), LIF (*leukemia inhibitory factor*, eng. - faktor inhibicije leukemije) i onkostatina M. Oni mogu direktno izvršiti aktivaciju STAT3 signalnog puta (*signal transducer and activator of transcription*, eng. – prenosilac signala i aktivator transkripcije 3) u astrocitima preko gp130 (*glycoprotein 130*, eng. – glikoprotein 130)

citokinskog receptora, ili indirektno, uticajem na druge ćelije u njihovoj okolini: neurone, mikrogliju ili endotelijalne ćelije.

Suprotan efekat na astrocite ostvaruje signalni put aktiviran receptorom $\beta 1$ -integrinom, zadržavajući ih u zreлом, nereaktivnom stanju (Robel i sar., 2009).

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) može imati ulogu u aktivaciji astrocita, pošto je uočeno je da je njegova ekspresija prisutna u reaktivnim astrocitima, za razliku od neaktiviranih. Pokazano je da inhibicija EGFR povoljno utiče na regeneraciju aksona i podstiče oporavak moždanih funkcija nakon traume mozga (Pekny i sar., 2014).

Jedno od ključnih svojstava ćelija astrocita koje im omogućava da reaguju na nastalu povredu mozga jeste njihova polarizovanost i sposobnost usmerene migracije. Dokaz za to je da astrociti sa inaktiviranim regulatorom ćelijske polarizacije GTP-azom Ro familije Cdc42 (cell division control protein 42, eng. –protein kontrole ćelijske deobe 42) bivaju onesposobljeni za pozicioniranje oko moždane lezije nastale nakon uboda, uprkos njihovom hipertrofičkom odgovoru i povećanoj ekspresiji GFAP (Robel i sar., 2011).

Nivo morfoloških promena izazvanih reaktivnom astrogliozom može varirati od blagih i gotovo neprimetnih do izuzetno intenzivnih, često praćenih formiranjem takozvanih glijalnih ožiljaka. Pronađeno je da, uz astrocite, periciti odigravaju važnu ulogu u njihovom formiranju. U formiranju glijalnih ožiljaka učestvuje deo reaktivnih astrocita koji zadobija svojstva multipotentnih matičnih ćelija i sposobnost proliferacije u cilju umnožavanja ćelija astrocita na mestu lezije. Ovakav odgovor astrocita se povezuje uglavnom sa invanzivnim oštećenjima mozga, poput ubodnih rana ili ishemije mozga. Shh signal poreklom iz cerebrospinalne tečnosti i plazme direktno je odgovoran za takvo zadobijanje svojstava matičnih ćelija (Sirko i sar., 2013).

Nedavna studija predstavila je uverljive dokaze za hipotezu da su reaktivna astroglioza i odgovarajuće izmene u astrocitnoj super-mreži usko specifične za tip bolesti, kao i da ispoljavaju efekte koji su usko vezani za svaku bolest (Zamanian i sar., 2012).

1.7.2. Astrociti i tumori mozga

Iako astrociti mogu biti činioc koji izaziva progresiju sekundarnih (metastatskih) neoplazmi, mnogo zapaženiju ulogu odigravaju u razvoju primarnih tumora mozga. U cilju utvrđivanja i dijagnostike tumora mozga, imunohistohemijska detekcija GFAP-a predstavlja

pouzdati metod utvrđivanja prisustva astrocitne komponente u resekcijama neoplazmi. Ukoliko je pored citoplazmičke imuno-reaktivnosti na GFAP u takvim preparatima prisutna izražena nuklearna atipija, takva neoplazma se najčešće klasifikuje kao neki oblik astrocitoma, u zavisnosti od stepena nuklearne atipije i pratećih morfoloških karakteristika (Sofroniew i sar., 2009). Suprotno, znak da je tumor mozga neglijalnog porekla (meduloblastom ili primarni limfom CNS-a) predstavlja znatno uočljivije prisustvo GFAP pozitivnih reaktivnih astrocita unutar ili na granicama tumorskog tkiva (Sofroniew i sar., 2009) (Slika 13.).

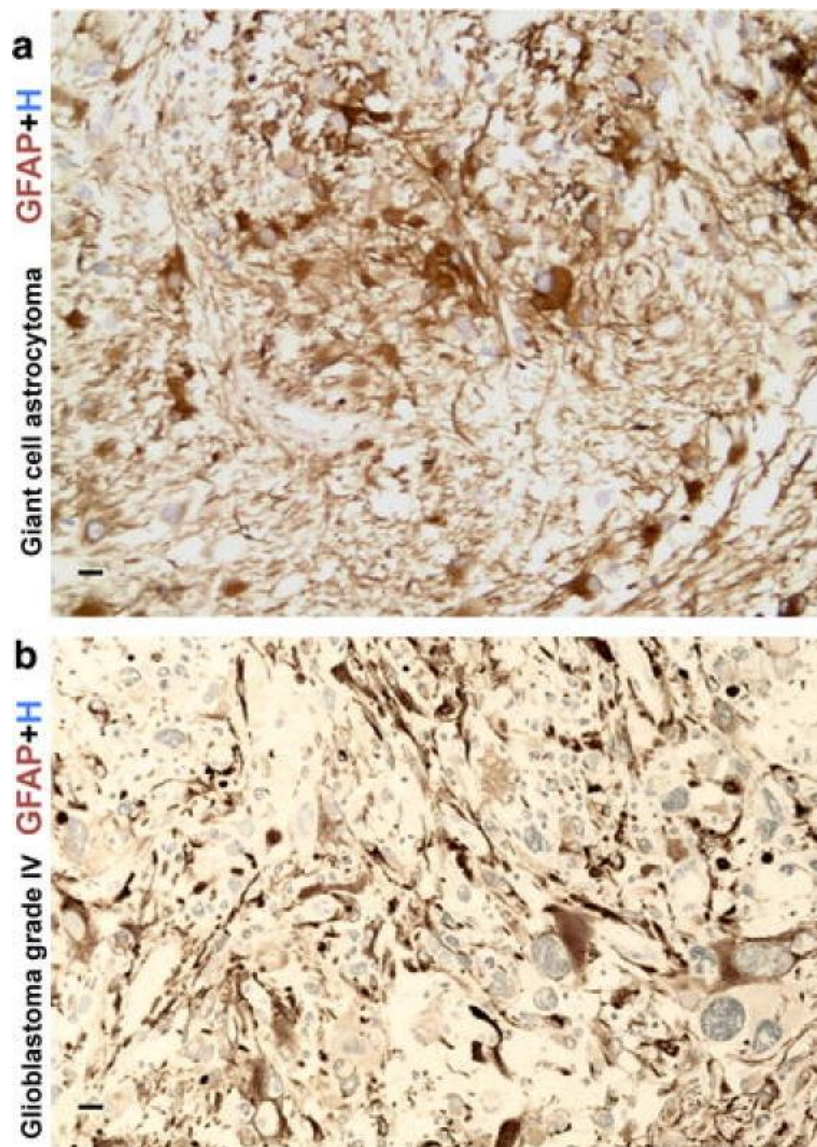


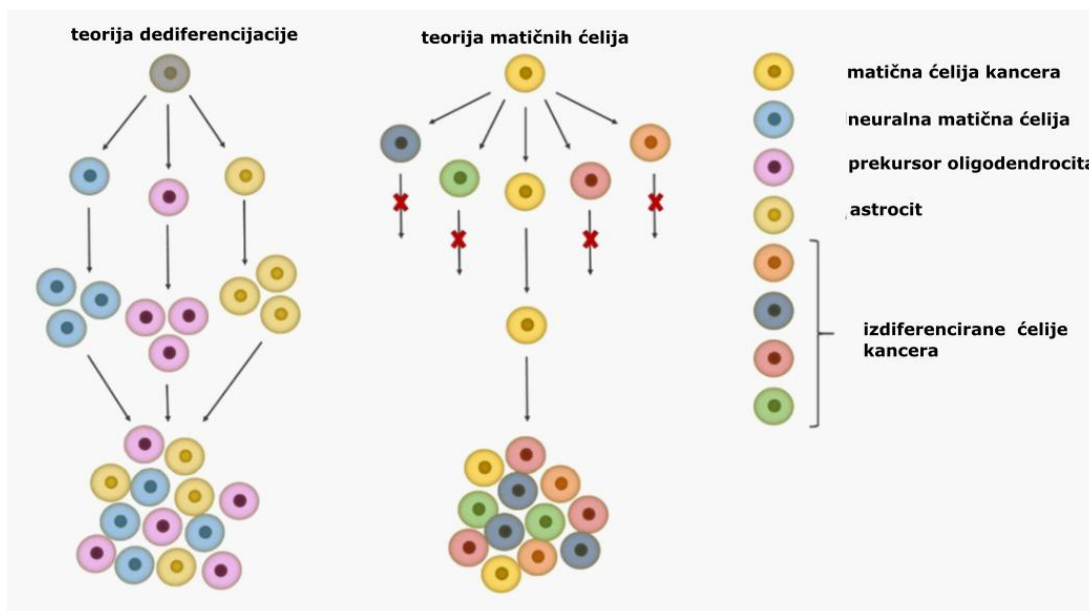
Figure 13 GFAP imunoreaktivne ćelije primarnih neoplazmi CNS **A.** subependimski astrocitom džinovskih ćelija **B.** Imunohistohemijski preparat glioblastoma (gradus IV) sa uočljivom izraženom nuklearnom i celularnom atipijom (preuzeto iz rada Sofroniew i sar., 2009.)

U zdravom mozgu čoveka, GFAP je uglavnom eksprimiran u zreлим astrocitima. Zbog toga je smatrano da visoka ekspresija GFAP predstavlja marker manje agresivnih tumora u kome preovladavaju izdiferencirane ćelije. Međutim, pokazano je da je visoka ekspresija GFAP odlikuje i ćelije radijalne glije tokom razvića mozga, kao i neuralne matične ćelije kod odraslog čoveka. Ovo saznanje smanjilo je pouzdanost GFAP-a kao markera niskogradusnih, manje invazivnih glioma. Pronađeno je da detekcija specifične izoforme GFAP, GFAP δ i GFAP α povećava dijagnostičku preciznost određivanja stadijuma astrocitoma (van Bodegraven i sar., 2019).

1.7.3. Glioblastomi – ćelijsko poreklo

Ćelijsko poreklo glioblastoma, kao i ostalih formi malignih astrocitnih glioma, nije u potpunosti razjašnjeno i predstavlja predmet intenzivnih istraživanja. Velika molekularna heterogenost glioblastoma koja se ogleda u različitim šablonima ekspresije transkripcionih regulatora, tumor-supresornih proteina i mutacija gena za kinazne receptore, ukazuje da je i njihovo ćelijsko poreklo takođe heterogeno.

Uobičajeno je shvatanje da kancer nastaje zahvaljujući akumulaciji somatskih mutacija koje rezultuju nekontrolisanom proliferacijom i selektivnom prednošću rasta u odnosu na nemutirane ćelije. Solidni tumori najčešće nastaju iz epitelijalnih tkiva. Takva mutirana ćelija može voditi poreklo od izdiferencirane ćelije koja je povratila sposobnost proliferacije, ili matične ćelije, koja već poseduje tu sposobnost (Goffart i sar., 2013). U skladu s tim, kao potencijalni izvori astrocitoma označeni su astrociti, glijalni prekursori i matične ćelije kancera (Sofroniew i sar., 2009). Dve vodeće teorije o poreklu glioblastoma predstavljaju “Teorija dediferencijacije astrocita” i „Teorija matičnih ćelija glioblastoma“ - GSC (*cancer stem cells*, eng. – matične ćelije kancera) ili GIC (*glioma initiating cells*, eng. -glioma inicirajuće ćelije) (Jovačeska, 2019).



Slika 14. Prikaz vodećih teorija o poreklu glioblastoma (preuzeto iz rada Jovačeska, 2019.)

1.7.3.1. Teorija dediferencijacije

Teorija dediferencijacije pretpostavlja da glioblastomi potiču od genetički izmenjenih normalnih ćelija astrocita koji se postepeno transformišu u maligne ćelije zadobijanjem sledećih neophodnih osobina: samoprodukcije faktora rasta, neosetljivosti na signale inhibiranja ćelijskog rasta, izbegavanja programirane ćelijske smrti (apoptoze), neograničenog replikativnog potencijala, neprekidnog podsticanja angiogeneze i sposobnosti invazije tkiva i metastaziranja. Aktivacija određenih onkogeni u kortikalnim astrocitima može inicirati formiranje histoloških karakteristika nalik GBM. Eksperimentalno je pokazano da gubitak funkcije INK4A/Arf (*alternative reading frame protein product of the CDKN2 locus*, eng. - gen za produkt alternativnog okvira čitanja lokusa *CDKN2*) rezultuje dediferencijacijom astrocita, dok ih udružena aktivacija K-Ras (*Kirsten sarcoma virus*, eng. – Kirsten-ov sarcoma virus) onkogeni ili konstitutivna aktivacija EGFR signalnog puta čini podobnim za malignu transformaciju i zadobijanje karakterističnog GBM fenotipa (Goffart i sar., 2013; Stiles i Rowitch, 2008).

1.7.3.2. Teorija matičnih ćelija kancera

Prisustvo periventrikularnih nervnih matičnih ćelija u mozgu odraslog čoveka koji eksprimiraju astrocitni marker GFAP, uputilo je na hipotezu o njihovoj ulozi u iniciranju nastanka astrocitnih glioma i glioblastoma. Uočeno je da su samo manje populacije ćelija unutar astrocitnih glioma sposobne za njihovo formiranje. Ove ćelijske populacije ispoljavaju osobine matičnih ćelija - sposobnost samoobnavljanja, multipotentnost i formiranje neurosfera u *in vitro* uslovima. Osobine i intenzitet rasta takvih neurosfera predstavljaju važan predikcioni faktor u progresiji tumora i kliničkom ishodu (Sofroniew i sar., 2009).

Vodeća teorija o poreklu glioblastoma izdvaja CSC kao glavne tumor-inicirajuće faktore sposobne za održavanje tumorskih lezija i produkciju heterogenih ćelijskih linija kancera. Sudeći po nedavnim otkrićima, GIC potiču od mutiranih neurogenih matičnih ćelija smeštenih unutar neurogenih niša subventrikularne zone mozga (SVZ) (Lee i sar., 2018; Mistry, 2019). Do takvog zaključka dovelo je paralelno upoređivanje prisustva „pokretačkih“ (*driver*, eng.) mutacija u uzorcima tumora, uzorcima patološki i radiološki neizmenjene SVZ bez znakova prisustva tumorskih ćelija i uzorcima krvi 28 pacijenata obolelih od primarnog GBM (Lee i sar., 2018). Pokazano je da je u uzorcima dobijenim iz netumorske SVZ kod 56,3% pacijenata bila prisutna najmanje jedna somatska „pokretačka“ mutacija. Iste „pokretačke“ mutacije koje su unutar ćelija SVZ slabo zastupljene, sa manje od 1% TMB (*tumor mutation burden*, eng. – mutaciono opterećenje tumora), poput mutacije u promotornom regionu *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*, eng. - reverzna transkriptaza telomeraze), zatim *EGFR*, *PTEN* i *TP53* genima bile su veoma zastupljene u uzorcima tumora (Lee i sar., 2018). Izazivanjem mutacija u nekim od navedenih gena unutar SVZ regiona miševa, udeo mutiranih neuralnih matičnih ćelija uspešno je izazvao formiranje tumora, od čega su čak dve trećine bile u regionima udaljenim od SVZ. Imunohistohemijskim obeležavanjem potvrđeno je da je mutirana prekusorska ćelija ologodendrocita glavni tip ćelije zaslužan za formiranje glioblastoma. Na ovaj način je otkriveno da mutirane matične ćelije SVZ poseduju sposobnost migracije u udaljene regione mozga i promovisanja nastanka glioblastoma putem klonalne selekcije.

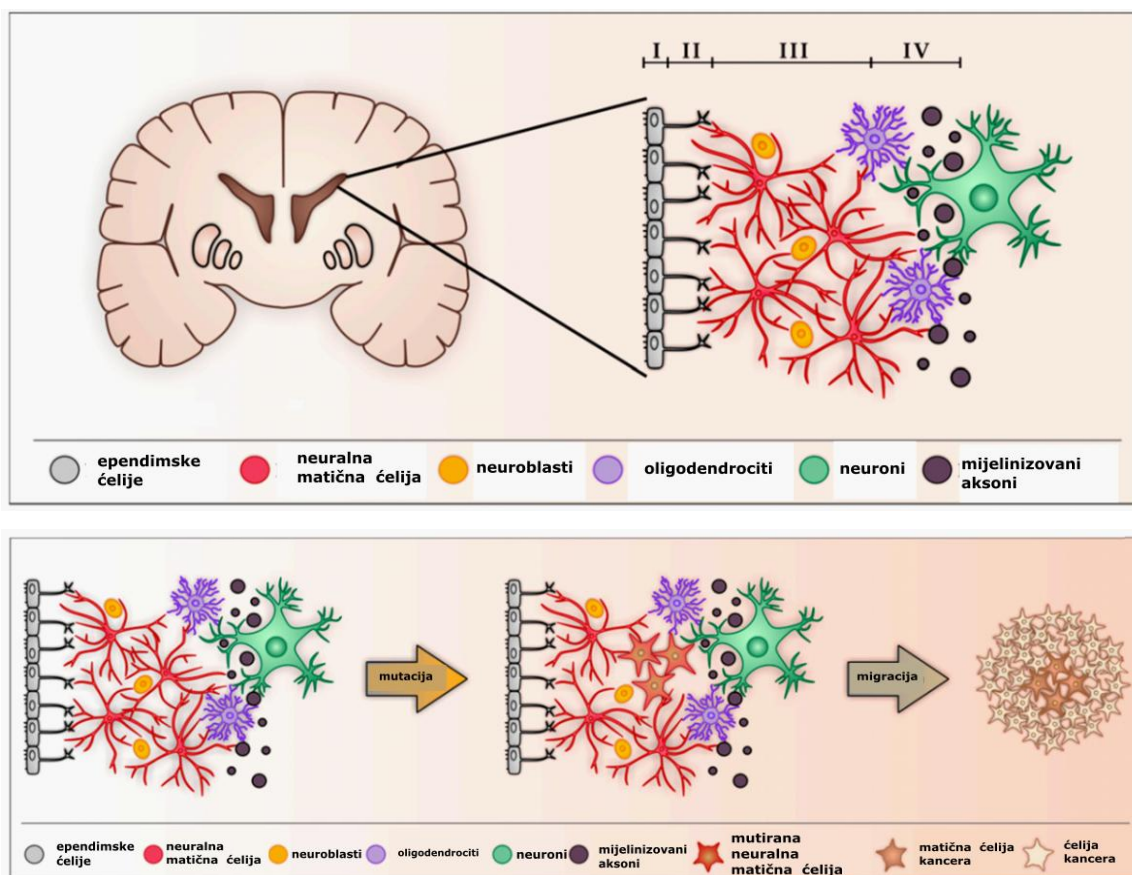
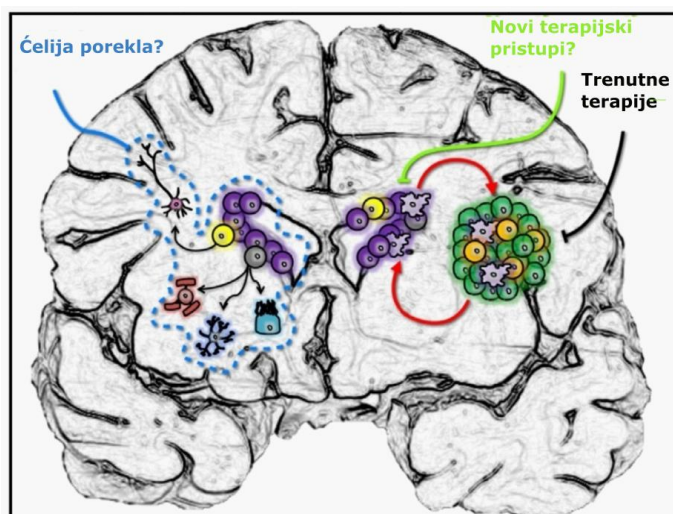


Figure 15. Šematski prikaz SVZ mozga i činioca humane neurogene niše u subependimalnoj zoni (gornja ilustracija). Na donjoj ilustraciji prikazan je nastanak tumor-promovišućih ćelija na osnovu teorije matičnih ćelija kancera (preuzeto iz rada Altmann i sar., 2019).

Ovakvim otkrićem je dato objašnjenje multifokalnog ili multicentričnog javljanja glioblastoma - istovremenog prisustva više radiološki nezavisnih lezija. Takođe, objašnjena je pojava rekurentnih tumora koja se dešava kod gotovo svih pacijenata, bez obzira na preciznost hirurške resekcije. Savremene terapije GBM bi zbog toga, pored terapije usmerene na lokalizovanu leziju tumora, morale biti usmerene na prepoznavanje i tretman matičnih ćelija unutar SVZ, u cilju poboljšanja kliničkog ishoda (Mistry, 2019). Takođe, radioterapija usmerena na SVZ predstavlja jednu od mogućnosti koja se istražuje 28 (slika 16.).



Slika 16. Odnos između adultnih neurogenih niša i glioblastoma-inicirajućih ćelija (preuzeto iz rada Goffart i sar., 2013.)

Savremena saznanja proistekla iz GWAS (*Genome Wide Association Studies*, eng. - izučavanja genomskih asocijacija) ukazuju na to da astrocitomi nižeg gradusa potiču od progenitornih ćelija astroglije, zadržavajući primitivni neurektodermalni genetički profil ćelije (Melin i sar., 2017). Tzv. „sekundarni glioblastomi“ koji nastaju progresijom iz takvih astrocitoma često se karakterišu mutacijom gena za izocitrat dehidrogenazu 1 (*IDH1*) i odlikuju znatno boljom prognozom i kliničkom slikom od primarnih glioblastoma.

Bez obzira na to koja od navedenih teorija preciznije objašnjava poreklo glioblastoma, mikrosredinski činioci i njihove interakcije omogućavaju i podstiču tumorogenezu, iako takvi mehanizmi još uvek nisu sasvim razjašnjeni (Mistry, 2019).

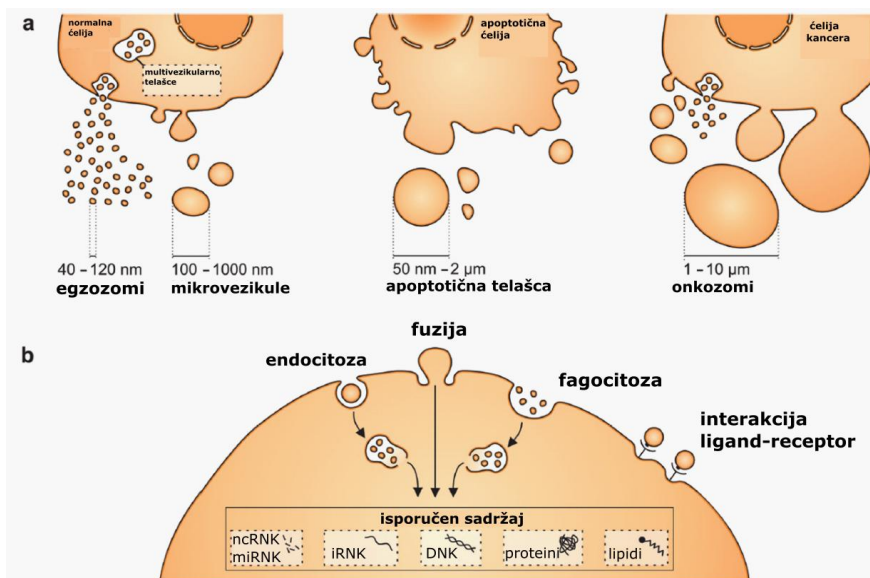
1.8. Komunikacija GBM ćelija sa mikrosredinskim činiocima

Maligne ćelije GBM i pored izuzetne invazivnosti retko kolonizuju tkiva izvan CNS-a (incidenca ekstrakranijalnih GBM metastaza iznosi 0,5 %), što se prvobitno objašnjavalo postojanjem krvno-moždane barijere. Međutim, ono što dodatno „zadržava“ GBM ćelije unutar tkiva CNS-a jeste konstantna dvosmerna komunikacija između tumorskih ćelija i činioca jedinstvene GBM mikrosredine karakteristične za tkiva CNS-a. Ćelijski parenhim kod GBM sačinjen je od vaskularnih ćelija, mikroglije, ćelija imunog sistema i neuralnih prekusora koji su u intenzivnoj i direktnoj interakciji sa tumorskim tkivom koje okružuju, usmeravajući njegovu

progresiju. Ta interakcija je prepoznata kao glavni faktor podsticanja geneze i progresije ovih tumora. (Dobra i sar., 2020; Simon i sar., 2020).

Mehanizam i priroda uzajamne komunikacije rasvetljeni su nedavno, kada su otkrivene EV (*extracellular vesicles*, eng. - ekstracelularne vezikule) kao jedan od najvažnijih vidova bidirekcionne komunikacije između tumora i tumorske mikrosredine. Dobra i sar., 2020; Zaborowski i sar., 2015).

Ekstracelularne vezikule se definišu kao bezjedarne ekstracelularne sferične strukture veličine između 30 nm i 10 µm. Njihovu opnu čini dvosloj fosfolipida a sadržaj mogu činiti raznovrsni tipovi biomolekula – različite klase proteina, fragmenti DNK molekula, informaciona RNK ili neki od tipova nekodirajuće RNK poput mikro RNK (*miRNAs*, eng.), duge nekodirajuće RNK (*long-non-coding RNAs*, eng.) i transportne RNK (Matarredona i sar., 2019). Tako je pomoću EV omogućena intenzivna komunikacija ćelije koja ih sekretuje sa susednim ili udaljenim ćelijama (Slika 17.) (Dobra i sar., 2020; Zaborowski i sar., 2015).

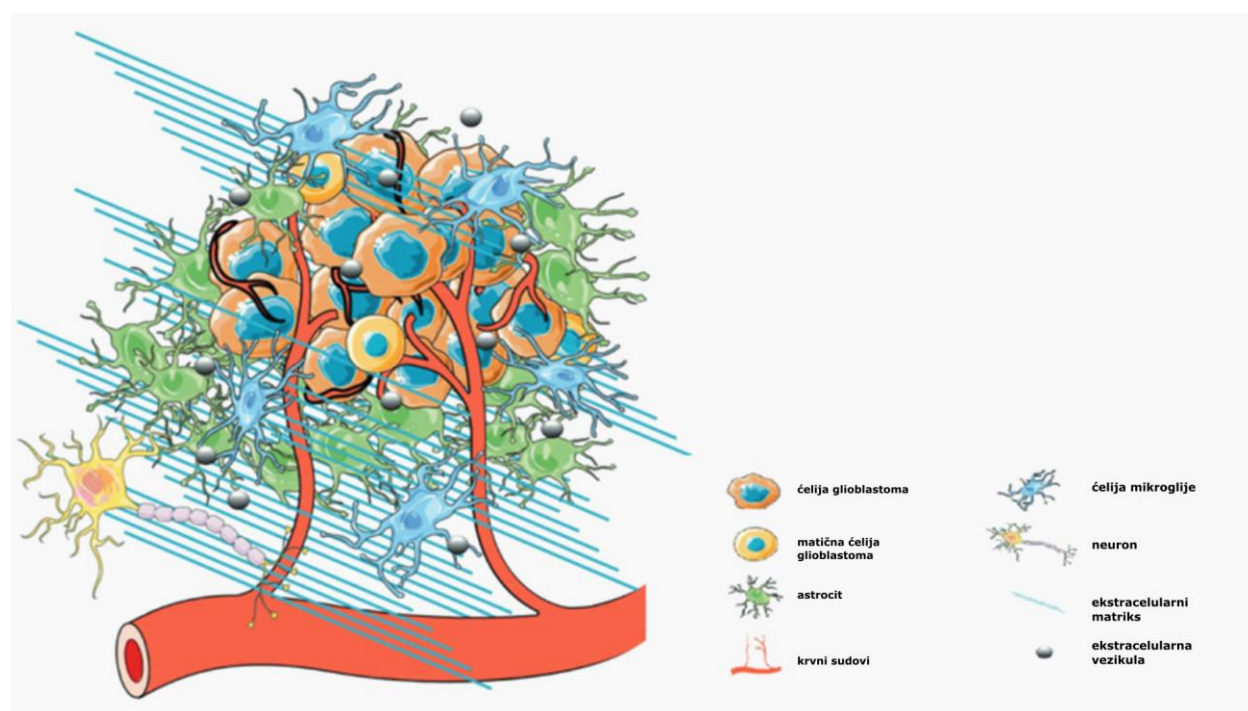


Slika 17. Različiti tipovi ekstracelularnih vezikula **A.** Egzozome i mikrovezikule produkuju normalne ćelije, process apoptoze izaziva formiranje apoptitičnih telašaca, dok ćelije kancera produkuju velike ekstracelularne vezikule pod nazivom “onkozomi” **B.** Različiti mehanizmi usvajanja EV od strane receptorske ćelije (preuzeto iz rada Zaborowski i sar., 2015.)

Ovakav vid transfera biomolekula iz tumorskih ćelija u neizmenjene ćelije mikrookoline i obratno zaslužan je za indukovanje tumor-promovišućih mehanizama poput angiogeneze, sposobnosti invazije tkiva, izbegavanja procesa apoptoze, kao i rezistencije na terapiju bevacizumabom i TMZ alkilirajućim agansom (Simon i sar., 2020).

1.8.1. Ekstracelularne vezikule GBM

Ekstracelularne vezikule su detektabilne u krvotoku, a njihov sadržaj oslikava sadržaj ćelije iz koje su sekretovane. Zahvaljujući tome bi se analizom njihovog sadržaja mogli preciznije dijagnostikovati molekularni podtipovi GBM (proneuralni, klasični, mezenhimalni). Trenutni standard u dijagnostici GBM zasnovan na biopsiji ne omogućava zadovoljavajuću karakterizaciju ekstremne intratumorske heterogenosti GBM zbog ograničenja koja donosi invazivni pristup uzorkovanju tumorskog tkiva (Dobra i sar., 2020). Kako su EV detektabilne u krvotoku, ali i cerebrospinalnoj tečnosti i urinu pacijenata, one predstavljaju važne kandidate za neinvazivnu, tečnu biopsiju GBM. Takođe, sposobnost EV da difunduju kroz krvno-moždanu barijeru ukazuje na mogućnost njihove upotrebe radi ciljanog dostavljanja lekova u ćelije tumora i GBM mikrosredinu (Dobra i sar., 2020). Otkriće uloge EV u razvoju GBM dovelo je do drugačijeg sagledavanja problema lečenja GBM, stavivši u fokus mikrosredinu GBM umesto samih tumorskih ćelija. (slika 18.) (Simon i sar., 2020).



Slika 18. Ilustracija međusobne komunikacije komponenti GBM mikrosredine i GBM ćelija (preuzeto iz rada Simon i sar., 2020.)

1.8.2. Interakcija mikroglije i GBM

Primećeno je da najveći udeo netransformisanih ćelija u biopsijama GBM predstavljaju tumor-asocirani makrofagi. Ovi glavni činioci tumor-asocirane mikroglije prodiru u tkivo GBM podstaknuti hemo-atraktivnim citokinima poput MCP-3 (*monocyte chemotactic protein-3*, eng. - monocitni hemotaktični proteina 3), CSF-1 (*colony-stimulating factor 1*, eng. - faktor stimulacije kolonija 1) i G-CSF (*granulocyte-colony stimulatory factor*, eng. - faktora stimulacije kolonija granulocita) koje proizvode tumorske ćelije. Posledica prodiranja makrofaga u tumorsko tkivo jeste degradacija ekstracelularnog matriksa čime se podstiče njegova invazivnost i rast. Naime, signalni molekuli koje proizvode ćelije GBM podstiču makrofage na produkciju MT1-MMP (*membrane type 1 metalloproteinase*, eng. - membranska metaloproteinaza tipa 1). Sekretacija MT1-MMP zauzvrat u ćelijama GBM podstiče sekreciju i MMP2 (*matrix-metalloproteinase 2*, eng. - aktivaciju matriks-metaloproteinaze 2) (Goffart i sar., 2013). Produkciju MMP2 u ćelijama mikroglije izaziva aktivacija CX3CL1/CX3CR1 (*C-X3-C motif chemokine ligand 1/ C-X3-C motif chemokine receptor 1*, eng. – ligand sa C-X3-C hemokinskim motivom/receptor za ligand sa C-X3-C hemokinskim motivom) signalnog puta (Held-Feindt i sar., 2010). Primećeno je da je aktivacija CX3CR1 receptora prisutna u ćelijama mikroglije asocirane sa gliomima i da je prisustvo V249I genetičke varijante CX3CR1 gena povezano sa umanjenom infiltracijom mikroglije kod primarnih GBM, što rezultuje boljim kliničkim ishodom (Held-Feindt i sar., 2010).

1.8.3. Limfociti i GBM

Pored makrofaga, i limfociti poseduju sposobnost infiltriranja u gliome i regulaciju imunog odgovora. Štaviše, povećano prisustvo Tregs (*regulatory T cells*, eng. – regulatorne T ćelije) u gliomima direktno je povezano sa progresijom i invanzivnošću GBM. Nalik makrofagima, Tregs bivaju regrutovane ka tumorskom tkivu posredstvom hemokina poput CCL2 (*C-C motif chemokine ligand 2*, eng. – ligand sa C-C hemokinskim motivom 2) i CCL22 (*C-C Motif chemokine ligand 22*, eng. – ligand sa C-C hemokinskim motivom 22). Uočeno je da je njihova infiltracija u korelaciji sa povećanom ekspresijom TGF- β mRNA (*Transforming growth factor beta 1*, eng. – transformišući faktor rasta beta 1) i ekspresije tog proteina, kao i da njegov izvor predstavljaju Tregs. (Biollaz i sar., 2009).

1.8.4. Interakcija neuralnih progenitora i GBM

Neuralne progenitorne ćelije ili NPC (*neural progenitor cells*, eng.) u mikrokolini takođe ostvaruju intenzivnu komunikaciju sa GBM. Ove ćelije poreklom iz subventrikularne zone ili žuljevitog tela bivaju putem CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor 4*, eng. – hemokinski receptor sa C-X-C motivom 4) regrutovane do slojeva ćelija koje okružuju GBM. Odatle, NPC ispoljavaju antitumorigeno dejstvo otpuštanjem rastvorljivih faktora koji umanjuju proliferaciju GBM putem izazivanja apoptoze GBM ćelija i diferencijacije GIC. Rezultati istraživanja na mišjem modelu GBM pokazali su da je tumor-supresorni efekat NPC povezan sa starenjem i neurogenim sposobnostima (Walzlein i sar., 2008). Kako sposobnost neurogeneze opada sa starenjem, manji broj NPC regrutovanih oko tumorske lezije može biti jedan od glavnih razloga lošijeg kliničkog ishoda kod starijih GBM pacijenata (Goffart i sar, 2013; Walzlein i sar., 2008).

1.8.5. Vaskularna niša i GBM

Neurogene niše SVZ zone u mozgu, u kojima su smeštene i iz kojih potiču NSC, odlikuju se izuzetno razgranatom vaskularnom mrežom. Poput NSC, i maligne GIC ostvaruju kontakt sa takvim vaskularnim nišama u cilju ostvarenja ravnoteže između kapaciteta samoobnavljanja i diferencijacije. Visokogradusni gliomi, a naročito GBM, ubrajaju se u izuzetno vaskularizovane tumore, a mikrovaskularna proliferacija i endotelijalna hiperplazija predstavljaju glavna histološka obeležja GBM. Pokazano je da endotelijalne ćelije sekretuju faktore koji podstiču GIC da ostanu u nediferenciranom i samoobnavljajućem stanju, koje zauzvrat podstiču angiogenezu i vaskularizaciju tumora (Erlandsson i sar., 2004). Tako je SCF (*stem cell factor*, eng. - faktor matičnih ćelija) izdvojen kao snažni proangiogeni faktor u GBM koji podstiče migraciju, preživaljavanje i proliferaciju NPC (Erlandsson i sar., 2004). Jedan od klinički najvažnijih faktora koje produkuju GBM ćelije jeste vaskularni-endotelijalni faktor rasta ili VEGF. Ćelije GBM pojačano sekretuju VEGF u uslovima hipoksije ili acidoze i još uvek nerazjašnjenim sredinskim uslovima. Ovaj faktor pojačava sposobnost GIC da indukuju angiogenezu odnosno vaskularizaciju tumora. Aktivacija onkogenog EGFR ili gubitak funkcije PTEN, važnih molekularnih obeležja GBM, povezani su sa povećanom produkcijom VEGF u malignim

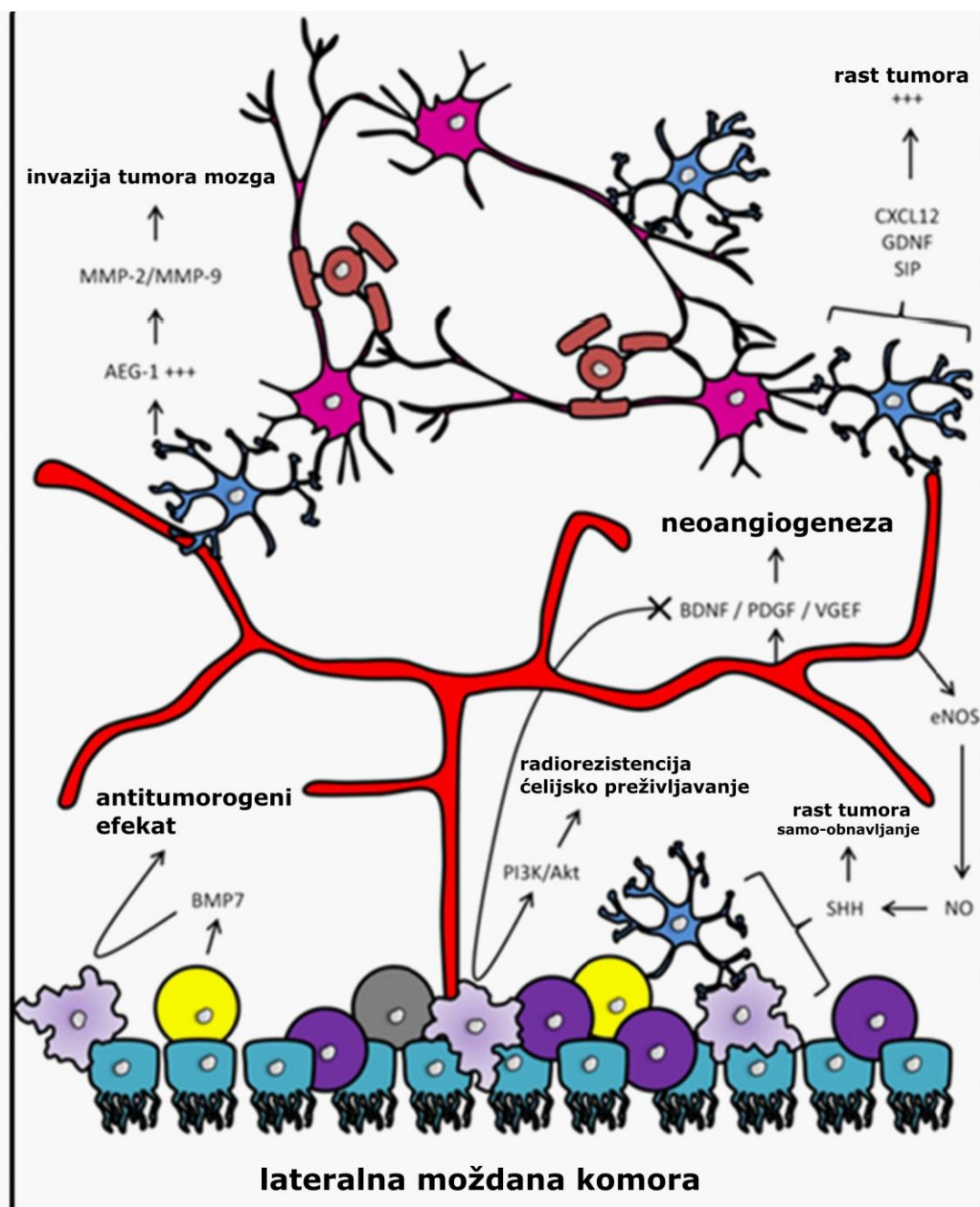
gliomima (Goffart i sar, 2013, Pore i sar., 2003). U cilju terapijskog umanjenja angiogeneze i invazivnosti GBM, razvijen je lek bevacizumab, koji predstavlja anti-VEGF antitelo. Ovaj lek kroz sprečavanje angiogeneze redukuje održavanje GIC populacija, a samim tim i progresiju tumora (Kazazi-Hyseni i sar., 2010).

1.8.6. Mikrosredinski uslovi u SVZ i GBM

Na slici 19. nalazi se šematski prikaz odnosa činioca SVZ mikrosredine i GIC ćelija. U uslovima hipoksije i acidoze ili aktivacijom onkogeni dolazi do pojave GIC unutar SVZ zone mozga. Hipoksične GBM ćelije pojačano ekspiriraju HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α subunit*, eng. - inducibilni faktor hipoksije - 1 α) podstičući sekreciju proangiogenih faktora poput VEGF (Brat i Van Meir, 2004). Takođe, GIC proizvode pro-inflamatorni citokin IL-8 koji aktivira eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*, eng. - azot-monoksid sintaza endotelijalnih ćelija) (Guequén i sar., 2019). Proizvodnja NOS aktivira signalni put S-nitrozilacije vaskularnog endotelijalnog kaderina (*VE-cadherin*, eng.) i drugih proteina činioca adherentnih veza (p129, β -katenina, α -katenina i γ -katenina) između endotelijalnih ćelija zaslužnih za integritet endotelijalne barijere. S-nitrozilacija rezultuje internalizacijom ovih proteina i narušavanjem endotelijalne barijere, dovodeći do mikrovaskularne hiperpermeabilnosti. Pored toga, NOS aktivira i Notch signalni put koji ubrzava progresiju tumora. Izmene u signalnim putevima receptora faktora rasta, obeležja GBM, dovode do prekomerne aktivacije PI3K/Akt^j signalnog puta (*phosphoinositide 3-kinase family*, eng. - gen za fosfatidilinozitol 3-kinazu) koji je važan regulator preživljavanja GBM ćelijskih populacija i otpornosti GIC na radioterapiju. Neuralne progenitorne ćelije ispoljavaju antitumorsko dejstvo na GBM sekrecijom tumor supresornih proteina poput BMP7 (*bone morphogenetic protein-7*, eng. - koštani morfogenetički protein 7), indukujući diferencijaciju GIC. Astroцити koji su u bliskom kontaktu sa vaskularnim endotelijumom SVZ niša vrše sekreciju neurotrofičkih faktora poput CXCL12 (*C-X-C motif chemokine ligand 12*, eng. - ligand sa C-X-C hemokinskim motivom 12), SIP (*siah-1 interacting protein*, eng. – Siah-1 interagujući protein) i GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*, eng. – neurotrofični faktor poreklom od glijalnih ćelijskih linija) koji podstiču invanzivne

^j Akt kinaza predstavlja serin-treonin specifičnu protein kinazu. „Akt“ iz njenog naziva potiče od privremenog klasifikacionog imena koje je naučnik Džejkob Firt (*Jacob Furth*, eng.) dodelio laboratorijskim miševima koje je odgajao. Miševe je odlikovalo razvijanje spontanog limfoma timusa ili timoma. Slovo „t“ označava timom i pridodato je nakon izolacije transformišućeg retrovirusa iz „Akt“ soja miševa.

osobine GBM ćelija. Oni takođe eksprimiraju AEG-1 (*astrocyte elevated gene-1 protein*, eng. - protein povećane aktivnosti astrocita) koji povećava invazivnost GBM kroz aktivaciju MMP-2 i MMP9 (slika 19.) (Goffart i sar., 2013; Brat i Van Meir, 2004).



Slika 19. Interakcija mikrosredinskih činioca u SVZ i aktivacija onkogena u GIC (ljubičasta boja) usled prisustva mikrosredinskih uslova poput hipoksije i acidize (preuzeto iz rada Goffart i sar., 2013)

1.8.7. Imunosupresivna mikrosredina u astrocitima i „reaktivni astrociti“

Primećeno je da ćelije GBM dele zajedničke osobine sa astrocitima. Jedna od njih je povećana produkcija glutaminske kiseline koju vrše ćelije tumora i koja može uticati na invazivnost rasta tumora. Analogno uticaju na astrocite, pojačana aktivacija STAT3 signalnog puta u ćelijama astroglioma umanjuje inflamaciju i imuni odgovor, podstičući na taj način proliferaciju tumora (Sofroniew i sar., 2010).

Iako je prisustvo i uticaj „reaktivnih astrocita“ unutar tumorske mikrosredine slabije istraženo, skorašnje studije predstavile su nekoliko važnih otkrića. Jedno od njih se odnosi na poreklo imunosupresivne mikrookoline unutar GBM. Pri istraživanju metastaza mozga, pokazano je ćelije tumora putem aktivacije STAT3 signalnog puta indukuju aktivaciju i održavanje subpopulacije reaktivnih astrocita koja okružuje tumorsku leziju i ispoljava pro-metastatsko dejstvo (Priego i sar., 2018). U okviru GBM identifikovana je specifična podgrupa reaktivnih astrocita koja se karakteriše aktivacijom JAK (*Janus kinase*, eng. – janus kinaza)/STAT signalnog puta i ekspresijom CD274 ćelijskog markera. Smatra se da na njihovu transformaciju i sposobnost produkcije antiinflamatornih IL10 i TGF- β direktno utiče sekrecija citokina od strane okolnih tumorskih ćelija i ćelija mikroglije (Henrik Heiland i sar., 2018). Kao što je spomenuto, ćelije mikroglije predstavljaju specijalizovane makrofage i glavnog činioca imunog sistema u CNS-u. Važnost njihove unakrsne komunikacije sa astrocitima u cilju formiranja imunološki „hladne“ ćelijske mikrosredine u gliomima dovelo ih je u žižu interesovanja savremene neuro-onkologije.

Analizom transkriptoma definisano je više transkripcionih podtipova astrocita koji odgovaraju njihovim različitim aktivacionim stanjima, a pod uticajem signalnih molekula astrociti mogu menjati transkripcioni profil duž dve ose. Krajeve prve transkripcione ose čine zrelo mAC (*mature astrocyte*, eng. – zreli astrocit) sa jedne i progenitorsko APC (*astrocyte precursor cell*, eng. – prekursor astrocita) stanje sa druge strane. Drugu osu čine transkripcioni profili između inflamatornog (A1) i alternativnog (A2) stanja.

Reaktivni astrociti koje karakteriše A1-specifična genska ekspresija odlikuju se podsticanjem signalnih puteva zaduženih za prezentaciju antigena, umanjenoj neurotoksičnosti i aktivaciju sistema komplementa. Alternativno aktivirani astrociti A2 su sa druge strane specifični

reaktivni astrociti koji nastaju usled ishemijskih oštećenja, utičući na formiranje glijalnih ožiljaka i zaštitu neurona i sinapsi putem sekrecije neurotrofičkih faktora i trombospondina. Pokazano je da tumor-asocirani reaktivni astrociti glioblastoma ispoljavaju multidimenzionalni pomak ka progenitorskom i alternativnom transkripcionom stanju. Kao novi marker gen takvih astrocita izdvojen je, pored spomenutog CD274 i *CHI3L1* (*Chitinase-3-like protein 1*, eng. - protein 1 nalik hitinazi 3), čija je povećana ekspresija karakteristična za A2 podtip astrocita (Henrik Heiland i sar., 2018).

1.8.8. Proliferacija i invazija GBM

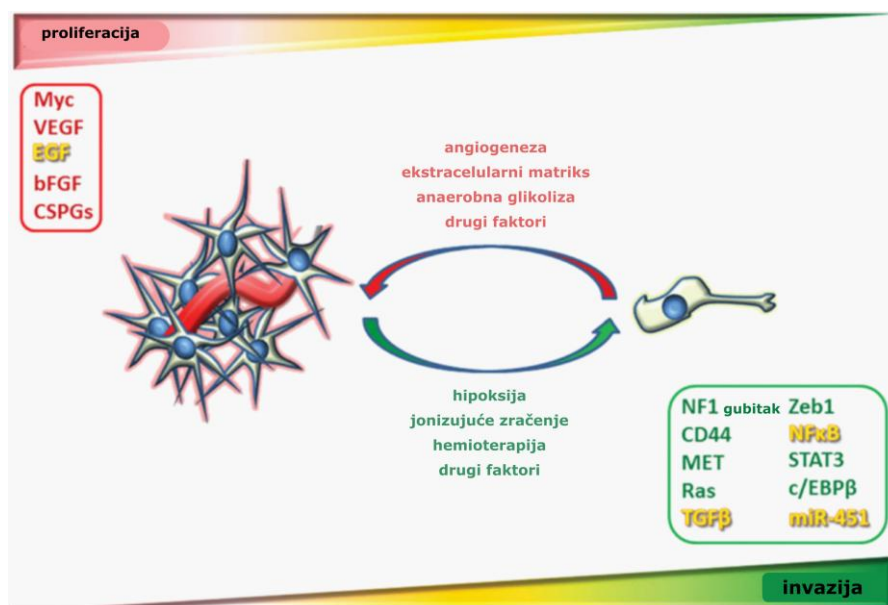
Infiltracija pojedinačnih neoplastičnih GBM ćelija u okolni parenhim, a zatim i njihova proliferacija pod jakim je uticajem međućelijskih interakcija kao i opisanih mikrosredinskih činioca, od kojih je najvažnija hipoksija. Mikrosredinski činioci poput prekidača izazivaju njihovu adaptaciju iz proliferativnog u invanzivni fenotip GBM ćelija i obratno, modulirajući njihov transkripcioni profil. Tako je GBM tumor istovremeno sačinjen od heterogenih subpopulacija malignih ćelija, od kojih je jedan deo skloniji invaziji – širenju u zdravo tkivo, a drugi proliferaciji – rastu tumorske mase. Preovladavanje subpopulacija GBM ćelija invazivnog fenotipa povezano je sa lošijim kliničkim ishodom odnosno kraćim vremenom preživljavanja (Xie i sar., 2014).

Zahvaljujući jedinstvenoj vaskulaturi mozga u vidu krvno-moždane barijere, kao i odsustvu limfnih sudova, pristup GBM tumorskih ćelija sistemske cirkulaciji je u velikoj meri sprečen. Posledica toga jeste izuzetno mali udeo zabeleženih metastaza GBM izvan neuraksisa. Kratko vreme preživljavanja pacijenata nakon uspostavljanja dijagnoze i primene terapije prouzrokovano je lokalnom invazijom i pojavom recidiva GBM. Baz obzira na to što su GBM neuroepitelijalnog porekla, pokazano je da je fenotipska transformacija karakteristična za proces metastaziranja solidnih tumora pod nazivom epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) analogna sa proneuralno-mezenhimalnom tranzicijom (PMT) karakterističnom za GBM (Niklasson i sar., 2019). Kao glavni uzrok GBM invazivnosti označene su GIC matične ćelije GBM (Xie i sar., 2014).

Na progresiju GBM utiču dva važna činioca, stopa proliferacije GBM ćelija i brzina migracije invanzivnih GBM ćelija. Iako se smatralo da je jednom uspostavljen invanzivni ili

proliferativni fenotip GBM tumora trajnog karaktera i da ne podleže izmeni, rastući broj dokaza govori o adaptivnoj prirodi GBM regulisanoj mikrosredinskim činiocima (Godlewski i sar., 2010).

Visoko-proliferativne ćelije odlikuje slaba invazivna sposobnost i obratno - invanzivne GBM ćelije karakteriše niska stopa proliferacije. Pokazano je da uslovi hipoksije, ali i jonizujuće zračenje i hemioterapija mogu izazvati poprmanje invanzivnog fenotipa od strane maligne ćelije glioblastoma kao i matičnih ćelija GBM. Sa druge strane, proces angiogeneze, prisustvo ekstracelularnog matriksa tumora i anaerobni metabolizam (glikoliza) podstiču proliferativni fenotip, repopulaciju tumorskih ćelija i njegov rast. Navedeni mikrosredinski uslovi pokreću zasebne signale i signalne puteve, neki od njih uključeni su u regulaciju oba fenotipa – invazivnog i proliferativnog. Primer za to su signalni put epidermalnog faktora rasta EFG, zatim TGF- β , NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, eng. - nuklearni transkripcioni faktor koji interaguje sa enhenserom gena za laki lanac imunoglobulina u aktiviranim B limfocitima) i miR-451 (*micro RNA 451*, eng. – mikro RNK 451). Tako miRNA-451 na osnovu intenziteta metaboličkog stresa reguliše adaptaciju na proliferativni ili invanzivni fenotip GBM ćelija putem aktivnosti unutar istog signalnog puta – LKB1/AMPK (*liver kinase B1/adenosine monophosphate-activated protein kinase*, eng. – jetrena kinaza B1/proteinska kinaza aktivirana adenzin-monofosfatom) (Godlewski i sar., 2010). Na slici 20. predstavljen je dijagram proliferacije i invazije GBM.



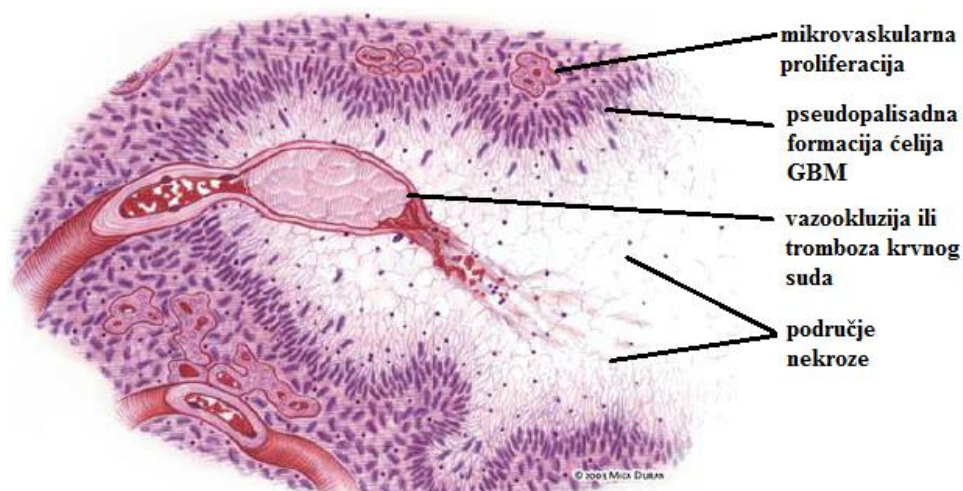
Slika 20. Dijagram transformacije GBM ćelija u proliferativni i invazivni fenotip u zavisnosti od aktivacije ključnih signalnih puteva podstaknute mikrosredinskim činiocima (preuzeto iz rada Xie i sar., 2014.)

U središtu tumorske mase koji karakteriše intenzivna angiogeneza najčešće preovladava proliferativni fenotip malignih ćelija, dok se ćelije rasute po obodu tumora infiltrirane u zdravo tkivo mozga karakterišu invanzivnim fenotipom. Zbog mikro-prisustva invanzivnih ćelija u zdravom parenhimu mozga, hirurška resekcija tumorske mase ne može biti kompletna. Zbog toga je gotovo neizbežno pojavljivanje lokalnih GBM lezija poreklom od infiltriranih GBM ćelija invanzivnog fenotipa koje se nakon operacije transformišu u proliferativne ćelije. Iako radioterapija i hemioterapija doprinose boljem kliničkom ishodu uništavajući većinu izdiferenciranih proliferativnih i invazivnih malignih ćelija, one su slabo delotvorne u uništavanju subpopulacija nediferenciranih maligno-transformisanih matičnih ćelija GBM. Zahvaljujući njihovoj sposobnosti samoobnavljanja i izraženoj ćelijskoj plastičnosti, GBM matične ćelije predstavljaju glavni uzrok pojave recidiva čineći ishod terapijskih procedura nepredvidljivim (Xie i sar., 2014).

Ubrzani rast GBM odvija se po dobro dokumentovanom vazo-okluzivnom modelu koji uključuje protrombotske mehanizme asocirane sa nekrozom tumora izazvane hipoksijom (Brat i sar., 2004; Rong i sar., 2006). Izrazito agresivna invazija pojedinačnih neoplastičnih GBM ćelija predstavlja obeležje i jednu od glavnih razlika između GBM i astrocitoma nižeg gradusa i glavni uzrok obeshrabrujuće kratkog vremena preživljavanja pacijenata.

1.8.9. Vazookluzija i nekroza kod GBM

Karakteristično morfološko obeležje GBM predstavljaju široka područja nekroze tkiva koje okružuje pseudopalisadna formacija neoplastičnih ćelija GBM. Nekroza tkiva predstavlja posledicu abnormalnog procesa ekstenzivne angiogeneze tumora, koja takođe predstavlja važnu morfološku karakteristiku GBM. Zbog poremećenog procesa angiogeneze, krvne sudove koji snabdevaju GBM tumor nutrijentima i kiseonikom često odlikuje vazookluzija ili intravaskularna tromboza koja onemogućava dopremanje kiseonika do perivaskularnih ćelija, prouzrokujući hipoksiju. U nedostatku kiseonika, GBM ćelije intenziviraju anaerobni metabolizam koji rezultuje lokalnom akumulacijom mlečne kiseline (Xie i sar., 2014). Hipoksija i akumulacija mlečne kiseline podstiču ćelije GBM koje se nalaze oko degenerisanog krvnog suda da migriraju ka regionima bogatijim kiseonikom. Tumorske ćelije koje bezuspešno migriraju bivaju degradirane putem procesa nekroze ili ređe apoptoze. Na ovaj način dolazi do formiranja nekrotičnih zona koje okružuju nefunkcionalni krvni sud, dok se na obodu ovih zona uočavaju pseudopalisadne formacije sačinjene od ćelija GBM koje su uspešno migrirale. Pseudopalisadne ćelije potom produkuju VEGF i transkripcione faktore indukovane hipoksijom (HIF) koji dovode do mikrovaskularne proliferacije okolnih ćelija (Slika 4) (Crespo i sar., 2015).



Slika 21. Pseudopalisadna formacija ćelija GBM (preuzeto iz rada Brat i sar., 2004.)

Kao što je spomenuto, glavni okidač procesa angiogeneze solidnih tumora predstavlja hipoksija, koja utiče na aktivaciju heterotrimeričnih hipoksija-inducibilnih transkripcionih faktora 1α i 2α (HIF- 1α i HIF- 2α). Aktivnost HIF transkripcionih faktora kontroliše PHD klasa

enzima (*prolyl hidroxylases*, eng. - prolil hidroksilaze). Ova klasa enzima u prisustvu molekularnog kiseonika, 2-oksoglutarata, jona gvožđa i askorbinske kiseline vrši prolil hidroksilaciju HIF- α subjediničica čime izaziva njihovu proteozomalnu degradaciju. U uslovima hipoksije, PHD enzimi bivaju inhibirani čime se omogućava aktivnost HIF transkripcionih faktora (van Uden i sar., 2008).

Hipoksija-inducibilni transkripcioni faktori iniciraju ekspresiju TGF- α i proangiogenih faktora poput VEGF koji imaju ulogu u formiranju mreže krvnih sudova (Huang i sar., 2016; van Uden i sar., 2008).

Transkripcioni faktor HIF-1 α , kroz regulaciju ekspresije oko 60 gena reguliše nekoliko ćelijskih procesa važnih za progresiju tumora, poput procesa glikolize i epitelno-mezenhimalne tranzicije. Pretpostavlja se da HIF-1 α reguliše ćelijski odgovor na hipoksiju putem aktivacije ekspresije *Glut1* (*glucose transporter 1*, eng. - transporter glukoze 1) i gena uključenih u proces glikolize. Aktivacijom anaerobnog metabolizma se tumorska ćelija adaptira na anaerobne uslove i osigurava svoj opstanak (Huang i sar., 2016).

Otkriveno je da pored navedenih uloga, HIF grupa transkripcionih faktora u ćelijama tumora mozga podstiče ekspresiju CD133 antigena karakterističnog za neuralne matične ćelije, odnosno prouzrokuje produkciju i opstajanje GIC matičnih ćelija glioblastoma.

Dok HIF-1 α transkripcioni faktor na opisane načine izaziva proliferaciju i preživljavanje svih kancerskih ćelija GBM tumora, aktivacija HIF-2 α transkripcionog faktora specifično odlikuje matične ćelije GBM, čak i u uslovima slabije izražene hipoksije. Zbog toga sprečavanje funkcije HIF-2 α putem inhibicije njegove dimerizacije, sposobnosti vezivanja za DNK, ekspresije iRNK ili proteina predstavlja pogodan terapijski pristup u tretiranju GBM (Wigerup i sar., 2016).

1.9. Molekularna biologija GBM

1.9.1. Molekularna dijagnostika i klasifikacija GBM

Otkriće izrazite molekularne heterogenosti glioblastoma otvorilo je put ka razvoju molekularne dijagnostike za zadatkom dopunjavanja nedostataka tradicionalne histopatologije. Nalik histopatološkoj dijagnostici koja se zasniva na prepoznavanju morfoloških karakteristika

patološki izmenjenih tkiva, molekularna klasifikacija prepoznaje specifične genetičke i epigenetičke izmene u individualnim uzorcima omogućavajući još precizniju dijagnostiku u cilju primene „personalizovane“ terapije GBM (Xie i sar., 2014). U tabeli 6. prikazane su razlike između primarnih i sekundarnih GBM na osnovu genetičkih abnormalnosti koje izazivaju promene u glavnim signalnim putevima GBM (Li i sar., 2016).

Tabela 6. - Genetičke abnormalnosti i glavni signalni putevi uključeni u patogenezu GBM (Li i sar., 2016.).

Genetičke abnormalnosti	Učestalost (%)	Glavni signalni putevi koji su izmenjeni
Sekundarni GBM		
Mutacija <i>IDH</i> gena	60-80	Metabolizam
Mutacija <i>ATRX</i> ili gubitak tog gena	57	Integritet genoma
Mutacija <i>TP53</i> gena	65	p53 signalni put
Gubitak ekspresije <i>RB1</i> gena	43	Rb signalni put
Gubitak ekspresije <i>CDKN2A</i> gena	19	Rb signalni put
Gubitak ekspresije <i>PTEN</i> gena	4	P13K signalni put
Genska fuzija <i>PTRZ1-MET</i>	15	RTK signalni put
Primarni GBM		
Mutacija promotora <i>TERT</i> gena	60-80	Održavanje telomera
Gubitak ekspresije <i>NF1</i> gena	60-80	MAPK signalni put
Gubitak ekspresije <i>PTEN</i> gena	36-41	P13K signalni put
Mutacija <i>P13K</i> gena	15-25	P13K signalni put
Mutacija <i>TP53</i> gena	28-35	p53 signalni put
<i>EGFR</i> vIII mutacija ekstracelularnog domena <i>EGFR</i> gena	25-50	RTK signalni put
Amplifikacija <i>EGFR</i> gena	36-60	RTK signalni put
Amplifikacija <i>PDGFRA</i> gena	10-13	RTK signalni put
Gubitak ekspresije <i>RB1</i> gena	14	Rb signalni put
Gubitak ekspresije <i>CDKN2A</i> gena	31-78	Rb signalni put
Genska fuzija <i>FGFR3-TACC3</i>	3	RTK signalni put

IDH – izocitrat dehidrogenaza; *ATRX* (*α thalassemia/mental retardation Syndrome X-Linked*, eng. - *ATRX* ATP-zavisna helikaza); *CDKN2A* - (*cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*, eng. - inhibitor ciklin-zavisne kinaze 2A); *PTEN* – (*phosphatase and tensin homolog*, eng. - homolog fosfataze i tenzina); *NF1* - (*neurofibromin 1*, eng. - neurofibromin 1); *RB1* – (*retinoblastoma 1*, eng. - retinoblastom 1); *TERT* – (*telomerase reverse transcriptase*, eng. - reverzna transkriptaza telomeraze); *EGFR* – (*epidermal growth factor receptor*, eng. - receptor epidermalnog faktora rasta); *PDGFRA* – (*platelet derived growth factor receptor α*, eng. - receptor trombocitnog faktora rasta alfa); *FGFR3* – (*fibroblast growth factor receptor 3*, eng. - receptor fibroblastnog faktora rasta 3); *TACC3* – (*transforming acidic coiled-coil containing protein 3*, eng. - transformišuća kiselina uporedna proteinska zavojnica 3); *RTK* – (*receptor tyrosine kinase*, eng. - receptor tirozinske kinaze); *MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*, eng. - mitogenom-aktivirajuća proteinska kinaza)

Epigenetički fenomeni - CpG metilacioni fenotip glioma i DNK metilacija promotornog regiona *MGMT* predstavljaju značajne prognostičke ali i predikcione biomarkere terapijskog odgovora kod primarnih glioblastoma klasičnog podtipa (Xie i sar., 2014).

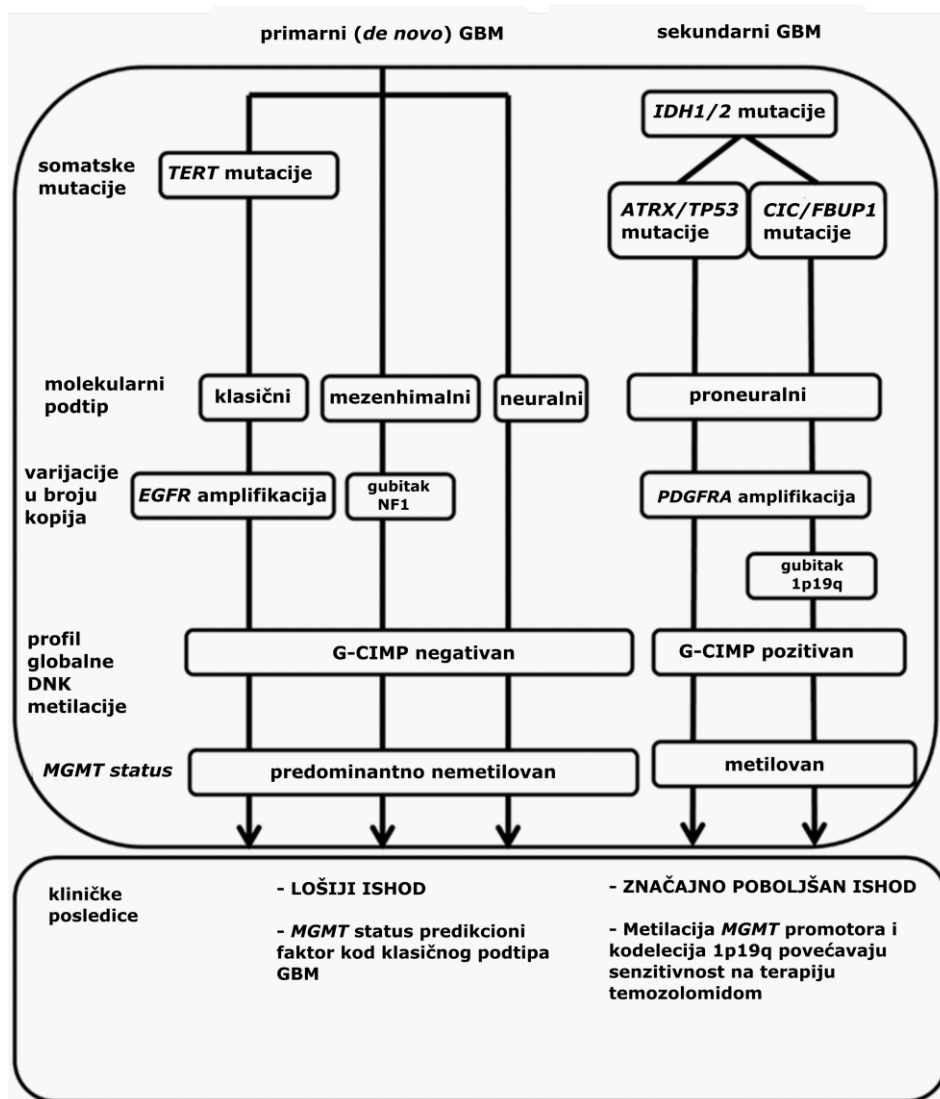
Konvencionalna podjela GBM na primarne i sekundarne ne oslikava genetičku heterogenost ovih tumora. Multidimenzionalnom analizom TCGA podataka koja je obuhvatala gotovo 500 GBM uzoraka okarakterisana su 4 molekularna podtipa GBM – klasični, mezenhimalni, proneuralni i neuralni, na osnovu razlike u ekspresionim profilima koji rezultuju proliferativnim ili invazivnim GBM fenotipom (Verhaak i sar., 2010).

Tabela 7. - Razlike u prisustvu mutacija četiri podtipa GBM (Verhaak i sar., 2010.).

Gen	Proneuralni (n=37)	Neuralni (n=19)	Klasični (22)	Mezenhimalni (n=38)	Ukupan broj mutacija
TP53	20 (54%)	4 (21%)	0 (0%)	12 (32%)	36
PTEN	6 (16%)	4 (21%)	5 (23%)	12 (32%)	27
NF1	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	14 (37%)	20
EGFR	6 (16%)	5 (26%)	7 (32%)	2 (5%)	20
IDH1	11 (30%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	12
PIK3R1	7 (19%)	2 (11%)	1 (5%)	0 (0%)	10
RB1	1 (3%)	1 (5%)	0 (0%)	5 (13%)	7
ERBB2	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	1 (3%)	7
EGFRvIII	1 (3%)	0 (0%)	5 (23%)	1 (3%)	7
PIK3CA	3 (8%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (3%)	6
PDGFRA	4 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4

Uočeno je da se tumori u kojima preovladava „klasični“ molekularni profil GBM ćelija odlikuju izraženijom proliferacijom, dok je „mezenhimalni“ molekularni profil povezan sa povećanom invanzivnošću GBM. Oba molekularna profila povezana su sa lošijim kliničkim ishodom. Sa druge strane, „proneuralni“ molekularni profil GBM povezan je sa povoljnijim kliničkim ishodom (Xie i sar., 2014). „Neuralni“ profil GBM ćelija asociran je sa odlikama normalnog, zdravog tkiva mozga i ekspresijom markera neurona.

Proneuralni glioblastomi po svojim karakteristikama odgovaraju sekundarnim glioblastomima i odlikuje ih mutacija *IDH* i *TP53* gena, zatim pozitivnost na G-CIMP fenotip (*glioma-CpG island methylator phenotype*, eng. - CpG metilacioni fenotip glioma), DNK metilacijom promotornog regiona za O⁶-metilguanin-DNK transferazu (*MGMT*), odsustvo amplifikacije *EGFR* i mutacije *TERT*, kao i neizmenjen Notch signalni put. G-CIMP fenotip, uz mutaciju *IDH* gena predstavlja molekularni „otisak prsta“ (*molecular fingerprint*, eng.) sekundarnih glioblastoma (slika 22.). (Olar i Aldape, 2014).



Slika 22. Klasifikacija glavnih molekularnih podtipova i njihova korelacija sa odgovorima i ishodima terapije (preuzeto iz rada Parker i sar., 2015.)

Upoređivanjem TCGA setova podataka o genomima, sekvenciranih transkriptoma i mikro RNK (miRNA) ekspresionim profilima sa kliničkim informacijama poput terapijskih ishoda i vremena preživljavanja, omogućeno je pronalaženje prognostičkih, prediktivnih i terapijskih biomarkera GBM. Takvim studijama potvrđen je povoljan klinički ishod kod pacijenata sa proneuralnim podtipom GBM koji se javlja kod pacijenata mlađih uzrasnih kategorija.

1.9.2. WHO klasifikacija GBM

Nakon čitavog veka klasifikacije tumora pretežno na osnovu mikroskopske analize eozin/hematoksilin obojenih histoloških preparata, revidirana "Klasifikacija tumora centralnog nervnog sistema" (CNS) iz 2016. godine, iza koje stoji WHO prvi put je uključila i molekularne parametre u nomenklaturu tumora. Ova nomenklatura podrazumeva da se histopatološkom nazivu tumora, koje se prvo navodi, u nastavku nakon zapete i u obliku opisnog prideva dodaje specifična genetička osobina (npr. Glioblastoma, IDH mutant) (Louis i sar., 2016).

Ova klasifikacija donosi veoma bitne promene u odnosu na prethodnu (iz 2007. godine) kada je u pitanju klasifikacija difuznih glioma (gliomi II-IV gradusa).

Dok su ranije svi astrocitni tumori bili u jednoj zasebnoj grupi, prema trenutno važećoj klasifikaciji svi tipovi difuznih glioma svrstani su u jednu grupu (Louis i sar., 2016).

Grupi difuznih glioma pripadaju astrocitni tumori II i III gradusa WHO, oligodendrogliomi II i III gradusa kao i glioblastomi (gradus IV). Ova grupa je definisana na osnovu zajedničkih osobina rasta ali i na osnovu zajedničkih molekularnih karakteristika, tačnije obrazaca mutacija gena *IDH 1* i *IDH 2* (Louis i sar., 2016).

Astrocitomi koji su morfološki jasno ograničeni na određenu oblast i koje ne odlikuje mutacija gena iz *IDH* genske familije, a odlikuje ih mutacija gena za serin-treonin protein kinazu *BRAF* (*V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, eng. – B1 homolog V-Raf viralnog onkogena mišjeg sarkoma), zatim mutacija gena za hamartin ili *TSC1* (*tuberous sclerosis 1*, eng. - tuberozno sklerozni protein 1) i tuberin ili *TSC2* (*tuberous sclerosis 2*, eng. - tuberozno sklerozni protein 2), čine zasebnu grupu. Prema ovoj klasifikaciji, difuzne astrocitome i oligodendrogliome odlikuje veća sličnost nego difuzne astrocitome i pilocistične astrocitome, što potvrđuju slični prognostički biomarkeri, kao i slični model terapije ovih difuznih glioma (Louis i sar., 2016).

Prema spomenutoj klasifikaciji, GBM su klasifikovani na sledeći način:

- Glioblastomi sa normalnim *IDH* genom (*glioblastoma, IDH wildtype, eng.*), u njih spadaju:
 - Glioblastomi sa džinovskim ćelijama
 - Gliosarkomi
 - Epiteloidni glioblastomi (ova podrupa predstavlja novinu u odnosu na klasifikaciju WHO iz 2007. godine)
- Glioblastomi sa mutiranim *IDH* genom (*glioblastoma, IDH mutant, eng.*)
- Glioblastomi za koje nema dovoljno informacija kako bi se dodelio specifični molekularni opis ili NOS glioblastomi (*not otherwise specified, eng.*) (Louis i sar., 2016).

1.9.3. Molekularni podtipovi GBM i proneuralno-mezenhimalna tranzicija

U kliničkoj praksi je zabeleženo da svi molekularni podtipovi GBM ispoljavaju sposobnost infiltracije u parenhim mozga izazivajući proliferaciju tumora. To je navelo na zaključak da se mehanizmi proliferativno-invazivne ili PMT fenotipske tranzicije razlikuju među molekularnim podtipovima GBM. Takođe, zabeleženo je da različiti molekularni profili GBM koegzistiraju unutar iste tumorske mase, uz postojanje intermedijernih proneuralno-mezenhimalnih ćelija (Niklasson i sar., 2019).

Pronađeno je da je glavni uzrok proneuralno mezenhimalne tranzicije i povećanja rezistentnosti na terapiju proces reaktivne astroglioze GIC ćelija. Dobro je dokumentovano da je mezenhimalni ekspresioni profil GBM ćelija povezan sa povećanom rezistencijom na terapiju. To je dokazano upoređivanjem GBM ćelijskih kultura više pacijenata, ali i ekspresionih profila populacija GIC prisutnih u istom GBM tumoru. (Niklasson i sar., 2019; Segerman i sar., 2016).

Kao što je napomenuto, astrociti mogu preći u reaktivno stanje pod uticajem proinflamatornih citokina poput interleukina IL1 β (*interleukin 1 beta, eng.* – interleukin 1 beta) ili TNF α (*tumor necrosis factor alpha, eng.* - faktor nekroze tumora alfa). Aktivirani astrociti regulišu neuroinflamatorne procese produkujući citokine i hemokine, uz zadobijanje kapaciteta za prezentovanje antigena posredstvom MHC klase II (*major histocompatibility complex 2, eng.* – glavni kompleks histokompatibilnosti klase II) (Niklasson i sar., 2019). Kroz sekreciju faktora

rasta, komponenti ekstracelularnog matriksa i morfogena, reaktivni astrociti upravljaju procesom zarastanja rana u CNS tkivu. Interesantno je da su sve navedene osobine otkrivene i kod GIC ćelijskih populacija glioma, označenih kao „reaktivne GIC“ po analogiji sa reaktivnim astrocitima (Niklasson i sar., 2019). Tako GIC, poput astrocita poseduju sposobnost prelaska iz bazalnog stanja u reaktivno stanje kojim zadobijaju sposobnost regulacije mikrosredinskih uslova kroz sekreciju citokina, uključujući i regulaciju komponenti imunog sistema. Uzimajući u obzir glijalno poreklo GIC, njihova sposobnost modulacije inflamatornih procesa u mikrosredini nije iznenađujuća (Niklasson i sar., 2019).

Pokazano je da se ekspresioni profil karakterističan za astrocite u reaktivnom stanju u velikoj meri poklapa sa profilom mezenhimalnog podtipa GBM ćelija i mezenhimalnih GIC. Međutim, ekspresija gena asociranih sa reaktivnom astrogliazom varira među ćelijama GBM unutar istog tumora, prouzrokujući intratumorsku molekularnu heterogenost. Takva heterogenost može biti posledica razlike u integraciji unutrašnjih i mikrosredinskih stimulatornih signala koji izazivaju različite vidove „reaktivnih stanja“ GIC ćelija i njihovo ekspresiono i morfološko variranje, nalik variranju astrocita od neprimetnih promena do formiranja glijalnih ožiljaka (Niklasson i sar., 2019).

Takva molekularna i fenotipska heterogenost leži u osnovi različitih terapijskih uspeha i rezistentnosti GBM. Podvrgavanje slabo invanzivnih proneuralnih GIC klonova osetljivih na terapiju pomoću IL1 β indukuje ekspresiju gena koji regulišu reaktivnu astrogliozu i epigenetičko reprogramiranje GIC klonova konvertujući ih u invazivniji mezenhimalni fenotip (Niklasson i sar., 2019).

1.9.4. Klinički najznačajnija genetička i molekularna obeležja GBM

Rasvetljavanje procesa gliomageneze na molekularnom nivou i izdvajanje klinički relevantnih molekularnih markera GBM dovelo je do vidnog napretka u dijagnostici i klasifikaciji GBM, prognostičke stratifikacije odnosno predikcije odgovora na terapiju. U nastavku teksta biće opisani molekularni markeri GBM čija je evaluacija predmet ove teze: status mutacije *IDH1/2* gena i status metilacije promotornog regiona *MGMT* gena. Ovi molekularni markeri se, uz amplifikaciju *EGFR* gena i prisustva kodelecije p kraka hromozoma 1

(1p) i q kraka hromozoma 19 (19q), ubrajaju u trenutno najizraženija molekularna obeležja GBM od kliničkog značaja (Crespo i sar., 2015).

Pored navedenih molekularnih markera GBM, predmet ove teze bila je i evaluacija statusa metilacije *CH13L1*, gena čija povećana ekspresija predstavlja marker mezenhimalnog transkripcionog podtipa GBM i čija je funkcija kao prognostičkog markera GBM usko povezana sa statusom metilacije *MGMT* (Chen i sar., 2020; Iwamoto i sar., 2014).

1.9.5. *IDH1/2* mutacije

Izocitrat dehidrogenaza predstavlja metabolički enzim - enzim Krebsovog ciklusa koji katalizuje oksidativnu dekarboksilaciju izocitrata do α -ketoglutarata, uz istovremenu redukciju NAD koenzima do NADH (Olar i Aldape, 2014). Ovaj enzim egzistira u tri izoforme (*IDH* 1-3) pri čemu je *IDH1* izoforma lokalizovana u citoplazmi i peroksizomima, dok su *IDH2/3* izoforme smeštene u mitohondrijama. Pored uloge u Krebsovom ciklusu i smanjenju oksidativnog stresa, *IDH1* ima funkciju u metabolizmu lipida i glukoze (Olar i Aldape, 2014).

Mutacije *IDH1/2* gena najčešće su zastupljene kao monoalelske, somatske i “missense” mutacije (*missense*, *eng.* - mutacije promene smisla). One su otkrivene 2009. godine prilikom analize genoma uzoraka GBM kada su i prvi put povezane sa tumorima (Crespo i sar., 2015). Kasnije studije identifikovale su prisustvo ovih mutacija u različitim tipovima tumora, poput kancera prostate, holangiokarcinoma, akutne mijeloidne leukemije, kartilaginoznih tumora, papilarnog karcinoma dojke, akutne limfoblastične leukemije, angioimunoblastičnog T-ćelijskog limfoma i primarne mijelofibroze (Yan i sar., 2009).

Najčešća i klinički najznačajnija *IDH* mutacija u GBM ćelijama je *IDH1-R132H* (G395A), mutacija u *IDH1* genu smeštenom na hromozomu 2 (2q33) (Crespo i sar., 2015). U pitanju je „missens“ supstitucija kodona 132 za aminokiselinu arginin. Kodon za arginin na poziciji 132 je evoluciono konzervisan i odgovoran za interakciju sa supstratom enzima – izocitratom. *IDH1-R132H* mutacija predstavlja najvažnije molekularno obeležje sekundarnih glioblastoma (prisutna je kod 80% niskogradusnih glioma). Ova mutacija se znatno ređe javlja kod primarnih GBM (5%) (Visser i sar., 2015). Određivanje statusa mutacije *IDH1-R132H* ključno je za razlikovanje sekundarnih od primarnih GBM, koje nije moguće razlikovati na osnovu histopatoloških karakteristika. Dodatni pozitivni prognostički značaj ovoj mutaciji daje

činjenica da je ona obično asocirana sa mutacijom u *TP53* i kodelecijom *del(1p)/del(19q)* koji predstavljaju tipične molekularne odlike sekundarnih GBM. Pored toga, prisustvo *IDH1* mutacije povezano je sa metilacijom *MGMT* promotornog regiona i odsustvom amplifikacije *EGFR* i gubitka hromozoma 10.

Mutacije u *IDH2* genu (hromozom 15q26) pogađaju kodone R172 i R140. One su u GBM retko zastupljene i međusobno isključive u odnosu na *IDH1* mutacije.

Povezanost *IDH* mutacija sa povećanim vremenom preživaljavanja GBM pacijenata otvorilo je pitanje njihove prirode: Da li se radi o pokretačkim (*driver, eng.*) mutacijama gliomogeneze, usputnim (*passenger, eng.*) mutacijama, ili čak korisnim mutacijama po tok bolesti?

Brojne studije su potvrdile ulogu *IDH1/2* mutacija kao direktnih pokretača gliomogeneze niskogradusnih glioma i sekundarnih GBM. U prilog „onkogenoj“ teoriji govori činjenica da je somatski mozaicizam za *IDH1* i *IDH2* mutacije odgovoran za sindrome enhondromatoze, Olijerov i Mafučijev sindrom. Ovi sindromi se odlikuju pojavom hemangioma i kartilaginoznih tumora i povezani su sa povećanim rizikom od nastanka glioma. Takođe, introdukcija mutirane forme *IDH* gena u normalne ćelijske linije podstiče njihovu proliferaciju i formiranje kolonija ćelija uz smanjenje sposobnosti diferencijacije (Yan i sar., 2009).

Mutacije *IDH* gena predstavljaju neomorfične mutacije. One rezultuju zadobijanjem novih funkcija (*gain-of-function, eng.*) *IDH* enzima koje su ključne za pokretanje onkogene transformacije u GBM. *IDH1-R132H* mutacija rezultuje zadobijanjem sposobnosti enzima da katalizuje reakciju redukcije 2-oksoglutarata do (D)-2-hidroksiglutarata (D-2HG) (Huang, 2019; Yan i sar., 2009).

Preovlađujuće stanovište je da je mutacija *IDH1-R132H* onkogeni i da spada u najranije genetičke događaje koji podstiču inicijaciju i rast niskogradusnih glioma odnosno sekundarnih GBM (Huang, 2019; Mansouri i sar., 2017). Ova mutacija se u sekundarnim glioblastomima dešava pre *TP53* mutacija i izmena u broju kopija *PTEN* i *EGFR* gena koji takođe nastupaju rano u gliomagenezi. Pored toga, ona predstavlja jedinu genetičku karakteristiku koju dele inicijalni sekundarni glioblastomi i njihovi recidivi (Huang, 2019).

Uzimajući u obzir njihovu potencijalnu ulogu kao pokretača onkogeneze, intrigantno je da je prisustvo *IDH* mutacija povezano sa poboljšanjem vremena preživljavanja GBM pacijenata. Iako sekundarni GBM dele zajedničke kliničke karakteristike sa primarnim

glioblastomima, ispostavilo se da se jasno razlikuju u molekularnoj patogenezi i izmenama u signalnim putevima. Te razlike za posledicu imaju smanjenu stopu infiltracije, progresije i rasta GBM, kao i povoljnije parametre toka bolesti u odnosu na primarne GBM. U cilju otkrivanja mehanizma uticaja IDH mutacija u gliomima, izvršena je komparativna analiza TCGA podataka za 286 slučajeva *IDH1*-mutiranih i *IDH1*-nemutiranih (*wildtype*, *eng.*) glioma (Huang i sar., 2017). Otkriveno je da je *IDH1-R132H* asocirana sa pozitivnim prognostičkim faktorima glioma: povećanjem ekspresije tumor-supresornih gena *NF1*, *PTEN* i *PIK3R1* (*phosphoinositide-3-kinase regulatory Subunit 1*, *eng.* – regulatorna subjedinicica 1 fosfatidilinozitol 3-kinaze) i smanjenjem ekspresije onkogenih *AKT2* (AKT serine/threonine kinase 2, *eng.* - AKT serin/treonin kinaza 2), *ARAF* (*serine/threonine protein kinase A-Raf*, *eng.* – serin/treonin proteinska kinaza A-Raf), *ERBB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*, *eng.* – Erb-B2 receptor proteinske kinaze 2), *FGFR3* i *PDGFRB* (*platelet derived growth factor receptor beta*, *eng.* - receptor trombocitnog faktora rasta beta) kao i gena koji podstiču progresiju glioma *FOXO1* (*forkhead box M1*, *eng.*), *IGFBP2* (*insulin-like growth factor binding protein 2*, *eng.* – protein vezivanja faktora rasta nalik insulinu) i *WWTR1* (*WW domain containing transcription regulator 1*, *eng.* – regulator transkripcije 1 sa WW domenom) (Huang i sar., 2017).

1.9.5.1. D-2HG kao onkometabolit

Prisustvo D-2HG je i do stotinu puta povišeno kod *IDH1-R132H* mutiranih glioma u odnosu na nemutirane gliome (Huang, 2019; Yan i sar., 2009). Smatra se da je *IDH1-R132H* jedan od ključnih pokretača gliomogeneze zahvaljujući produkciji „onkometabolita“ D-2HG koji indukuje epigenetičke, metaboličke i transkripcione promene u mutiranim ćelijama. D-2HG predstavlja kompetitivni inhibitor 2-oksoglutarat-zavisnih dioksigenaza, u koje spadaju prolil hidroksilaze (PHD), histon demetilaze i TET (*Ten-eleven translocation*, *eng.*) familija 5-metilcitozin hidroksilaza (Chowdhury i sar., 2011; Huang, 2019). Od navedenih grupa enzima, najveću senzitivnost na D-2HG pokazuju histon-demetilaze (i do 200 puta više u odnosu na PHD). D-2-hidroksiglutarat indukuje metilaciju histona i direktno zaustavlja proces ćelijske diferencijacije. Otkriveno je da je prisustvo D-2HG korelisano sa povećanom akumulacijom represivne trimetilacije lizinskog ostatka na poziciji 9 histona 3 (H3K9me3) koja prethodi promenama u obrascu DNK metilacije genoma (Chowdhury i sar., 2011). Takođe, prisustvo

inhibitora IDH1-R132H, AGI-5198 rezultovalo je demetilacijom histona H3K9me3 i indukcijom ekspresije gena koji regulišu ćelijsku diferencijaciju (Rohle i sar., 2013). Introdukcija *IDH1-R132H* mutacije u imortalizovane ćelijske linije humanih astrocita bila je dovoljna za izazivanje epigenetičkog šablona sličnog CpG metilacionom fenotipu (G-CIMP) koji je karakterističan za GBM sa prisustvom *IDH1* mutacije (Huang i sar., 2017).

Sa druge strane, postoje dokazi da D-2HG nije ključan za progresiju glioma i da utiče na smanjenje stope ćelijske proliferacije glijalnih ćelija, makar u *in vitro* uslovima (Struys, 2006; Tiburcio i sar., 2018). Ovim se može objasniti uloga *IDH* mutacija kao pozitivnih prognostičkih faktora. Otkriveno je da D-2HG predstavlja inhibitor enzima ATP sintaze i aktivator AMPK signalnog puta koji snižavaju aktivnost mTOR^k signalnog puta koji podstiče proliferaciju tumorskih ćelija (Mansouri i sar., 2017).

1.9.5.2. Uloga *IDH1* mutacije u gliomagenezi

Iako preovlađujuće, trenutno shvatanje o ulozi IDH mutacija kao pokretača gliomageneze je sporno i nailazi na oprečna mišljenja. Prema Huangu, zabuna o kontradiktornoj prirodi *IDH1-R132H* mutacija potiče od različitih model-sistema kojima su istraživači pribegavali: upotrebe egzogene transdukcije *IDH1-R132H* mutiranog gena nasuprot endogene, heterozigotne *IDH1-R132H* (Huang, 2019).

Iako je endogena, heterozigotna *IDH1-R132H* mutacija česta u gliomima, ona se gubi i izuzetno teško održava u ćelijskim kulturama ili ksenograftima^l poreklom od pacijenata. Zbog toga je transdukcija ćelijskih kultura egzogenom *IDH1-R132H* postala standard u istraživanjima. Većina dostupnih podataka o onkogenoj prirodi IDH mutacija dobijena primenom egzogene *IDH1-R132H* u eksperimentalnim model sistemima glioma. Pokazalo se da transdukcija egzogenom *IDH1-R132H* rezultuje sferoidnim rastom MYC^m-imortalizovanih humanih neuralnih progenitornih ćelija, kao i rastom nezavisnim od podlogeⁿ kod imortalizovanih ćelijskih linija humanih astrocita u poređenju sa *IDH1* nemutiranom kontrolom. (Bardella i sar., 2016;

^k *Mammalian target of rapamycin complex 1*, eng.- proteinski kompleks u sisarskim ćelijama koje inhibira rapamicin. Rapamicin predstavlja imunosupresorni lek koji deluje tako što inhibira progresiju iz G1 i S fazu ćelijskog ciklusa B i T limfocita.

^l Transplantacija organa ili tkiva s jednog živog bića na drugo

^m *Myelocytomatosis viral oncogen*, eng. – protoonkogen čije mutacije imaju ulogu u razvijanju Burkittovog limfoma (*Burkitt lymphoma*, eng.). Ovaj regulatorni gen kodira transkripcioni faktor, nuklearni fosfoprotein koji odigrava ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze. Predstavlja humani homolog virusnog onkogeno mijelocitomatoze ili v-myc.

ⁿ Anchorage-independent growth, eng.

Koivunen i sar., 2012). Ove osobine su jaki i dokazani pokazatelji tumorogenosti i govore u prilog onkogenoj teoriji (Bardella i sar., 2016).

Sa druge strane, takve rezultate nije bilo moguće reprodukovati u eksperimentalnim model sistemima koji su uključivali endogenu heterozigotnu *IDH1-R132H*. Štaviše, takve studije su navodile na potpuno suprotne zaključke. Zapanjujuće je da su heterozigotne *IDH1-R132H* ćelijske linije pokazale suprotan efekat na rast neuralnih progenitorskih ćelija, sprečavajući sferoidni rast (Bardella i sar., 2016). Uticaj heterozigotne *IDH1-R132H* na inhibiciju rasta nezavisnog od podloge objasnilo je poreklo problema spomenutog održavanja heterozigotne *IDH1-R132H* u ksenograftima i ćelijskim kulturama, ali i pružilo uvid u drugačiji funkcionalni značaj *IDH1-R132H* i moguću antitumorsku i antiproliferativnu, odnosno blagotvornu ulogu na tok bolesti.

U prilog tome govori da je kod *IDH1-R132H* heterozigotnih miševa zabeleženo odsustvo razvijanja tumora, uprkos visokoj koncentraciji D-2HG. Takođe, pacijenti oboleli od D-2-hidroksiglutarne acidurije, retkog autozomno-recesivnog sindroma koji se karakteriše visokom koncentracijom D-2HG u urinu, krvnoj plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti, nisu pokazali predispoziciju za razvoj tumora (Struys i sar., 2006).

Ovakvi dokazi govore u prilog tvrdnji da je *IDH1-R132H* mutacija u suštini tumor-supresivna i da ne poseduje sposobnost direktne inicijacije i promocije gliomogeneze (Tiburcio i sar., 2018).

Međutim, takvu tumor-supresivnu aktivnost *IDH1-R132H* poništava prisustvo drugih genetičkih i mikrosredinskih činioca uključenih u proces gliomogeneze. Pokazano je da inaktivacija *TP53* i *RB* signalnih puteva (karakteristika sekundarnih GBM) u imortalizovanim ćelijskim linijama humanih astrocita prikriva *IDH1-R132H* tumor-supresivnu aktivnost (Izquierdo-Garcia i sar., 2015). Takođe, visoka koncentracija ekstracelularnog glutamata poništava *IDH1-R132H* indukovanu supresiju rasta nezavisnog od podloge i podstiče proliferaciju tumora (Tiburcio i sar., 2018). To otkriće je naročito značajno ukoliko su uzme u obzir da su *IDH1-R132H* mutirani glioblastomi najčešće lokalizovani u čeonom režnju mozga za koji je karakterističan visok protok ovog neurotransmitera.

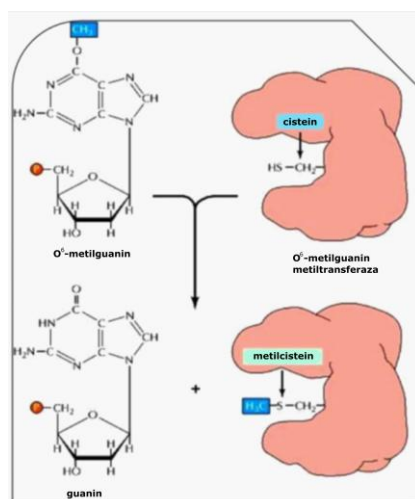
U spomenutoj studiji Huang zaključuje da je funkcionalni gubitak aktivnosti *IDH1-R132H* enzima, a ne nedostatak funkcije divljeg tipa *IDH1* enzima razlog za zastupljenost i očuvanje *IDH1-R132H* mutacija od stadijuma inicijacije do progresije. Zbog toga istraživanja

usmerena na mehanizme poništavanja *IDH1-R132H* tumor-supresivne funkcije predstavljaju izuzetno važan pristup u ravijanju načina prevencije progresije glioma i definisanju terapijskih protokola (Huang, 2019).

Iako je uloga *IDH1-R132H* mutacija u gliomagenezi nerazjašnjen do kraja, detekcija statusa ove mutacije predstavlja izuzetno pouzdan molekularni marker sekundarnih GBM, o čemu govori spomenuta WHO klasifikacija GBM.

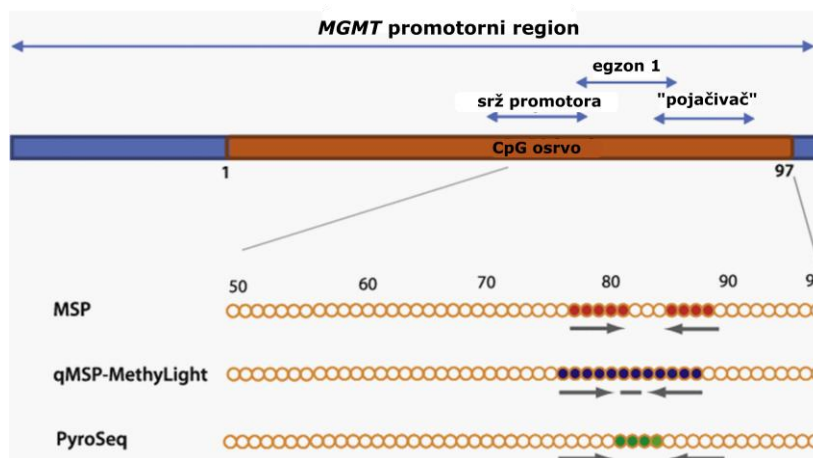
1.9.6. Hipermetilacija promotornog regiona *MGMT*

Status metilacije promotornog regiona *MGMT* predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora GBM i moćan predikcioni faktor odgovora na terapiju alkilirajućim agensima, derivatima nitrozouree i TMZ, ili njihovom kombinacijom. (Crespo i sar., 2015; Herrlinger i sar., 2006). Ovi lekovi deluju citotoksično na proliferativne ćelije dodavanjem alkil-grupe (alkil-adukata) na nekoliko pozicija u molekulu DNK, od kojih je najčešća O⁶-pozicija guanina. Alkilacija guanina dovodi do mutacije pogrešno sparenih baza (*missmatch mutation*, eng.), dvostrukog prekida u molekulu DNK i apoptoze proliferativnih ćelija GBM. Gen *MGMT*, smešten na q kraku hromozoma 10 (10q26.3), kodira evoluciono visoko-konzervisani reparacioni enzim O⁶-metilguanin-DNK metil-transferazu. Ovaj enzim deluje tako što otklanja alkil-adukate sa O⁶-pozicije guanina, poništavajući citotoksičnost spomenutih alkilirajućih agenasa. Tokom tog procesa, alkil-grupa biva ireverzibilno prebačena sa molekula DNK na *MGMT* (samoubilačka inhibicija), čime *MGMT* postaje nepovratno inhibiran (slika 23.).



Slika 23. Mehanizam direktne reparacije DNK oštećenja koju katalizuje enzim *MGMT* (preuzeto sa <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>)

U čak 50% slučajeva GBM, aktivnost *MGMT* gena biva epigenetički utišana putem metilacije specifičnih CpG pozicija (*Cytosine-phosphate-guanine*, eng. - citozin-fosfat-guanin) od ukupno 97 pozicija unutar CpG niza koji čini CpG ostrvo (*CpG island*, eng.) dužine 777bp, smeštenog u promotornom regionu *MGMT* gena (slika 24.) (Cankovic i sar., 2013; Mansouri i sar., 2019; Wick i sar., 2014).



Slika 24. Šematski prikaz CpG ostrva unutar promotornog regiona *MGMT* i najčešćih CpG pozicija obuhvaćenih prilikom analize MSP, qMSP metodama i metodom pirosekvenciranja (preuzeto iz rada Cankovic i sar., 2013.)

Otkriveno je da je metilacija CpG pozicija u rasponu od -251 do -101 pozicije promotornog regiona *MGMT* ključna za njegovo transkripciono utišavanje. Taj region je dobio naziv DMR1 (*differentially methylated region 1*, eng. - diferencijalno metilisan region 1). Takođe, otkriveno je prisustvo još jednog takvog regiona +97 do +196 koji je nazvan DMR2 region (Mansouri i sar., 2019). Epigenetičko utišavanje *MGMT* za posledicu ima smanjenje funkcije *MGMT* enzima što onemogućava adekvatnu reparaciju oštećenja DNK prouzrokovanih alkilirajućom terapijom.

Hipermetilacija *MGMT* je kod primarnih GBM najčešće praćena gubitkom jedne kopije alela usled delecije q kraka hromozoma 10 (*chromosome 10q deletion*, eng.) koji nosi *MGMT* lokus (10q26) (Mansouri i sar., 2019). U takvim slučajevima, metilacija preostalog *MGMT* alela u potpunosti inhibira reparacionu funkciju *MGMT*, što potvrđuje značaj epigenetičkog vida regulacije ekspresije *MGMT* gena (Wick i sar., 2014; Yan i sar., 2009).

Zbog visoke zastupljenosti u GBM i potencijalnog direktnog uticaja na uspeh hemioterapije, prognostički i predikcioni značaj metilacije *MGMT* promotora je intenzivno ispitivan. Prve dokaze za uticaj metilacije *MGMT* promotora na terapijski odgovor pružilo je

„Stupp“-ovo kliničko ispitivanje, u kome je pozitivan status metilacije povezan sa dužim vremenom preživljavanja pacijenata bez obzira na vid terapije, radioterapiju ili radioterapiju kombinovanu sa TMZ (Stupp i sar., 2005). Prognostička uloga metilacije *MGMT* promotora u slučajevima terapije Temozolomidom potvrđena je kliničkim ispitivanjima koja su nakon toga usledila (RTOG0525) (Gilbert i sar., 2011). Sa druge strane, pokazano je da je pozitivan status metilacije *MGMT* promotora takođe povoljan predikcioni faktor odgovora na radioterapiju u odsustvu hemioterapije kod GBM pacijenata (Rivera i sar., 2010). To navodi na zaključak da je *MGMT* potencijalno uključen i u reparaciju oštećenja DNK prouzrokovanih radioterapijom (Crespo i sar., 2015).

1.9.6.1. Evaluacija metilacije promotornog regiona *MGMT* u kliničkoj praksi

Uprkos pouzdanim dokazima o povoljnom prognostičkom značaju metilacije promotornog regiona *MGMT*, rutinska laboratorijska evaluacija ovog GBM markera nije široko zastupljena, pre svega zbog nedostataka tehničke standardizacije. Opštu usaglašenost oko načina evaluacije ovog biomarkera onemogućavaju varijacije u metodama detekcije između različitih laboratorija i razlike u definicijama graničnih vrednosti pozitivnog statusa metilacije *MGMT* (Mansouri i sar., 2019). Standardizaciju dodatno onemogućava visoka heterogenost uzoraka GBM, kao i nedostatak preciznije identifikacije promotornih regiona *MGMT* čija metilacija ima prediktivni značaj. Pored toga, postoje dokazi da je šablon ekspresije *MGMT* nezavisan od metilacionog statusa i ishoda lečenja, ukazujući na moguću regulaciju njegove ekspresije putem drugih molekularnih mehanizama osim metilacije promotornog regiona i delecije q kraka hromozoma 10 (Crespo i sar., 2015). Takođe, visoka pouzdanost statusa metilacije *MGMT* kao nezavisnog prognostičkog markera otežava njegovu evaluaciju kao samostalnog predikcionog faktora (Esteller i sar., 2008).

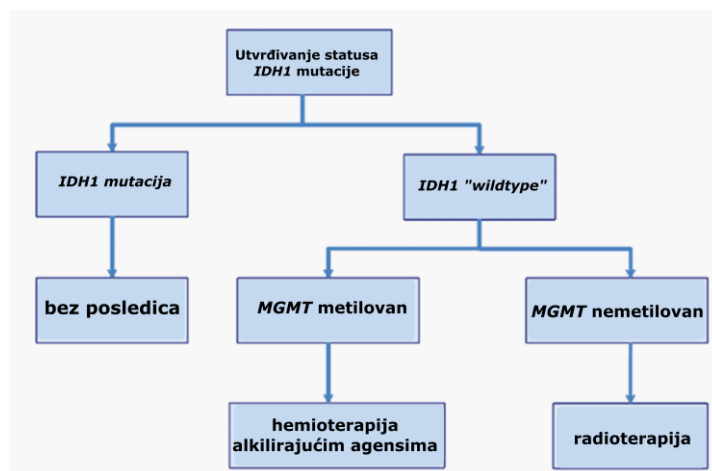
Zbog svega navedenog, implementacija evaluacije ovog parametra u kliničkom donošenju odluka je znatno usporena. Kako terapija temozolomidom može biti od koristi i u odsustvu metilacije *MGMT* promotora, standardni vid tretmana svih GBM pacijenata, bez obzira na status metilacije *MGMT* predstavlja spomenuti „Stupp“ protokol, odnosno radioterapija kombinovana sa primenom TMZ (Crespo i sar., 2015; Perry i sar., 2017).

1.9.6.2. Kombinacija *IDH1-R132H* i statusa metilacije *MGMT*

Sve više dokaza upućuje na to da status metilacije *MGMT* može imati znatno pouzdaniji predikcioni značaj u kombinaciji sa drugim molekularnim markerima GBM (Mansouri i sar., 2019). Najvažniji takav marker predstavlja status mutacije *IDH1-R132H*. Pokazano je da je kod gotovo svih visokorizičnih pacijenata obolelih od niskogradusnih glioma za koje je utvrđeno prisustvo *IDH1-R132H* mutacije registrovana i hipermetilacija *MGMT* promotornog regiona. (Baumert i sar., 2016; van den Bent i sar., 2010). Rezultati randomizovanog kliničkog ispitivanja Neuroonkološke radne grupe NOA-04 (*The Neurooncology Working Group of the German Cancer Society*, eng.) i NOA-08 pokazali su da je kod *IDH1-R132H* mutiranih GBM (sekundarnih GBM), status metilacije *MGMT* povezan sa poboljšanim vremenom preživljavanja bez progresije tumora (PFS) bez obzira na primenjeni vid terapije - hemioterapije, radioterapije li njihove kombinacije (Wick i sar., 2009). To dokazuje prognostičku vrednost statusa metilacije *MGMT* kod sekundarnih GBM (Rhun i sar., 2015).

Sa druge strane, kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM), status metilacije *MGMT* povezan je sa poboljšanjem PFS vremena kod pacijenata koji su primali hemioterapiju alikilirajućim agensima, ali ne i onih koji su primali isključivo radioterapiju kao inicijalni vid terapije GBM (Wick i sar., 2012). To ukazuje na ulogu statusa metilacije *MGMT* promotora kao predikcionog markera odgovora na hemioterapiju kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM) (Rhun i sar., 2015).

Na osnovu rezultata NOA-04 kliničkog ispitivanja, predstavljen je interaktivni model formiranja terapijske strategije zasnovan na biomarkerima *IDH1-R132H* mutacije i statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* (slika 25.) (Rhun i sar., 2015; Wick i sar., 2009). Takav model omogućava prilagođavanje modela terapije (alikilirajući agensi, radioterapija) u zavisnosti od statusa metilacije promotora *MGMT* i tipa GBM (primarni ili sekundarni GBM).



Slika 25. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.)

Širu implementaciju ovog modela u kliničkoj praksi onemogućava činjenica da, za razliku od pouzdanih metoda utvrđivanja statusa mutacije *IDH1-R132H* (metode sekvenciranja DNK, imunohistohemija), dogovor oko optimalne metode evaluacije statusa metilacije *MGMT* promotora još uvek nije postignut (Mansouri i sar., 2019). Kao jedno od mogućih rešenja, predložen je algoritam evaluacije statusa ovog markera koji uključuje više različitih metoda detekcije u zavisnosti od čistoće uzorka, statusa *IDH1* mutacije i kliničkih parametara pacijenta (Mansouri i sar., 2019).

1.9.7. Metode detekcije metilacije *MGMT* promotornog regiona

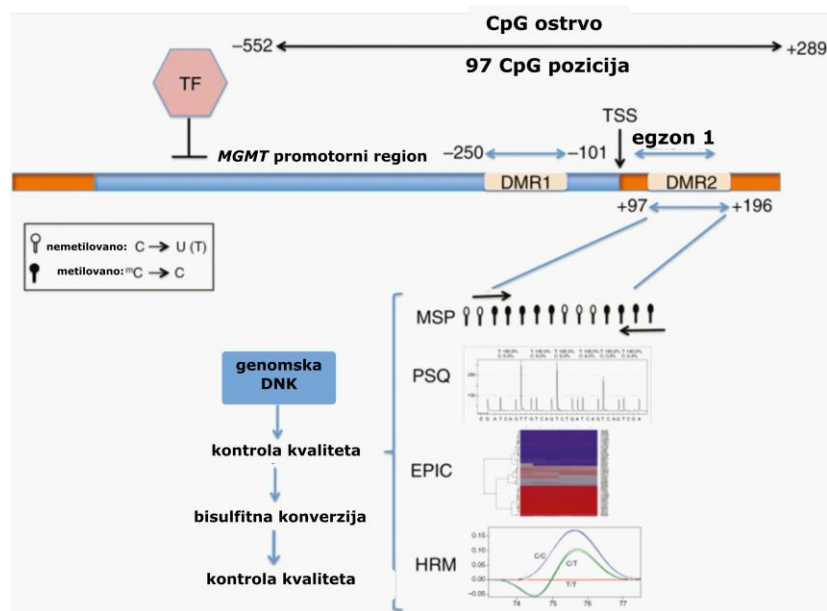
Od brojnih metoda detekcije statusa metilacije, u najzastupljenije se ubrajaju: metilaciono specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*, eng.), kvantitativni „real-time“ MSP ili qMSP (*Quantitative MSP*, eng.), bisulfitno sekvenciranje i pirosekvenciranje ili PSQ (*Pyrosequencing*, eng.) i HMR (*High-resolution melt*, eng. – Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije). Uprkos razlikama u principu očitavanja rezultata, kvantitativnoj ili kvalitativnoj evaluaciji i ceni analize, ove metode dele zajedničke inicijalne korake: izolaciju genomske DNK, kvalitativnu i kvantitativnu proveru izolata DNK i bisulfitnu konverziju DNK izolata. U tabeli 8 prikazane su prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona. U metode evaluacije metilacije koje se ne oslanjaju na proces bisulfitne konverzije spada imunohistohemijska detekcija, MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent*

probe amplification, eng. - metilaciono specifično višestruko umnožavanje proba nezavisno od ligacije), zatim metode hromatinske imunoprecipitacije (Chip) poput „Infinium MethylationEPIC BeadChip” tehnologije i druge (tabela 8) ((Mansouri i sar., 2019).

Tabela 8. - Prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona (Mansouri i sar., 2019.)

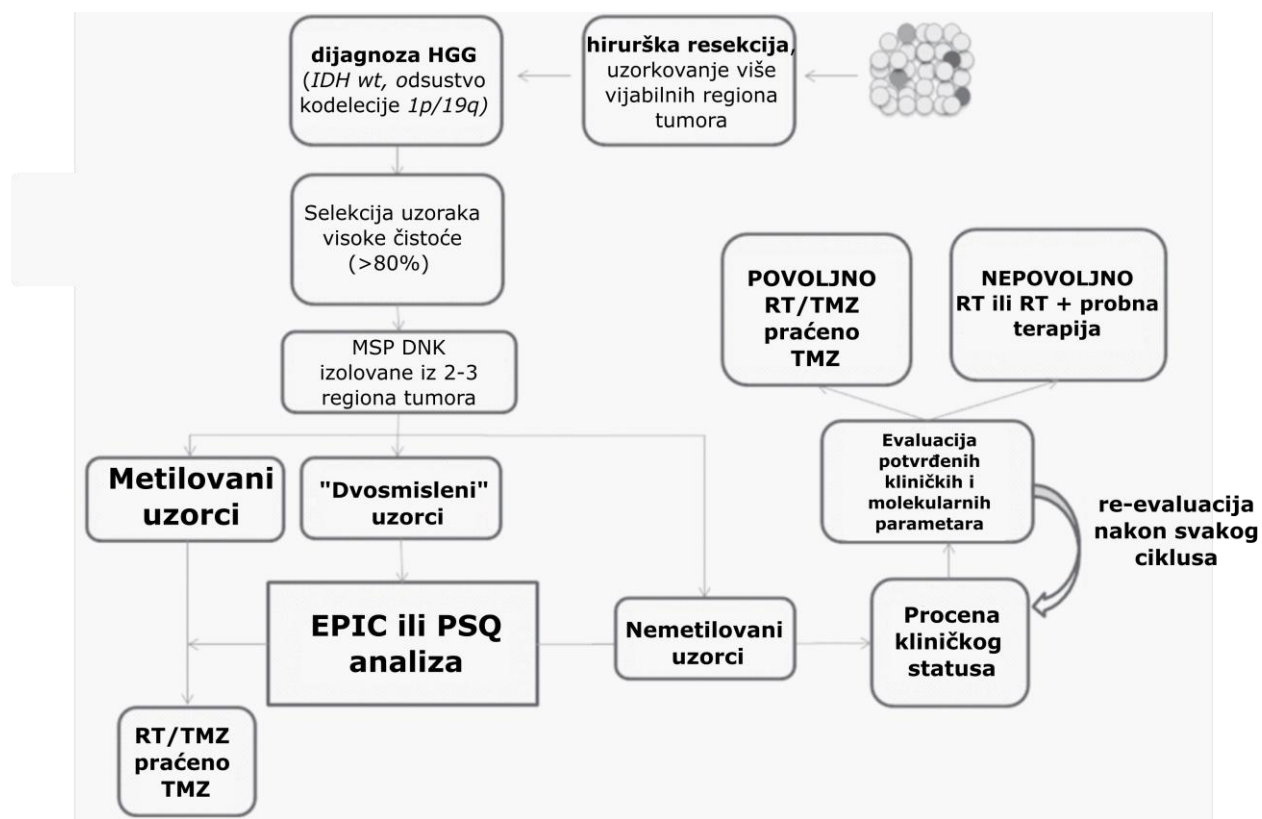
Metoda	Vreme izvođenja	Prednosti	Nedostaci	Procenjeni troškovi po uzorku (USD)
Konvencionalni MSP	2 dana	- Pokazana prediktivna i prognostička vrednost - Pristupačna cena	- Nepouzdana rezultati - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka	\$5/uzorak
Real-Time MSP	2 dana	- Granične vrednosti potvrđene u kliničkim ispitivanjima	- Nepouzdana rezultati za uzorke sa mozaičnim šablonom metilacije - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka - Visoka cena	\$10–20/uzorak
Pirosekvenciranje	5 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Duže vreme do dobijanja rezultata - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima - neophodan centralni objekat za visokoprotočne (<i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode	\$10–30/uzorak
Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije	2 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima - Duže vreme dobijanja rezultata - Visoka cena	\$20–30 /uzorak
EPIC	5 dana	- Omogućava analiziranje dodatnih biomarkera (1p/19q, G-CIMP) - Kompatibilna sa različitim načinima pripreme uzoraka	- neophodan centralni objekat za visokoprotočne (<i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima - Varijabilnost u evaluaciji od strane različitih posmatrača	\$500–700/uzorak
IHC	2 dana	- Niska cena	- Nekonzistentna korelacija sa kliničkim ishodima	\$10–30/uzorak
MLPA	2 dana	- Nije neophodna bisulfitna konverzija uzoraka - Niska cena	- Prediktivna upotrebljivost nije dokazana	\$10–30/uzorak

Pirosekvenciranje se smatra najpouzdanijom metodom ili „zlatnim standardom“ evaluacije statusa metilacije, zbog mogućnosti analize individualnih CpG pozicija. Međutim, interpretacija i određivanje kliničkog značaja takvih rezultata mogu biti otežani usled pojave uzoraka sa parcijalno metilovanim promotornim regionom *MGMT* (Mansouri i sar., 2019; Yoshioka i sar., 2018). Takođe, ova metoda zahteva intenzivni laboratorijski rad, veliko iskustvo i podrazumeva značajna incijalna ulaganja u opremu. Uprkos svojim prednostima, PSQ metoda nije široko-zastupljena u kliničkoj praksi i istraživanjima (Mansouri i sar., 2019; Yoshioka i sar., 2018). U poređenju sa PSQ, MSP i qMSP metode su isplativije, podrazumevaju manji utrošak vremena i korišćenje jednostavnije i dostupnije opreme, zbog čega predstavljaju najbolje kandidate za uvođenje u svakodnevnu kliničku praksu (Yoshioka i sar., 2018). Na slici 26. nalazi se šematski prikaz postupka evaluacije metilacionog statusa DMR2 regiona.



Slika 26. Promotorni region *MGMT* i uobičajene metode evaluacije statusa metilacije; TF – *transcription factor*, eng. - transkripcioni faktor; TSS - *transcription start site*, eng. - mesto početka transkripcije; EPIC – mikročip za analizu metilacije (Illumina, Inc.); HRM – *high resolution melting*, eng. – analiza topljenja visoke rezolucije (preuzeto iz rada Mansouri i sar., 2019.)

Mansouri i saradnici su 2019. godine na osnovu dostupnih podataka o pristupima evaluaciji statusa metilacije *MGMT*, predložili optimalni model njegove kliničke evaluacije. Oni su pritom naglasili važnost uzimanja u obzir drugih molekularnih markera GBM, poput *IDH1* mutacije i predložili dijagnostički protokol za slučajeve gde je evaluacija statusa *MGMT* nejasna (slika 27.) (Mansouri i sar., 2019).



Slika 27. Predloženi algoritam lečenja GBM pacijenata, zasnovan na statusu metilacije *MGMT* i drugih kliničkih parametara; HGG – high grade glioma, eng. – gliomi visokog gradusa (preuzeto iz rada Mansouri i sar., 2019)

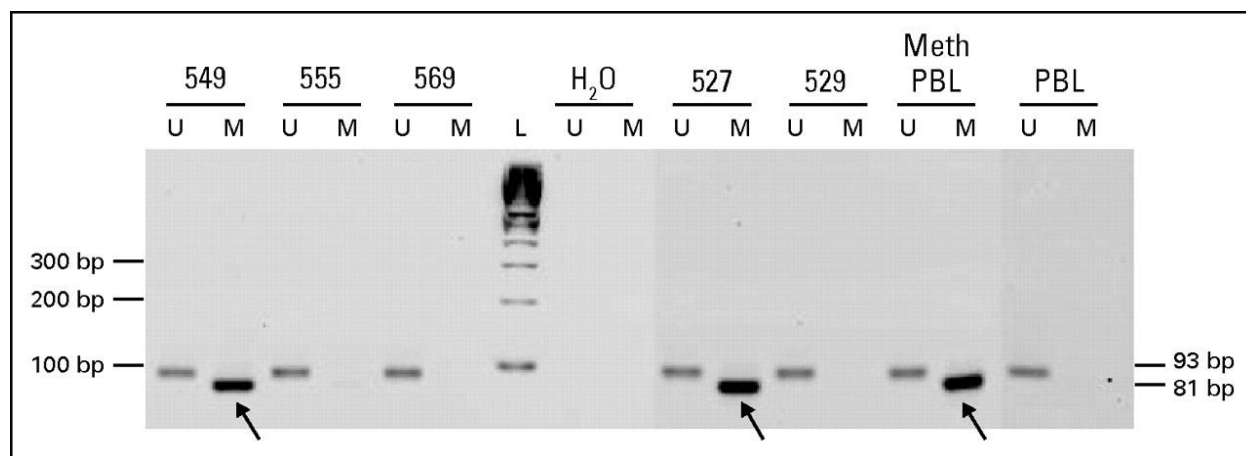
1.9.7.1. Metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija

Metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP predstavlja prvu opisanu i najzastupljeniju metodu detekcije metilacije *MGMT* promotornog regiona, a njena validnost je više puta dokazana randomizovanim studijama (Bujko i sar., 2012; Cho i sar., 2003; Frommer i sar., 1992; Mansouri i sar., 2019).

Suštinu ove tehnike čini bisulfitna konverzija DNK izolata, kojom se postiže konvertovanje nemetilovanog citozina u uracil. Bisulfitna konverzija je praćena amplifikacijom *MGMT* alela (ili druge sekvence DNK od interesa) metodom polimerazne lančane reakcije PCR (*polymerase chain reaction*, eng.), uz korišćenje posebno dizajniranih oligonukleutida koji prepoznaju i vezuju specifična CpG mesta unutar DMR1/2 regiona (Grossman i sar., 2015). Amplifikacija se izvršava istovremeno u dve zasebne PCR reakcije - u jednoj dolazi do

umnožavanja metilovanog PCR produkta, a u drugoj nemetilovanog PCR produkta. Pri tome se koriste dva seta oligonukleotida, od kojih jedan set prepoznaje metilovanu formu promotorne sekvence, a drugi njenu nemetilovanu formu. Oligonukleotidi za metilovanu formu omogućavaju amplifikaciju isključivo potpuno metilovanih regiona *MGMT* koji imaju biološku funkciju utišavanja *MGMT* transkripcije. Drugačiji šabloni metilacije (nepotpuna metilacija) ovih CpG pozicija koji bi mogli imati biološku ulogu utišavanja transkripcije se zbog toga ne mogu detektirati, što umanjuje senzitivnost metode. Najpouzdaniji i najčešće korišćeni setovi oligonukleotida za *MGMT* promotorni region definisali su Esteller i saradnici pre dve decenije (Esteller i sar., 1999). PCR produkti koji se dobijaju njihovom primenom obuhvataju CpG mesta od pozicije 73 do pozicije 90 unutar DMR2 regiona (Esteller i sar., 1999; Johannessen i sar., 2018).

Umnožene sekvence se vizuelizuju metodom gel-elektroforeze u cilju kvalitativne interpretacije signala (utvrđivanja prisustva PCR produkta određene dužine) (slika 28) (Esteller i sar., 1999; Hegi i sar., 2008).



Slika 28. Vizuelizacija MSP rezultata na gel-elektroforetskom snimku; strelice označavaju metilovanu M formu *MGMT* promotornog regiona; U – nemetilovana forma *MGMT* promotornog regiona; L – (*ladder*, eng.) 100 bp DNK marker; PBL – *peripheral blood lymphocytes*, eng. – uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi; Meth PBL – *methylated peripheral blood lymphocytes*, eng. – metilovani uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi (preuzeto iz rada Hegi i sar., 2008.)

Uspeh bisulfitne konverzije veoma zavisi od kvaliteta DNK izolata i izbora tipa uzoraka tkiva. Iako su uzorci FFPE tkiva (*formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue*, eng. - tkiva fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafinske blokove) zbog nezahtevnih uslova skladištenja najuobičajeniji izvor DNK materijala pri MSP analizama (i molekularno-biološkim analizama

uopšte), izolati DNK dobijeni iz njih su visoko-degradovani i niskog kvaliteta. Zbog toga se pri izvođenju MSP metode savetuje izbegavanje ovakvih uzoraka, kada god je to moguće (Tournier i sar., 2012).

Kako ova metoda zavisi od subjektivne interpretacije (uočavanja traka PCR produkta na elektroforetskom gelu) ona je pouzdana jedino u detekciji izrazito metilovanih ili nemetilovanih uzoraka. Međutim, evaluacija slabije metilovanih uzoraka pokazala se nepouzdanom, a takvi uzorci se označavaju kao „dvosmisleni“. Pored toga, deo uzoraka (DNK izolata) može pokazati različiti status metilacije za više replikata, što se označava kao „nekonzistentni“ status metilacije. Pokazano je da stopa nekonzistentnosti MSP metode iznosi 12%, a vreme preživljavanja pacijenata kod kojih je utvrđen „nekonzistentni“ status metilacije poklapalo se sa vremenom preživljavanja pacijenata sa nemetilovanim *MGMT* promotornim regionom (Xia i sar., 2016).

Ova metoda ne omogućava preciznu kvantitativnu evaluaciju metilacije promotornog regiona *MGMT* gena. Usled visoke intratumorske heterogenosti GBM uzoraka, kvantitativna evaluacija sa ciljem detekcije manjih grupa ćelijskih klonova sa metilovanim promotorom *MGMT* može imati predikcioni i prognostički značaj. U prilog tome govori saznanje da čak i pacijenti sa niskim nivoom metilacije *MGMT* promotora mogu imati korist od terapije alikilirajućim agensima. To je podržano činjenicom da GBM mogu sadržati male populacije GIC ćelija koje se karakterišu visokom stopom metilacije *MGMT*. (Mansouri i sar., 2019; Sciuscio i sar., 2011).

Uprkos tome, rezultati većeg broja studija ukazuju na „dozno-zavisni“ trend, po kome je porast stepena metilacije asociran sa boljim vremenom preživljavanja (Sciuscio i sar., 2011).

Računarskom obradom gel-elektroforetskih snimaka uz pomoć softvera poput „ImageJ“^o moguće je donekle unaprediti interpretaciju MSP rezultata i dobiti semi-kvantitativne vrednosti statusa metilacije, što povećava potencijal ove metode za širu kliničku primenu u dijagnostičkim procedurama. Tako su Christians i saradnici na osnovu odnosa intenziteta metilovanih (M – *methylated*, eng.) i nemetilovanih (U – *unmethylated*, eng.) PCR amplikona *MGMT* promotornog regiona na elektroforetskom gelu definisali tri nivoa metilacije:

- jako metilovani- ukoliko je M/U vrednost veća od 1,
- slabo metilovani – ukoliko je M/U vrednost između 0 i 1
- nemetilovani - M/U vrednost jednaka 0 (Christians i sar., 2013).

^o ImageJ software analysis (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), eng.

Uprkos navedenim ograničenjima, MSP predstavlja najčešće korišćenu i visoko standardizovanu metodu koja pruža čvrste i pouzdane rezultate u roku od nekoliko sati, uz minimalne troškove analize.

1.9.7.2. Kvantitativna metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija (qMSP)

Kvantitativna MSP analiza deli isti princip analize sa konvencionalnom MSP, uz dodatak upotrebe „Real-time“ PCR tehnologije odnosno fluorimetrije.

Zahvaljujući fluorimetrijskoj nadgradnji PCR sistema omogućena je kvantifikacija specifične sekvence DNK u uzorku i prevazilaženje ograničenja koja odlikuju konvencionalni kvalitativni PCR. U zavisnosti od prirode fluorimetrijskih reagenasa, postoje dva glavna pristupa „Real-time“ PCR kvantifikaciji: direktni i indirektni pristup. Direktni pristup podrazumeva korišćenje fluorofora (poput SYBR Green boje) koje se nespecifično vezuju za dsDNA (double stranded DNA, eng. – dvolančani DNK molekul). Indirektni pristup se zasniva na korišćenju specifičnih, fluorescentnim bojama obeleženih DNK proba koje prepoznaju i isključivo se vezuju za sekvencu od interesa u uzorku (FRET^p tehnologija, *TaqMan*® probe).

Bez obzira na pristup, intenzitet emitovane fluorescencije se detektuje pomoću odgovarajućeg optičkog detekcionog sistema u cilju definisanja C_t^q (C_q) vrednosti i konstruisanja krive amplifikacije. C_t vrednost se definiše kao broj PCR ciklusa u kome se registruje značajna promena intenziteta fluorescencije (dRn) u odnosu na „pozadinski“ signal. Niska C_t vrednost ukazuje na visoku početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku, i obratno. C_t vrednost predstavlja ključni parametar qPCR analize i na osnovu nje je moguće odrediti početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku (apsolutna kvantifikacija) ili uporediti njenu koncentraciju sa koncentracijom neke druge sekvence ili gena u uzorku (relativna kvantifikacija). Upotreba ove metode pri evaluaciji statusa metilacije *MGMT* promotora se najčeće oslanja na relativnu kvantifikaciju (SYBR-Green), odnosno normalizaciju broja kopija metilovanog *MGMT* PCR produkta u odnosu na broj kopija nemetilovane forme *MGMT* promotora i/ili nekog gena „normalizatora“, „housekeeping“ gena poput ACTB (Beta-Actin, eng. - beta aktin). (Johannessen

^p Fluorescence Resonance Energy Transfer, eng. - fluorescentni rezonantni transfer energije

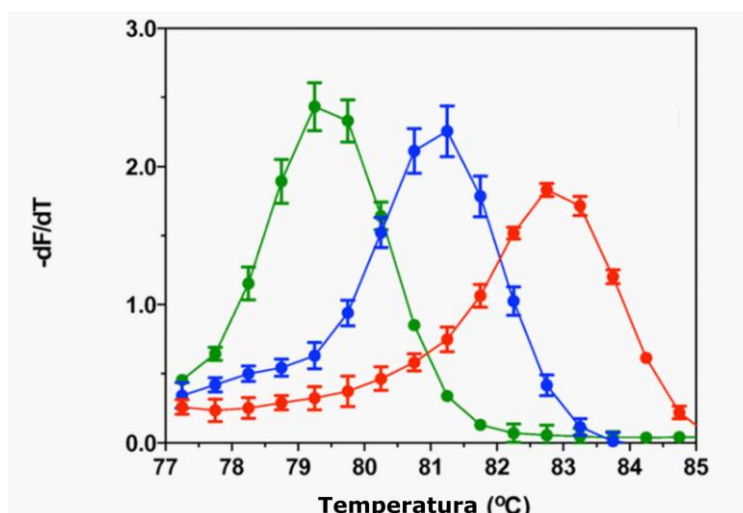
^q The cycle threshold, eng.

i sar., 2018; Mansouri i sar., 2019). Na ovaj način je omogućena pouzdanija semikvantifikacija (semi-kvantitativni MS-MSP) odnosno kvantifikacija (kvantitativni MSP) statusa metilacije *MGMT* promotora u uzorcima tumora (Håvik i sar., 2012; Yoshioka i sar., 2018).

Kod indirektnog pristupa PCR kvantifikaciji, registrovanje amplifikacije tokom PCR reakcije predstavlja pouzdan i dovoljan dokaz za identifikaciju PCR produkta od interesa, zahvaljujući FRET probama dizajniranim za specifično prepoznavanje sekvence od interesa.

Sa druge strane, direktni pristup Real-Time PCR tehnologije uključuje konstruisanje „krive topljenja“ (*melting curve analysis*, eng.) koja omogućava identifikaciju specifičnog PCR produkta. Njen oblik je određen dužinom DNK fragmenta koji se amplifikuje, kao i njegovim nukleotidnim sastavom (Lorente i sar., 2008). Svaki PCR produkt odlikuje karakteristična temperatura topljenja, odnosno temperatura na kojoj je denaturisano 50% molekula DNK. Karakteristična temperatura topljenja nekog PCR produkta se na grafiku krive topljenja uočava kao njen „pik“ koji dokazuje prisustvo tog PCR produkta u uzorku (Cikota i sar., 2002; Smith i sar., 2009).

Zbog navedenog, qMSP metoda dovodi do uštede vremena utrošenog na dokazivanje prisustva specifičnog PCR produkta, koje se kod konvecionalne MSP metode oslanja na metodu gel-elektroforeze. Tako su 2008. godine Lorente i saradnici predstavili metodu evaluacije statusa metilacije *MGMT* korišćenjem ranije navedenih konvencionalnih MSP oligonukleotida pri direktnom Real-Time pristupu qMSP, gde je prisustvo „pik“-a na temperaturi od 81 °C grafika krive topljenja dokaz za prisustvo metilovane forme promotornog regiona *MGMT* (Lorente i sar., 2008).



Slika 29. Primer grafika krive topljenja za tri različita MSP produkta; (preuzeto iz rada Smith i sar., 2009.)

Međutim, kako bi rezultati qMSP bili klinički relevantni, neophodno je precizirati granične vrednosti za razlikovanje metilovanih od nemetilovanih uzoraka. Tehnička granična vrednost koja označava verovatnoću prisustva/odsustva metilacije od 50% se najčeće koristi za razdvajanje pozitivnih i negativnih rezultata (Mansouri i sar., 2019). Ukoliko je dobijeni rezultat u blizini granične vrednosti, on se smatra „dvosmislenim“ ili „unutar sive zone“ (Mansouri i sar., 2019).

Yoshioka i saradnici su u studiji koja se odnosila na semikvantitativnu qMSP evaluaciju, pored prisustva pika pri temperaturi od 81 °C na krivi topljenja, kao dodatni kriterijum za definisanje pozitivnog statusa metilacije, definisali i ΔC_t granične vrednosti. ΔC_t granična vrednost izražava kao razliku između dobijenih C_t vrednosti za nemetilovani i metilovani *MGMT* produkt. U navedenoj studiji zabeležene su statistički značajne razlike u kliničkom ishodu GBM pri korišćenju ΔC_t graničnih vrednosti koje su iznosile 0,2,4,6 (Yoshioka i sar., 2018).

U cilju kvantifikacije statusa metilacije, Havik i saradnici su kao graničnu vrednost definisali da je PMR (*percentage of methylated reference*, eng. - procenat metilovane reference) jednak 0 (Håvik i sar., 2012). PMR predstavlja relativni odnos količine metilovanog *MGMT* produkta u uzorku i količine metilovanog *MGMT* produkta u komercijalno dostupnoj metilovanoj kontroli (bisulfitno konvertovana *in vitro* metilovana humana DNK[†]). Kao kalibrator nulte PMR vrednosti, korišćeni su uzorci meningioma kod kojih je detektovano potpuno odsustvo metilacije *MGMT* promotora. Uzorci u kojima je zabeležena PMR vrednost veća od

[†] bisulfite converted *in vitro* methylated human DNA; Chemicon, Millipore

nule smatrani su pozitivno metilovanim. Količine *MGMT* promotora u uzorku i kontroli normalizovane su korišćenjem oligonukleotida za *ALU-C4* repetitivnu sekvencu po sledećoj formuli.

$$PMR = \frac{M / ALU \text{ u uzorku}}{M / ALU \text{ u metilovanoj kontroli}}$$

Takođe, za uzorke koji su imali veću vrednost od granične C_t vrednosti (35), smatralo se da je količina PCR produkta jednaka 0 (Håvik i sar., 2012).

U brojnim istraživanjima, ali i velikim kliničkim studijama, qMSP metoda je pokazala visok potencijal za primenu u kliničkoj praksi, pre svega zbog visoke reproducibilnosti rezultata i pouzdanosti, ali i pristupačnih troškova.

1.9.8. Status metilacije proteina 1 nalik hitinazi 3 CHI3L1 (YKL-40)

1.9.8.1. CHI3L1

Protein 1 nalik hitinazi, poznat i pod nazivom humani glikoprotein hrskavice 39 i skraćenicama CHI3L1, YKL-40 i HC-gp39, predstavlja sekretovani glikoprotein molekulske mase 40-kDa, čija prekomerna produkcija odlikuje tumore GBM, i to najvećim delom činioce mikrosredine GBM – reaktivnih astrocita i okolnih tumor-infiltrirajućih makrofaga (Chen i sar., 2020). CHI3L1/YKL-40 pripada familiji hitinaza, glikozid hidrolaza 18, a njegov genski lokus se nalazi na q kraku hromozoma 1 (1q32.1) (Kavsan i sar., 2011).

Jedine sisarske hitinaze koji imaju funkciju glikohidrolaza odnosno razgradnje hitina, polimera GlcNAc (*N*-Acetylglucosamine, eng. - *N*-acetilglukozamin), jesu CHIT1 (*Chitotriosidase 1*, eng. - hitotriozidaza 1) i AMC (*acidic mammalian chitinase*, eng. - kisela sisarska hitinaza). Ostali članovi ove proteinske familije, u koje spada i CHI3L1, ne ispoljavaju takvu enzimsku aktivnost uprkos posedovanju supstrat-vezujućih domena i visokom stepenu homologije sa hitinazama gljiva, bakterija i biljaka (Eurich i sar., 2009). Zbog toga se ovakva grupa humanih hitinaza naziva „lektini nalik hitinazama“ (*Chitinase-like-lectins (Chi-lectins)*, eng.). Važna uloga lektina nalik hitinazama u hroničnim inflamatornim oboljenjima je nedavno prepoznata. Pokazalo se da oni imaju ulogu u inflamatornim bolestima creva, ulcerativnom kolitisu i Kronovoj bolesti, ali i dijabetesu tipa 2, reumatoidnom artritisu i osteoartritisu,

^s Lektini predstavljaju vrstu proteina koji poseduju sposobnost vezivanja ugljenih hidrata.

proliferativnom dermatitisu, alergijskoj bronhijalnoj astmi i mnogim drugim patološkim stanjima (Bonneh-Barkay i sar., 2011; Eurich i sar., 2009).

Iako je CHI3L1 protein identifikovan još 1993. godine, njegova biološka funkcija je dugo ostala nepoznata. CHI3L1 protein poseduje funkcionalni motiv za vezivanje ugljenih hidrata koji mu omogućava vezivanje polimera ili oligomera N-acetilglukoamina. Međutim, njegova enzimska funkcija je u potpunosti odsutna. Gubitak enzimske funkcije može se objasniti supstitucijom leucina sa esencijalnim ostatkom glutaminske kiseline unutar katalitičkog domena CHI3L1 (Eurich i sar., 2009).

U normalnim stanjima, funkciju povećane produkcije i sekretovanja CHI3L1 poseduju hondrociti, sinovijalne ćelije, neutrofili i makrofagi tokom ćelijske diferencijacije. Tokom stanja inflamacije, smatra se da ovaj protein izuzetno važan za proces remodelovanja tkiva (Wurm i sar., 2019).

1.9.8.2. Uloga CHI3L1 u patološkim stanjima i tumorima

Prekomerna ekspresija CHI3L1 je povezana sa brojnim patološkim stanjima poput amiotrofične lateralne skleroze (ALS), izmene fibroblasta kod ciroze jetre, povećanim naslagama komponenti vezivnog tkiva i hiperplazije sinovijuma kod reumatoidnog artritisa i povećanom stopom ćelijske infiltracije i epitelijalne proliferacije kod hroničnog kolitisa (Eurich i sar., 2009; Gaur i sar., 2020). Takođe, prekomerna aktivnost *CHI3L1* gena je dokumentovana za različite tipove kancera, poput karcinoma skvamoznih ćelija ezofagusa, retinoblastoma i glioma (Kavsan i sar., 2011). Pokazano je da CHI3L1 ima ključnu ulogu faktora stimulacije rasta kod solidnih tumora i protektivni uticaj u procesu apoptoze u tumorskim i inflamatornim ćelijama (Eurich i sar., 2009).

1.9.8.3. Uloga CHI3L1 u GBM

U uslovima akutne neuroinflamacije, makrofagi ispoljavaju izraženu sposobnost indukovanja ekspresije CHI3L1 inflamatornog citokina u astrocitima, podstičući zadobijanje morfoloških odlika astrocita karakterističnih za reaktivnu astrogliozu. Uzimajući u obzir činjenicu da reaktivni astrociti predstavljaju najzastupljeniju ne-neoplastičnu komponentu mikrookoline GBM, otvoreno je pitanje njihove uloge u procesu gliomogeneze (Bonneh-Barkay i

sar., 2012; Wurm i sar., 2019). U cilju ispitivanja onkogene uloge *CHI3L1* u GBM, izvršena je analiza genske ekspresije reaktivnih astrocita izolovanih iz središta tumorske mase GBM, ali i neinfiltiranog graničnog regiona tumorske lezije. Kod obe grupe izolovanih astrocita uočena je značajno povećana ekspresija *CHI3L1* (Wurm i sar., 2019). Dodatno, otkriveno je da reaktivni astrociti kroz sekreciju *CHI3L1* promovišu tranziciju GBM ćelija ka mezenhimalnom fenotipu, podstiči aktivaciju MAPK/AKT signalnog puta koja rezultuje zadobijanjem sposobnosti proliferacije i migracije. Pokazano je da se uticaj sekretovanog *CHI3L1* na aktivaciju MAPK/AKT ostvaruje preko interakcije sa IL13RA2 (*interleukin-13 receptor subunit alpha-2*, eng. - alfa-2 subjedinicica interleukin-13 receptora) (Wurm i sar., 2019).

Eksperimentima na ćelijskim kulturama i ksenotransplantatima u mozgu „Wistar“ pacova pokazano je da prekomerna ekspresija *CHI3L1* podstiče tumorogenost ćelija, rast nezavisan od podloge i stimulaciju inicijacije tumorogeneze, potvrđujući njegovu onkogenu ulogu u tumorima mozga (Kavsan i sar., 2011; Liu i sar., 2009). Pored toga, prekomerna ekspresija *CHI3L1* povezana je sa gubitkom hromozoma 10, povećanjem rezistencije na radioterapiju, kapaciteta invazivnosti i aktivnosti metaloproteinaza (Iwamoto i sar., 2014). Ovakva onkogeni svojstva mogu se pripisati navedenoj sposobnosti *CHI3L1* da putem interakcije sa IL13RA2 aktivira signalne puteve receptorskih tirozin kinaza (MAPK i PI3K) u ćelijama vezivnog tkiva, koji rezultuju fosforilacijom i aktivacijom mitogenom aktiviranih protein kinaza ERK1/2 i AKT kinaze (Iwamoto i sar., 2014).

Prekomerna ekspresija *CHI3L1* predstavlja jedno od najupečatljivijih molekularnih obeležja po kome se primarni GBM razlikuju u odnosu na zdravo tkivo mozga i gliome nižeg gradusa (Iwamoto i sar., 2014; Kavsan i sar., 2011). U skladu s tim, TCGA studija je prekomernu ekspresiju *CHI3L1* identifikovala kao molekularni marker mezenhimalnog podtipa, karakterističan za primarne GBM (Jovčevska, 2019). Prekomerna ekspresija *CHI3L1* nije prisutna u sekundarnim GBM, već sasvim suprotno, njih odlikuje utišavanje ekspresije ovog gena. Pokazano je da je inhibicija aktivnosti *CHI3L1* gena suprimirala invazivnost ćelija GBM i delimično obnovila njihovu osetljivost na terapiju alkilirajućim agensima. Tako *CHI3L1* predstavlja važan molekul čija je aktivnost, uz MGMT, odgovorna za rezistentnost GBM ćelijskih linija na TMZ. Zbog toga, razvijanje lekova sa ciljem inaktivacije *CHI3L1* zauzima važno mesto u unapređenju GBM terapijskih procedura (Akiyama i sar., 2014).

Takođe, zbog činjenice da se ovaj protein sekretuje u krvotok i lako i pouzdano detektuje u serumu, on predstavlja jedan od najperspektivnijih serumskih markera glioblastoma koji se trenutno ispituju (Iwamoto i sar., 2014).

1.9.8.4. Funkcija *CHI3L1* u matičnim ćelijama GBM direktno zavisi od statusa metilacije promotora *MGMT*

Uticaj prekomerne ekspresije *CHI3L1* na pospešivanje rezistentnosti na terapiju TMZ, ukazao je na mogućnost funkcionalne povezanosti ovog markera mezenhimalnog podtipa GBM i epigenetičkog utišavanja aktivnosti *MGMT* gena putem hipermetilacije promotornog regiona. Kako bi istražili takvu povezanost, Chen i saradnici su 2020. godine izveli seriju *in vitro* i *in vivo* eksperimenata na grupi od šest humanih *IDH1/2* „wildtype“ kultura matičnih ćelija GBM (GSCs) (Chen i sar., 2020). Ovo istraživanje je iznedrilo izuzetno važno otkriće – kod primarnih, *IDH1/2* „wildtype“ GBM, *CHI3L1* ispoljava sasvim različite funkcije u GSCs u zavisnosti od prisustva hipermetilacije promotornog regiona *MGMT*. U navedenoj studiji, status metilacije *MGMT* promotora GSCs ćelija je utvrđivan konvencionalnom MSP metodom (Chen i sar., 2020). U prisustvu hipermetilovanog *MGMT* promotornog regiona *MGMT-m* (*MGMT-methylated*, eng.), *CHI3L1* u GSCs deluje kao tumor-supresorni gen. Sa druge strane, u odsustvu hipermetilacije *MGMT-um* (*MGMT-unmethylated*, eng.), *CHI3L1* deluje promovišuće na proces tumorigeneze. Ovom studijom je dokazano i da je povezanost metilacije *MGMT* i *CHI3L1* aktivnosti uzročno-posledična. Otkriveno je da dvojaka funkcija *CHI3L1* ne potiče od razlika u molekularnim karakteristikama GSCs različitih podtipova primarnih GBM već direktno od statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona. Hipermetilacije *MGMT* promotornog regiona modulira uticaj *CHI3L1* na činioce *RAS-MEK-ERK* signalnog puta. Tako *CHI3L1*, kod *MGMT-m* GSCs, indukuje senzitivnost na terapiju TMZ kroz aktivaciju DDR (*DNA damage response*, eng. - odgovor na DNK oštećenje). Kod *MGMT-um*, *CHI3L1* deluje inhibitorno na aktivaciju DDR, indukujući rezistenciju na terapiju TMZ. Kao jedan od važnih zaključaka ovog istraživanja, Chen i saradnici naglašavaju značaj istraživanja funkcije gena u zavisnosti od globalnih epigenetičkih karakteristika genoma, a ne samo molekularne klasifikacije bazirane na šablonima ekspresije gena (Chen i sar., 2020).

1.9.8.5. Hipermetilacija promotornog regiona *CHI3L1*

Druga važna studija iz 2020. godine tiče se analize ključnih biomarkera i signalnih puteva glioblastoma na osnovu informacija o genskoj ekspresiji i DNK metilaciji preuzetoj iz GEO baze podataka (*gene expression omnibus*, eng.) (Tang i sar., 2020). Tang i saradnici su pritom, u okviru grupe od izabranih 60 hipometilovanih/prekomerno eksprimiranih gena i 110 hipermetilovanih/utišanih gena, pokazali povezanost prekomerne ekspresije 9 gena i lošijeg kliničkog ishoda odnosno ukupnog preživljavanja GBM pacijentata (Tang i sar., 2020). Kao jedan od najistaknutijih iz takve grupe predstavljen je upravo *CHI3L1*. Za 4 gena, uključujući i *CHI3L1*, pokazano je da je nivo genske ekspresije negativno korelisan sa pozitivnim statusom metilacije odgovarajućih promotornih regiona gena, ukazujući na epigenetički nivo regulacije njihove aktivnosti. U skladu s tim, hipometilacija (demetilacija) promotornog regiona *CHI3L1* prikazana je kao specifični i visoko-osetljivi dijagnostički i prognostički marker GBM koji ih razlikuje od zdravih kontrola (Tang i sar., 2020).

Steponaitis i saradnici su 2016. godine sprovedi istraživanje koje se ticalo evaluacije prekomerne ekspresije *CHI3L1* ali i statusa metilacije promotornog regiona ovog gena kao samostalnih prognostičkih faktora u gliomima (Steponaitis i sar., 2016). Evaluacija ovih molekularnih karakteristika izvršena je na uzorcima prikupljenim od 98 pacijenata obolelih od glioma različitog stepena maligniteta – 10 pilocističnih astrocitoma I gradusa, 30 difuznih astrocitoma II gradusa, 20 anaplastičnih astrocitoma II gradusa i 38 astrocitoma IV gradusa (glioblastoma). Status metilacije *CHI3L1* utvrđivan je konvencionalnom kvalitativnom MSP metodom pri čemu su korišćena dva seta oligonukleotida za različito pozicionirane CpG dinukleotide unutar promotornog regiona ovog gena. Iako je ovom studijom pokazana pozitivna korelacija između nivoa ekspresije *CHI3L1* određivanog kvantitativnom RT-PCR metodom (*reverse-transcription polymerase chain reaction*, eng.) i različitih histopatoloških gradusa glioma, status metilacije promotornog regiona *CHI3L1* nije prepoznat kao pouzdani samostalni prognostički faktor glioma i toka gliomogeneze. Razlog za to mogla bi biti ograničenja koja podrazumeva kvalitativni MSP pristup evaluaciji statusa metilacije. Naime, jedini kriterijum za detekciju pozitivno metilovanih uzoraka bilo je prisustvo odgovarajućeg metilovanog *CHI3L1* PCR produkta na agaroznom gelu, bez obzira na prisustvo ili odsustvo nemetilovanog PCR produkta. Nakon otkrića uloge *CHI3L1* u rezistenciji GSCs na terapiju alikilirajućim agensima,

kao i dvojne uloge *CHI3L1* u glioblastomima u zavisnosti od statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* odnosno primarnog i sekundarnog podtipa GBM, status metilacije *CHI3L1* bi u kombinaciji sa evaluacijom hipermetilacije *MGMT* mogao predstavljati važan pomoćni prognostički faktor primarnih GBM (Steponaitis i sar., 2016).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bilo je definisanje i ispitivanje pouzdanosti prognostičkih i predikcionih markera karakterističnih za srpsku populaciju obolelih od GBM, kao i razvoj i uvođenje molekularnih testova za njihovu detekciju u neuropatološkim i neuroonkološkim laboratorijama. Krajnji cilj je povećanje preživljavanja i kvaliteta života pacijenata obolelih od malignih glioma uz primenu efikasne individualne terapije.

Sa tom idejom krenulo se od poboljšanja trenutne dijagnostike determinisanjem statusa mutacija u *IDH1* i *IDH2* genima kao obaveznom kriterijumu za precizniju molekularnu substratifikaciju GBM prema WHO. Ispitane su i različite metode za evaluaciju epigenetičkih markera statusa metilacije promotora *MGMT* i *CHI3L1* gena u uzorcima GBM i njihove korelacije sa kliničkopatološkim podacima pacijenata. Finalno, analiziran je i udruženi prognostički i predikcioni značaj statusa metilacije *MGMT* i *CHI3L1*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biološki materijal

3.1.1. Pacijenti – kliničkopatološki parametri

Ovo istraživanje je uključivalo analizu uzoraka glioma pacijenata operisanih na Klinici za Neurohirurgiju (Klinički centar u Nišu) između 2013. i 2019. godine. Kliničkopatološki parametri pacijenata su navedeni u tabeli 9.

Tabela 9. - Kliničkopatološki parametri pacijenata obuhvaćenih ovom studijom

Redni broj	Starost	Pol	Dijagnoza	Gradus (WHO)	Tip hemioterapije	Obim resekcije	Ukupno vreme preživljavanja (OS)
1	35	M	GBM	IV	TMZ	mr	80+
2	66	M	GBM	IV	PCV	mr	8
3	57	M	GBM	IV	PCV	mr	5
4	60	M	GBM	IV	BCNU	mr	4
5	36	M	GBM	IV	PCV	mr	1
6	54	Ž	GBM	IV	BCNU	mr	7
7	68	M	GBM	IV	BCNU	mr	10
8	74	M	GBM	IV	PCV	pr	7
9	40	M	GBM	IV	TMZ	mr	13
10	66	M	GBM	IV	TMZ	mr	12
11	47	M	GBM	IV	TMZ	pr	9
12	62	Ž	GBM	IV	TMZ	pr	18
13	65	M	GBM	IV	PCV	pr	7
14	63	Ž	GBM	IV	bez ter.	b	0
15	49	M	GBM	IV	TMZ	mr	19
16	52	Ž	Oligodendroglioma anaplasticum	III	BCNU	mr	0
17	75	M	GBM	IV	bez terapije	b	0
18	77	M	GBM	IV	bez terapije	b	0
19	72	Ž	Oligoastrocytoma	II	bez terapije	pr	0
20	58	M	GBM	IV	BCNU	pr	4
21	73	Ž	Astrocytoma anaplasticum	III	bez ter.	b	0
22	63	Ž	GBM	IV	PCV	pr	7
23	50	Ž	GBM	IV	TMZ	mr	12
24	63	M	GBM	IV	BCNU	b	6
25	69	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	4

Redni broj	Starost	Pol	Dijagnoza	Gradus (WHO)	Tip hemioterapije	Obim resekcije	Ukupno vreme preživljavanja (OS)
26	57	Ž	GBM	IV	PCV	b	3
27	53	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	2
28	44	M	Oligoastrocytoma	III	PCV	mr	1
29	46	Ž	GBM	IV	TMZ	mr	14
30	80	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	3
31	50	Ž	Oligoastrocytoma	II	PCV	mr	31
32	65	M	GBM	IV	BCNU	pr	8
33	58	M	GBM	IV	TMZ	b	8
34	29	M	GBM	IV	TMZ	mr	19
35	55	M	GBM	IV	TMZ	pr	21
36	67	M	GBM	IV	PCV	pr	8
37	69	M	GBM	IV	PCV	b	4
38	61	Ž	Hemangiopericytoma	I-II	bez terapije	mr	
39	67	Ž	Meningioma	I-II	bez terapije	mr	
40	81	M	GBM	IV	BCNU	pr	4
41	71	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	3
42	73	M	GBM	IV	BCNU	pr	9
43	43	M	GBM	IV	TMZ	mr	16
44	26	M	Oligoastrocytoma	II	bez terapije	mr	
45	73	M	GBM	IV	BCNU	pr	9

Pol: M – muški, Ž – ženski; Tip resekcije: mr – maksimalna resekcija, pr – parcijalna resekcija, b – biopsija; Tip hemioterapije: BCNU – karmustin, PCV – prokarbazin, lomustin, vinkristin; TMZ – temozolomid

Uzorci su prikupljeni od ukupno 43 pacijenata (grupa od 20 pacijenata podvrgnuta je kompletnoj resekciji vidljive tumorske mase (MR,TR^t), 17 parcijalnoj resekciji (PR^u) sa 10-50% rezidualne tumorske mase, dok je kod 8 pacijenata izvršena jedino biopsija (B^v) pri čemu je odstranjeno manje od 10% tumorske mase. Preoperativni indeks po Karnofskom svih pacijenata iznosio je $\geq 80\%$. Prosečna starost ispitivanih pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze iznosila je 59.15 ± 13.41 godina.

^t Total resection, eng. - maksimalna resekcija

^u Partial resection, eng.

^v Biopsy, eng.

Svi pacijenti su podvrgnuti kombinaciji zračne terapije (3D konformalna radioterapija) i nekog oblika hemoterapije. Terapijska doza zračenja je iznosila 60 Gy^w u 30 frakcija (2 Gy dnevno, 5 puta nedeljno).

Na osnovu tipa hemioterapije, pacijenti su podeljeni u tri grupe:

- Grupa 1 (n = 12 pacijenata): temozolomid (TMZ)—prvi ciklus sa dozom od 150 mg/m² u toku 5 dana; narednih 5 ciklusa u dozi od 200 mg/m². Ciklusi su ponavljani na svake 3 nedelje.
- Grupa 2 (n = 11 pacijenata): prokarbazin, lomustin (1-[2-chloroethyl]-3-cyclohexyl-1-chloroethylnitrosourea (CCNU)) i vinkristin (PCV režim): CCNU 110 mg/m² per os prvog dana; procarbazine 60 mg/m² per os od 8. do 21. dana; vinkristin 1.4 mg/m² (maksimum 2 mg), i.e., 8.-og i 21.-og dana. Ciklusi su ponavljani na svakih 6–8 nedelja.
- Grupa 3 (n = 14 pacijenata): karmustin (BCNU) 200 mg/m², i.e., dan 1. Ciklusi su ponavljani na svakih 8 nedelja.

Protokol istraživanja i formulari saglasnosti ispitanika odobreni su od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, (dozvola br. 01-2113-10 od 01.04.2013. godine). Pisana saglasnost dobijena je od svih subjekata u kliničkom ispitivanju.

3.1.2. Uzorci tumora

Uzorci glioma su patohistološki dijagnostikovani od strane iskusnih neuropatologa (N.V i M.K), prema klasifikaciji tumora mozga predloženoj 2007. godine od strane WHO (tabela 9).

Dijagnoza	ICD-O ^x	Broj pacijenata (n=43)
Glioblastom	9440/3	37
Anaplastični astrocitom	9401/3	1
Anaplastični oligodendrogliom	9451/3	1
Oligoastrocitom	9382/3	4

Tabela 9. - Zastupljenost podtipova glioma

U istraživanju su korišćeni sveže zamrznuti uzorci tkiva FF (*fresh frozen, eng.*) u tečnom azotu, koji su od trenutka uzorkovanja skladišteni na -80 °C, kao i uzorci tkiva fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinske blokove FFPE, koji su skladišteni na sobnoj temperaturi.

^w Gray, eng. Grej – SI izvedena jedinica za energiju za apsorbovanu dozu radijacije.

^x International Classification of Diseases for Oncology, eng. – Međunarodna klasifikacija onkoloških bolesti Svetske zdravstvene organizacije

3.1.3. Oligonukleotidi

U tabeli 10 prikazane su sekvence parova oligonukleotida korišćenih pri *IDH1*, *IDH2*, *MGMT*, *CHI3L1* i *ALU-C4* amplifikaciji PCR metodom u ovoj studiji.

Tabela 10 - Setovi oligonukleotida za PCR amplifikaciju *IDH1*, *IDH2*, *MGMT*, *CHI3L1* i *ALU-C4*

Gen	Sekvenca oligonukleotida (5' to 3')	Referentna studija
IDH1	F: AATGAGCTCTATATGCCATCACTG R: TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT	(Arita i sar., 2014)
IDH2	F: ATTCTGGTTGAAAGATGGCG R: TGTGGCCTTGACTGCAGAG	(Arita i sar., 2014)
MGMT (metilovan) M	F: TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC R: GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	(Esteller i sar., 1999)
MGMT (nemetilovan) U	F: TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT R: AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	(Esteller i sar., 1999)
1.CHI3L1 (nemetilovan)	F: TTTTATAAAAAGGGTTGGTTTGTC R: TAACCCAAATACCTATTTAAAACGC	(Steponaitis i sar., 2016)
1.CHI3L1 (metilovan)	F: TTTTATAAAAAGGGTTGGTTTGTC R: TAACCCAAATACCTATTTAAAACGC	(Steponaitis i sar., 2016)
2.CHI3L1 (nemetilovan)	F: TTAGATGTTTGTGTAGTTGTTTTGT R: CCAAAAATACTTTAAACCCCAAT	(Steponaitis i sar., 2016)
2.CHI3L1 (metilovan)	F: TGTTAGATGTTTCGTGTAGTCGTTTC R: CCAAAAATACTTTAAACCCCGAT	(Steponaitis i sar., 2016)
ALU-C4	F: GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA R: ATTAATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA	(Aithal MGS i sar., 2015)

3.2. Izolacija genomske DNK

3.2.1. Izolacija DNK iz FF uzoraka tumora

Izolovanje genomske DNK iz sveže zamrznutih uzoraka tumora (FF) vršeno je korišćenjem “QIAamp® DNeasy Blood & Tissue” (QIAGEN Inc., Nemačka) kompleta reagenasa. Prema preporuci proizvođača, korišćeni su isecci tkiva čija je masa iznosila približno 25 mg. Isecci tkiva su najpre homogenizovani u hladnom fosfatnom puferu 1xPBS (*phosphate-buffered saline*, eng.) (170 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,0) uz pomoć mehaničkog homogenizatora. Homogenizatima je dodavano po 100 ml rastvora za liziranje (AL reagens) i 20 µl proteinaze K, nakon čega je sledila inkubacija na temperaturi od 56 °C u termomikseru (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 3h. U cilju odstranjivanja RNK molekula, lizati su inkubirani sa 4 µl RNaze A 2 min na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije sa RNazom, lizatima je dodavano po 200 µl AL reagensa uz inkubaciju na temperaturi od 70 °C u trajanju od 10 min. Nakon inkubacije, lizati su uz dodatak 200 µl etanola prebacivani u "Spin" hromatografske kolone za izolaciju DNK i centrifugirani u mikrocentrifugi (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka) u cilju prečišćavanja (po 500 µl AW1 i AW2 puferi za ispiranje). Finalno, DNK je izolovana iz kolone u 200 µl AE pufera za eluciju.

3.2.2. Izolacija genomske DNK iz FFPE isečaka tumora

Za ekstrakciju genomske DNK iz tkiva fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinske blokove (FFPE) korišćen je „QiAamp DNA FFPE Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Nemačka). Prema uputstvima iz protokola proizvođača, 8 isečaka FFPE uzorka debljine 10 µm, najpre je podvrgavano deparafinizaciji u 1 ml ksilola. Po dodavanju ksilola u epruvetu sa FFPE isečcima, sadržaj epruvete je mešan na vorteksu (Heidolph™ Reax Top Vortex Mixer, Nemačka) i centrifugiran na 14000 rpm u trajanju od 2 min. Nakon centrifugiranja, odlivan je supernatant, dodavano 1 ml 96% etanola u preostali talog i ponavljan postupak centrifugiranja i odlivanja supernatanta. Nakon sušenja taloga inkubacijom od 10 min na sobnoj temperaturi u cilju otklanjanja rezidua etanola, pristupano je proceduri izolacije DNK korišćenjem hromatografskih „QIAamp MinElute Spin“ kolona. Taj postupak se sastoji iz koraka analognim protokolu izolacije genomske DNK iz FF uzoraka: inkubaciji uzorka u smeši ATL pufera za liziranje i proteinaze K, inkubaciji sa RNazom A, dodavanja apsolutnog etanola i AL pufera za liziranje, zatim prečišćavanja puferima za ispiranje (AW1 i AW2) i finalne elucije u 30 µl ATE pufera.

3.2.3. Izolacija genomske DNK iz leukocita periferne krvi zdrave osobe

Ekstrakcija genomske DNK iz leukocita periferne krvi zdrave osobe vršena je pomoću „QIAamp® DNeasy Blood & Tissue“ (QIAGEN Inc., Nemačka) kompleta reagenasa. Najpre je vršeno centrifugiranje 5 ml uzorka krvi na 2500 x g u trajanju od 10 minuta, u cilju razdvajanja 3 različite frakcije – krvne plazme u gornjoj frakciji, središnji sloj (*buffy coat*, eng.) mononuklearnih ćelija periferne krvi (monocita, T i B limfocita i NK ćelija (*natural killer*, eng. - ćelija ubica)) i sloja koncentrovanih eritrocita u donjoj frakciji. Iz središnje frakcije je potom izdvojeno 200 µl površinskog „buffy coat“ dela sedimenta i uz dodatak 200 µl AL reagensa i 20

μl K proteinaze inkubirano na temperaturi od 56 °C u termomikseru (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 3h. Ostatak procedure izolacije DNK je izvršen prema uputstvu predstavljenom od strane proizvođača.

3.2.4. Dodatno prečišćavanje DNK izolata

Radi dodatnog prečišćavanja FF i FFPE izolata genomske DNK, vršena je njihova etanolna precipitacija. DNK izolati su uz dodatak 3m Na-acetata pH 5,2 (0,1 ukupne zapremine izolata) i 100% ledenog etanola (-20 °C, 2x zapremine izolata), inkubirani preko noći u zamrzivaču na -20 °C. Potom je vršeno centrifugiranje 15 min na 13000 rpm i temperaturi od 4°C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta, talog DNK je rastvoren u 70% etanolu (u 2 početne zapremine izolata) i postupak centrifugiranja je ponovljen pod istim uslovima. Nakon odlivanja supernatanta, DNK je rastvarana u 40 μl ddH₂O i skladištena u zamrzivaču na -20 °C.

3.3. Kvantifikacija i provera kvaliteta DNK izolata

3.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija i određivanje kvaliteta DNK izolata

Određivanje koncentracije DNK izolata vršeno je spektrofotometrijskom „nanodrop“ metodom na aparatu *BioSpec-nano* (Shimadzu, Japan). Merenja su vršena u triplikatu, a po jednom merenju nanošeno je 2 μl DNK uzorka na ležište na aparatu. Pored određivanja koncentracije izražene u nanogramima po mikrolitru (ng/μl), aparat je automatski analizirao stepen čistoće uzorka na osnovu odnosa izmerenih OD₂₆₀ i OD₂₈₀ optičkih gustina. Kvalitet uzorka je smatran zadovoljavajućim ukoliko je stepen čistoće iznosio više od 1,8.

3.3.2. Provera kvaliteta DNK izolata metodom agarozne gel-elektroforeze

U cilju analize intaktnosti DNK izolata primenjena je metoda agarozne elektroforeze na 1% gelu pri naponu od 1-10 V/cm gela i trajanju od 2h. Pufer 1xTAE (Tris, acetat, EDTA) (40 mM TRIS-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,09) korišćen je za pripremu gela i kao pufera za elektroforezu. DNK interkalirajući agens etidijum bromid dodavan je TAE puferu u koncentraciji od 0,5 mg/ml sa ciljem detekcije i vizuelizacije DNK molekula na agaroznom gelu. Određivanje

dužine fragmenata DNK na gelu omogućeno je korišćenjem komercijalnog DNK standarda λ faga digeriranog BstEII enzimom, SERVA DNKStandard λ x BstE II[®] (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Po završetku elektroforeze, snimci gela su generisani pomoću UV transiluminatora i sistema za fotodokumentaciju „DocPrint“, (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Francuska).

3.4. Evaluacija statusa *IDH1/2* mutacije

3.4.1. Amplifikacija *IDH1/2* fragmenata PCR metodom

Određivanje statusa mutacije *IDH1* i *IDH2* gena vršeno je metodom Sangerovog sekvenciranja kojoj je prethodila PCR amplifikacija DNK fragmenata egzona 4 *IDH1* i *IDH2* gena. Za PCR amplifikaciju korišćeni su odgovarajući setovi oligonukleotida (tabela 1) u količini od 10 pM. PCR amplifikacija *IDH1/2* fragmenta vršena je u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L, 1x koncentrovanom B1 puferu i $MgCl_2$ u koncentraciji od 2mM (Solis BioDyne OU, Estonija), 0,2 μ M smeše dNTP^y i 1U (*units*, eng. – jedinica) FIREPol[®] polimeraze i 100 ng DNK matrice. Za PCR umnožavanje *IDH1/2* korišćen je uređaj Mastercycler[®]Gradient (Eppendorf, Austrija) i sledeći program amplifikacije: izlaganje smeše temperaturi od 94 °C u trajanju od 5 min (inicijalna denaturacija i aktivacija polimeraze), nakon kog slede 35 ciklusa sačinjena od izlaganja temperaturi od 94 °C u trajanju od 30 sek, 57 °C u trajanju od 30 sek i 72 °C u trajanju od 30 sek. Nakon poslednjeg ciklusa sledila je faza finalne ekstenzije na temperaturi od 72 °C u trajanju od 10 min. Sve PCR reakcije su rađene u duplikatu, a njihova uspešnost je proveravana metodom agarozne gel-elektroforeze.

3.4.2. Determinacija mutacija u *IDH1* i *IDH2* metodom sekvenciranja po Sangeru

U cilju detekcije prisustva *IDH1-R132H* mutacije i *IDH2* mutacija u kodonima 172 i 140, izvršeno je direktno sekvenciranje PCR produkata korišćenjem „Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” kompleta reagenasa (Applied Biosystems) i automatizovanog sekvenatora 3130 Genetic analyzer (Genetski analizator, srp.) (Applied Biosystems) i standardnog protokola

^y Deoksinukleozid trifosfat

sekvenciranja. Setovi oligonukleotida („forward“ i „reverse“) koji su korišćeni za reakciju sekvenciranja bili su identični onim korišćenim za PCR amplifikaciju. Rezultati sekvenciranja su analizirani pomoću SnapGene[®] i Geneious Prime[®] softvera kao i Ensembl i CLUSTALW on-line aplikacijama za analizu sekvenci DNK, i upoređivani sa referentnim sekvencama prikupljenim iz GenBank baze podataka (IDH1: NM_005896.4, IDH2: NM_002168.4).

3.5. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* gena

3.5.1. Bisulfitna konverzija DNK

Stepen metilacije *MGMT* promotornog regiona određivan je metodama konvencionalne MSP i „real time“ MSP.

PCR amplifikaciji prehodila je bisulfitna konverzija 2 µg genomske DNK. FF izolati genomske DNK konvertovani su pomoću EpiTect[®] Bisulfite kompleta reagenasa (Qiagen, Hilden, Nemačka), dok je za DNK izolate iz FFPE uzoraka korišćen EpiTect Plus FFPE bisulfite komplet reagenasa (Qiagen, Hilden, Nemačka). Kvalitet i kvantitet bisulfitno konvertovane DNK određivan je spektrofotometrijski na Biospec-nano aparatu.

3.5.2. Analiza konvencionalnom MSP metodom

Nakon izvođenja seta optimizacionih reakcija (koncentracije MgCl₂, količine HotStarTaq[®] polimeraze i DNK matrice) definisan je sledeći sastav PCR smeše (ukupne zapremine 20 µl) za određivanje statusa metilacije *MGMT* konvencionalnom MSP metodom kod FF DNK izolata: 125 ng bisulfitno konvertovane DNK matrice, 10 pM odgovarajućih „forward“ i „reverse“ para nukleotida (Tabela 10), 1xPCR puferske smeše sa 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Nemačka), 0,2 µM smeše dNTP i 1U HotStarTaq[®] polimeraze.

Pri analizi FFPE uzoraka, optimalni sastav PCR smeša podudarao se sa korišćenim pri analizi FF uzoraka, osim koncentracije HotStarTaq[®] polimeraze koja je povećana do 4U.

Nakon reakcija optimizacije temperature „anilinga“, definisani su optimalni uslovi amplifikacije u Mastercycler[®]Gradient (Eppendorf, Austrija) PCR uređaju po programu:

- Inicijalna denaturacija - 95 °C u trajanju od 15 minuta

- 35 PCR ciklusa:
- 95 °C 50 sekundi
- 59 °C 50 sekundi
- 72 °C 50 sekundi
- Finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju od 10 minuta

Kao pozitivne kontrole nemetilovanih i metilovanih PCR produkata korišćene su komercijalne bisulfitno konvertovane metilovane i nemetilovane DNK matrice (EpiTect® PCR Control DNA set (Qiagen, Nemačka)). Bisulfitno konvertovane DNK izolovane iz uzorka meningioma i leukocita periferne krvi zdrave osobe korišćene su kao negativne kontrole. U cilju normalizacije signala nivoa metilacije prilikom softverske obrade elektroforetskih snimaka, izvođene su kontrolne reakcije sa *ALU-C4* parom oligonukleotida (Tabela 10). Sve PCR reakcije su rađene u duplikatu.

3.5.2.1. Kvalitativna analiza konvencionalnom MSP metodom

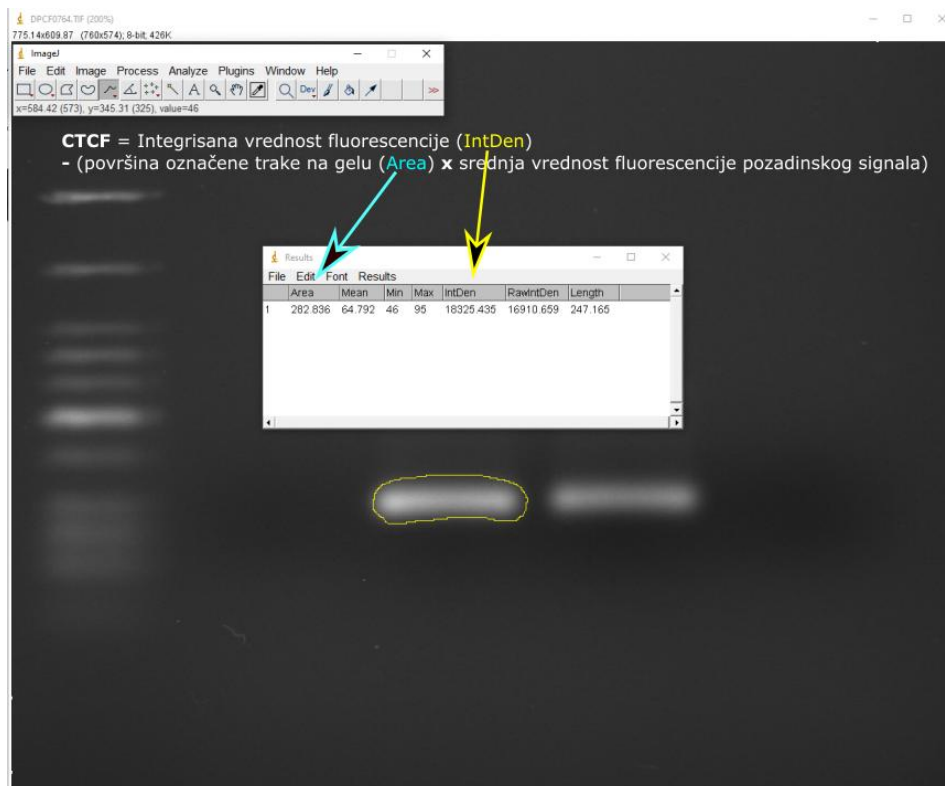
Kvalitativno određivanje statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona vršeno je po metodi koju su opisali Esteller i saradnici (Esteller i sar., 1999). Separacijom PCR produkata na 2% agaroznom gelu i uočavanjem specifičnih produkata (dužine 81bp) za metilovanu varijantu promotornog regiona *MGMT*, analiziranim uzorcima je dodeljivan pozitivan ili negativan status metilacije.

3.5.2.2. Semi-kvantitativna analiza konvencionalnom MSP metodom

Prema ranije opisanoj proceduri koju su predstavili Christians i saradnici 2012. godine, snimci agaroznih gelova sa metilovanim, nemetilovanim MSP produktima podvrgavani su analizi pomoću ImageJ (National Institutes of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>) softvera. Cilj analize bila je semi-kvantitativna evaluacija statusa metilacije *MGMT* na osnovu odnosa intenziteta signala metilovanih i nemetilovanih produkata (M/U odnosa) (Christians i sar., 2012).

Obradom snimaka gelova u ImageJ programu određivan je relativni odnos intenziteta fluorescencije M i U (M/U odnos) MSP produkata. Pritom su korišćene dve različite opcije u sklopu ImageJ za merenje intenziteta fluorescencije: “Analyze gels” opcija i “CTCF” (*C*orrected *t*otal *c*ell *f*luorescence, eng.) opcija.

Za razliku od “Analyze gel”, “CTCF” opcija nije primarno namenjena analizi elektroforetskih gelova, već imunohistohemijskim analizama uzoraka. Međutim, dok “Analyze gels” nudi efikasnu analizu intenziteta fluorescencije traka na pojedinačnim gelovima, “CTCF” omogućava merenje apsolutne vrednosti fluorescencije i upoređivanje uzoraka nanesenih na dva različita gela. “CTCF” vrednosti se dobijaju obeležavanjem pojedinačnih traka na gelu i merenja njihovog intenziteta fluorescencije. Takve vrednosti se zatim normalizuju na osnovu intenziteta fluorescencije pozadinskog signala gela (slika 30).



Slika 30. Kvantifikacija intenziteta fluorescencije PCR produkta na gelu korišćenjem "CTCF" opcije u ImageJ programu

Na osnovu M/U odnosa ispitivani uzorci su podeljeni u tri grupe: nemetilovanu (M/U=0 potpuno odsustvo M trake na gelu), slabo metilovanu (M/U<1) i hipermetilovanu (M/U>1). 113

Pored navedene, istražene su još dve metode semi-kvantitativne evaluacije statusa metilacije *MGMT* koje su zasnovane na ImageJ upoređivanju intenziteta „CTCF“ M i U signala

sa „CTCF“ intenzitetom *ALU-C4* produkta, u cilju njihove normalizacije. Navedeni semi-kvantitativni pristupi prilagođeni su konvencionalnoj MSP metodi na osnovu ranije predstavljenih qMSP procedura kojima se stepen metilacije u uzorku kalibriše signalom metilacije u metilovanom referentnom uzorku. Rezultat dobijen nakon takve kalibracije izražava procentualni odnos detektovane metilacije u uzorku i referentne metilovane kontrole (PMR vrednost). Takva evaluacija statusa metilacije vršena je na dva načina prema sledećim jednačinama (Håvik i sar., 2012):

$$PMR = \frac{(GBM) M/U / ALU C4}{(Metilovana kontrola) M/U / ALU C4} \times 100$$

$$PMR = \frac{(GBM) M / ALU C4}{(Metilovana kontrola) M / ALU C4} \times 100$$

3.5.3. Real-time MSP (qMSP) evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT*

Određivanje statusa metilacije promotornog regiona putem qMSP metode vršeno je pomoću AriaMx qPCR uređaja (Aiglent technologies, Sjedinjene Američke Države). Relativna kvantifikacija M i U PCR produkata izvođena je direktnim qPCR pristupom korišćenjem QuantiNova SYBR[®] Green PCR kompleta reagenasa (Qiagen, Nemačka). PCR reakcije su izvođene u reakcionim smešama zapremine 20 µl koje su sadržale QuantiNova Sybr[®] Green master mix u 1x koncentraciji, QN ROX[™] referentnu boju u koncentraciji od 1x, 10 pM odgovarajućih „forward“ i „reverse“ oligonukleotida HPLC čistoće (tabela 10) i 125 ng bisulfitno-konvertovane DNK matrice. Program PCR amplifikacije sastojao se od sledećih ciklusa:

- 95 °C u trajanju od 2 minuta
- 35 PCR ciklusa sačinjena od:
 - 95 °C u trajanju od 5 sekundi
 - 60 °C u trajanju od 11 sekundi

Poslednji segment PCR reakcije predstavljalo je kreiranje krive topljenja, a sve PCR reakcije su izvođene u duplikatu.

Prvi pristup izračunavanju stepena metilacije na osnovu qMSP rezultata predstavljao je semi-kvantitativni pristup koji su 2018. godine opisali Yoshioka i saradnici (Yoshioka i sar., 2018). Ovaj pristup se zasniva na obrnuto proporcionalnoj korelaciji između ΔC_t vrednosti i vremena preživljavanja pacijenata. Navedena ΔC_t vrednost predstavlja razliku između zabeleženih C_t vrednosti za nemetilovani *MGMT* produkt i metilovani *MGMT* produkt. U slučaju odsustva „pika“ na temperaturi od 81 °C, uzorci su smatrani nemetilovanim i za njih nisu izračunavane ΔC_t vrednosti. Za graničnu (cutoff) ΔC_t vrednost evaluacije pozitivnog statusa metilacije uzeta je $\Delta C_t=2$, za koju su dobijeni najpouzdaniji rezultati u navedenoj studiji (Yoshioka i sar., 2018). Uzorci su smatrani metilovanim ukoliko je ΔC_t vrednost iznosila manje od 2, a nemetilovanim ukoliko je ta vrednost bila veća od 2. Pored, toga, izvršene su analize i za granične ΔC_t vrednosti od 0, 4, 6 i 8.

Drugi pristup evaluaciji stepena metilacije na osnovu qMSP analize predstavljala je modifikacija metode koju su predstavili Havik i saradnici (Havik i sar., 2012). Stepenn metilacije izražavan je u vidu procenta metilovane reference (PMR) koji predstavlja procentualni odnos relativne količine (*fold change*, eng.) metilovanog produkta u uzorku i referentnoj pozitivnoj kontroli - bisulfitno-konvertovanoj kontrolnoj DNK (Qiagen, Nemačka). Normalizacija relativne količine metilovanog produkta u uzorcima i kontrolama omogućena je PCR reakcijama sa ALU-C4 setom oligonukleotida. Nulta PMR vrednost definisana je na osnovu vrednosti nivoa metilacije u uzorku meningioma, koji je korišćen kao negativna kontrola pri svakoj PCR amplifikaciji. U slučaju registrovanja C_t vrednosti za metilovani produkt koja je iznosila više od 35, relativna količina metilovanog produkta je označavana kao 0. Uzorci sa PMR vrednošću većom od 0 označavani su kao metilovani. Relativna količina metilovanog produkta određivana je $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodom, a PMR vrednost prema sledećoj formuli:

$$\frac{(\text{GBM}) \text{ M} / \text{ALU C4}}{(\text{Metilovana kontrola}) \text{ M} / \text{ALU C4}} \times 100$$

3.6. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *CHI3L1* gena

Status metilacije promotornog regiona *CHI3L1* gena određivan je semikvantitativno metodom konvencionalne MSP. Za izvođenje PCR reakcija korišćena su dva seta oligonukleotida za dva zasebna regiona unutar sekvence promotora *CHI3L1* koje su dizajnirali Steponaitis i saradnici (Tabela 10) (Steponaitis i sar., 2016).

PCR reakcije su izvođene u reakcionim smešama ukupne zapremine 25 μ l koje su sadržale pufer B1 u 1x koncentraciji i 2mM $MgCl_2$ (Solis BioDyne OU, Estonija), 10 pM odgovarajućih „forward“ i „reverse“ oligonukleotida, 0,2 μ M dNTP smeše, 1U FIREPol® polimeraze (Solis BioDyne OU, Estonija) i 100 ng bisulfitno-konvertovane DNK matrice. MSP reakcija je izvođena u Mastercycler®Gradient (Eppendorf, Austrija) uređaju prema sledećem programu:

- Inicijalna denaturacija - 94 °C u trajanju od 5 minuta
- 36 PCR ciklusa:
 - 95 °C 15 sekundi
 - 58 °C 30 sekundi
 - 72 °C 20 sekundi
- Finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju od 10 minuta

Sve PCR reakcije su određene u duplikatu. PCR produkti odgovarajuće dužine su detektovani metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu, a semikvantitativna vrednost statusa metilacije određivana je pomoću ImageJ (National Institutes of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>) upoređivanjem intenziteta metilovanih (M) u nemetilovanih (U) produkata na snimcima gela, prema ranije opisanoj metodi (Christians i sar., 2012).

3.7. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka Kruskal-Wallis testom, Studentovim t-testom i χ^2 testom izvršena je pomoću programa StatSoft, Inc. (2004) STATISTICA, verzija 7. Analiza preživljavanja je vršena konstruisanjem Kaplan-Meier-ovih kriva, a njihovo upoređivanje vršeno je log-rank i Wilcoxon-ovim (Gehan) testom. Međuklasni korelacioni koeficijent ICC (*Interclass correlation coefficient, eng.*) određivan je u cilju upoređivanja tri pristupa konvencionalnoj MSP analizi statusa metilacije *MGMT*.

4. REZULTATI

4.1. Korelacija epidemioloških karakteristika pacijenata i ukupnog preživljavanja (OS)

Primenom univarijantne Cox-ove regresione analize (modela proporcionalnog rizika) utvrđen je uticaj starosti pacijenata, stepena hirurške resekcije i tipa adjuvantne terapije kao samostalnih prognostičkih faktora vremena preživljavanja pacijenata obuhvaženim ovim istraživanjem (tabela 11).

Tabela 11. - Rezultati univarijantne Cox-ove regresione analize prognostičkih faktora ukupnog vremena preživljavanja grupe od 43 pacijenta obolelih od glioma visokog gradusa

Prognostički faktori	P vrednost	Hazard količnik (HR)	95% CI (HR)
Starost pacijenata	0.0007	1.0683	1.0281 to 1.1101
Stepen resekcije Maksimalna resekcija Parcijalna resekcija Biopsija	0.0004	0.4093	0.2488 to 0.6735
Tip Adjuvantne terapije TMZ PCV BCNU	<0.0001	0.1639	0.0779 to 0.3448

Nakon toga, prognostički potencijal pojedinačnih demografskih i kliničkih parametara ispitivan je analizom Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja.

4.1.1. Starosne grupe pacijenata

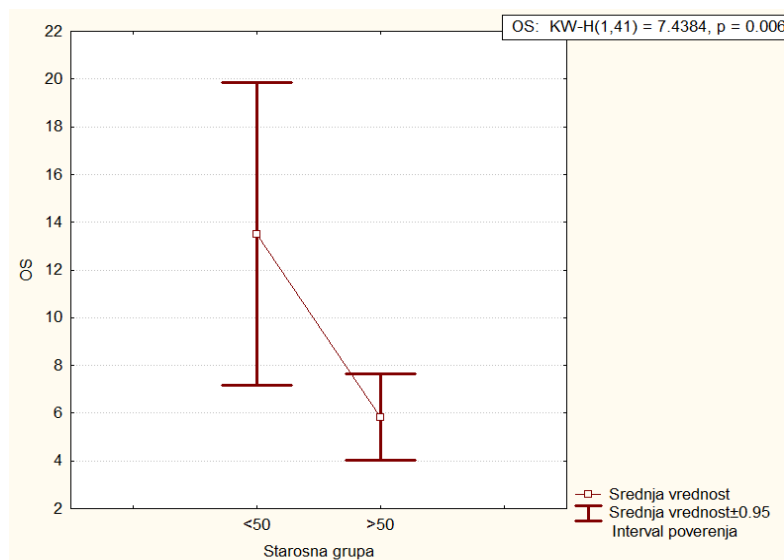
Na osnovu preporuka studija o uzrasnoj stratifikaciji stepena rizika kod glioma, izabrana je granica od 50 godina u cilju starosne stratifikacije ispitivane grupe pacijenata (Aum i sar., 2014; Taghizadeh i sar., 2019).

Pacijenti mlađi od 50 godina činili su 24,4% od ukupnog broja pacijenata. Njih je odlikovalo duže ukupno vreme preživljavanja ($13.5 \pm 8,87$ meseci) u odnosu na grupu pacijenata stariju od 50 godina ($5,84 \pm 4,96$ meseci) (tabela 12).

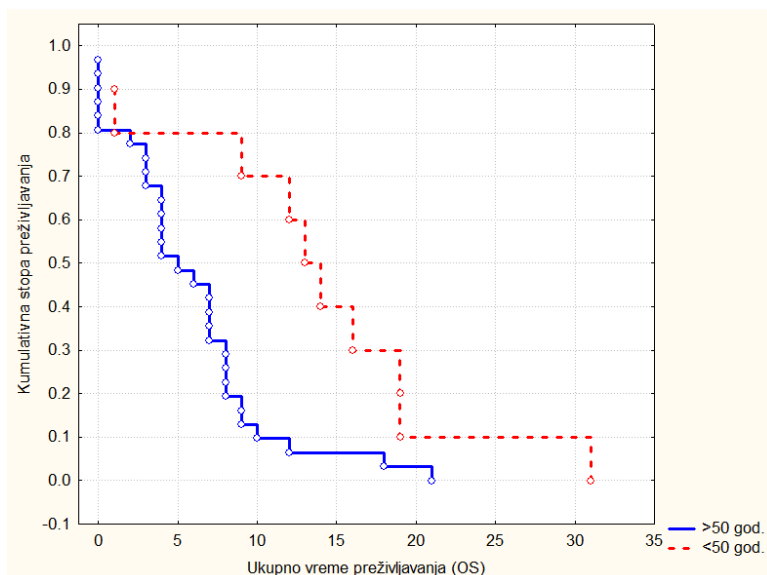
Tabela 11. - Korelacija ukupnog vremena preživljavanja pacijenata i uzrasne grupe

Starosna grupa	Broj pacijenata (N)	Ukupno preživljavanje (OS)
<50 god.	10	13.5 $\pm$ 8,87 meseci
>50 god.	31	5,84 $\pm$ 4,96 meseci

Statistički značajne razlike u u ukupnom vremenu preživljavanja pacijenata u zavisnosti od starosne grupe potvrđene su upoređivanjem srednjih vrednosti OS vremena (Kruskal-Wallis (KW-H(1,41)= 7,4384, $p = .006$) i Kaplan-Meier-ovih kumulativnih kriva preživljavanja (Log-Rank= 3.130149 $p = .00175$) (slike 31. i 32.).



Slika 31. Grafik srednjih vrednosti OS vremena za “<50” i “>50” starosne grupe pacijenata



Slika 32. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja "<50" i ">50" starnosnih grupa pacijenata

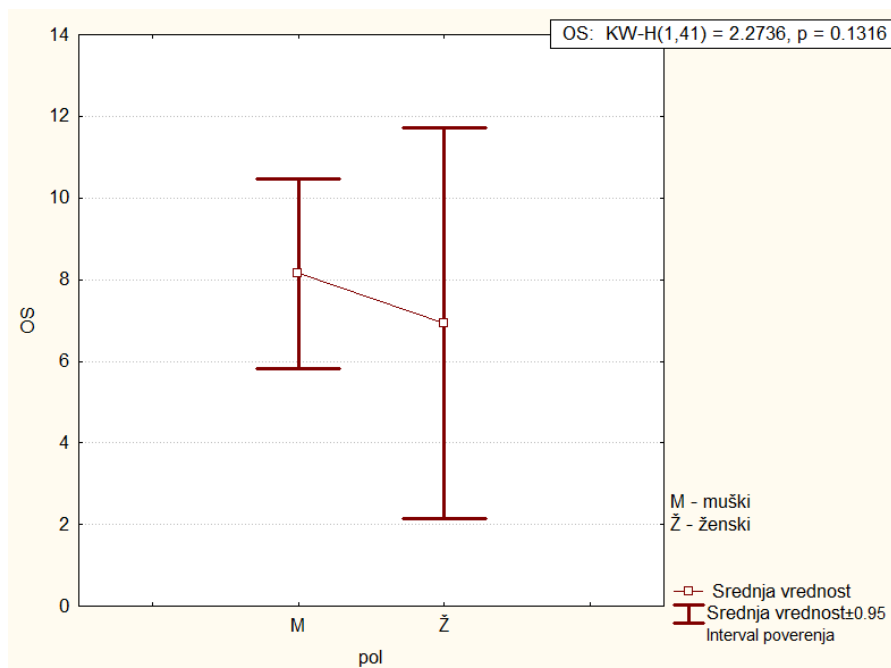
4.1.2. Pol pacijenata

U ovom istraživanju, udeo pacijenata muškog pola (63,4%) bio je veći od ženskog (36,6%) u odnosu od 1,73 (tabela 13).

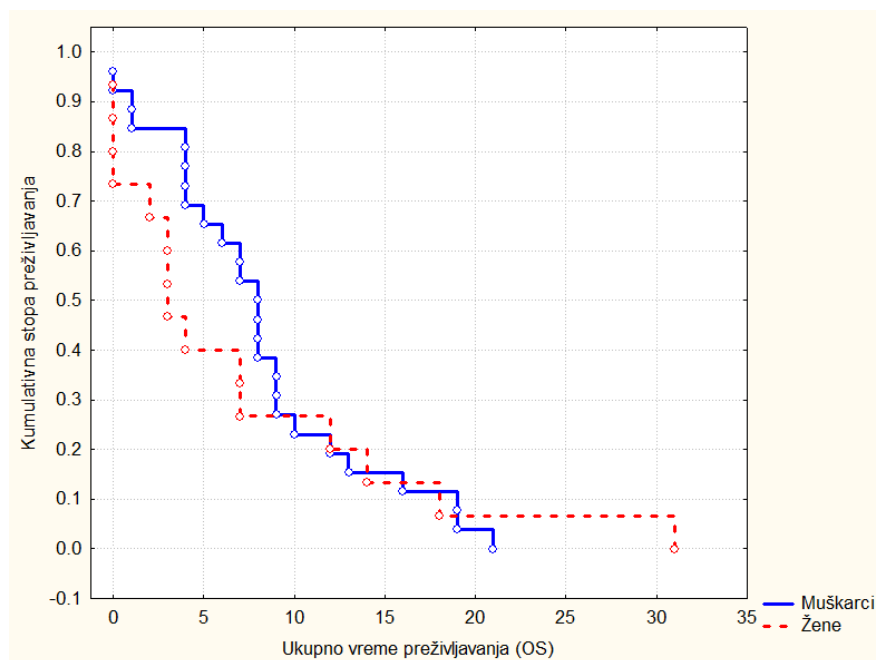
Tabela 13 Ukupno vreme preživljavanja pacijenata u zavisnosti od pola

pol	Broj pacijenata (N)	Ukupno preživljavanje (OS)
Muškarci	26	8,15±5,75 meseci
Žene	15	6,93±8,66 meseci

Statistički značajne razlike u vremenu preživljavanja u zavisnosti od pola nisu utvrđene upoređivanjem srednjih vrednosti OS vremena (Kruskal-Wallis (KW-H(1,41)= 2,2736, p= .1316) i Kaplan-Meier-ovih kumulativnih kriva preživljavanja (LogRank= -.590296 p = .55499) (slike 33. i 34.)



Slika 33. Srednje vrednosti OS vremena u zavisnosti od pola pacijenata



Slika 34. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od pola pacijenata

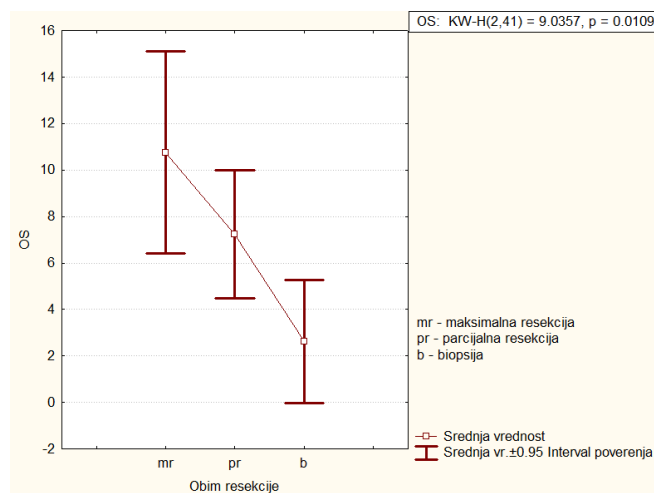
4.2. Korelacija stepena resekcije tumora i ukupnog preživljavanja (OS)

Od ukupnog broja pacijenata sa dijagnostikovanim visokogradusnim gliomom kompletna (maksimalna) resekcija (MR) tumorske mase izvršena je kod 16 pacijenata, parcijalna resekcija (PR) kod 17, a kod 8 pacijenata izvršeno je jedino uzorkovanje biopsijom (B). Pacijente sa izvedenom kompletnom resekcijom odlikovalo je najduže ukupno vreme preživljavanja (10.75 ± 8.16 meseci), dok je pacijente sa izvršenom parcijalnom resekcijom odlikovalo OS vreme od 7.23 ± 5.38 . Pacijente kod kojih je izvršena jedino biopsija odlikovalo je najkraće vreme preživljavanja (2.62 ± 3.15) (tabela 14).

Tabela 14. - Ukupno vreme preživljavanja pacijenata u zavisnosti od stepena resekcije tumora

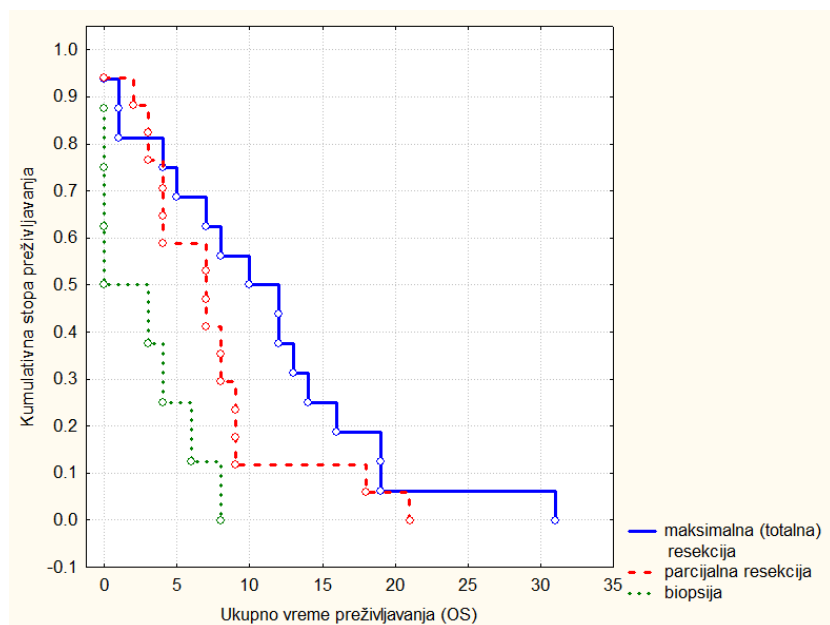
Obim resekcije	Broj pacijenata (N)	Ukupno preživljavanje (OS)
Kompletna resekcija	16	10.75 ± 8.16 meseci
Parcijalna resekcija	17	7.23 ± 5.38 meseci
biopsija	8	2.62 ± 3.15 meseci

Upoređivanjem srednjih OS vrednosti grupa pacijenata sa različitim nivoom hirurške resekcije tumorske mase otkrivena je statistički značajna razlika u OS vremenu preživljavanja između MR grupe i B grupe ($KW-H(1,24) = 7.3398$, $p = 0.0067$), kao i PR grupe i B grupe pacijenata ($KW-H(1,25) = 5.3903$, $p = 0.0202$). Međutim, takva razlika nije potvrđena između srednjih OS vrednosti MR i PR grupa pacijenata ($KW-H(1,33) = 1.8348$, $p = 0.1756$) (slika 35.).



Slika 35. Srednje vrednosti OS vremena u zavisnosti od stepena resekcije tumora

Analiza Kaplan-Meier kriva preživljavanja pokazala je statistički značajne rezlike između MR i B (Log-Rank= -2.30217 p = .02133) i PR i B grupa pacijenata (Log-Rank= -2.03083 p = .04227), dok takva razlika nije pokazana između MR i PR grupa pacijenata (Log-Rank = -1.45756 p = .14496) (slika 36.).



Slika 36. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od stepena resekcije tumora

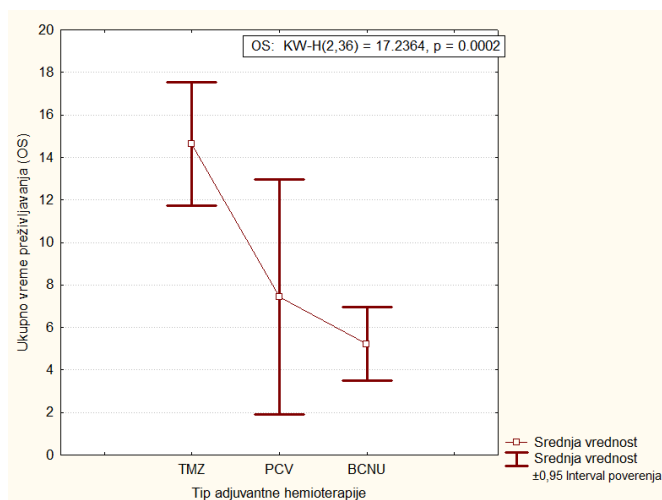
4.3. Korelacija vrste adjuvantne hemioterapije i ukupnog preživljavanja (OS)

Poređenjem različitih tipova hemioterapije, utvrđeno je najduže srednje OS vreme preživljavanja pacijenata (14.63 ± 4.29) pri tretmanu Temodal[®]-om (TMZ). Pacijente kod kojih je primenjen PCV režim hemioterapije odlikovalo je srednje OS vreme od 7.45 ± 8.22 meseci, dok je grupu pacijenata sa BCNU terapijom karakterisalo najkraće OS vreme preživljavanja od 5.21 ± 2.99 meseci (tabela 15).

Tabela 15. - Ukupno vreme preživljavanja pacijenata u zavisnosti od tipa adjuvantne hemioterapije

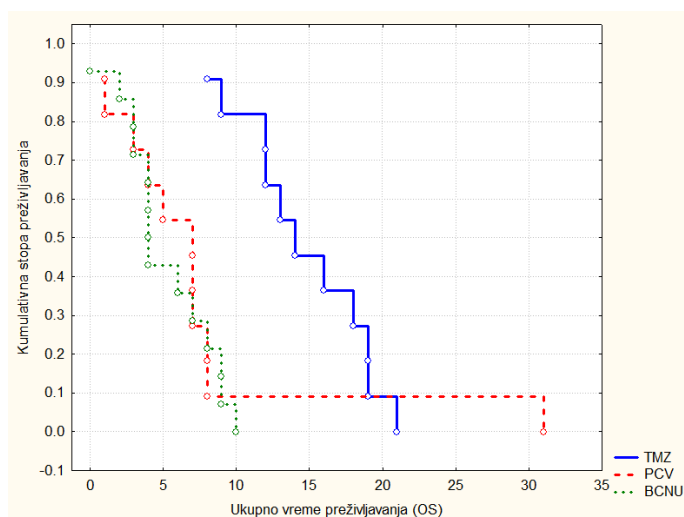
Tip adjuvantne hemioterapije	Broj pacijenata (N)	Ukupno preživljavanje (OS)
TMZ	11	$14,63 \pm 4,29$ meseci
PCV	11	$7,45 \pm 8,22$ meseci
BCNU	14	$5,21 \pm 2,99$ meseci

Upoređivanjem srednjih OS vrednosti ove tri grupe pacijenata, utvrđene su statistički značajne razlike između TMZ i PCV (KW-H(1,22) = 10.206, $p = 0.0014$) i TMZ i BCNU (KW-H(1,25) = 15.4282, $p = 0.00009$) grupa pacijenata. Srednje OS vrednosti BCNU i PCV grupa pacijenata nisu pokazale statistički značajnu razliku (KW-H(1,25) = 0.0921, $p = 0.7616$) (slika 37.).



Slika 37. Srednje vrednosti OS vremena u zavisnosti od tipa adjuvantne hemioterapije

Slične rezultate pokazala je analiza Keplen-Meier kriva preživljavanja u zavisnosti od tipa hemioterapije. Pokazana je razlika između krive preživljavanja TMZ grupe pacijenata i PCV (Log-Rank= -1.95714 $p = .05033$) odnosno BCNU (Log-Rank=-3.57924 $p = .00034$). Razlike između PCV i BCNU Kaplan-Meier-ove krive kumulativne stope preživljavanja nisu potvrđene Log-Rank statističkom analizom (Log-Rank= -.367575 $p = .71319$) (slika 38.).



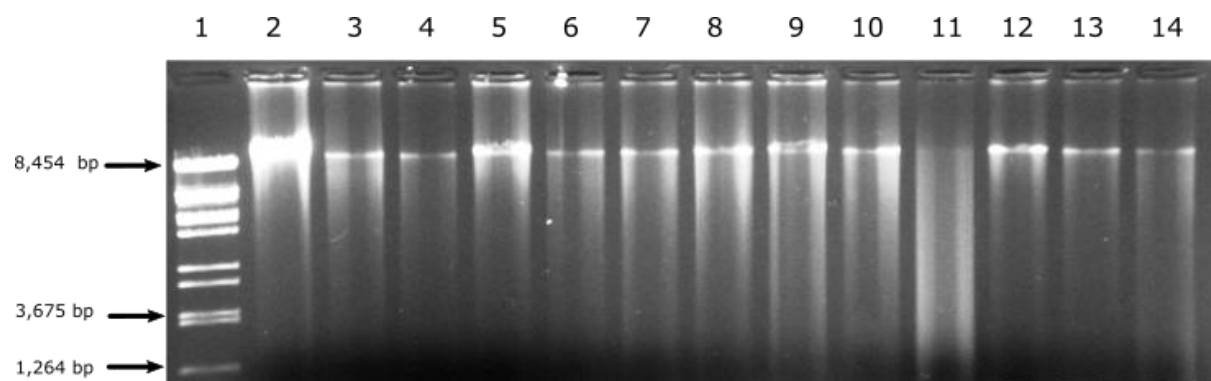
Slika 38. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od tipa adjuvantne terapije

4.4. Analiza molekularnih markera glioblastoma

4.4.1. Kvalitet i integritet izolata genomske DNK

4.4.1.1. DNK izolacija iz FF uzoraka

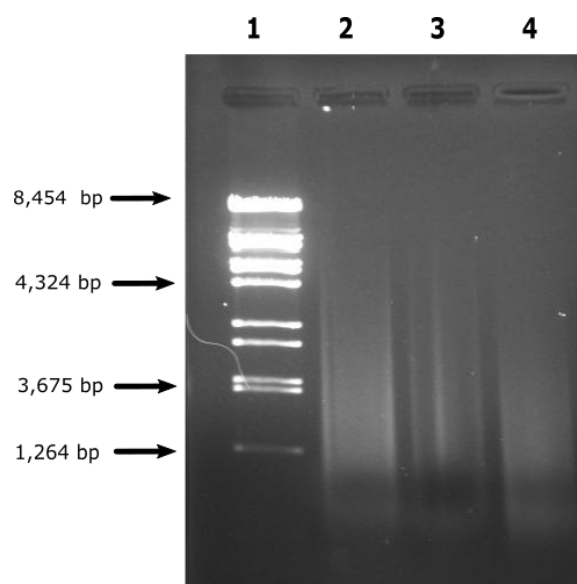
Prosečna $OD_{260/280}$ vrednost DNK izolata iz FF uzoraka tumora iznosila je 1.93 ± 0.26 , što ukazuje na njihov visok stepen čistoće. Proverom kvaliteta putem metode elektroforeze na 1% agaroznom gelu utvrđen je visok integritet izolovane DNK. Izolovana genomska DNK je na snimcima gelova uočljiva u vidu diskretnih traka, dok je prisustvo razmaza (*smear*, *eng.*) koji potiču od visoko degradovane DNK kod većine uzoraka bilo slabo izraženo (slika 39.).



Slika 39. Provera nivoa degradacije DNK izolata iz FF uzoraka metodom elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Redosled uzoraka: 1 - komercijalni DNK standard - λ fag digeriran BstEII enzimom, 2-9 – Izolati genomske DNK iz FF uzoraka GBM, 10 – Izolat genomske DNK iz FF uzorka hemangiopericitoma, 11 – Izolat genomske DNK iz FF uzorka meningioma 12-14 – izolati genomske DNK iz FF uzoraka meningioma

4.4.1.2. DNK izolacija iz FFPE uzoraka

Prosečna $OD_{260/280}$ vrednost izolata genomske DNK iz FFPE uzoraka iznosila je 1.82 ± 0.38 , ukazujući na njihovu prihvatljivu čistoću. Sa druge strane, gel-elektroforetska provera kvaliteta izolata genomske DNK iz FFPE uzoraka tumora ukazala je na njihov slabiji kvalitet. Na snimcima 1% agaroznog gela FFPE DNK izolata uočavani su dugački „smear“-ovi sačinjeni od fragmenata DNK različitih dužina, uglavnom kraćih od 1,264 bp. Takva fragmentacija, uz istovremeno potpuno odsustvo diskretne trake visokomolekularne DNK ukazivala je na visok stepen degradacije genomske DNK u FFPE uzorcima (slika 40.).

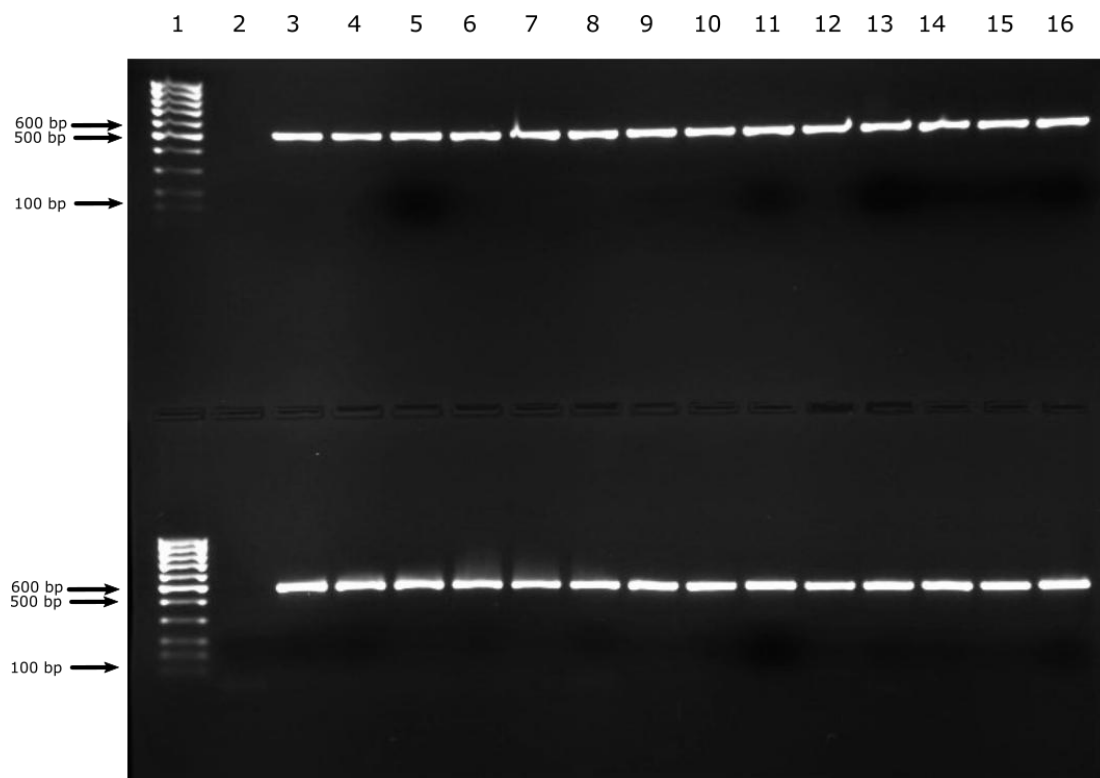


Slika 40. Provera stepena degradacije izolata genomske DNK iz FFPE uzoraka GBM metodom elektroforeze na 1% agaroznom gelu Redosled uzoraka: 1 - komercijalni DNK standard - λ fag digeriran BstEII enzimom; 2-4 Izolati genomske DNK iz FF uzoraka GBM

4.4.2. Evaluacija statusa mutacije *IDH1-R132H*

4.4.2.1. Provera uspešnosti amplifikacije *IDH1*

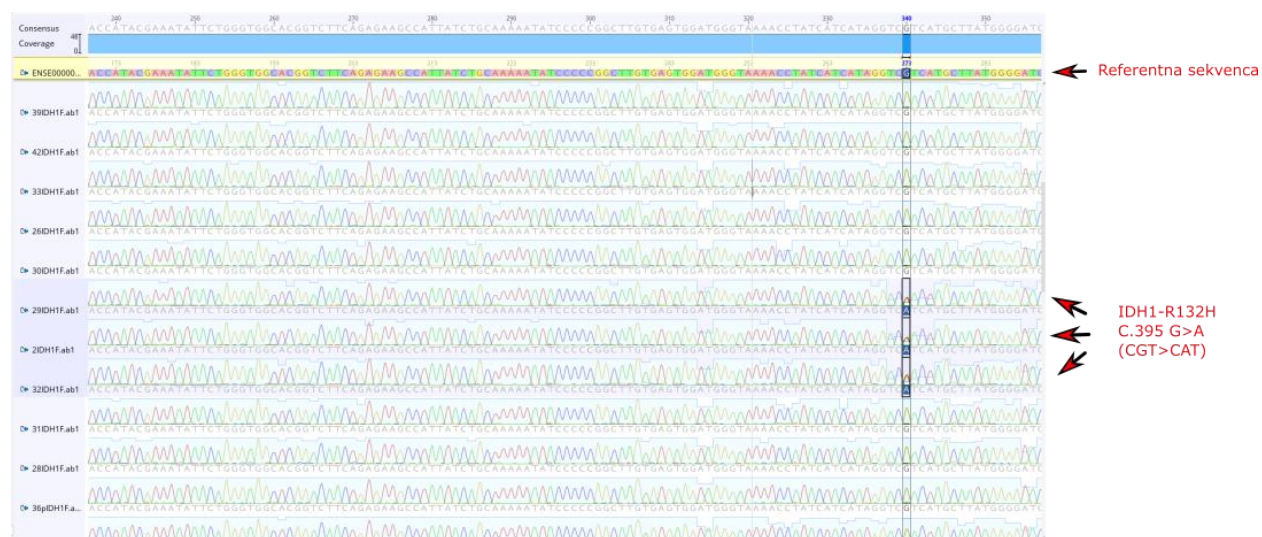
Nakon PCR amplifikacije sekvence egzona 4 *IDH1* gena u FF DNK izolatima tumora, izvršena je provera uspešnosti PCR reakcija metodom gel-elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Svaki set PCR reakcija nanošen je na gel uz adekvatnu negativnu kontrolu (NTC) i marker DNK (100 bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.). Procenat uspešnosti *IDH1* PCR reakcija je iznosio 100%, a na elektroforetskim snimcima registrovano je prisustvo specifičnog produkta amplifikacije (436 bp), uz odsustvo drugih nespecifičnih produkata i dimera oligonukleotida (slika 41.).



Slika 41. Provera uspešnosti *IDH1* PCR reakcija metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Redosled uzoraka: 1- Marker DNK (100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.). 2 – NTC negativna kontrola bez DNK matrice u PCR reakciji 3-16 DNK izolati iz FF uzoraka GBM pacijenata

4.4.2.2. Sekvenciranje *IDH1*

Sangerovim sekvenciranjem utvrđen je redosled nukleotida u *IDH1* PCR produktima svih FF uzoraka obuhvaćenih ovim istraživanjem, uključujući i kontrolne uzorke (meningioma, hemangiopericitoma i leukocita periferne krvi). Procenat visoko-kvalitetnih očitavanja pojedinačnih baza u analiziranim sekvencama iznosio je $71.16 \pm 1.88\%$, a njihov GC sastav iznosio je $\approx 40\%$. Upoređivanjem sa referentnom sekvencom (NM_005896.4) iz GeneBank® baze podataka genomskih sekvenci, kod tri uzorka otkriveno je prisustvo G>A „missense“ mutacije na poziciji 395 koja rezultuje konverzijom kodona za arginin (CGT) u kodon za histidin (CAT). Ova mutacija je potvrđena kod dva uzorka oligoastrocitoma i jednog uzorka GBM (slika 42.).



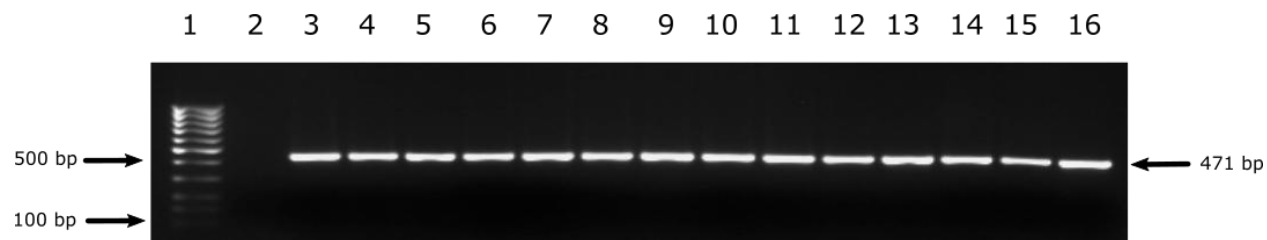
Slika 42. Uporedni prikaz hromatograma analiziranih IDH1 sekvenci i detekcija G>A tranzicije unutar kodona 132

Prosečna starost pacijenata kod kojih je detektovano prisustvo *IDH1-R132H* mutacije iznosila je 41 ± 10.8 godinu, dok je srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja iznosila 17 meseci, što je značajno duže od srednje vrednosti vremena preživljavanja *IDH1-wt* grupe pacijenata (7.7 ± 6.87 meseci). Sva tri uzorka su ocenjena pozitivno na prisustvo metilacije promotornog regiona *MGMT* kvalitativnom i Real-Time MSP analizom.

4.4.3. Evaluacija statusa mutacije *IDH2-R172* i *IDH2-R140*

4.4.3.1. Provera uspešnosti amplifikacije *IDH2*

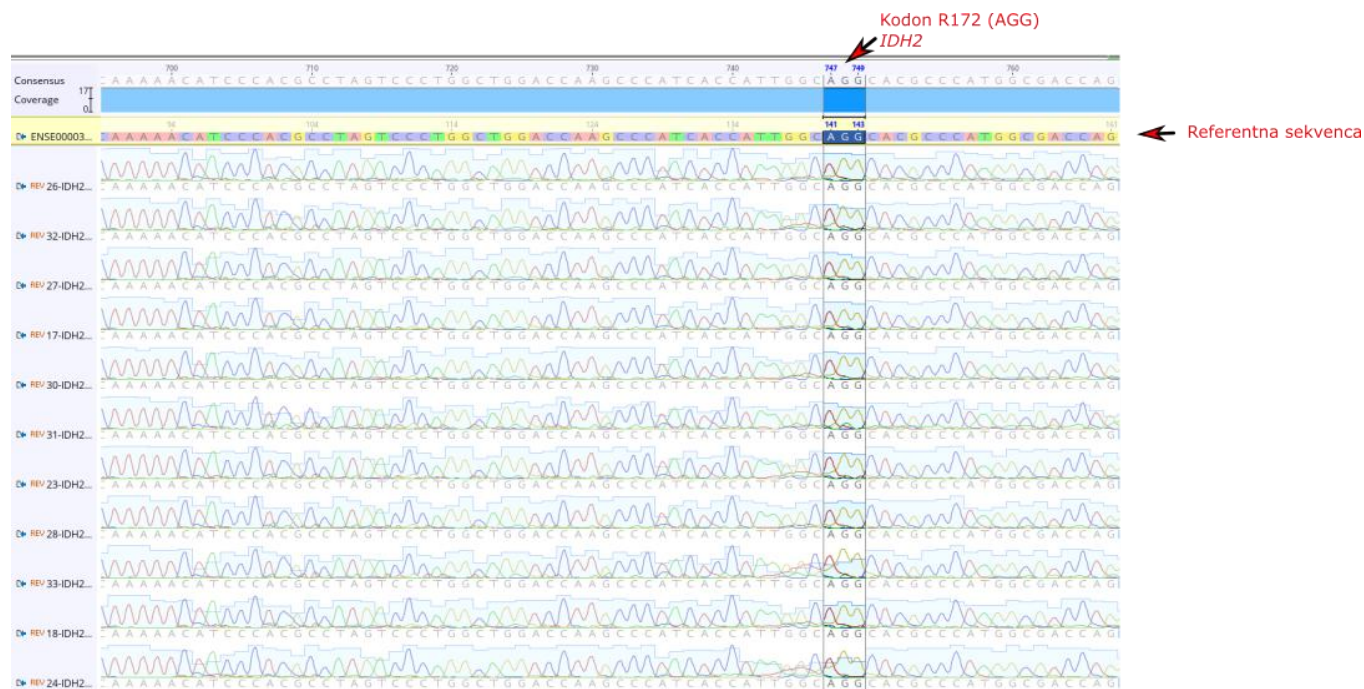
Poput *IDH1* PCR umnožavanja, *IDH2* amplifikacija u uzorcima genomske DNK poreklom iz FF izolata tumora bila je uspešna, što je dokazano metodom gel-elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Na snimcima 2% agaroznih gelova uočene su diskretne trake specifičnih *IDH2* PCR produkata dužine 471 bp, bez prisustva dimera oligonukleotida i nespecifičnih produkata (slika 43.).



Slika 43. Provera uspešnosti *IDH2* (egzon 4) PCR reakcija metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Redosled uzoraka: 1- Marker DNK (100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.), 2 – NTC negativna kontrola bez DNK matrice u PCR reakciji 3-16 DNK izolati iz FF uzoraka GBM pacijenata

4.4.3.2. Sekvenciranje *IDH2*

Kod FF uzoraka svih pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem uspešno je sekvenciran *IDH2*, sa udelom pouzdanih očitavanja pojedinačnih nukleotida od $75.18 \pm 12.95\%$. Upoređivanjem sa referentnom sekvencom *IDH2* gena (NM_002168.4), kod svih uzoraka potvrđeno je odsustvo mutacije u kodonu R140 i R172 (slike 44. i 45.).



Slika 44. Uporedni prikaz hromatograma analiziranih *IDH2* sekvenci i odsustvo tačkastih mutacija unutar kodona R172 *IDH2* u uzorcima GBM



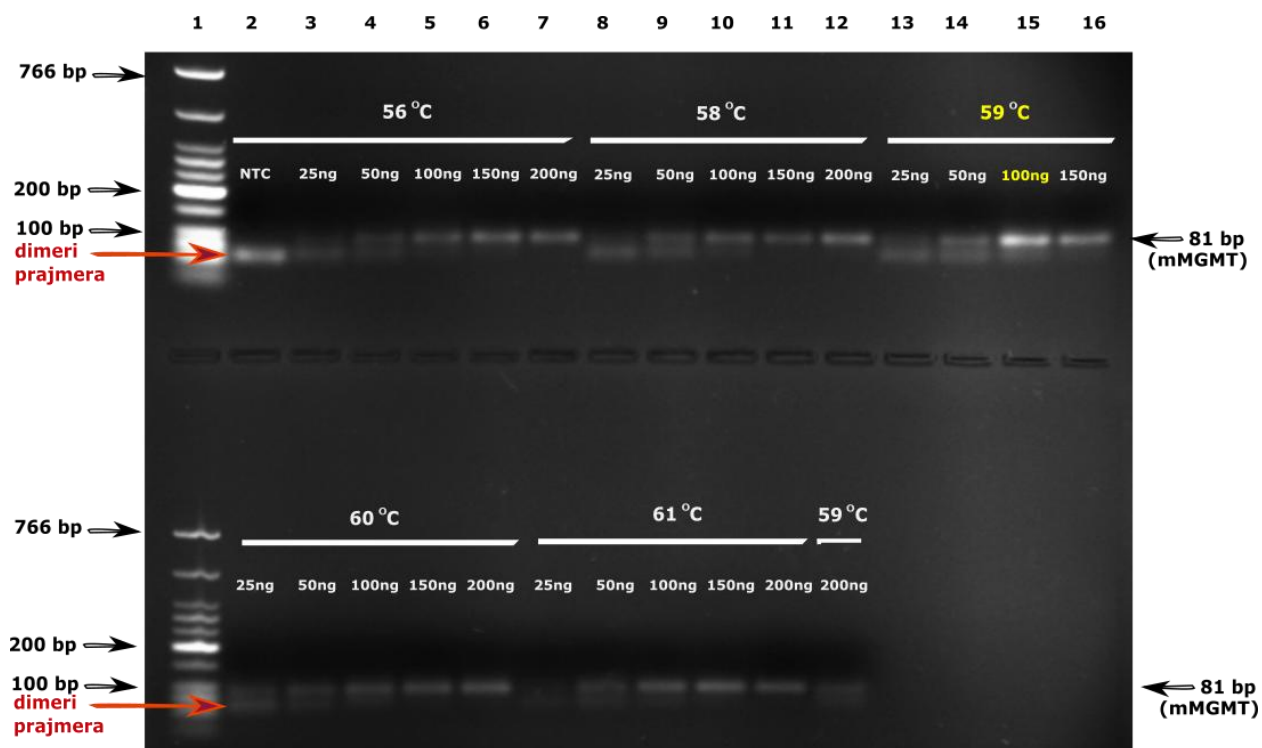
Slika 45. Hromatogrami analiziranih IDH2 sekvenci i odsustvo tačkastih mutacija unutar kodona R140 IDH2 u uzorcima GBM

4.4.4. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT*

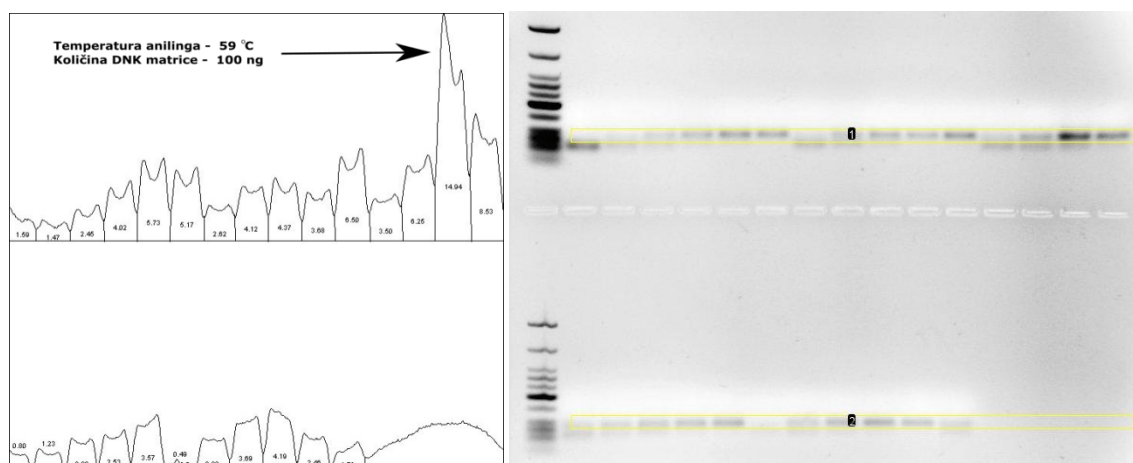
4.4.4.1. Evaluacija konvencionalnom MSP metodom u FF uzorcima

4.4.4.1.1. Optimizacija uslova *MGMT* PCR reakcije za MSP analizu FF uzoraka

U cilju definisanja optimalnih uslova mMGMT MSP reakcije izvršeno je variranje temperature anilinga i koncentracije bisulfitno konvertovane „template“ DNK. Kvalitet i prinos optimizacionih PCR reakcija proveravan je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu i softverskom obradom snimaka gelova ImageJ metodom. Najveći prinos metilovanog *MGMT* produkta detektovan je pri temperaturi anilinga od 59 °C i količini od 100 ng bisulfitno konvertovane DNK matrice (slike 46. i 47.).

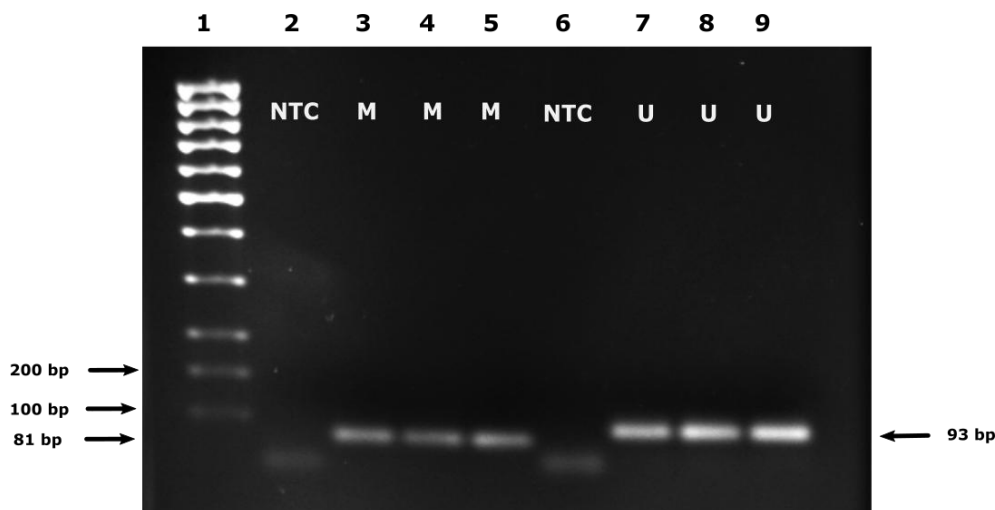


Slika 46. Optimizacija uslova mMGMT MSP reakcije za FF uzorke tumora variranjem temperature anilinga i količine DNK matrice (ng). 1 –DNK marker (Low Molecular Weight DNA ladder, New England BioLabs® inc.); NTC - negativna kontrola



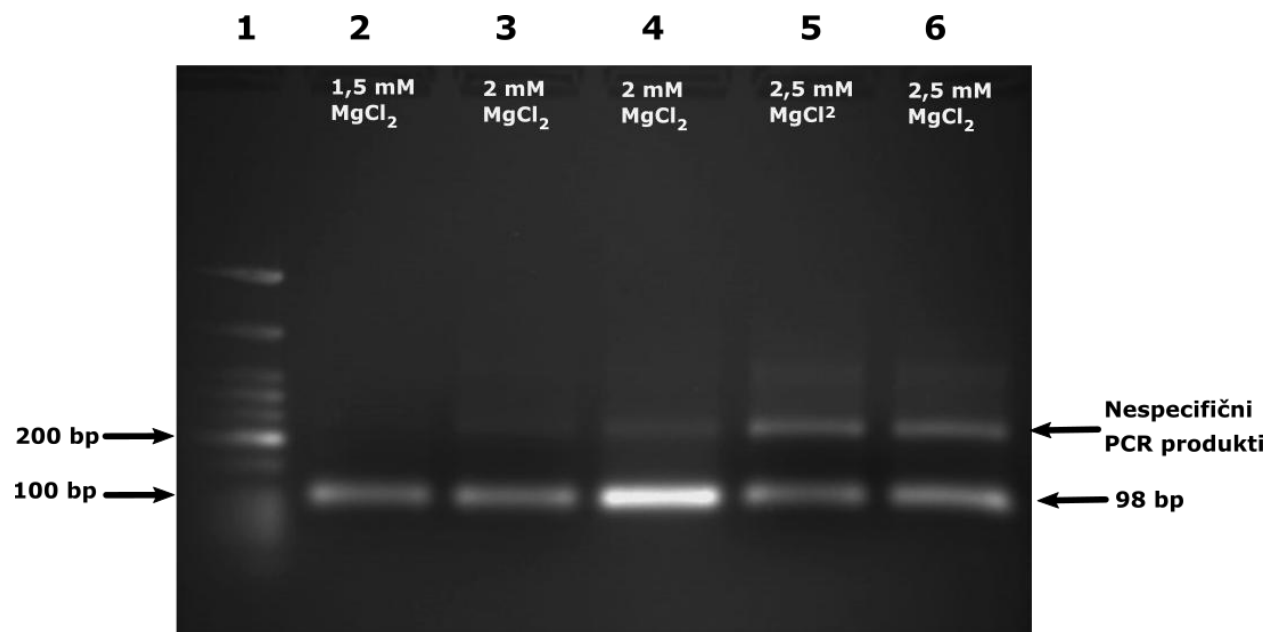
Slika 47. ImageJ analiza MGMT optimizacije uslova mMGMT MSP reakcije

Navedeni uslovi MSP reakcije pokazali su se optimalnim i pri probnoj amplifikaciji nemetilovanih *MGMT* produkata (U) udruženoj sa istovremenom amplifikacijom metilovane varijante promotornog regiona *MGMT* (M) u PCR aparatu. Metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu utvrđeno je prisustvo diskretnih traka dužine 81 bp (*mMGMT*) i 93bp (*uMGMT*) i odsustvo dimera oligonukleotida i amplifikacije nespecifičnih produkata (slika 48.).



Slika 48. Gel-elektroforetska analiza probe *MGMT* MSP reakcije pri temperaturi anilinga od 59 °C i količini DNK matrice od 100 ng. Redosled na gelu: 1- DNK marker 100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.); 2-NTC kontrola (set oligonukleotida za metilovanu formu *MGMT*); 3-5 – „Metilovani“ *MGMT* PCR produkti (uzorci GBM); NTC – kontrola (set oligonukleotida za nemetilovanu formu *MGMT*); 7-9 - 3-5 – „Nemetilovani“ *MGMT* PCR produkti (uzorci GBM)

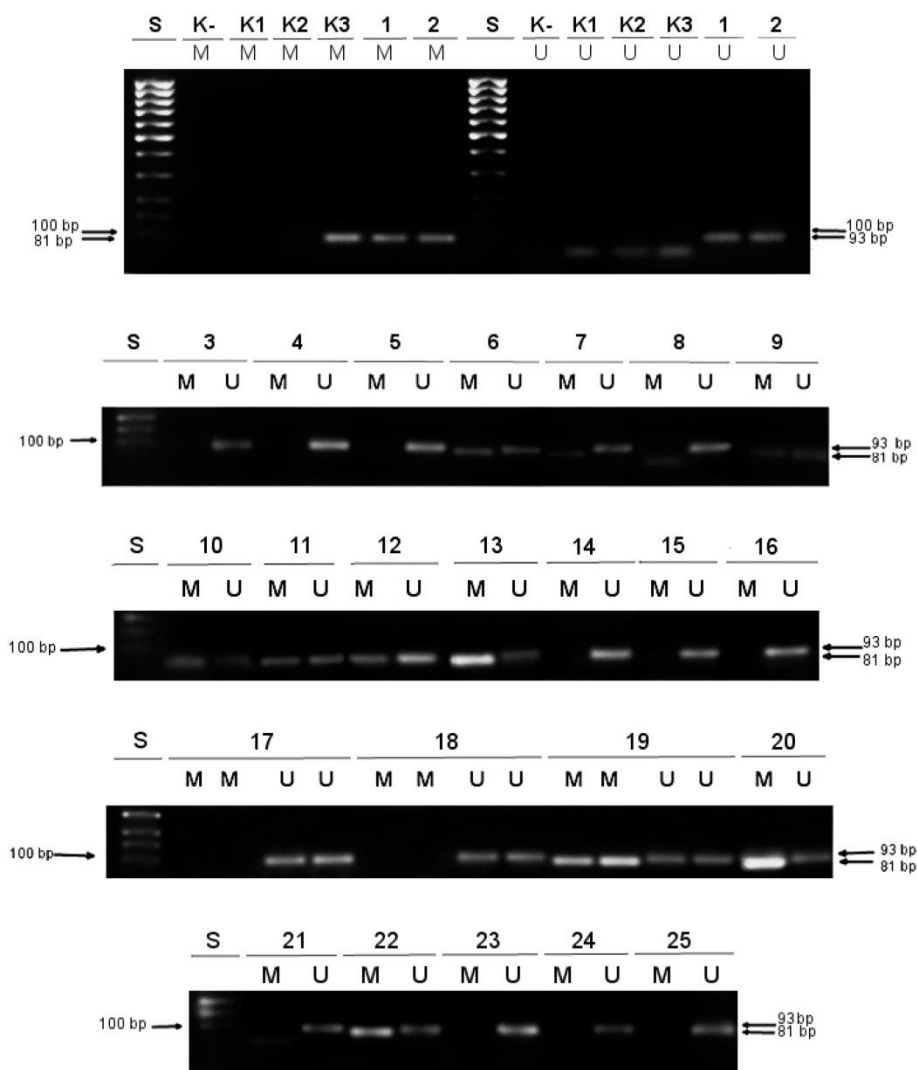
Nakon utvrđivanja validnosti *MGMT* MSP reakcija, vršena je provera uslova PCR reakcije za *ALU C4* sekvence *ALU* elementa koji je imao ulogu u normalizaciji *MGMT* MSP reakcije. Amplifikacija *ALU C4* sekvence bila je uspešna pri korišćenju istog PCR programa amplifikacije i sastava PCR smeše koji je primenjivan pri amplifikaciji *MGMT*. Prinos i kvalitet *ALU C4* PCR amplifikacije dodatno su proveravani variranjem koncentracije MgCl_2 u PCR smešama, pri čemu je kao optimalna koncentracija definisana 1,5 mM MgCl_2 (slika 50.).



Slika 50. Gel-elektroforetska vizuelizacija optimizacije uslova PCR amplifikacije *ALU C4* sekvence variranjem koncentracije MgCl_2 u PCR smešama. Redosled na gelu: 1 – DNK marker (Low Molecular Weight DNA ladder, New England BioLabs® inc.); 2-6 – PCR produkti amplifikacije *ALU C4* sekvence u uzorku GBM pri koncentracijama MgCl_2 u rasponu od 1,5mM – 2,5mM. Sa povećanjem koncentracije MgCl_2 pojačavan je intenzitet traka nespecifičnih PCR produkata na 2% agaroznom gelu.

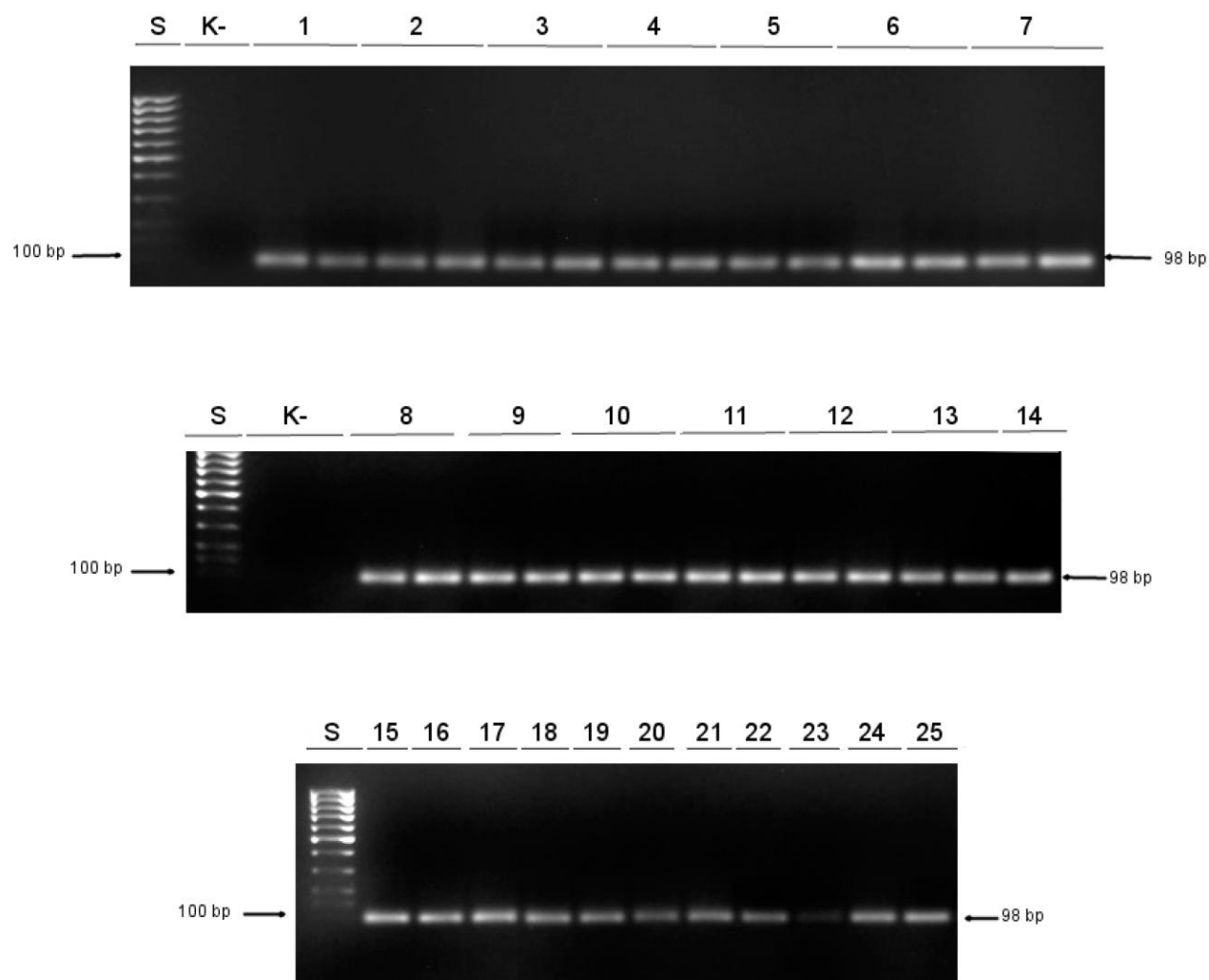
4.4.4.1.2. MSP analiza FF uzoraka – masovni PCR

Po uspostavljanju optimalnih parametara PCR reakcije za dve forme *MGMT* i *ALU C4* sekvencu, pristupljeno je serijskoj evaluaciji statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* MSP metodom i vizuelizaciji PCR reakcija na 2% agaroznom gelu. Na slici 51. predstavljen je uporedni prikaz vizuelizacije MSP reakcija na agaroznom gelu za 25 GBM pacijenata, uz odgovarajuće pozitivne i negativne kontrolne reakcije.



Slika 51. Evaluacija statusa metilacije *MGMT* promotora u FF uzorcima GBM metodom konvencionalne MSP. S – DNK standard 100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.); K-: NTC negativna kontrola; K1 – metilovana humana kontrolna DNK; K2 – nemetilovana i bisulfitno-konvertovana humana kontrolna DNK; K3 – metilovana i bisulfitno-konvertovana humana kontrolna DNK; M – Metilovani *MGMT* PCR produkti; U – nemetilovani PCR produkti; 1-25 – Bisulfitno konvertovana DNK izolovana iz FF uzoraka GBM

Uporedo sa serijskim *MGMT* MSP reakcijama, vršena je serijska PCR amplifikacija *ALU C4* sekvence u cilju prilagođene normalizacije MSP signala analogne metodama normalizacije predstavljenim u ranijim studijama (Degl'Innocenti i sar., 2019; Håvik i sar., 2012) (slika 52.).



Slika 52. Amplifikacija segmenta ALU elementa (ALU C4 sekvence) sa ciljem normalizacije MSP signala prilikom softverske obrade snimaka gelova u ImageJ programu. S –DNK standard 100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.); K- - NTC negativna kontrola; 1-25: bisulfitno-konvertovana DNK izolovana iz FF uzoraka GBM

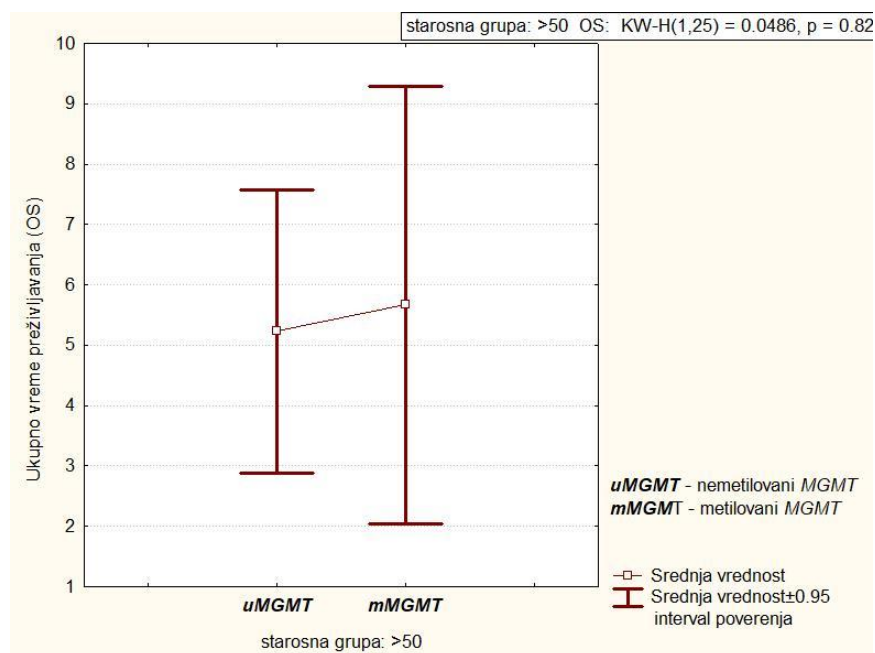
4.4.4.2. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* kao prognostičkog faktora GBM

4.4.4.2.1. Kvalitativni MSP

Kvalitativnom inspekcijom MSP rezultata metodom gel-elektroforeze na 2% agaroznom gelu determinisan je status metilacije promotornog regiona *MGMT* kod ukupno 37 uzoraka, uključujući tri kontrolna uzorka (hemangiopericitoma, meningioma i leukocita periferne krvi zdrave osobe). U skladu sa postupkom evaluacije predstavljenim od Esteller i saradnika, pozitivni status metilacije promotornog regiona *MGMT* dodeljivan je uzorcima za koje je evidentirano prisustvo metilovanog *MGMT* produkta na gelu. Ukupno 19 (55.88%) uzoraka GBM i visokogradusnih glioma ocenjeno je pozitivno na status hipermetilacije *MGMT*, dok je 15 uzoraka (44.12%) ocenjeno negativno. Kontrolni uzorci hemangiopericitoma, meningioma i leukocita periferne krvi ocenjeni su negativno na prisustvo metilacije u promotornom regionu *MGMT*.

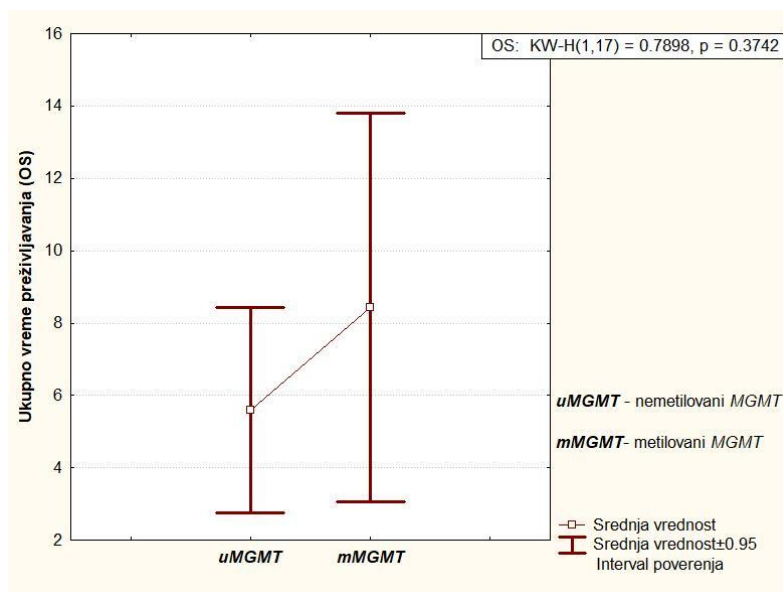
U cilju određivanja prognostičke vrednosti hipermetilacije *MGMT* promotora, izvršena je statistička obrada rezultata. Iz statističke analize isključeni su uzorci sa prethodno potvrđenim *IDH1-R132H* statusom mutacije i analizirani isključivo *IDH1*-wildtype visokogradusni gliomi. Kako >50 god. i <50 god. starosne grupe odlikuje značajna razlika u OS vremenu preživljavanja (kod „>50“ je 5.84 ± 4.96 meseci, a kod <50 je 13.5 ± 8.87 meseci), ispitivanje *MGMT* je vršeno odvojeno za ove grupe. Mali broj pacijenata unutar grupe mlađih od 50 godina ($N=9$) onemogućavao je izvođenje pouzdanih zaključaka o uticaju *MGMT* hipermetilacije. Starosna grupa >50 god. bila je sačinjena od 25 pacijenata što je činilo pouzdanijom za izvođenje zaključaka.

Unutar >50 god. starosne grupe, 12 (48%) pacijenata ocenjeno je pozitivno na prisustvo hipermetilacije *MGMT* dok je 13 njih (52%) ocenjeno negativno. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja za metilovanu grupu pacijenata iznosilo je 5.67 ± 5.71 meseci a 5.23 ± 3.88 meseci za nemetilovanu grupu pacijenata. Statistički značajna razlika između srednjih vrednosti ukupnog preživljavanja pacijenata (OS) između metilovane i nemetilovane grupe pacijenata nije pronađena ((KW-H(1,25) = 0.0486, $p = 0.82$) (slika 53.).



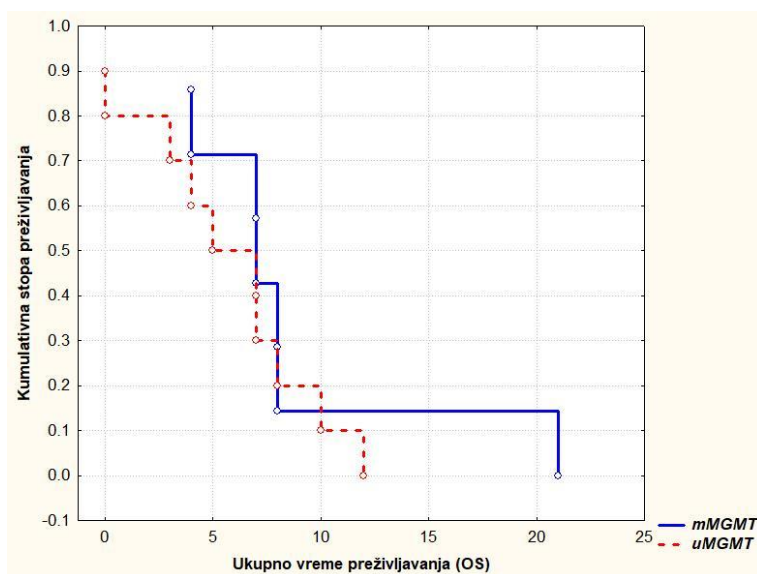
Slika 53. Srednje vreme preživljavanja metilovane i nemetilovane grupe pacijenata unutar grupe pacijenata starijih od 50 godina.

U nastavku statističke analize izvršena je dodatna redukcija grupe pacijenata izostavljanjem slučajeva koji su uključivali biopsiju kao jedini vid hirurške intervencije. Preostala grupa bila je sačinjena od 17 pacijenata od čega je kod 7 (41.18%) detektovano prisustvo hipermetilacije *MGMT* promotora. Povećanje homogenosti analizirane grupe uzimanjem u obzir stepen resekcije rezultovalo je neznatnim poboljšanjem značajnosti statističke razlike između srednjih vremena OS preživljavanja u zavisnosti od statusa hipermetilacije *MGMT* ((KW-H(1,17) = 0.7898 , p = 0.3742). Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosila je 8.43 ± 5.8 meseci dok je kod onih sa negativnim statusom iznosila 5.6 ± 3.98 meseci (slika 54.).



Slika 54. Srednje vreme preživljavanja metilovane i nemetilovane grupe pacijenata unutar grupe pacijenata starijih od 50 godina maksimalnim/parcijalnim obimom hirurške resekcije tumorske mase.

Analizom Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja nije utvrđena razlika između navedenih uMGMT i mMGMT grupa pacijenata (Log-Rank= -0.936606, $p = 0.34896$) (slika 55.).



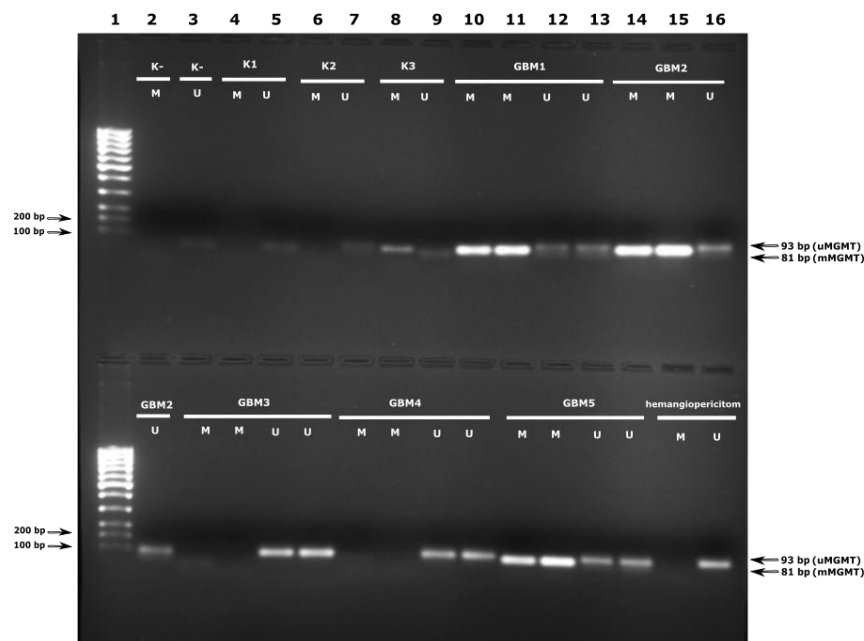
Slika 55. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona

4.4.4.2.2. Semi-kvantitativni MSP

Semi-kvantitativna evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* izvršena je najpre izvornom varijantom metode koju su predstavili Christians i saradnici, a zatim njenim modifikacijama koje su uključivale *ALU C4* normalizaciju M/U signala.

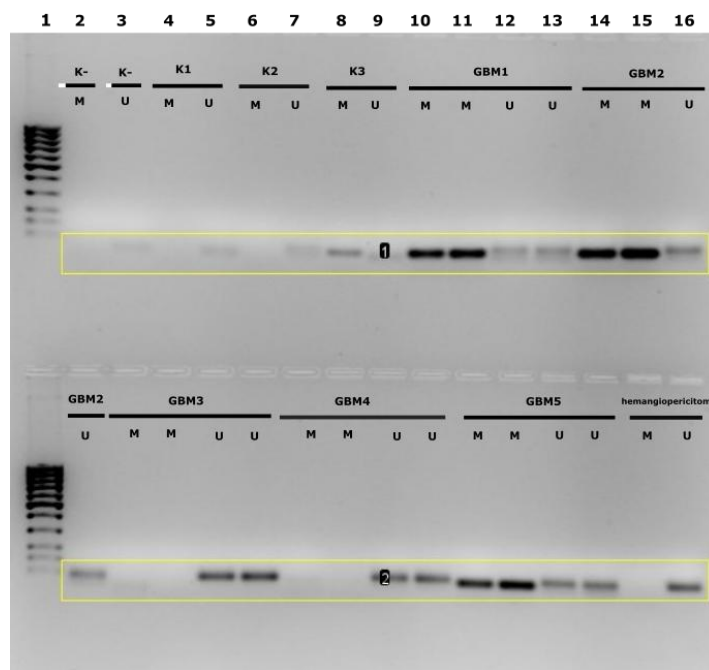
4.4.4.2.2.1. “M/U” kvantifikacija signala metilacije

Relativni odnos intenziteta fluorescencije M i U MSP produkata (M/U odnos) određivan je upotrebom “Analyze gels” i “CTCF” opcija, na osnovu čega je uzorcima dodeljivan jedan od tri statusa metilacije: nemetilovan (M/U=0), slabo metilovan (M/U<1) i jako metilovan (M/U>1). Korišćenjem obe ImageJ opcije postignuto je identično grupisanje pacijenata na osnovu stepena metilacije *MGMT* (slike 56. i 57.).

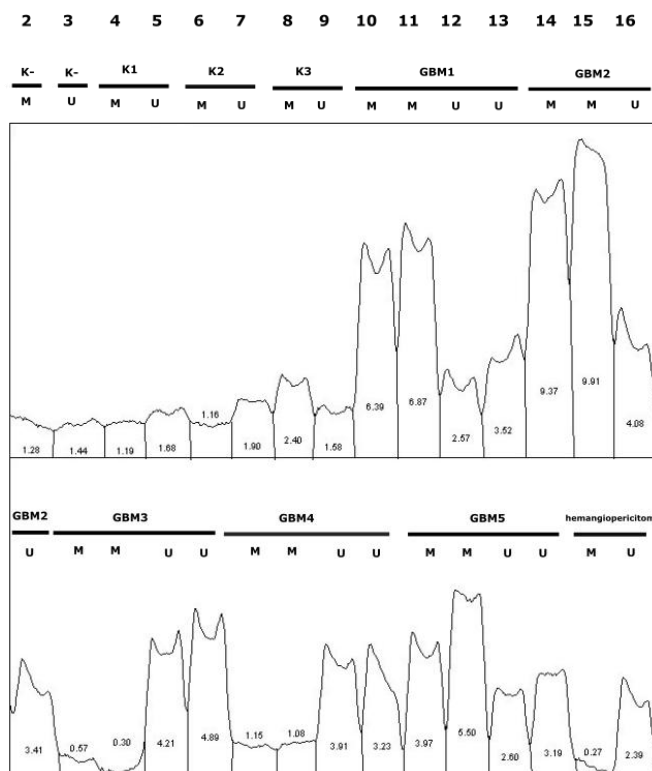


Slika 56. Primer snimka gel-elektroforeze namenjenog obradi u ImageJ programu. Ležište 1 - DNK standard 100bp DNA ladder, New England BioLabs® inc.); K-: NTC negativna kontrola; K1 – metilovana humana kontrolna DNK; K2 – nemetilovana i bisulfitno-konvertovana humana kontrolna DNK; K3 – metilovana i bisulfitno-konvertovana humana kontrolna DNK; GBM1-5 – uzorci glioblastoma; M – metilovani MSP produkt *MGMT* promotornog regiona; U - nemetilovani MSP produkt *MGMT* promotornog regiona

A)

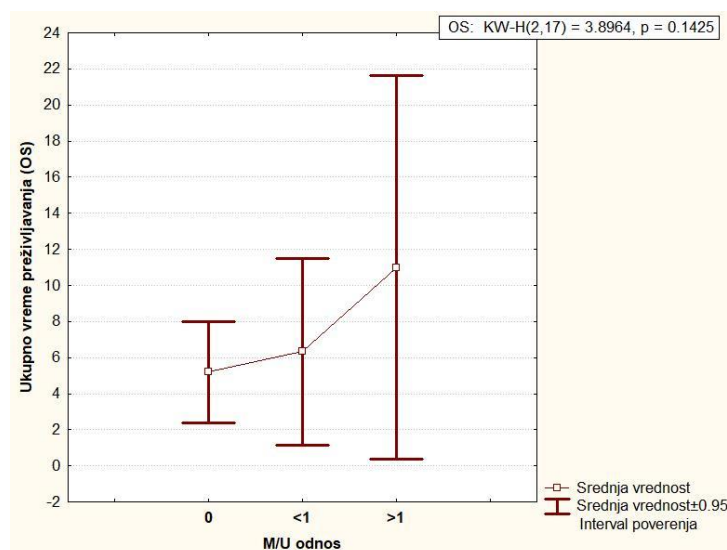


B)



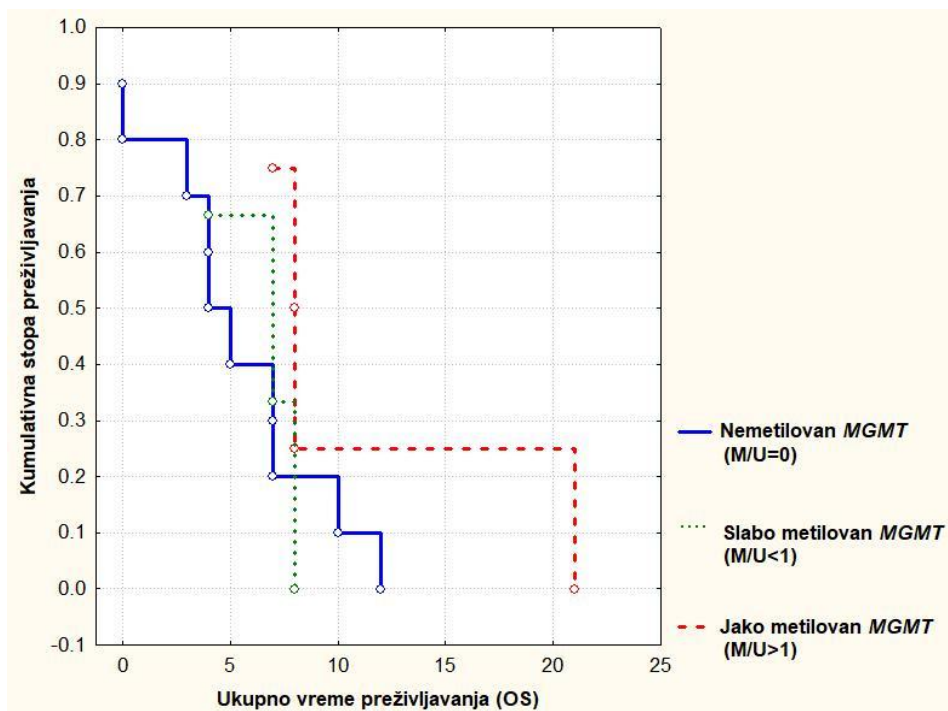
Slika 57. ImageJ obrada snimka gela. A) Negativ originalnog snimka gela sa označenim segmentima u kojima se vrši merenje intenziteta fluorescencije B) Grafik intenziteta fluorescencije pojedinačnih traka (izraženo u procentima).

U cilju istraživanja korelacije semi-kvantitativnih vrednosti nivoa metilacije *MGMT* promotornog regiona i vremena preživljavanja pacijenata, izvršena je statistička analiza nad istom grupom od 17 pacijenata koja je bila obuhvaćena prilikom kvalitativne MSP evaluacije. Najveća srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja (OS) registrovana je kod grupe od 4 pacijenta sa hipermetilovanim *MGMT* (>1) (11 ± 6.68 meseci), zatim grupe od tri pacijenta sa slabo metilovanim *MGMT* (6.33 ± 2.08 meseci) i na kraju grupe od 10 pacijenata sa nemetilovanim *MGMT* (5.2 ± 3.9 meseci) (slika 58.).



Slika 58. Srednje vreme preživljavanja kod GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od stepena metilacije promotornog regiona *MGMT*. Statistički značajna razlika u ukupnom vremenu preživljavanja pacijenata registrovana je jedino između nemetilovane i hipermetilovane grupe pacijenata (KW-H(1,14) = 3.4328, p = 0.06)

Statistički značajne razlike u ukupnom vremenu preživljavanja (OS) pacijenata nisu registrovane između slabo metilovane ($M/U < 1$) i nemetilovane ($M/U = 0$) grupe pacijenata (KW-H(1,13) = 0.4687, p = 0.4936), kao i jako metilovane ($M/U > 1$) i slabo metilovane ($M/U < 1$) grupe pacijenata (KW-H(1,7) = 1.6814, p = 0.1947). Međutim, upoređivanjem ukupnog vremena preživljavanja jako metilovane i nemetilovane grupe pacijenata Kruskal-Wallis testom, dobijena p vrednost bila je veoma bliska kritičnoj vrednosti praga značajnosti od 0.05 (p = 0.06). Sličan rezultat je dobijen upoređivanjem Kaplan-Meier-ovih kumulativnih kriva preživljavanja u zavisnosti od stepena metilacije (Log-Rank = -1.81593 p = 0.06938) (slika 59.).



Slika 59. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije MGMT promotornog regiona

4.4.4.2.2.2. “PMR” kvantifikacija signala metilacije

Prvi način PMR semi-kvantitativne evaluacije statusa metilacije podrazumevao je normalizaciju izmerene *mMGMT* CTFC vrednosti *ALU C4* signalom, a zatim njegovo upoređivanje sa referentnom metilovanom kontrolom u cilju dobijanja procentualne (PMR) vrednosti stepena metilacije.

Drugi način određivanja semikvantitativne PMR vrednosti uključivao je i vrednosti intenziteta fluorescencije nemetilovanog *uMGMT* produkta na gelu. M/U odnos intenziteta fluorescencije (CTCF vrednosti) normalizovan je *ALU C4* signalom, a zatim upoređivan sa *ALU C4* normalizovanim M/U odnosom u referentnoj metilovanoj kontroli.

Obe ove metode rezultovale su izuzetno bliskim PMR vrednostima i identičnom semi-kvantitativnom klasifikacijom pacijenata. Visoka vrednost međuklasnog korelacionog koeficijenta (ICC^z) između PMR vrednosti dobijenih na oba načina potvrđuje sličnost dobijenih rezultata (tabela 16).

^z Intraclass correlation coefficient, eng.

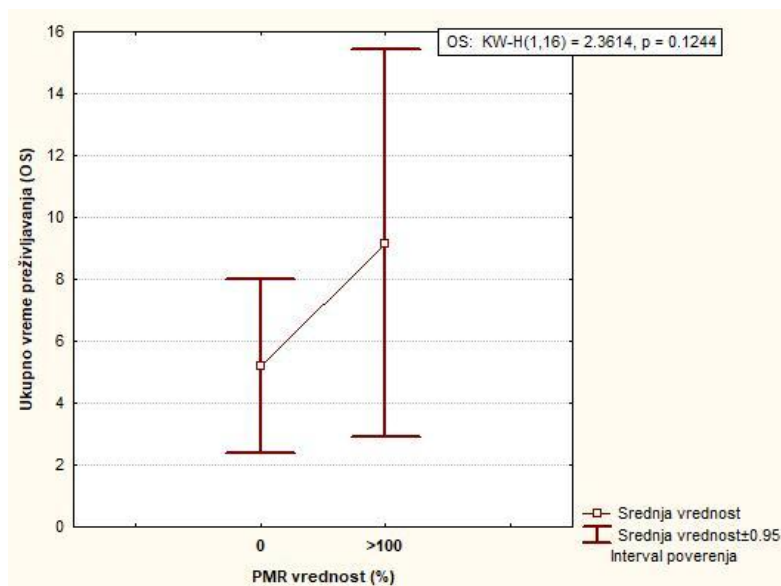
Tabela 16. Korelacija podataka o nivou metilacije *MGMT* promotora dobijenih putem M/U i dva PMR pristupa

	ICC	95% CI	p
M/U i PMR1	0,763	0,532-0,888	<0,001
M/U i PMR2	0,493	0,139-0,739	0,005
PMR1 i PMR2	0,844	0,678-0,928	<0,001

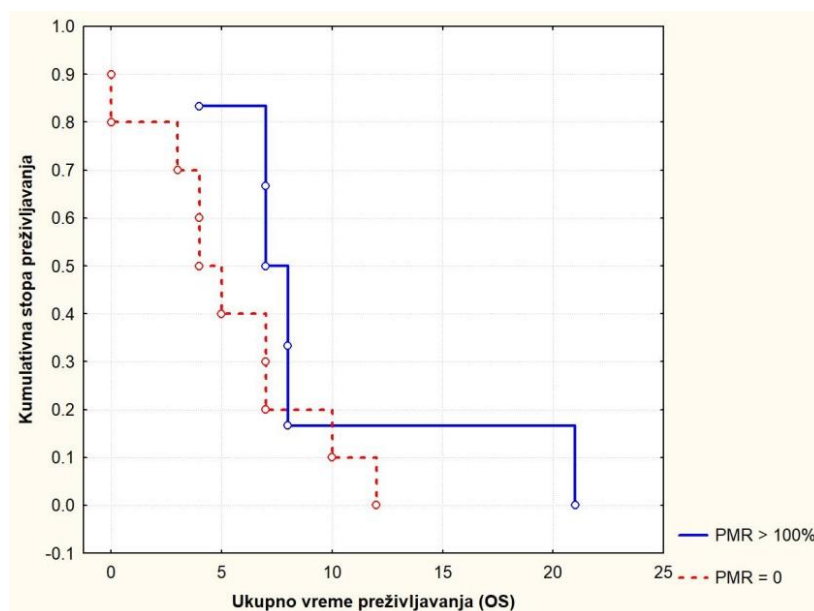
Na osnovu PMR vrednosti, uzorci su svrstavani u jednu od tri grupe: nemetilovanu (PMR = 0), slabo metilovanu (PMR<100%) i jako metilovanu (PMR>100%). Na osnovu PMR vrednosti, spomenuta grupa od 17 pacijenata podeljena je na sledeće podgrupe:

- Nemetilovanu (PMR = 0) grupu (N=10) čija je srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja 5.2 ± 3.9 meseci
- Slabo metilovanu (PMR<100%) grupu kojoj je pripao jedan pacijent (OS=8 meseci)
- Jako metilovanu (PMR > 100%) (N=6) podgrupu čija je srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja (9.17 ± 5.98) meseci

Upoređivanjem vremena preživljavanja nemetilovane i jako metilovane podgrupe i odgovarajućih Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja Kruskal-Wallis i Log-Rank testom, dobijene p vrednosti bile su blizu kritičnoj vrednosti praga značajnosti od 0.05 (KW- $H(1,16) = 2.3614$, $p = 0.1244$) i (Log-Rank=-1.43286 $p = 0.15190$) (slike 60. i 61.).



Slika 60. Srednje vreme preživljavanja kod GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od PMR stepena metilacije promotornog regiona MGM



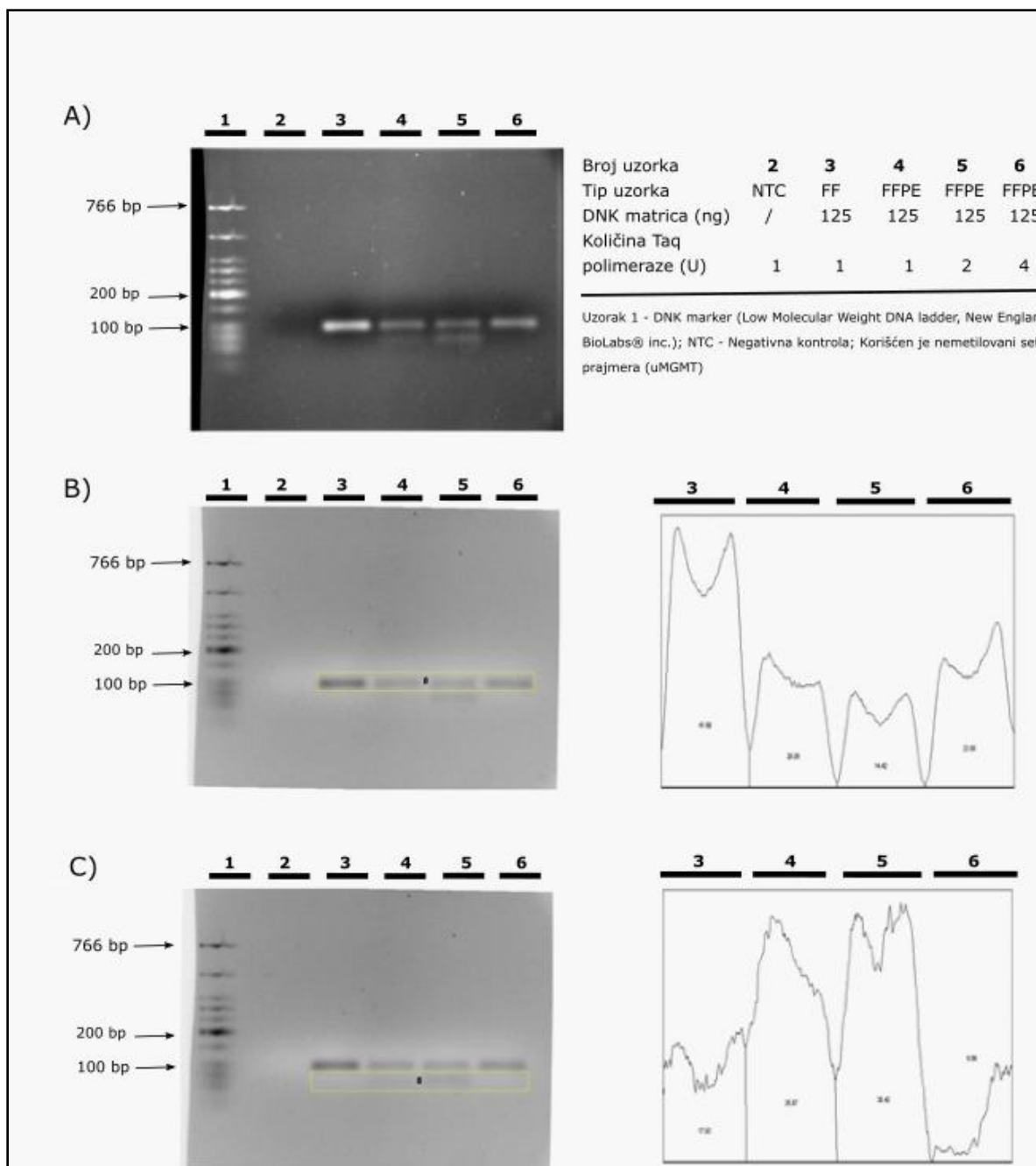
Slika 61. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od PMR semi-kvantitativnog statusa metilacije MGMT promotornog regiona

4.4.4.3. MSP analiza FFPE uzoraka

Nakon MSP analize statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* u FF sveže zamrznutim uzorcima tumora, pristupljeno je analizi parafinskih FFPE uzoraka visokogradusnih glioma. Analizirano je ukupno 27 FFPE uzoraka, od kojih je za 23 postojao odgovarajući parnjak sveže zamrznutog FF uzorka. Preostala četiri FFPE uzorka poticala su od tri GBM pacijenta za koje nije postojao FF uzorak, pri čemu je jedan od njih predstavljao recidiv GBM.

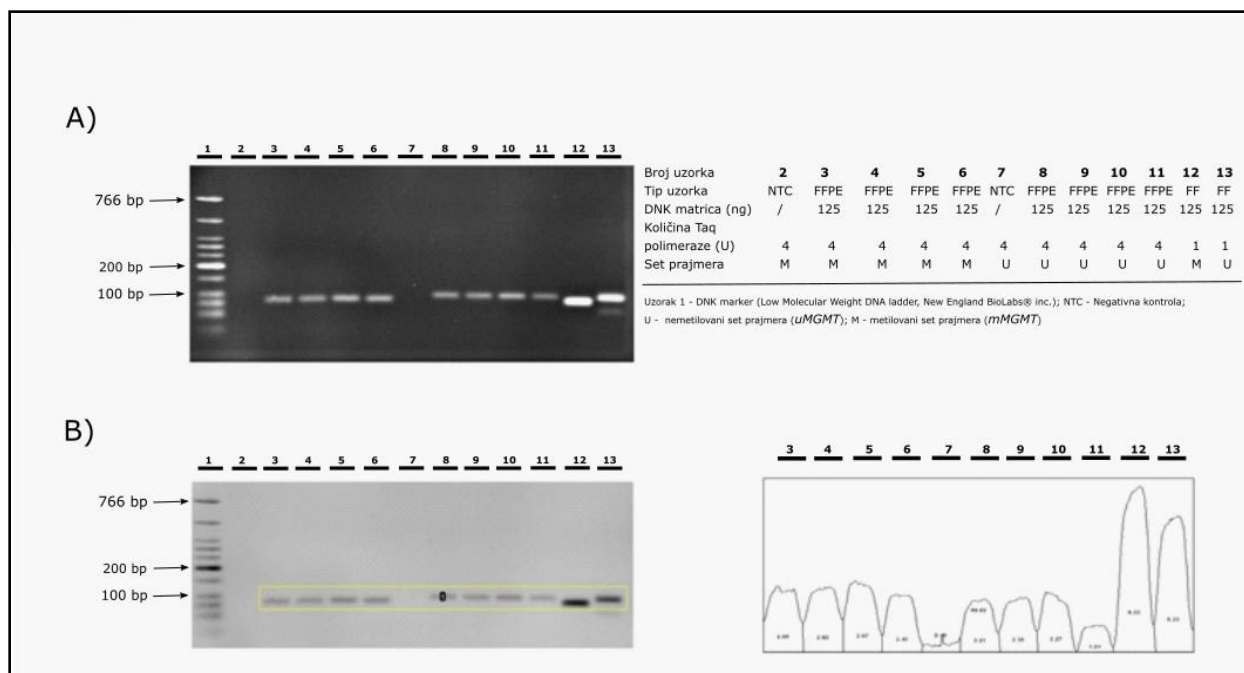
4.4.4.3.1. Optimizacija uslova *MGMT* MSP reakcije

Kako se kvalitet FFPE DNK izolata pokazao znatno nižim u odnosu na FF DNK izolate, bilo je neophodno dodatno optimizovati sastav PCR reakcionih smeša. U skladu s tim, izvršeno je variranje koncentracije DNK matrice i količine enzima Taq polimeraze. Proverom uspešnosti reakcija optimizacije metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu i obradom dobijenih snimaka gelova u ImageJ programu, definisana je optimalna količina DNK matrice od 125 ng i enzima Taq polimeraze (4U HotStarTaq[®]). Navedene koncentracije komponenti PCR smeše rezultovale su povećanjem intenziteta *MGMT* produkata uz istovremeno gubljenje dimera oligonukleotida na agaroznom gelu (slika 62.).



Slika 62. Rezultati MSP optimizacije u cilju definisanja optimalne koncentracije enzima Taq polimeraze (HotStarTaq®) **A)** Originalni izgled snimka 2% agaroznog gela sa pratećom legendom. Na njemu su predstavljene nemetilovani *MGMT* produkti umnoženi MSP metodom pri korišćenju FFPE DNK izolata kao DNK matrice i 1U, 2U i 4U koncentracije HotStarTaq® enzima. Kao kontrolna reakcija izvršena je *uMGMT* amplifikacija pri korišćenju FF DNK izolata kao DNK matrice (uzorak 3) **B)** Snimak gela obrađen pomoću ImageJ programa u cilju evaluacije stepena fluorescencije *uMGMT* MSP produkata na gelu, predstavljenih na grafikonu sa desne strane slike **C)** ImageJ analiza intenziteta fluorescencije prisutnih dimera oligonukleotida na gelu

Uspešnost optimizacije sastava PCR smeše pri korišćenju FFPE DNK izolata kao DNK matrice finalno je proverena amplifikacijom *uMGMT* i *mMGMT* produkata i poređenjem sa dobijenom vrednošću M/U odnosa pri korišćenju odgovarajućeg FF DNK izolata kao DNK matrice (slika 63.).

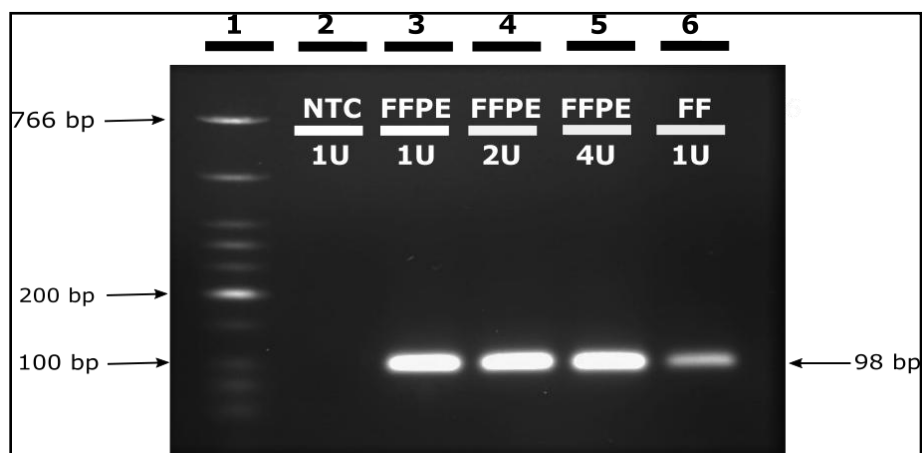


Slika 63. Upoređivanje ImageJ evaluacije stepena *MGMT* metilacije u FF i FFPE uzoraka. **A)** Snimak agaroznog gela na kome se uočavaju *mMGMT* i *uMGMT* MSP produkti i odgovarajuća legenda sa desne strane. Uzorci 3,4,5,6 – metilovani *MGMT* MSP produkti (FFPE GBM); Uzorci 8,9,10,11 – nemetilovani *MGMT* MSP produkti (FFPE GBM) Uzorci 12 i 13 – metilovani i nemetilovani *MGMT* MSP produkti referentnog FF uzorka **B)** Grafički prikaz intenziteta fluorescencije *mMGMT* i *uMGMT* MSP traka na gelu

Iako je kvalitet signala bio zadovoljavajući, intenzitet fluorescencije metilovanih i nemetilovanih FFPE MSP produkata bio je gotovo tri puta niži u poređenju sa odgovarajućim MSP produktima. Uprkos takvoj razlici u apsolutnoj vrednosti intenziteta fluorescencije, rezultat ImageJ semi-kvantitativne analize probnog FFPE uzorka poklapao se sa analizom odgovarajućeg FF uzorka, smeštajući ga u istu grupu (jako metilovanu $M/U > 1$). Razlika između dobijenih vrednosti M/U odnosa iznosila je 8.47% (FFPE M/U odnos = 1.28; FF M/U odnos = 1.18).

Nakon optimizacije sastava PCR smeše pri amplifikaciji *uMGMT* i *mMGMT* MSP produkata, izvršena je provera uspešnosti amplifikacije *ALU C4* sekvence pri korišćenju 1U, 2U i 4U koncentracija HotStarTaq® polimeraze i 125ng FFPE DNK izolata kao DNK matrice. U poređenju sa *ALU C4* amplifikacijom u odgovarajućem FF uzorku, sve koncentracije

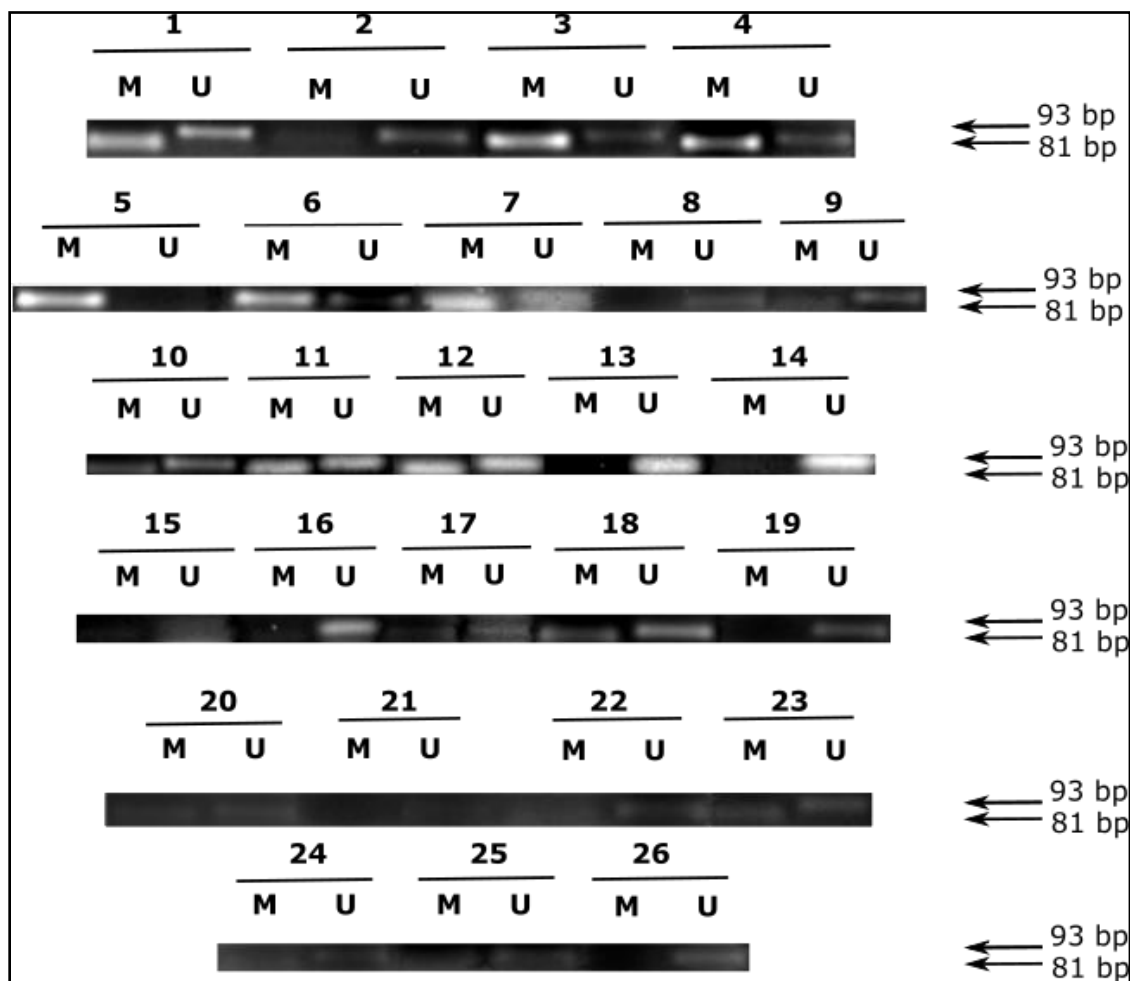
HotStarTaq[®] polimeraze rezultovale su podjednako zadovoljavajućim kvalitetom *Alu C4* MSP amplifikacije, zbog čega je za nastavak analize izabrana koncentracija enzima od 1U (slika 64.).



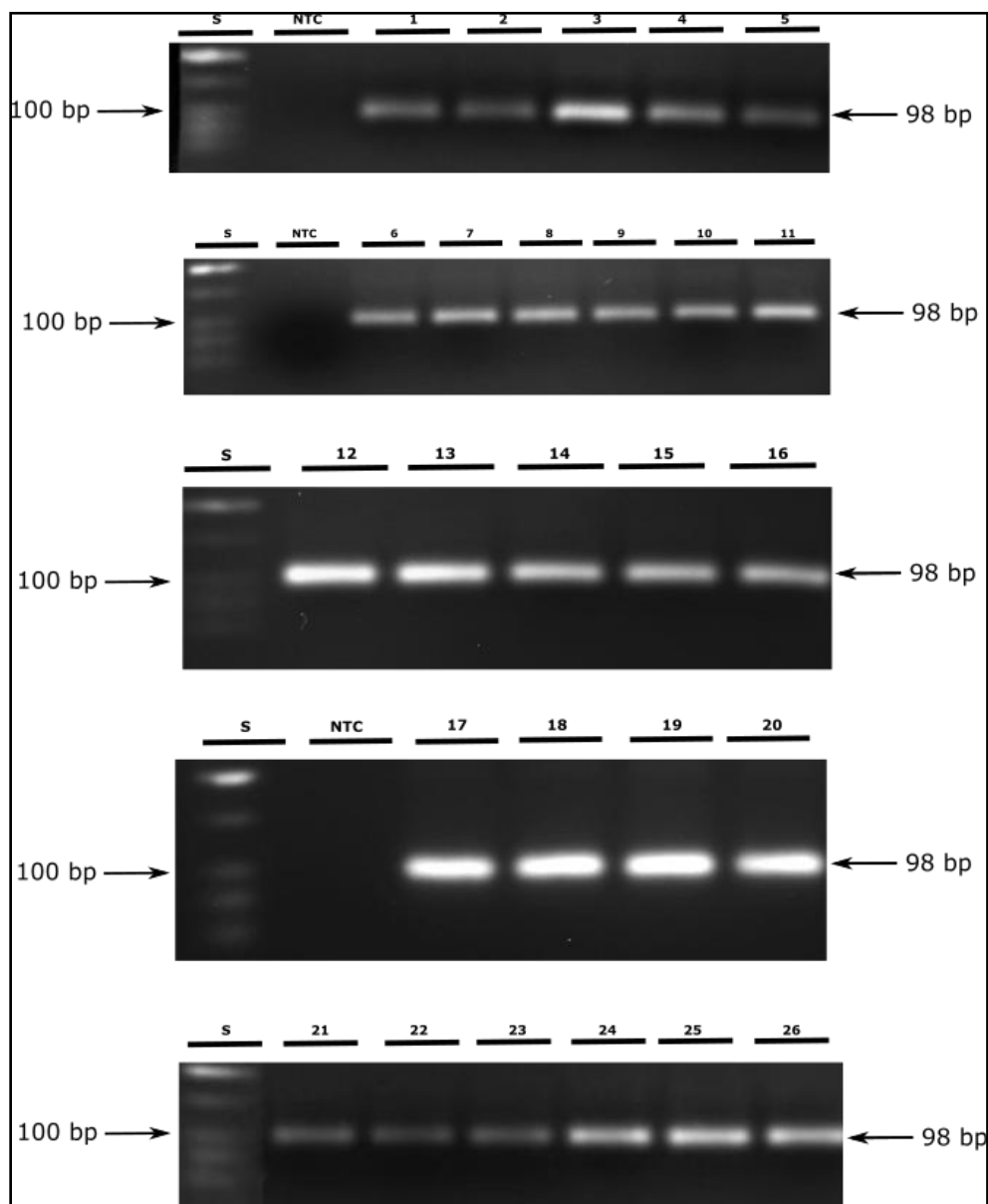
Slika 64. Amplifikacija segmenta ALU elementa (ALU C4 sekvence) sa ciljem normalizacije MSP signala prilikom softverske obrade snimaka gelova u ImageJ program. 1 – DNK standard DNK marker (Low Molecular Weight DNA ladder, New England BioLabs[®] inc.); 2 - NTC negativna kontrola; 3-5: bisulfitno-konvertovana DNK izolovana iz FFPE uzoraka GBM sa 1-4U koncentracijama HotStarTaq[®] polimeraz; 6 – ALU C4 MSP produkt referentnog FF uzorka

4.4.4.3.2. MSP analiza – masovni PCR

Po završetku optimizacionih reakcija pristupljeno je serijskoj MSP analizi statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* u FFPE uzorcima. Od ukupno 27 uzoraka, za 26 njih (23 pacijenta) je bilo izvodljivo izvršiti kvalitativnu i semi-kvantitativnu evaluaciju statusa metilacije *MGMT* (slika 65.).



Slika 65. Evaluacija statusa metilacije *MGMT* promotora u FFPE uzorcima GBM metodom konvencionalne MSP.
M – Metilovani *MGMT* PCR produkti; U – nemetilovani PCR produkti; 1-26 – Bisulfitno konvertovana DNK izolovana iz FFPE uzoraka GBM

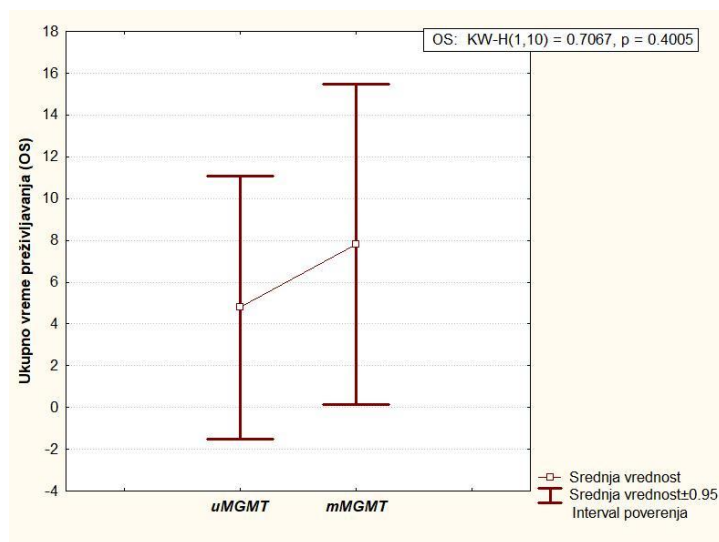


Slika 66. Amplifikacija segmenta ALU elementa (ALU C4 sekvence) sa ciljem normalizacije MSP signala prilikom softverske obrade snimaka gelova u ImageJ programu. S – (Low Molecular Weight DNA ladder, New England BioLabs® inc.); K- - NTC negativna kontrola; 1-26: bisulfitno-konvertovana DNK izolovana iz FF uzoraka GBM

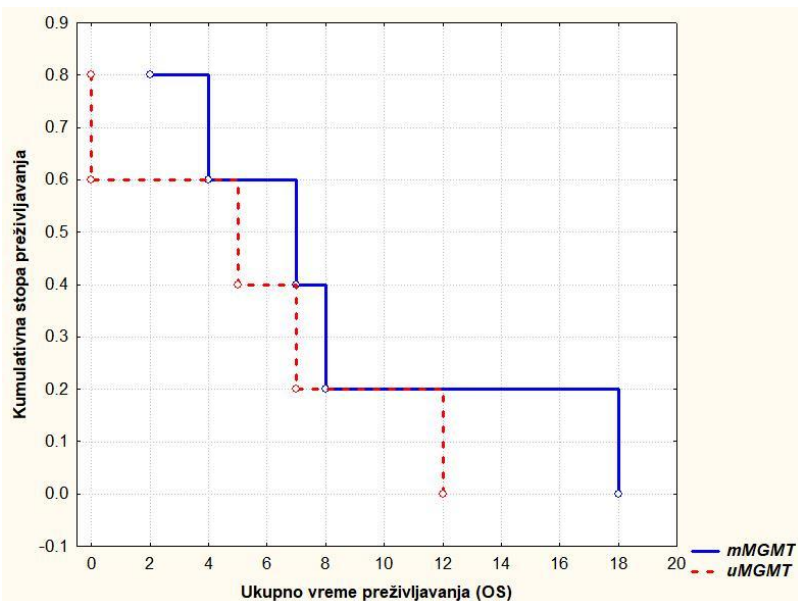
4.4.4.3.3. Kvalitativna MSP analiza

Kvalitativno određivanje statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona vršeno je detekcijom prisustva odgovarajućeg PCR produkta na 2% agaroznom gelu. Ukupno 15 uzoraka je ocenjeno pozitivno na prisustvo *mMGMT* produkta, dok je 11 uzoraka ocenjeno negativno. Ovom analizom bili su obuhvaćeni FFPE uzorci dodatna dva GBM pacijenta za koje nije postojao odgovarajući FF uzorak.

Rezultati kvalitativne *MGMT* MSP evaluacije FFPE uzoraka u potpunosti su se poklopili sa *MGMT* MSP analizom 20 FF uzoraka. Od toga je 10 uzoraka poticalo od pacijenata starijih od 50 godina, sa dijagnostikovanim GBM i izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom. Unutar te grupe, srednje vreme preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosilo je 7.8 ± 6.18 meseci, dok je kod pacijenata sa negativnim statusom metilacije *MGMT* iznosilo 4.8 ± 5.0 meseci. Međutim, korelacija vremena preživljavanja u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona nije pronađena ($KW-H(1,19) = 0.7067$, $p = 0.4005$), što je potvrđeno i analizom kumulativnih kriva preživljavanja (Log-Rank = -0.789215 , $p = .42999$). (slike 67. i 68.).



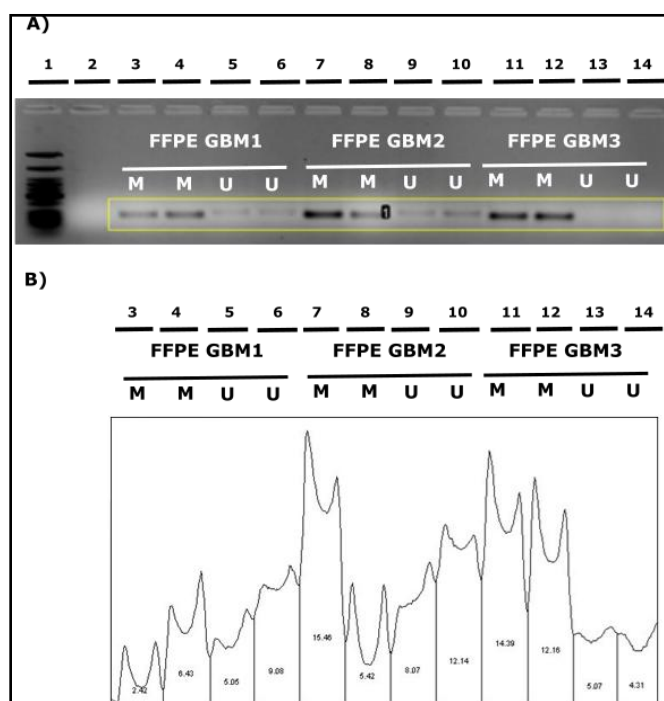
Slika 67. Srednje vreme preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* u FFPE uzorcima



Slika 68. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od prisustva metilacije MGMT promotornog regiona u FFPE uzorcima GBM

4.4.4.3.4. Semi-kvantitativna MSP analiza

Semi-kvantitativna evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* u FFPE uzorcima izvršena je pomoću ImageJ programa i ranije spomenutih pristupa kvantifikacije signala metilacije (M/U i CTCF) (slika 69.).

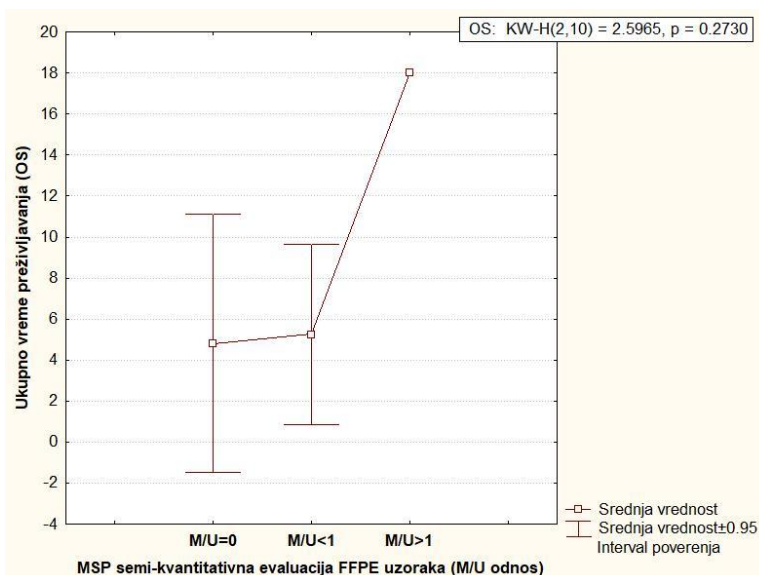


Slika 69. ImageJ obrada snimka gela nakon MSP FFPE uzoraka. A) Negativ originalnog snimka gela sa označenim segmentom u kome je izvršeno merenje intenziteta fluorescencije B) Grafik intenziteta fluorescencije pojedinačnih traka (izraženo u procentima).

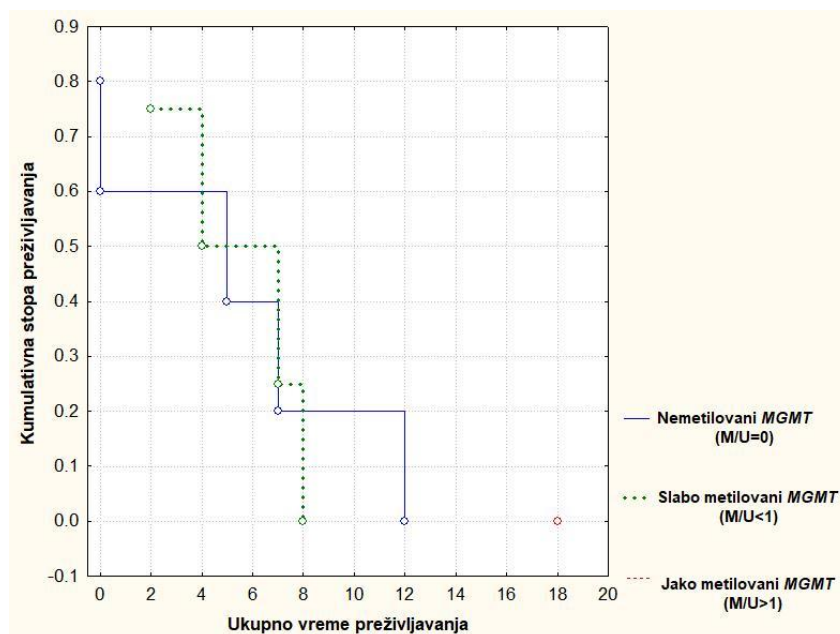
Za razliku od kvalitativne evaluacije statusa metilacije *MGMT*, semi-kvantitativna evaluacija FFPE uzoraka je rezultovala drugačijim grupisanjem uzoraka u zavisnosti od stepena metilacije u odnosu na FF uzorke. Izračunavanje CTCF vrednosti fluorescencije traka na 2% agaroznim gelovima pomoću ImageJ programa rezultovalo je sledećom raspodelom pacijenata u semi-kvantitativne grupe: 10 nemetilovanih, 6 slabo metilovanih i 4 jako metilovanih. Pritom je 8 uzoraka (40%) drugačije okarakterisano u poređenju sa rezultatima dobijenim analizom FF uzoraka. Stepen podudaranja rezultata dobijenih ImageJ analizom FF i FFPE uzoraka CTCF pristupom bio je veoma nizak (međuklasni korelacioni koeficijent $ICC = 0.1837$, 95% CI - 0.2832-0.5801).

Vrednosti M/U odnosa intenziteta fluorescencije u FFPE uzorcima dobijene Analize gels opcijom u okviru ImageJ analize razlikovale su se u proseku 0.32 ± 0.63 u odnosu na CTCF vrednosti. Korišćenje M/U pristupa rezultovalo je znatno većom međusobnom korelacijom dobijenih rezultata sa rezultatima FF *MGMT* analize (ICC = 0.5169, 95% CI 0.06412-0.7932). Međutim, ovaj pristup je takođe proizveo drugačiju raspodelu pacijenata u zavisnosti od stepena metilacije *MGMT* (10 nemetilovanih, 8 slabo metilovanih i 2 jako metilovana).

U okviru te grupe, 10 pacijenata je pripadalo grupi starijoj od 50 godina uz izvedenu totalnu ili parcijalnu resekciju tumorske mase. Od toga je 5 pacijenata okarakterisano negativno na prisustvo metilacije *MGMT* promotora, a 4 ocenjeno kao slabo metilovano. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja nemetilovane i slabo metilovane grupe pacijenata bila je približno ista, 4.8 ± 5 odnosno 5.25 ± 2.75 meseci, a statistički značajna razlika između njih nije pronađena (KW-H(1,9) = 0.1373, p = 0.7110). Takođe, upoređivanjem kumulativnih kriva preživljavanja ove dve grupe dobijen je sličan rezultat (Log-Rank = .1125388 p = .91040). Preostali FFPE uzorak bio je ocenjen kao jako metilovan (M/U>1), i izdvajao se po OS vremenu preživljavanja od ostalih semi-kvantitativnih grupa (OS = 18 meseci) (slike 70. i 71.).



Slika 70. Srednje vreme preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* u FFPE uzorcima.



Slika 71. Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja u zavisnosti od semi-kvantitativnog stepena metilacije MGMT promotornog regiona u FFPE uzorcima GBM

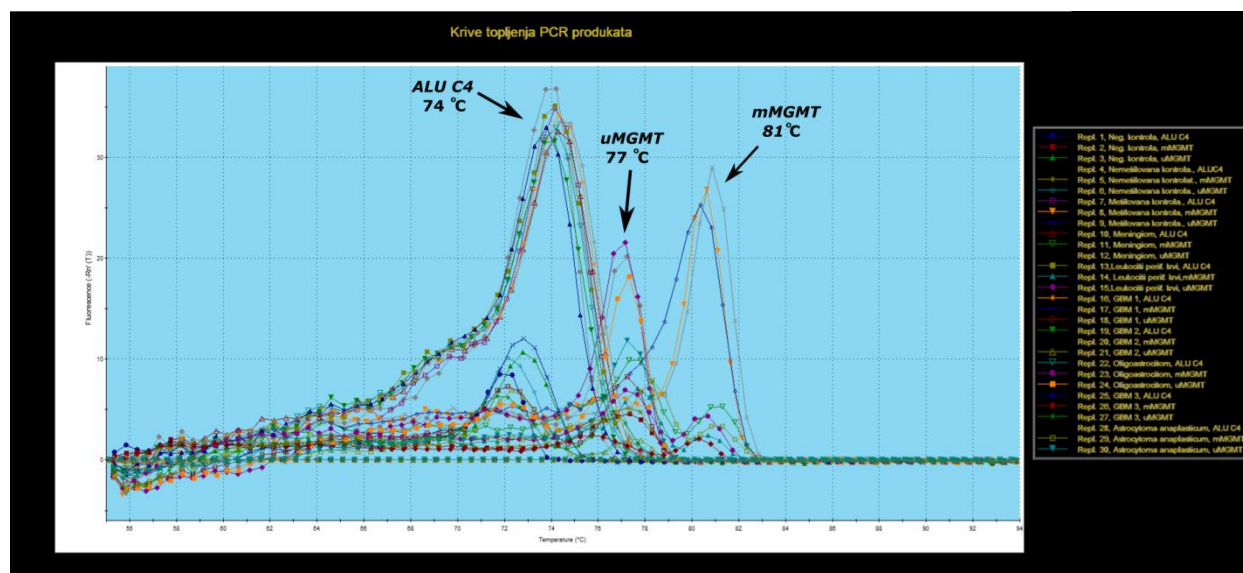
Metode normalizacije M/U signala intenzitetom *ALU C4* MSP produkta pokazale su izuzetno nizak stepen podudaranja sa komplementarnim rezultatima dobijenim analizom FF uzoraka. Semi-kvantitativne grupe formirane na osnovu dobijenih PMR vrednosti nisu se međusobno statistički značajno razlikovale u ukupnom vremenu preživljavanja.

4.4.4.4. Real-time MSP (qMSP) evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT*

Evaluacija statusa promotornog regiona *MGMT* izvršena je za ukupno 40 FF uzoraka visokogradusnih glioma, kao i tri kontrolna uzorka (meningioma, hemangiopericitoma i leukocita periferne krvi). Generisane C_t vrednosti analizirane su semikvantitativnom (ΔC_t) i kvanitativnom (PMR) metodom radi upoređivanja dobijenih rezultata.

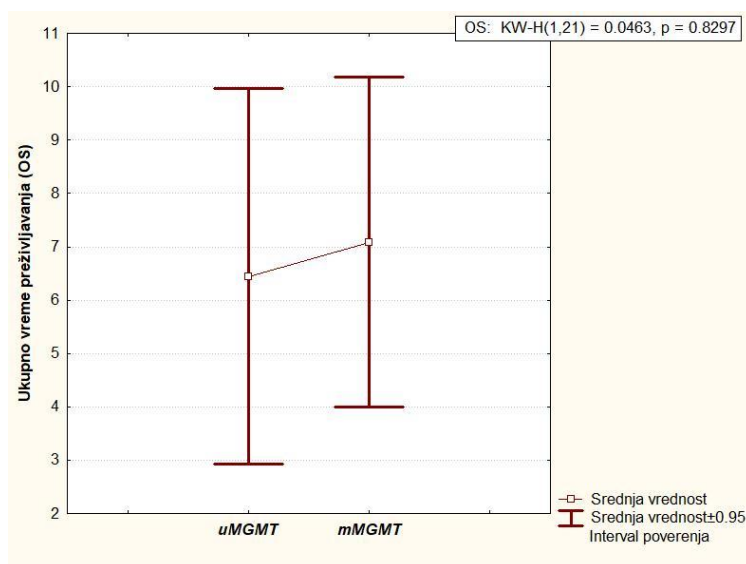
4.4.4.4.1. Semikvantitativni qMSP – ΔC_t metoda

U skladu sa protokolom semi-kvantitativne qMSP evaluacije statusa promotornog regiona *MGMT* koji su uspostavili Yoshioka i saradnici, prvi korak predstavljala je detekcija uzoraka sa prisutnim pikom na temperaturi od 81 °C na grafiku krive topljenja. Prisustvo takvog pika utvrđeno je za 24 FF uzorka visokogradusnih glioma, kao i uzorke meningioma i hemangiopericitoma (slika 72.).

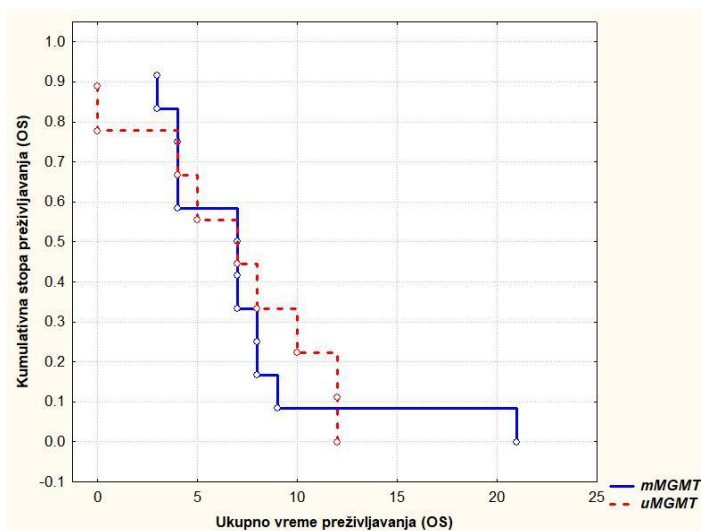


Slika 72. Krive topljenja *ALU C4*, *uMGMT* i *mMGMT* qPCR produkata

Na osnovu prisustva odgovarajućeg pika, 12 uzoraka je označeno kao metilovano (OS=7.08±4.87 meseci) a 9 kao nemetilovano (OS=6.44±4.58 meseci), u okviru grupe pacijenata starijih od 50 godina sa izvedenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom. Ukupna vremena preživljavanja ove dve grupe pacijenata nisu se statistički značajno razlikovala (KW-H(1,21) = 0.0463, p = 0.8297) (Log-Rank= .2877708 p = .77352=) (slike 73. i 74.).

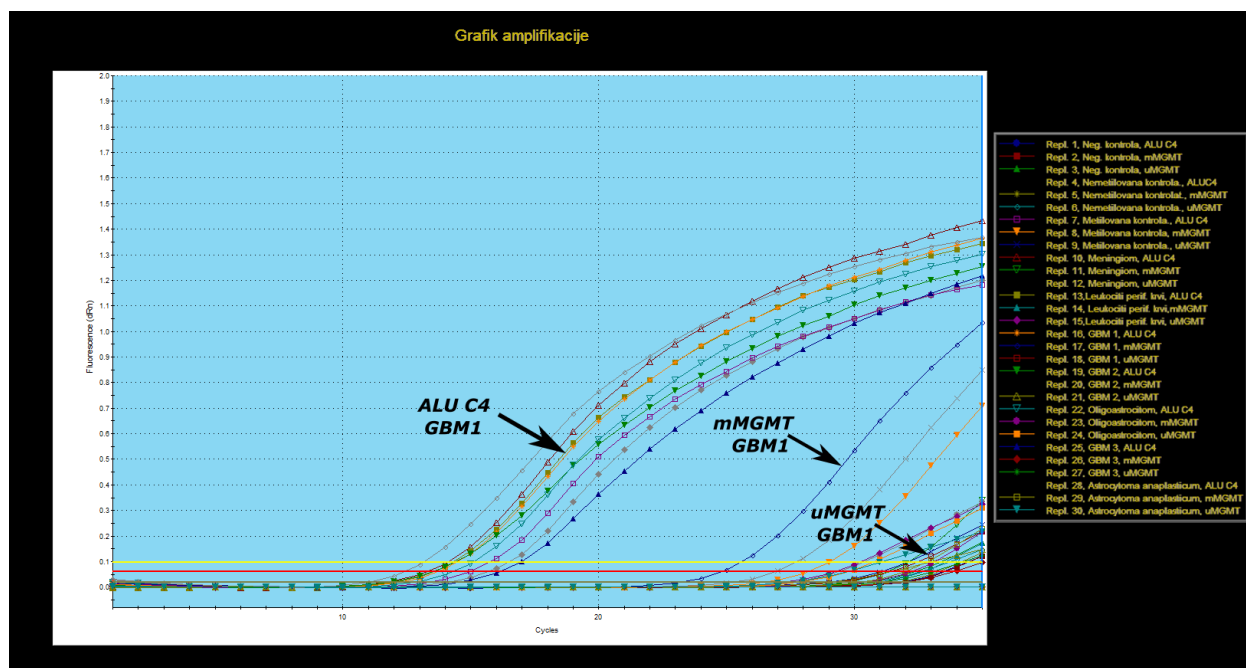


Slika 73. Srednje vreme preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kvalitativnog qMSP statusa metilacije promotornog regiona MGMT u FF uzorcima (prisustva odgovarajućeg pika na krivi topljenja qPCR produkta).



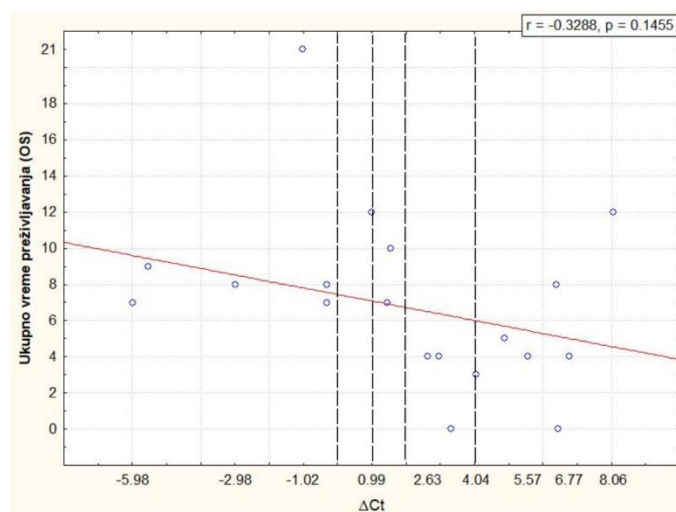
Slika 74. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kvalitativnog qMSP statusa metilacije promotornog regiona MGMT u FF uzorcima.

Nakon detekcije svih uzoraka sa odgovarajućim *mMGMT* pikom na grafiku krive topljenja, izvršena je semi-kvantitativna evaluacija stepena metilacije upoređivanjem dobijenih C_t vrednosti za metilovani (*mMGMT*) i nemetilovani (*uMGMT*) produkt (slika 75.).



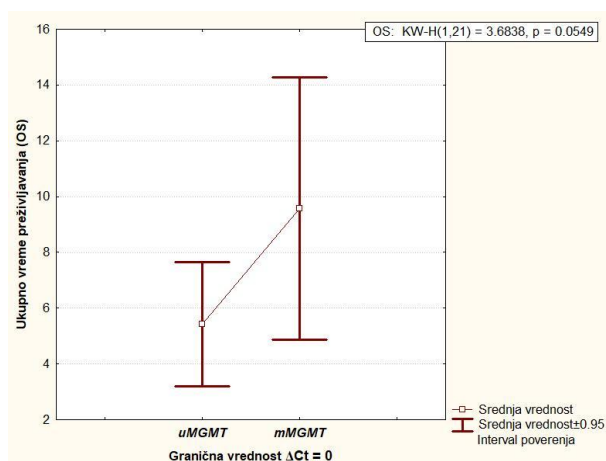
Slika 75. Grafik amplifikacije ALU C4, mMGMT i uMGMT qMSP produkata u FF uzorcima GBM

Na osnovu ΔC_t vrednosti - razlike između C_t vrednosti *mMGMT* i *uMGMT* qMSP produkata, izvršena je preciznija evaluacija statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona. Po uzoru na referentnu studiju, istraživane su sledeće granične ΔC_t vrednosti – 0, 1, 2, 4, sa ciljem definisanja grupa uzoraka sa pozitivnim i negativnim statusom metilacije *MGMT* promotornog regiona (slika 76.).

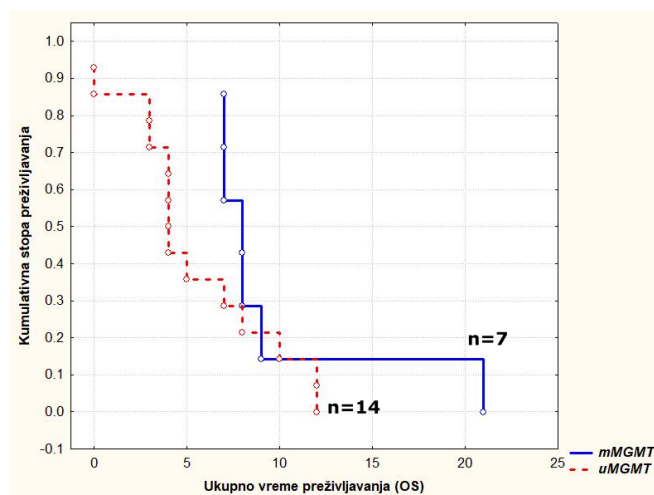


Slika 76. Dijagram rasejanja korelacije izmerenih ΔC_t vrednosti i ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase

Odabirom $\Delta C_t = 0$ vrednosti za razgraničavanje uzoraka sa pozitivnim i negativnim statusom metilacije *MGMT* promotornog regiona, kod 7 pacijenata je prepoznato prisustvo metilovane varijante promotornog regiona *MGMT*. Srednje vreme preživljavanja pacijenata sa *mMGMT* varijantom iznosilo je 9.57 ± 5.09 meseci dok je za grupu pacijenata sa nemetilovanim statusom *MGMT* srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja iznosila 5.43 ± 3.88 meseci. Kruskal Wallis testom utvrđena je statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja ove dve grupe pacijenata ($KW-H(1,21) = 3.6838$, $p = 0.0549$). Međutim, upoređivanjem Kaplan-Meier-ovih kriva preživljavanja takva razlika nije prepoznata, iako je p vrednost bila bliska kritičnoj vrednosti praga značajnosti od 0.05 (Log Rank = -1.49743 $p = .13428$) (slike 77. i 78.).

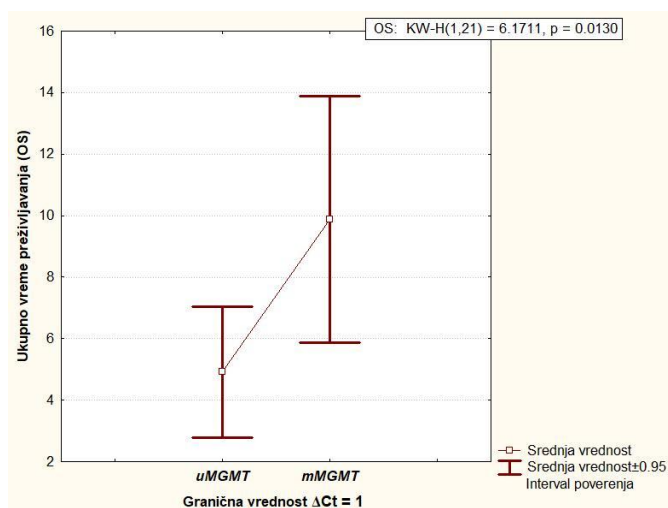


Slika 77. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 0$

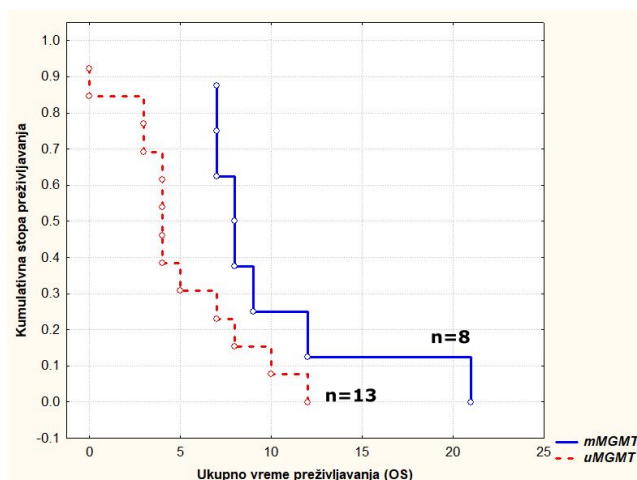


Slika 78. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 0$

Uzimanjem $\Delta C_t = 1$ za graničnu vrednost, ukupno 8 uzoraka je ocenjeno kao metilovano, dok je 13 označeno kao nemetilovano. U poređenju sa $\Delta C_t = 0$ graničnom vrednošću, odabir $\Delta C_t = 1$ rezultovao je neznatnom promenom u srednjim vremenima preživljavanja pacijenata sa metilovanim (9.87 ± 4.79 meseci) odnosno nemetilovanim (4.92 ± 3.52 meseci) *MGMT* statusom. Ovakva promena je proizvela značajnu razliku u rezultatima statističkih testova, koji su u ovom slučaju ukazivali na korelaciju između statusa metilacije *MGMT* i ukupnog vremena preživljavanja pacijenata (KW-H(1,21) = 6.1711, $p = 0.013$; Log Rank = -2.16351 $p = .03050$). (slike 79. i 80.).

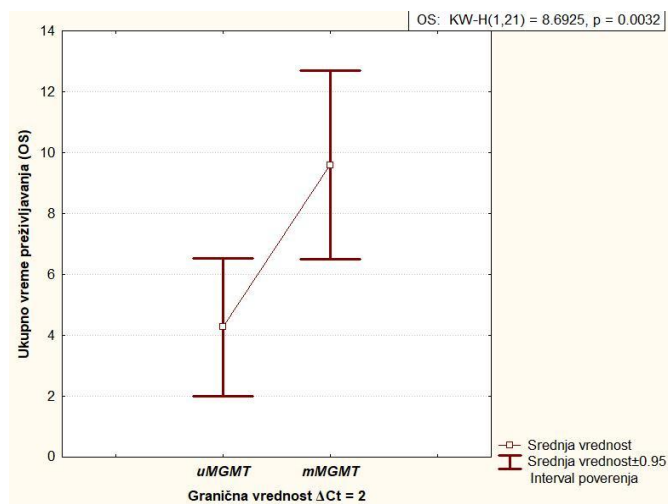


Slika 79. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 1$

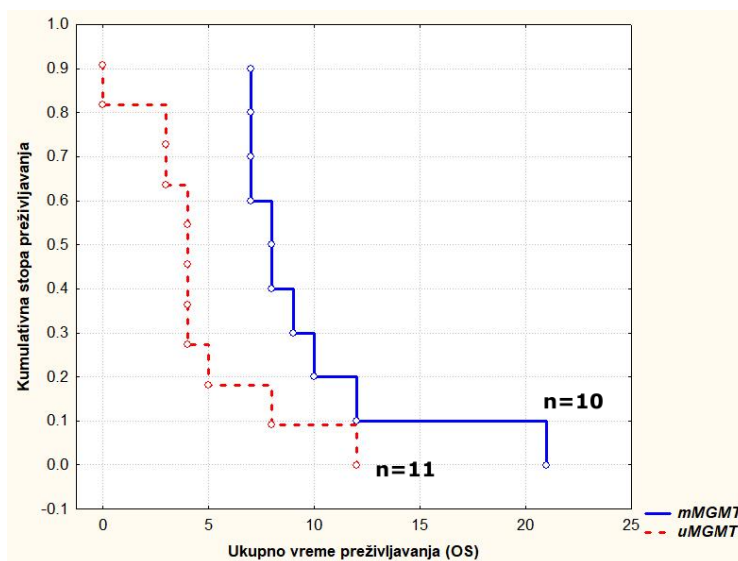


Slika 80. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 1$

Definisanjem $\Delta C_t = 2$ kao granične vrednosti statusa metilacije, 10 uzoraka je ocenjeno kao metilovano, dok je 11 označeno kao nemetilovano. Ova granična vrednost je rezultovala najvećom statistički značajnom razlikom između pacijenata sa nemetilovanim i metilovanim statusom *MGMT* od svih testiranih graničnih vrednosti (KW-H(1,21) = 8.6925, $p = 0.0032$; Log Rank = -2.37051 $p = .01776$). Srednje vrednosti ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosilo je 9.6 ± 4.32 meseci odnosno 4.27 ± 3.37 meseci sa nemetilovanim *MGMT* statusom (slike 81. i 82.).

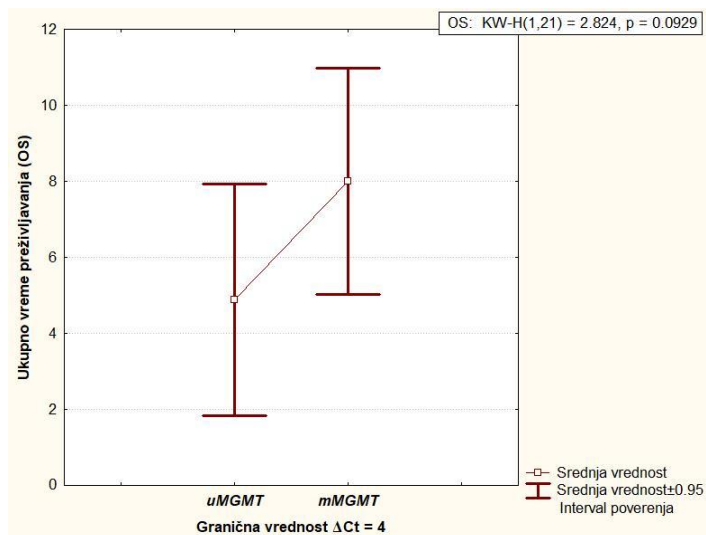


Slika 81. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 2$

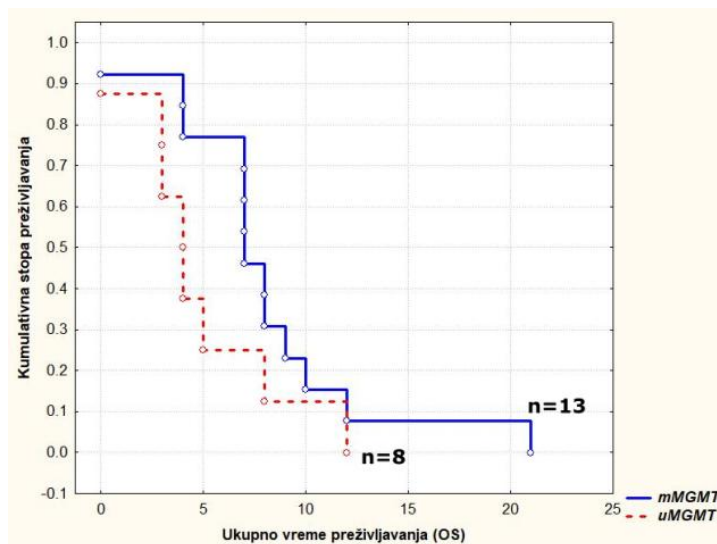


Slika 82. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 2$

Korišćenjem $\Delta C_t = 4$ vrednosti kao granice razlučivanja pozitivnog statusa metilacije, 13 uzoraka je ocenjeno kao metilovano dok je 8 označeno kao nemetilovano. Iako blizu praga značajnosti, ova granična vrednost rezultovala je odsustvom statistički značajnih razlika između vremena preživljavanja pacijenata sa nemetilovanim i metilovanim statusom *MGMT* (KW-H(1,21) = 2.824, $p = 0.09$; Log Rank = -1.35894 $p = .17417$). Srednje vrednosti ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosilo je 8 ± 4.92 meseci odnosno 4.88 ± 3.64 meseci sa nemetilovanim *MGMT* statusom (slike 83. i 84.).



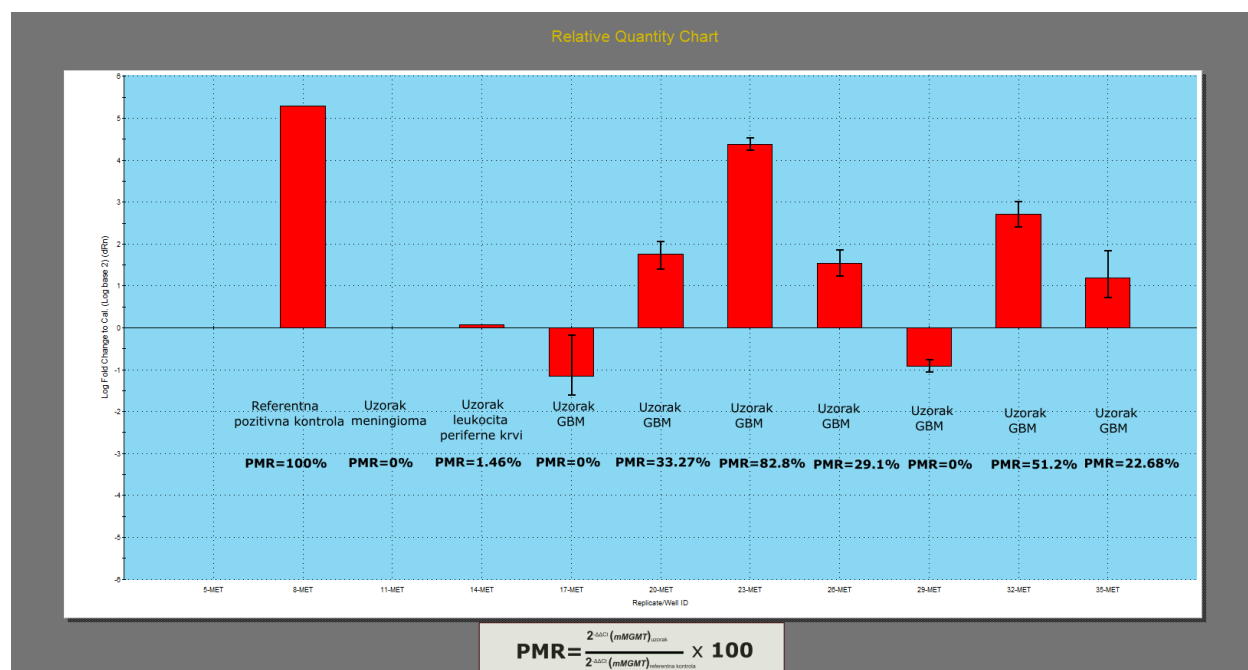
Slika 83. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 4$



Slika 84. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od semi-kvantitativnog statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pri $\Delta C_t = 4$

4.4.4.4.2. Kvantitativni qMSP – PMR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metoda

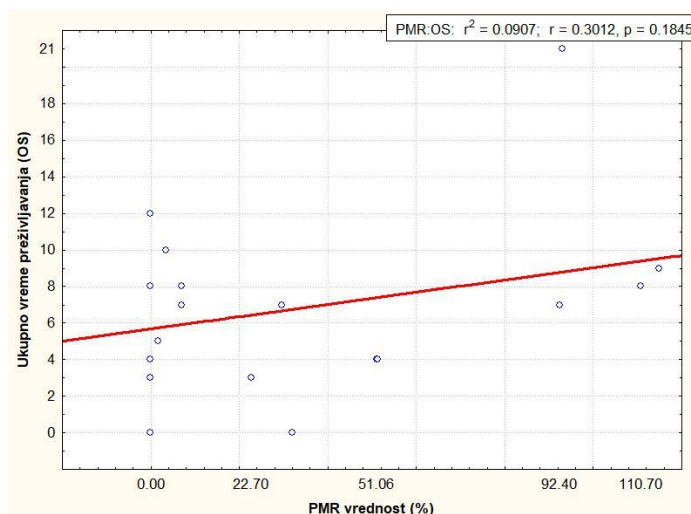
Kvantitativna qMSP analiza statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* izvršena je izračunavanjem procentualnog udela nivoa amplifikacije *mMGMT* produkta u odnosu na referentnu pozitivnu kontrolu, odnosno generisanjem PMR vrednosti. U skladu sa referentnom studijom, nivo amplifikacije *mMGMT* normalizovan je stepenom *ALU C4* amplifikacije kao endogenom kontrolom, a dobijena PMR vrednost za kontrolni uzorak meningioma iskorišćena je za uspostavljanje granične (nulte) PMR vrednosti. PMR vrednosti su izražene kao procentualni odnos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti amplifikacije (“fold-change”, eng.) *mMGMT* produkata registrovanih za uzorke tumora i $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti pozitivne referentne kontrole. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti su generisane korišćenjem pratećeg softvera Real-Time PCR uređaja, MxPro – Mx3005P v4.10 © 2007 Stratagene (slika 85.).



Slika 85. Grafik qMSP relativne kvantifikacije *mMGMT* produkta u uzorcima GBM sa preračunatim PMR vrednostima

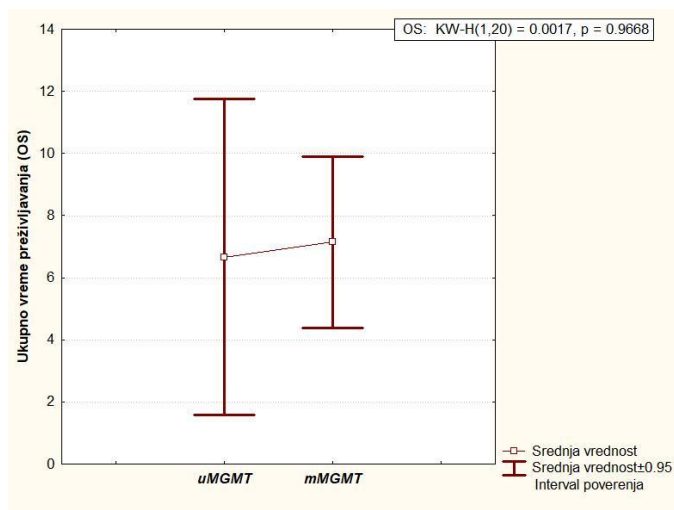
Od ukupno 40 analiziranih uzoraka kvantitativnom qMSP metodom, 20 njih (50%) je ocenjeno pozitivno na prisustvo metilacije *MGMT* promotornog regiona sa PMR vrednošću većom od 0. U okviru grupe pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, detektovano je 14 uzoraka sa pozitivnim statusom

metilacije *MGMT* promotora i 6 uzoraka sa negativnim statusom. Među uzorcima ocenjenim pozitivno na prisustvo metilacije, najmanja zabeležena PMR vrednost iznosila je 1.64%, dok je najveća iznosila 110.7%.

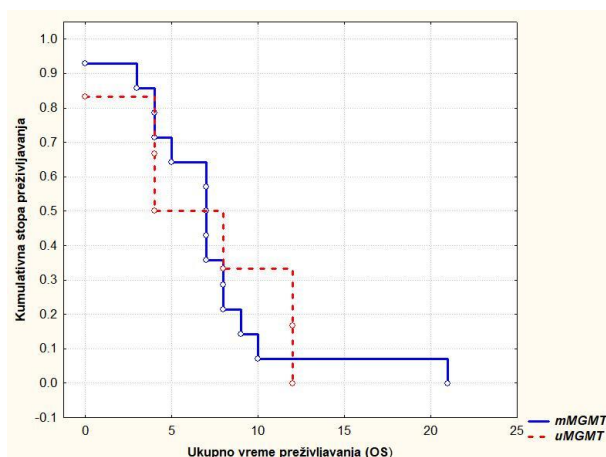


Slika 86. Dijagram rasejanja korelacije izmerenih PMR vrednosti i ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase

Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosila je 7.14 ± 4.78 meseci, dok je kod pacijenata sa negativnim statusom ta vrednost iznosila 6.67 ± 4.84 meseci. Statistički značajne razlike između vremena preživljavanja ovih grupa pacijenata nisu utvrđene (KW-H(1,20) = 0.0017, $p = 0.9668$; Log Rank = 0.0017 $p = .9668$) (slika 87. i 88.).



Slika 87. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kvantitativnog (PMR) statusa metilacije promotornog regiona *MGMT*



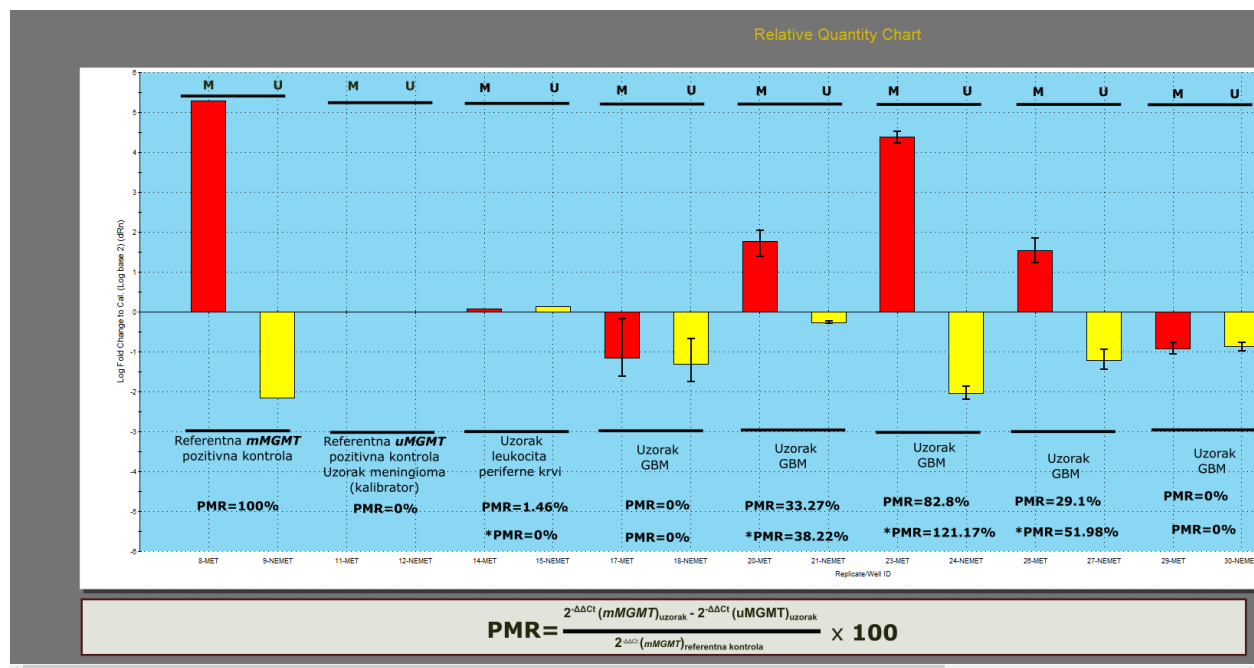
Slika 88. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kvantitativnog statusa metilacije (PMR) promotornog regiona MGMT

Kvantitativna qMSP evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* određivanjem PMR vrednosti pokazala je nizak stepen sličnosti sa kvalitativnom analizom, pokazujući razliku za 22.22% uzoraka (međuklasni korelacioni koeficijent ICC=0.5586, 95% CI 0.2858-0.7476). Takođe, ova metoda je pokazala nizak stepen sličnosti sa semi-kvantitativnom ΔC_t metodom ($\Delta C_t = 2$ granična vrednost) (ICC=0.4913, 95% CI 0.1984-0.8261).

U cilju dodatne kalibracije očitanih vrednosti stepena metilacije (PMR vrednosti), za svaki uzorak je preračunata $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost koja predstavlja relativni odnos količine PCR produkta nemetilovane forme *MGMT* (*uMGMT*) i količine nemetilovanog produkta u referentnom kontrolnom uzorku meningioma. Korišćenjem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti za *mMGMT* i *uMGMT* izračunavan je relativni odnos količine *mMGMT* i *uMGMT* u uzorku, analogno izračunavanju vrednosti M/U odnosa prilikom konvencionalne MSP analize. Kalibracija PMR vrednosti je izvršena prema sledećoj formuli:

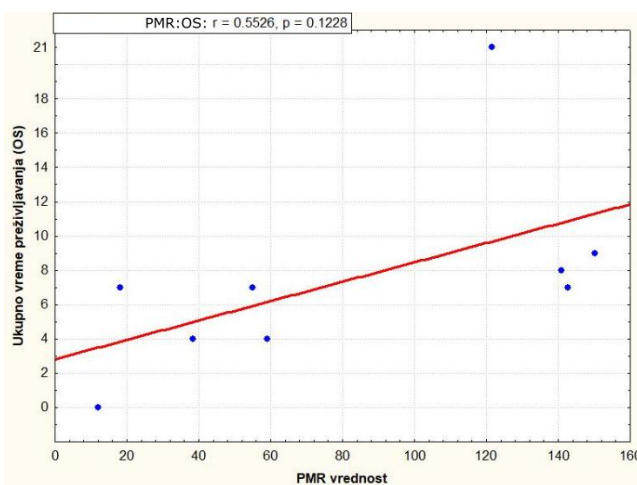
$$\text{PMR} = \frac{2^{-\Delta\Delta C_t(mMGMT)_{\text{uzorak}}} - 2^{-\Delta\Delta C_t(uMGMT)_{\text{uzorak}}}}{2^{-\Delta\Delta C_t(mMGMT)_{\text{referentna kontrola}}}} \times 100$$

Na grafiku generisanom u MxPro – Mx3005P v4.10 © 2007 Stratagene X programu prikazana je relativna kvantifikacija *uMGMT* i *mMGMT* sa korigovanim PMR vrednostima za uzorke GBM (slika 89.).



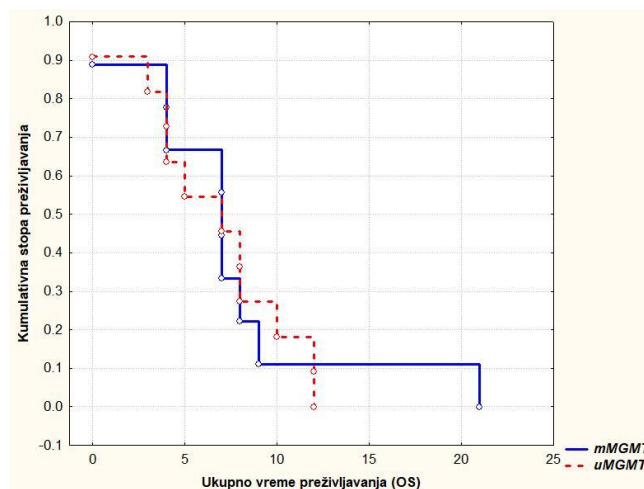
Slika 89. Grafik qMSP relativne kvantifikacije *mMGMT* i *mMGMT* produkata u uzorcima GBM sa preračunatim PMR vrednostima pre i nakon korekcije (označeno zvezdicom)

Nakon opisane kalibracije, detektovano je ukupno 17 (42.5 %) uzoraka sa pozitivnim statusom metilacije promotornog regiona *MGMT*, odnosno PMR vrednošću većom od 0. U okviru grupe pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, detektovano je 9 uzoraka sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* promotora i 11 uzoraka sa negativnim statusom. Među uzorcima ocenjenim pozitivno na prisustvo metilacije, najniža zabeležena PMR vrednost iznosila je 12.03%, dok je najviša iznosila 150.2% (slika 90.).



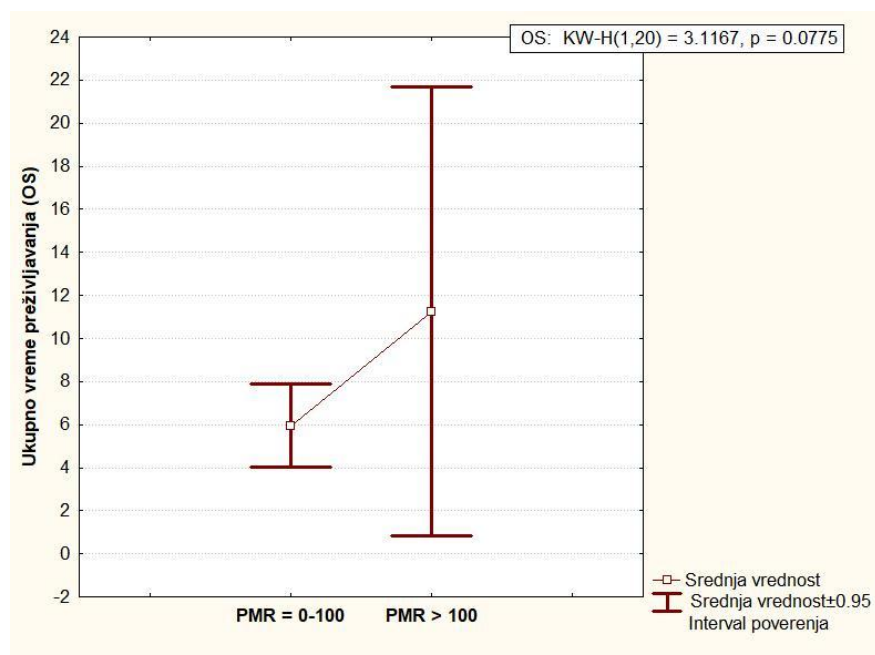
Slika 90. Dijagram rasejanja korelacije kvantitativnog stepena metilacije *MGMT* promotornog regiona (PMR vrednosti) i ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase

Statistički značajna razlika između srednjih vrednosti ukupnog vremena preživljavanja za ove dve grupe pacijenata nije pronađena ($KW-H(1,20) = 0.0015$, $p = 0.9694$). Upoređivanjem Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja dobijen je sličan rezultat ($\text{Log-Rank} = -.069359$, $p = .94470$) (slika 91.).

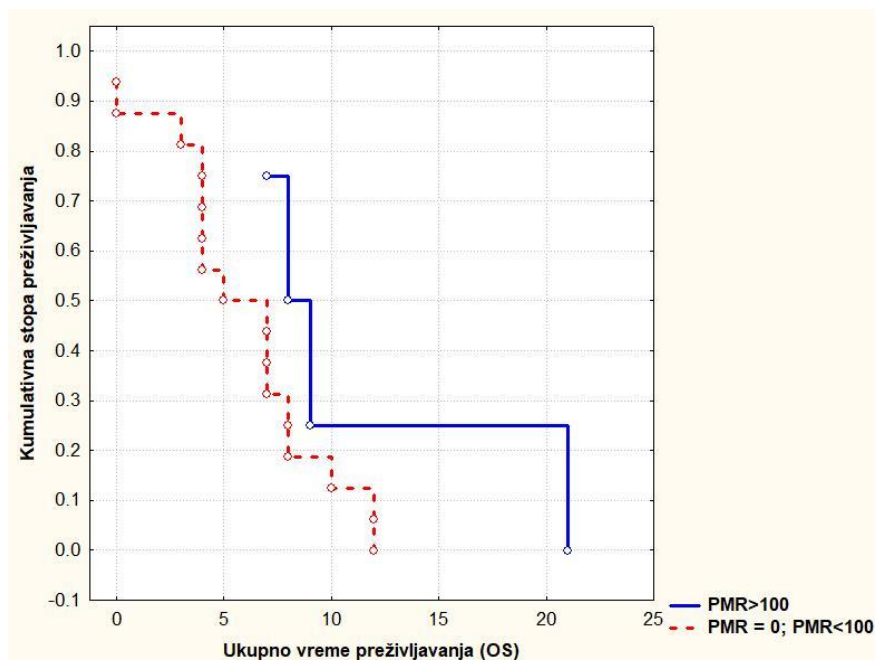


Slika 91. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kvantitativnog statusa metilacije (PMR) promotornog regiona MGMT korigovanog *uMGMT* signalom amplifikacije

U okviru navedene grupe od 20 pacijenata, srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa „hipermetilovanim“ statusom *MGMT* ($PMR > 100$) bilo je značajno duže (11.25 ± 6.55 meseci) u odnosu na pacijente sa nemetilovanim i slabo metilovanim statusom (5.93 ± 3.62 meseci). Ova razlika je potvrđena Kruskal-Wallis testom i p vrednošću blizu praga značajnosti od 0.05 ($KW-H(1,20) = 3.1167$, $p = 0.0789$), kao i upoređivanjem Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja ($\text{Log Rank} = -1.75585$, $p = .07911$) (slike 92. i 93.).



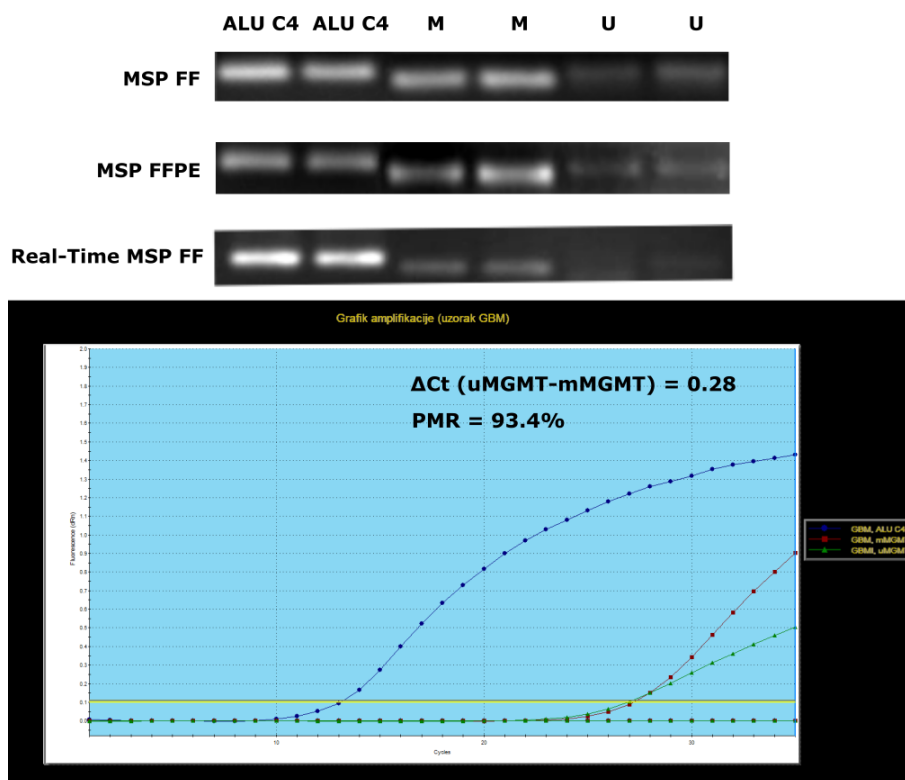
Slika 92. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od PMR vrednosti korigovanih *uMGMT* stepenom amplifikacije. Na grafiku je predstavljena razlika u ukupnom preživljavanju između hipermetilovane (PMR>100) nasuprot nemetilovane/slabo metilovane grupe (0≤PMR<100) pacijenata.



Slika 93. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od PMR vrednosti korigovanih *uMGMT* stepenom amplifikacije. Na grafiku je predstavljena razlika u ukupnom preživljavanju između hipermetilovane (PMR>100) nasuprot nemetilovane/slabo metilovane grupe (0≤PMR<100) pacijenata.

4.4.4.5. Kombinovana evaluacija statusa promotornog regiona *MGMT* na osnovu MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata

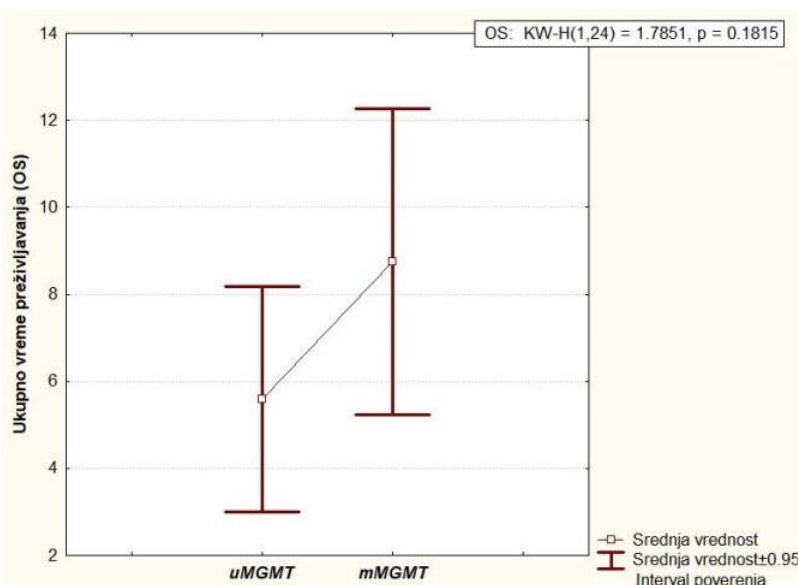
Upoređivanjem rezultata dobijenih analizom FF uzoraka MSP i qMSP metodama i dopunskom analizom odgovarajućeg FFPE uzorka (ukoliko postoji) donošena je finalna odluka o kvalitativnom statusu metilacije *MGMT* promotornog regiona svakog pacijenata obuhvaćenog ovom studijom. Od ukupno 24 pacijenta koji pripadaju grupi starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, kod 12 je utvrđeno odsustvo metilacije, dok je kod 7 njih utvrđeno prisustvo metilacije na osnovu rezultata dobijenih različitim metodama. Kod 5 pacijenta je utvrđen pozitivan status metilacije *MGMT*, ali uz odsustvo potpunog poklapanja rezultata dobijenih različitim metodama, zbog čega su ovi rezultati označeni kao dvosmisleni.



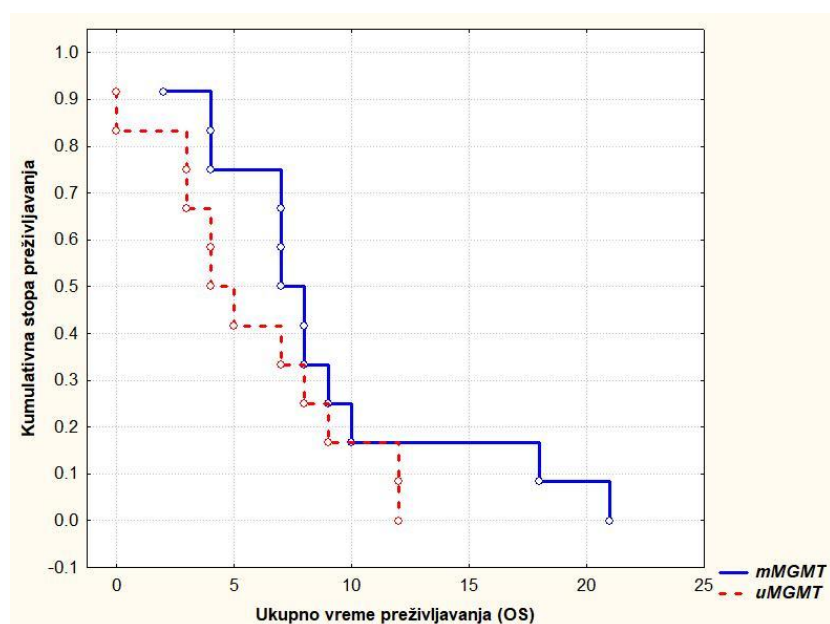
Slika 94. Uporedni prikaz rezultata evaluacije statusa promotornog regiona *MGMT* dobijenih MSP i qMSP analizom FF i FFPE uzorka GBM

Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom promotornog regiona *MGMT* iznosilo je 8.75 ± 5.54 meseci, dok je za grupu sa negativnim statusom iznosilo 5.58 ± 4.07 meseci. Upoređivanjem srednjih vrednosti OS vremena i

kumulativnih kriva preživljavanja između ovih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike, iako su p vrednosti testova bile relativno blizu praga značajnosti od $p = 0.05$ (KW-H(1,24) = 1.7851, $p = 0.1818$; Log-Rank = -1.23213 $p = .21790$; Gehan-Wilcoxon = 1.307018 $p = .19121$). (slika 95. i 96.).

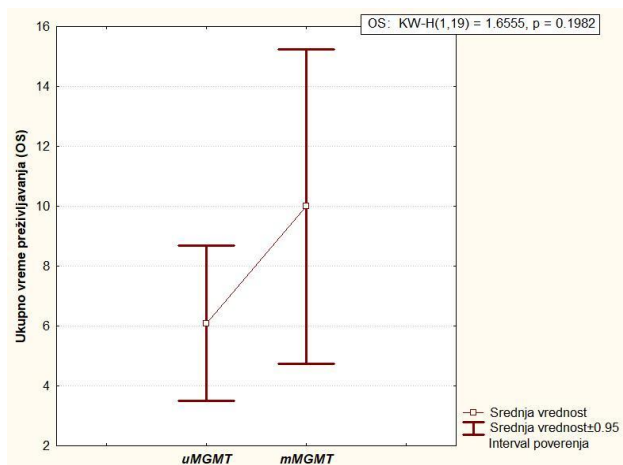


Slika 95. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotora definisanog na osnovu kombinacije MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata analize.

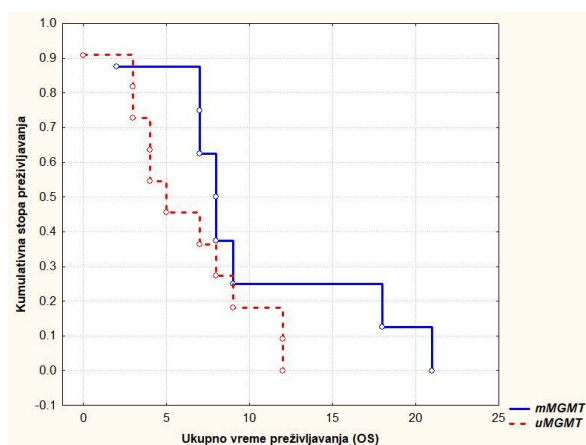


Slika 96. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) grupisanih prema statusu metilacije *MGMT* promotora definisanog na osnovu kombinacije MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata analize

Nakon isključivanja dvosmislenih rezultata statusa metilacije i svođenja analizirane grupe na 19 pacijenata, srednje vreme preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije promotornog regiona *MGMT* iznosilo je 10 ± 6.28 meseci, dok je srednje OS vreme pacijenata sa negativnim statusom metilacije ostalo isto (5.58 ± 4.07 meseci). Ovakva redukcija rezultovala je neznatno povoljnijim statističkim parametrima prilikom analize stepena korelacije statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona i ukupnog vremena preživljavanja pacijenata (KW-H(1,19) = 1.6555, $p = 0.1982$; Log-Rank = -1.38828 $p = .16505$) (slike 97. i 98.).



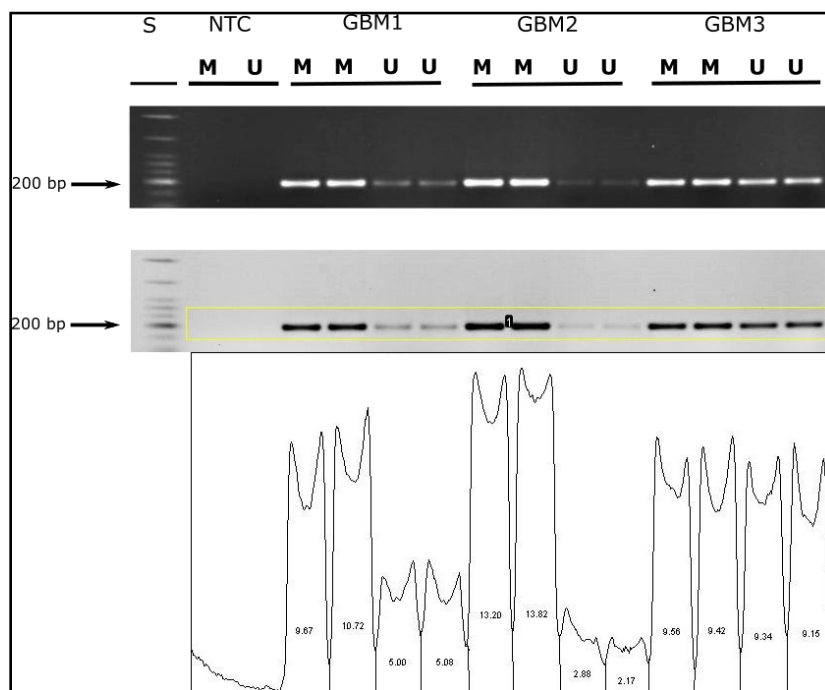
Slika 97. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotora definisanog na osnovu kombinacije MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata analize. Iz analize su izuzeti rezultati dobijeni za 5 pacijenata, zbog nekonzistentosti u evaluaciji različitim metodama.



Slika 98. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) grupisanih prema statusu metilacije *MGMT* promotora definisanog na osnovu kombinacije MSP/qMSP i FF/FFPE rezultata analize. Iz analize su izuzeti rezultati dobijeni za 5 pacijenata, zbog nekonzistentosti u evaluaciji različitim metodama.

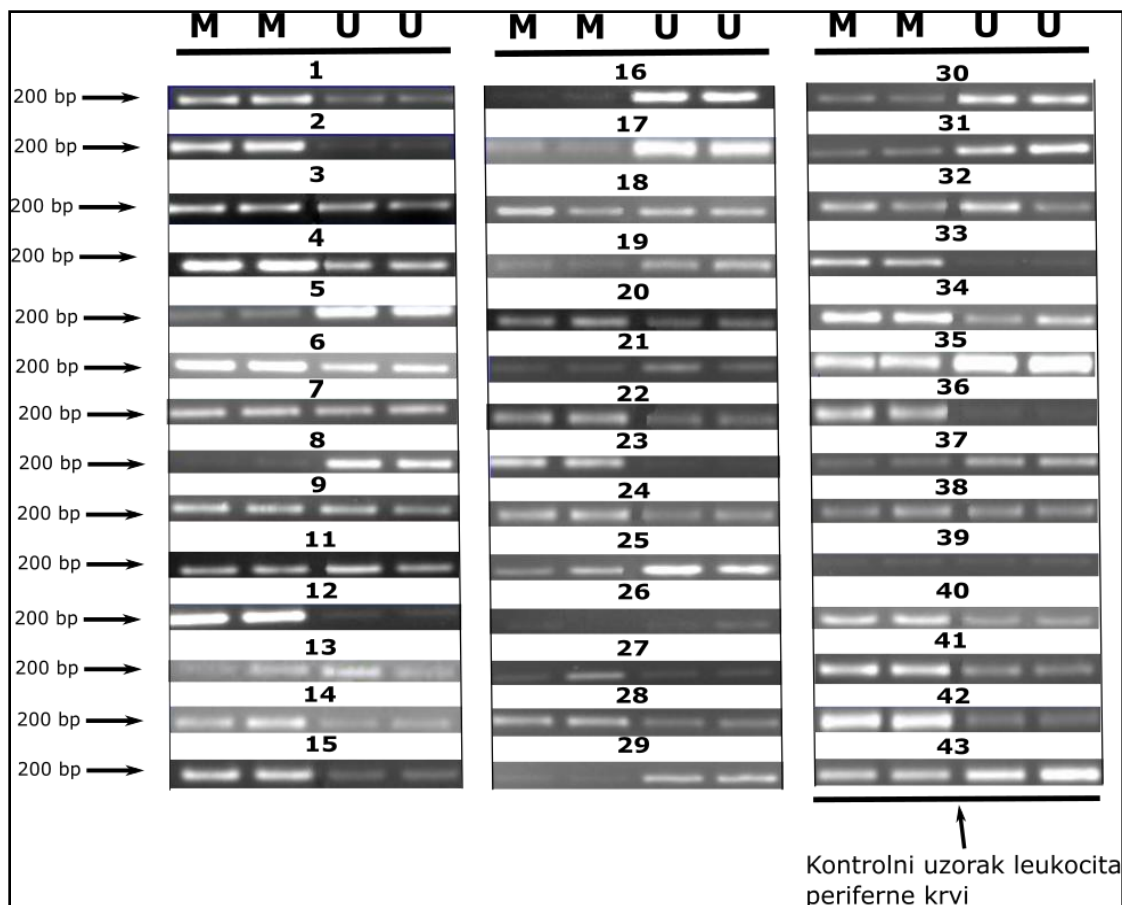
4.4.4.6. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *CHI3L1*

U cilju ispitivanja uticaja statusa metilacije promotornog regiona *CHI3L1* na ukupno vreme preživljavanja GBM pacijenata, izvršena je MSP analiza 40 uzoraka visokogradusnih glioma kao i analiza tri kontrolna uzorka (hemagiopericitoma, meningioma i leukocita periferne krvi). Variranjem temperature anilinga, količine $MgCl_2$ i FIREPol[®] polimeraze potvrđen je optimalni sastav PCR smeše i uslova PCR reakcije predstavljenih u referentnoj studiji (Steponaitis i sar., 2016). Uspešna amplifikacija promotornog regiona *CHI3L1* postignuta je korišćenjem prvog seta oligonukleotida dizajniranih u spomenutoj studiji. Korišćenje drugog seta oligonukleotida rezultovalo je odsustvom amplifikacije i variranjem kvaliteta rezultata, zbog čega su oni izuzeti iz dalje analize. Nakon probne MSP analize tri uzorka GBM i postignute uspešne amplifikacije sekvence promotornog regiona *CHI3L1*, pristupljeno je serijskoj MSP analizi preostalih uzoraka. Semi-kvantitativna evaluacija statusa metilacije se zasnivala na merenjima intenziteta fluorescencije metilovanih i nemetilovanih MSP produkata na 2% agaroznom gelu korišćenjem ImageJ programa.



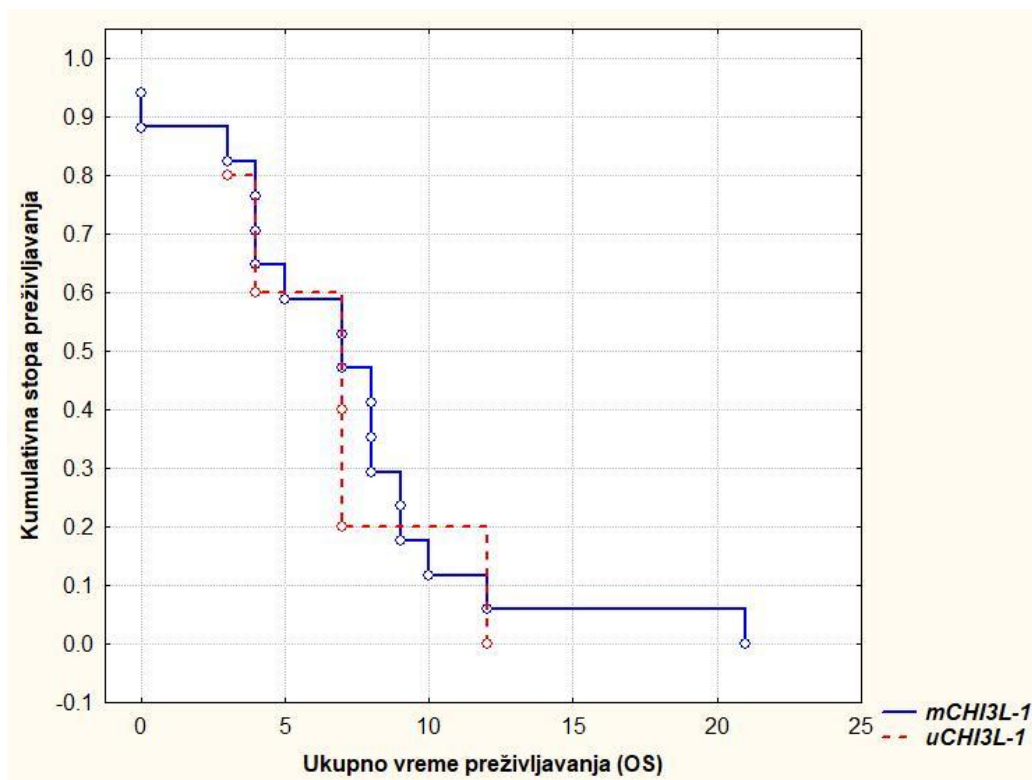
Slika 99. Snimak gela i ImageJ obrada rezultata probne MSP amplifikacije metilovane i nemetilovane varijante promotornog regiona *CHI3L1*

Odnos intenziteta fluorescencije MSP produkata izražavan je u vidu M/U vrednosti, a uzorak je smatran pozitivnim na prisustvo metilacije *CHI3L1* ukoliko je dobijena M/U vrednost iznosila više od 0.74. Takva granična vrednost je definisana na osnovu dobijenog M/U odnosa za uzorak leukocita periferne krvi zdrave osobe, po uzoru na protokol predstavljen u referentnoj studiji (slika 100.) (Steponaitis i sar., 2016).



Slika 100. Uporedni prikaz metilovanih (M) i nemetilovanih (U) *CHI3L1* MSP produkata vizuelizovanih metodom 2% agarozne gel-elektroforeze

Ukupno 28 pacijenata je imalo pozitivni status metilacije promotornog regiona *CHI3L1*, dok je kod 12 njih utvrđen negativan status. Upoređivanjem ove dve grupe Kruskal-Wallis i Log-Rank statističkim testovima, nije pronađena korelacija između statusa metilacije *CHI3L1* i ukupnog vremena preživljavanja. Isti rezultat je zabeležen nakon redukcije analizirane grupe na grupu pacijenata starijih od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase (KW-H(1,22) = 0.0998, p = 0.7521; Log-Rank = -.260840 p = .79422) (slika 101.).



Slika 101. Kumulativne stope preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) grupisanih prema semi-kvantitativnom statusu metilacije *CH13L1* promotornog regiona

4.4.4.7. Uticaj različitih kombinacija statusa metilacije *MGMT* i *CHI3L1* na ukupno vreme preživljavanja GBM pacijenata

U tabeli 17. predstavljeni su rezultati evaluacije statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* i *CHI3L1* za svakog pacijenta obuhvaćenog ovim istraživanjem, udruženo sa odgovarajućim kliničkim parametrima.

Tabela 17. – Sumarni prikaz kliničkih i molekularnih parametara svih pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem

Redni broj	Godine	Pol	Dijagnoza	Gradus (WHO)	Tip hemioterapije	Obim resekcije	Ukupno vreme preživljavanja (OS)	Status metilacije <i>MGMT</i>	Status metilacije <i>CHI3L1</i>	Status mutacije <i>IDH1-R132H</i>
1	35	M	GBM	IV	TMZ	mr	80+	Negativan	Pozitivan	Negativan
2	66	M	GBM	IV	PCV	mr	8	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
3	57	M	GBM	IV	PCV	mr	5	Negativan	Pozitivan	Negativan
4	60	M	GBM	IV	BCNU	mr	4	Negativan	Pozitivan	Negativan
5	36	M	GBM	IV	PCV	mr	1	Negativan	Negativan	Negativan
6	54	Ž	GBM	IV	BCNU	mr	7	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
7	68	M	GBM	IV	BCNU	mr	10	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
8	74	M	GBM	IV	PCV	pr	7	Negativan	Pozitivan	Negativan
9	40	M	GBM	IV	TMZ	mr	13	Pozitivan	Nije determinisan	Negativan
10	66	M	GBM	IV	TMZ	mr	12	Negativan	Negativan	Negativan
11	47	M	GBM	IV	TMZ	pr	9	Pozitivan	Negativan	Negativan
12	62	Ž	GBM	IV	TMZ	pr	18	Pozitivan	Nije determinisan	Negativan
13	65	M	GBM	IV	PCV	pr	7	Pozitivan	Negativan	Negativan
14	63	Ž	GBM	IV	bez ter.	b	0	Negativan	Negativan	Negativan
15	49	M	GBM	IV	TMZ	mr	19	Negativan	Pozitivan	Negativan
16	52	Ž	Oligodendroglioma anaplasticum	III	BCNU	mr	0	Negativan	Pozitivan	Negativan
17	75	M	GBM	IV	bez terapije	b	0	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
18	77	M	GBM	IV	bez terapije	b	0	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
19	72	Ž	Oligoastrocytoma	II	bez terapije	pr	0	Negativan	Pozitivan	Negativan
20	58	M	GBM	IV	BCNU	pr	4	Negativan	Pozitivan	Negativan
21	73	Ž	Astrocytoma anaplasticum	III	bez ter.	b	0	Pozitivan	Nije determinisan	Negativan
22	63	Ž	GBM	IV	PCV	pr	7	Pozitivan	Negativan	Negativan
23	50	Ž	GBM	IV	TMZ	mr	12	Negativan	Pozitivan	Negativan
24	63	M	GBM	IV	BCNU	b	6	Pozitivan	Negativan	Negativan
25	69	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	4	Pozitivan	Negativan	Negativan
26	57	Ž	GBM	IV	PCV	b	3	Pozitivan	Negativan	Negativan
27	53	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	2	Pozitivan	Nije determinisan	Negativan
28	44	M	Oligoastrocytoma	III	PCV	mr	1	Pozitivan	Pozitivan	Pozitivan
29	46	Ž	GBM	IV	TMZ	mr	14	Negativan	Negativan	Negativan
30	80	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	3	Negativan	Pozitivan	Negativan

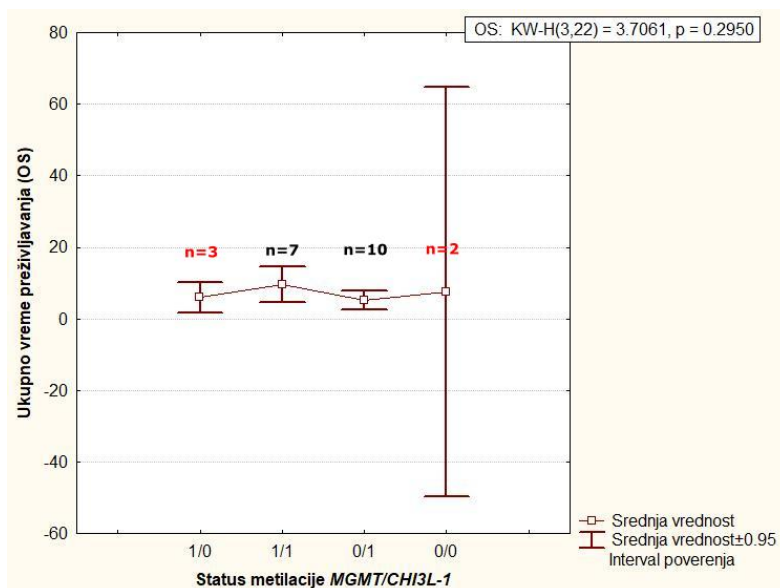
Redni broj	Godine	Pol	Dijagnoza	Gradus (WHO)	Tip hemioterapije	Obim resekcije	Ukupno vreme preživljavanja (OS)	Status metilacije MGMT	Status metilacije CH13L1	Status mutacije IDH1-R132H
31	50	Ž	Oligoastrocytoma	II	PCV	mr	31	Pozitivan	Pozitivan	Pozitivan
32	65	M	GBM	IV	BCNU	pr	8	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
33	58	M	GBM	IV	TMZ	b	8	Negativan	Pozitivan	Negativan
34	29	M	GBM	IV	TMZ	mr	19	Pozitivan	Pozitivan	Pozitivan
35	55	M	GBM	IV	TMZ	pr	21	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
36	67	M	GBM	IV	PCV	pr	8	Negativan	Pozitivan	Negativan
37	69	M	GBM	IV	PCV	b	4	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
38	61	Ž	Hemangiopericytoma	I-II	bez terapije	mr	/	Negativan	Pozitivan	Negativan
39	67	Ž	Meningioma	I-II	bez terapije	mr	/	Negativan	Pozitivan	Negativan
40	81	M	GBM	IV	BCNU	pr	4	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
41	71	Ž	GBM	IV	BCNU	pr	3	Negativan	Negativan	Negativan
42	73	M	GBM	IV	BCNU	pr	9	Negativan	Pozitivan	Negativan
43	43	M	GBM	IV	TMZ	mr	16	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
44	26	M	Oligoastrocytoma	II	bez terapije	mr		Negativan	Pozitivan	Negativan
45	73	M	GBM	IV	BCNU	pr	9	Pozitivan	Pozitivan	Negativan

Pol: M – muški, Ž – ženski; Tip resekcije: mr – maksimalna resekcija, pr – parcijalna resekcija, b – biopsija; Tip hemioterapije: BCNU – karmustin, PCV – prokarbazin, lomustin, vinkristin; TMZ – temozolomid

Radi ispitivanja potencijalnog udruženog uticaja statusa metilacije promotornih regiona *MGMT* i *CH13L1* na OS ukupno vreme preživljavanja pacijenata, definisane su sledeće grupe pacijenata po osnovu šablona metilacije ova dva gena:

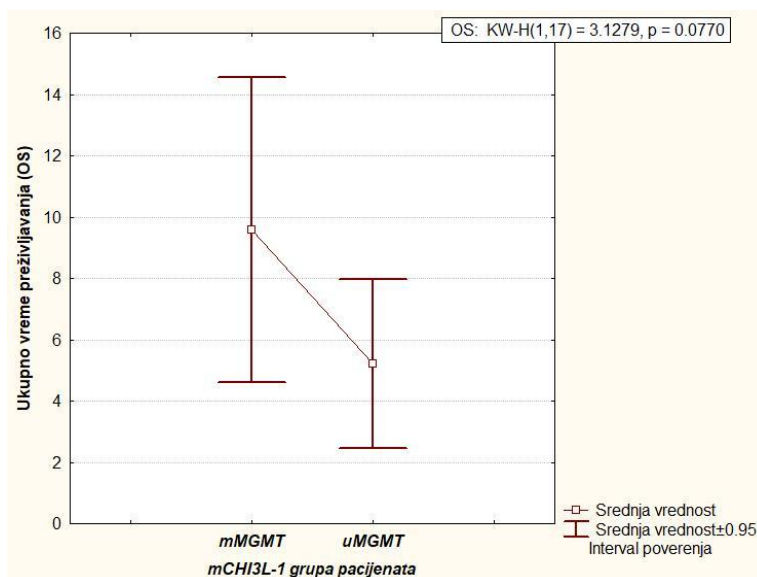
- **1/0 šablon** – metilovan *MGMT* i nemetilovan *CH13L1*
- **1/1 šablon** - metilovan *MGMT* i metilovan *CH13L1*
- **0/1 šablon** - nemetilovan *MGMT* i metilovan *CH13L1*
- **0/0 šablon** - nemetilovan *MGMT* i nemetilovan *CH13L1*

U okviru grupe pacijenata starijih od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, šablon metilacije 1/0 registrovan je kod 3 pacijenta, 1/1 kod 7 pacijenata, 0/1 kod 10 pacijenata i 0/0 kod dva pacijenta. Na slici 102. predstavljene su srednje vrednosti ukupnog vremena preživljavanja navedenih grupa pacijenata.

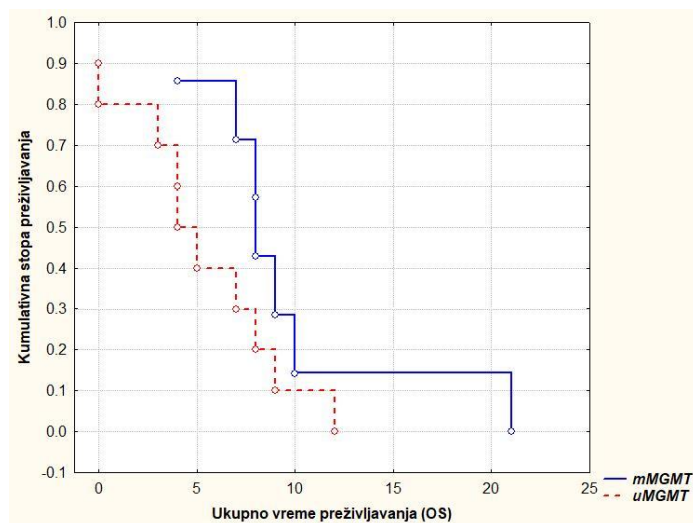


Slika 102. Srednje vrednosti ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od kombinovanog statusa metilacije *MGMT* i *CHL3L1* promotora (šablona metilacije)

Statistički značajna razlika između srednjih vrednosti ukupnog vremena preživljavanja dva najzastupljenija šablona metilacije 1/1 (9.57 ± 5.38 meseci) i 0/1 (5.2 ± 3.85 meseci) bila je veoma bliska pragu značajnosti od $p = 0.05$ ($KW-H(1,17) = 3.1279$, $p = 0.0770$). Sličan rezultat dobijen je upoređivanjem Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja Log-Rank testom ($\text{Log-Rank} = -1.59335$, $p = .11108$) (slike 103. i 104.).



Slika 103. Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja *mCHL3L1* GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotnog regiona



Slika 104. Kumulativne stope preživljavanja *mCHI3L1* GBM pacijenata (starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase) u zavisnosti od statusa metilacije MGMT promotornog regiona.

5. DISKUSIJA

Glioblastome (GBM), najčešću i najagresivniju formu glioma, odlikuje jako izražena intratumorska genetička heterogenost. Usled ove heterogenosti, prisutna je velika varijabilnost u odgovoru pacijenata na primenu trenutnih standarda terapije GBM (Degl'Innocenti i sar., 2019). Rešenje ovog problema predstavlja personalizovana medicina, koja podrazumeva prilagođavanje terapijskih protokola individualnim genetičkim obeležjima pacijenata i postaje imperativ u razvoju savremenih terapijskih protokola GBM (Taghizadeh i sar., 2019). Brojnim studijama i kliničkim ispitivanjima identifikovano je nekoliko molekularnih obeležja, pouzdanih prognostičkih i predikcionih faktora GBM (Aum i sar., 2014; Nørøxe i sar., 2017). U najznačajnije takve markere ubraja se status metilacije promotornog regiona *MGMT* gena koji predstavlja prognostički marker novodijagnostikovanih GBM i faktor predikcije odgovora pacijenta na hemioterapiju alikilirajućim agensima poput Temozolomida (Szopa i sar., 2017). Međutim, usled nepostojanja konsenzusa oko odgovarajućih metoda detekcije i definicije optimalnih graničnih vrednosti, šira implementacija evaluacije statusa ovog markera u kliničkoj praksi još uvek nije postignuta (Mansouri i sar., 2019; Szopa i sar., 2017). Prema dostupnoj literaturi, metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija (MSP) i kvantitativna MSP predstavljaju metode evaluacije statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona koje su najpogodnije za uvođenje u svakodnevnu kliničku rutinu (Rosas-Alonso i sar., 2021). Uspostavljanjem optimalnih graničnih vrednosti i pronalaženjem odgovarajućih pomoćnih genetičkih ili epigenetičkih faktora koji promovišu rezistentnost na hemioterapiju mogla bi se prevazići ograničenja navedenih metoda i pospešiti njihova primena u kliničkoj praksi (Hegi i sar., 2019).

5.1. Demografski i klinički prognostički faktori GBM

5.1.1. Starost i pol pacijenata

Uprkos manjim razlikama u definiciji starosne granice za „stariju“ grupu pacijenata, rezultati brojnih istraživanja i randomizovanih kontrolnih kliničkih ispitivanja potvrđuju ulogu starosne dobi pacijenta kao snažnog prognostičkog faktora GBM (Perry i sar., 2017; Wick i sar., 2009; Wick i sar., 2012). Osim toga, ovim ispitivanjima ističe se uloga metilacije *MGMT*

promotornog regiona kao prognostičkog faktora kod starijih grupa pacijenata (Weller i sar., 2017). Prema smernicama Evropske Asocijacije za Neuro-onkologiju (European Association for Neuro-Oncology, eng.) iz 2017. godine, evaluacija statusa promotornog regiona *MGMT* predstavlja standard dijagnostičkog testiranja kod pacijenata starijih od 65 godina (Ghosh i sar., 2017). Kod takvih pacijenata se, u zavisnosti od statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona, primenjuje terapija TMZ u okviru terapijskog režima (pozitivan status metilacije), odnosno samo hipofrakcionisana zračna terapija (negativan status metilacije). U randomizovanom kliničkom ispitivanju NOA-04 koje je obuhvatalo grupu od 318 pacijenata obolelih od visokogradusnih astrocitoma, vršena je identifikacija značajnih kliničkih i demografskih faktora koji imaju uticaj na klinički ishod terapije GBM (Wick i sar., 2009). Statističkom analizom primenom Cox-ovog modela sa proporcionalnim rizikom utvrđeno je da pacijente starije od 50 godina odlikuje znatno kraće vreme ukupnog preživljavanja u odnosu na mlađu grupu (Wick i sar., 2009). Na uzorku od 335 pacijenata obolelih od nekog oblika glioma, pronađeno je da je pacijente starije od 45 godina odlikovao nepovoljniji klinički ishod u odnosu na mlađu grupu pacijenata ($P=0.038$) (Liang i sar., 2020). U retrospektivnoj studiji iz 2017. godine koja je obuhvatala 61-og pacijenta, Ghosh i saradnici su potvrdili razliku u vremenu preživljavanja između grupe pacijenata starije od 50 godina u odnosu na mlađu grupu (8.8 meseci u odnosu na 4.55 meseci) (Ghosh i sar., 2017).

U ovom istraživanju je, primenom univarijantnog Cox-ovog regresionog modela, dokazana je korelacija (nezavisni prognostički značaj) starosti pacijenata i ukupnog vremena preživljavanja ($p=0.0007$, $HR=1.0683$, 95% CI – 1.0281 – 1.1101) (tabela 11). Upoređivanjem srednjih OS vrednosti odnosno kumulativnih kriva preživljavanja (Slike 31. i 32.), korelacija vremena preživljavanja pacijenata i njihove starosne dobi potvrđena je sa visokim stepenom pouzdanosti (KW-H(1,41)= 7,4384, $p=.006$) (Log-Rank= 3.130149 $p=.00175$). Usled nepostojanja statistički značajnih razlika u ukupnom vremenu preživljavanja *mMGMT* i *uMGMT* grupa pacijenata uzimanjem u obzir svih 45 pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem, izvršena je starosna stratifikacija pacijenata i zasebna evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* za obe starosne grupe.

Iako protektivna uloga estrogena kod pacijenata obolelih od visokogradusnih glioma nije dovoljno ispitana, nedavna saznanja proistekla iz karakterizacije ortopičnog modela glioblastoma govore u prilog takvoj hipotezi (Barone i sar., 2009; Quick-Weller i sar., 2017). Međutim, analizom vremena preživljavanja pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem nije pokazana

statistički značajna razlika u zavisnosti od pola (Slike 33. i 34.). Zbog toga ovaj parametar nije uziman u obzir prilikom analize statusa metilacije *MGMT* i *CH13L1*.

5.1.2. Step en resekcije tumora (EOR)

Obim hirurske resekcije tumora predstavlja nezavisni prognostički faktor koji je snažno korelisan sa ukupnim vremenom preživljavanja GBM pacijenata (Ahmadloo i sar., 2013; Laurent i sar., 2020; Yong i sar., 2014). Analizom uticaja potencijalnih prognostičkih faktora (veličine tumora, prisustva edema, pomeranja središnje (megiosagitalne) linije, lokalizacije, starosne dobi, preoperativnog indeksa po Karnofskom, ocene na Skali za moždani udar Nacionalnog insituta za zdravlje (NIHSS) i stepena resekcije tumora) na ukupno vreme preživljavanja pacijenata, pronađeno je da je ukupno vreme preživljavanja pacijenata sa izvršenom totalnom resekcijom tumorske mase znatno duže u odnosu na pacijente sa izvršenom parcijalnom resekcijom (16.7 meseci u poređenju sa 11.8 meseci, $p < 0.0001$). Takav rezultat je postignut i nakon stratifikacije pacijenata u odnosu na starosnu dob (> 60 godina, odnosno ≤ 60 godina) i podudarajuću lokalizaciju tumora u mozgu (Stummer i sar., 2008). U spomenutom NOA-04 randomizovanom kliničkom ispitivanju potvrđen je prognostički uticaj stepena hirurške resekcije kod GBM pacijenata (Wick i sar., 2009). Tom prilikom je, primenom Cox-ovog modela sa proporcionalnim rizikom pri p vrednosti od 0.0006, utvrđen najveći hazard količnik između biopsije i kompletne resekcije kao faktora (3.5), zatim biopsije i parcijalne resekcije (2.1) i na kraju parcijalne i potpune resekcije (1.6) (Wick i sar., 2009). Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti postojanje jasne razlike u ukupnom vremenu preživljavanja između grupe pacijenata sa izvršenom biopsijom sa jedne strane i pacijenata sa parcijalnom ili totalnom resekcijom sa druge strane.

Uzimajući u obzir značaj stratifikacije u zavisnosti od stepena hirurške resekcije, nad grupom pacijenata obolelih od glioma visokog gradusa obuhvaćenim ovim istraživanjem izvršena je statistička analiza primenom univarijantnog Cox-ovog regresionog modela, kojim je dokazana korelacija stepena hirurške resekcije i ukupnog vremena preživljavanja pacijenata ($p = 0.0004$, $HR = 0.4093$, 95% CI – 0.2488 – 0.6735) (tabela 11). Dodatno, izvršeno je utvrđivanje razlika u vremenu ukupnog preživljavanja Kruskal-Wallis testom i upoređivanje Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja pacijenata Log-Rank testom. Navedenim testovima potvrđena je značajna razlika u ukupnim vremenima preživljavanja između grupe pacijenata sa izvršenom

biopsijom (B grupe) i grupe pacijenata sa izvršenom maksimalnom resekcijom (MR grupe) $KW-H(1,24) = 7.3398$, $p = 0.0067$; $\text{Log-Rank} = -2.30217$ $p = .02133$), kao i B grupe pacijenata i grupe pacijenata sa izvršenom parcijlanom resekcijom (PR) grupe ($KW-H(1,25) = 5.3903$, $p = 0.0202$; $\text{Log-Rank} = 2.03083$ $p = .04227$) (Slike 35. i 36.). Kako takva razlika nije utvrđena između MR i PR grupa pacijenata, MR i PR grupe pacijenata su posmatrane kao jedinstvena podgrupa prilikom stratifikacije pacijenata u zavisnosti od stepena resekcije u ovom istraživanju.

5.1.3. Vrsta adjuvantne hemioterapije

Primena adjuvantnih (dopunskih) hemioterapijskih protokola zasnovanih na derivatima nitrozouree (PCV i BCNU režim) odnosno Temozolomidu, predstavlja snažan prognostički faktor vremena preživljavanja GBM pacijenata (Ahmadloo i sar., 2013; Wick i sar., 2009). Prema rezultatima randomizovanog kliničkog ispitivanja NOA-04 na uzorku od 223 pacijenta obolelih od GBM, primenom multivarijantnog postepenog (*stepwise*, eng.) Cox-ovog regresionog modela sa proporcionalnim rizikom pokazan je snažan prognostički uticaj na vreme preživljavanja primene adjuvantne hemioterapije bazirane na derivatima nitrozouree (102 pacijenta) i Temozolomidu (21 pacijenta) u poređenju sa odsustvom njihove primene (p vrednost < 0.001 ; $HR=1.622$, 95% CI 1.382–1.904) (Ahmadloo i sar., 2013). Takođe, prema rezultatima studije koju su izveli Brandes i saradnici, ukupno vreme preživljavanja pacijenata sa TMZ tretmanom je bilo je značajno duže u odnosu na BCNU grupu pacijenata (15.9 meseci u odnosu na 11.5 meseci) (Brandes i sar., 2008).

Navedeni zaključci su potvrđeni statističkom obradom podataka za grupu pacijenata obuhvaćenu ovim istraživanjem. Statističkom analizom primenom univarijantnog Cox-ovog regresionog modela, dokazana je korelacija između primene različitih vidova adjuvantne terapije (TMZ, PCV i BCNU) i ukupnog vremena preživljavanja pacijenata ($p < 0.0001$, $HR = 0.1639$, 95% CI – 0.0779 – 0.3448) (tabela 11). Takođe, utvrđeno je postojanje značajnih razlika između TMZ i PCV grupe pacijenata ($KW-H(1,22) = 10.206$, $p = 0.0014$; $\text{Log-Rank} = -1.95714$ $p = .05033$), kao i TMZ i BCNU grupa ($KW-H(1,25) = 15.4282$, $p = 0.00009$; $\text{Log-Rank} = -3.57924$ $p = .00034$) (Slike 37 i 38). Takve razlike nisu otkrivene upoređivanjem PCV i BCNU grupa pacijenata. Ovakvi rezultati potvrđuju superiornost primene adjuvantne TMZ terapije u poređenju sa BCNU i PCV režimima, koja je više puta dokumentovana (Vinjamuri i sar., 2009; Wick i Winkler, 2018).

Na osnovu zaključaka izvedenih na osnovu analize prognostičkog značaja spomenutih demografskih i kliničkih faktora, izvršena je odgovarajuća stratifikacija analizirane grupe pacijenata a zatim i njena redukcija na kohortu pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom tumorske mase.

5.2. Analiza molekularnih markera GBM

5.2.1. Kvalitet i integritet izolata genomske DNK

Uzorci tkiva fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafinske blokove (FFPE) predstavljaju važan izvor genetičkog materijala pacijenata pri brojnim molekularno-biološkim analizama. Međutim, visok stepen fragmentacije DNK molekula koji karakteriše FFPE uzorke može predstavljati izazov pri uspostavljanju optimalnih uslova MSP reakcije i umanjiti senzitivnost detekcije statusa metilacije ovom metodom. Savremeni kompleti reagenasa namenjeni izolaciji DNK iz FFPE uzoraka omogućili su dobijanje DNK izolata prihvatljivog kvaliteta i integriteta u poređenju sa sveže-zamrznutim uzorcima (FF), poboljšavajući uspeh njihove primene prilikom MSP analiza (Bonnet i sar., 2018; de Ruijter i sar., 2015; Mittempergher i sar., 2011). Proverom stepena degradacije DNK izolata metodom gel elektroforeze na 1% agaroznom gelu, utvrđen je visok stepen degradacije i prisustvo karakterističnih „razmaza“ na agaroznom gelu kod FFPE izolata (Slika 40.). Imajući to u vidu, prilikom MSP analize statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona u FFPE izvršena je dodatna optimizacija uslova MSP reakcije. Reakcija optimizacije je izvršena u skladu sa preporukama za prevazilaženje PCR inhibicije u FFPE uzorcima, koje su predstavili Dietrich i saradnici (Dietrich i sar., 2013). Variranjem koncentracije DNK matrice, količine $MgCl_2$ jona i temperature anilinga identifikovane su optimalne količine činioca PCR smeše - DNK matrice (125 ng) i enzima Taq polimeraze (4U).

5.2.2. Evaluacija statusa mutacije *IDH1/2*

Izocitrat-dehidrogenaze (IDH) 1 i 2 predstavljaju ključne metaboličke enzime zadužene za generisanje redukovano nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) čime se održava rezervoar redukovano glutaciona i peroksiredoksina u ćeliji (DeCordova i sar., 2020). Takođe, aktivnost ovih enzima ima ulogu u produkciji α -ketoglutarata, važnog supstrata brojnih enzima (Kaminska i sar., 2019). Pokazano je da mutacije *IDH1/2* predstavljaju jednu od glavnih molekularnih karakteristika niskogradusnih glioma (70-80%) ali i većine sekundarnih glioblastoma (Kaminska i sar., 2019).

Jedna od najznačajnijih mutacija *IDH1* gena u glioblastomima predstavlja *IDH1-R132H*, koja od 2016. godine predstavlja važan molekularni marker u Klasifikaciji tumora centralnog nervnog sistema predstavljenoj od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (Louis i sar., 2016). Pored gubljenja normalne katalitičke aktivnosti IDH1 enzima koje ima važnu ulogu u metaboličkoj adaptaciji ćelije, *IDH1-R132H* mutacija prouzrokuje i zadobijanje sposobnosti produkcije D-2-hidroksiglutarata (2HG). Prekomerna produkcija 2-HG u ćelijama kancera izaziva izmenu u metaboličkim putevima (Krebs-ovog ciklusa) i inhibiciju histonskih i DNK demetilaza, rezultujući globalnim epigenetičkim utišavanjem ekspresije gena odnosno CpG metilacionim fenotipom glioma (DeCordova i sar., 2020). Na taj način u ćelijama glioma dolazi do sprečavanja ćelijske diferencijacije i brojnih potencijalno onkogenih izmena povezanih sa interakcijom sa činiocima mikrosredine tumora, čija priroda nije razjašnjena do kraja (Huang, 2019; Kaminska i sar., 2019). Detekcija *IDH1/2* mutacija predstavlja važno sredstvo u postizanju preciznije klasifikacije glioma i boljeg predviđanja očekivanog vremena preživljavanja pacijenata. Prema navedenoj WHO klasifikaciji glioblastomi se mogu podeliti na *IDH-wt* GBM koji odgovaraju primarnim ili *de novo* GBM i *IDH-mut* GBM, koji predstavljaju sekundarne GBM nastale progresijom od astrocitoma nižeg gradusa (Kaminska i sar., 2019).

Gotovo sve tipove tumora oligoastrocitnog i oligodendrocitnog porekla i većinu sekundarnih GBM odlikuje prisustvo *IDH/2* mutacija, dok je kod primarnih GBM ova mutacija veoma retka (3% slučajeva) (Ichimura i sar., 2009). Ove mutacije se smatraju inicirajućim genetičkim događajima u nastanku glioma II i III WHO gradusa i sekundarnih glioblastoma (Kaminska i sar., 2019). Zahvaljujući ulozi *IDH1-R132H* u izazivanju CpG metilacionog fenotipa glioma, sekundarne glioblastome često odlikuje epigenetičko utišavanje funkcije *MGMT* gena. Zbog utišavanja funkcije *MGMT* terapijski odgovor na primenu alkilirajućih agenasa

(TMZ, derivati nitrozouree) biva znatno povoljniji, zbog čega su sekundarne glioblastome karakteriše znatno duže vremene preživljavanja (OS=31 mesec) u poređenju sa primarnim GBM (15 meseci) (Yan i sar., 2009).

Zbog opisanih funkcionalnih povezanosti mutacije *IDH1/2* i statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona, udružena evaluacija statusa ovih markera čini najzačajniju prognostičku i predikcionu molekularnu analizu glioblastoma, koja prevazilazi zaseban prognostički značaj ovih molekularnih markera (Kramář i sar., 2016; Molenaar i sar., 2014). U vezi s tim, Molenaar i saradnici su, na uzorku od 98 GBM pacijenata, izvršili genetičku stratifikaciju pacijenata na osnovu genetičkog i epigenetičkog statusa *IDH1* i *MGMT* gena (Molenaar i sar., 2014). Između tri formirane grupe pacijenata, najduže vreme preživljavanja odlikovalo je grupu sa pozitivnim statusom *IDH1-R132H* mutacije i pozitivnim statusom metilacije *MGMT*. Sledeća grupa po dužini vremena preživljavanja bila je grupa pacijenata sa pozitivnim statusom *IDH1-R132H* i odustvom metilacije *MGMT*, dok je grupu pacijenata kod kojih je ustanovljeno udruženo odsustvo *IDH1-R132H* mutacije i metilacije *MGMT* odlikovalo najkraće vreme preživljavanja. Prekomerna ekspresija *MGMT* javlja se u 60% slučajeva GBM, a evaluacija njegovog epigenetičkog utišavanja putem metilacije promotornog regiona ima ulogu snažnog i pouzdanog predikcionog i prognostičkog faktora kod primarnih (*IDH1/2wt*) GBM, kao i starijih uzrasnih kategorija pacijenata (Radke i sar., 2019; Taylor i Schiff, 2015).

Određivanje prisustva *IDH1/2* mutacije metodom Sangerovog sekvenciranja predstavljalo je početnu etapu ispitivanja prognostičkog značaja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona u ovom istraživanju. Ono je izvršeno je u cilju klasifikacije GBM na primarne (*IDH1wt*) i sekundarne (*IDH1mut*) GBM u cilju formiranja *IDH1* homogenih kohorti. Najpre je, korišćenjem odgovarajućih setova oligonukleotida i DNK izolata iz FF uzoraka tumora, izvršena PCR amplifikacija egzona 4 *IDH1* gena u cilju detekcije *IDH1-R132H* mutacije i egzona 4 *IDH2* u cilju detekcije mutacija u kodonima R172 i R140. Nakon njihovog sekvenciranja, softverskom obradom dobijenih rezultata utvrđen je visok nivo kvaliteta očitavanja rezultujućih DNK sekvenci ($71.16 \pm 1.88\%$ za *IDH1*) i ($75.18 \pm 12.95\%$ za *IDH2*). Upoređivanjem sa referentnom sekvencom preuzetom iz GeneBank® baze podataka, utvrđeno je prisustvo *IDH1-R132H* mutacije kod 3 pacijenta obuhvaćenih ovim istraživanjem. Histopatološke dijagnoze *IDH1-R132H* pozitivnih uzoraka bile su sa oligoastrocitomom (2 uzorka) i glioblastomom (1 uzorak). Ovakav rezultat poklapa se sa činjenicom da je kod 98%

uzoraka oligoastrocitoma prisutna *IDH1-R132H*, čime je potvrđena njihova histopatološka klasifikacija (Watanabe i sar., 2009). Takođe, registrovana niska učestalost sekundarnih GBM u ispitivanoj grupi GBM pacijenata u saglasju je sa niskom učestalošću sekundarnih GBM (5% GBM pacijenata) dokumentovanom u ranijim istraživanjima (Molenaar i sar., 2014).

Poznato je da je prisustvo *IDH1-R132H* mutacije povezano sa mlađim uzrasnim kategorijama pacijenata obolelih od glioma. U ovom istraživanju, srednje vreme preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom *IDH1-R132H* mutacije iznosilo je 41 ± 10.8 . Takav rezultat je u skladu sa činjenicom da je 90% *IDH1-R132H* mutacija u gliomima zabeleženo kod pacijenata mlađih od 55 godina (Robinson C i Kleinschmidt-DeMasters, 2017).

U poređenju sa OS vremenom *IDH1-R132H* grupe pacijenata (17 meseci), *IDHwt* pacijente je odlikovalo kraće vreme preživljavanja (7.7 ± 6.87 meseci), čime je potvrđena dobro dokumentovana korelacija pozitivnog statusa mutacije *IDH1-R132H* i dužeg vremena preživljavanja GBM pacijenata (Molenaar i sar., 2014; Tabei i sar., 2021).

Pokazano je da je kod GBM pacijenata sa pozitivnim statusom *IDH1-R132H* mutacije, u velikom udelu (57%) udružen sa hipermetilacijom *MGMT* promotornog regiona (Li i sar., 2016). U skladu s tim, kod svih pacijenata sa utvrđenim pozitivnim statusom *IDH1-R132H* mutacije detektovan je pozitivan status metilacije *MGMT* promotornog regiona, kako konvencionalnom MSP analizom, tako i Real-Time kvantitativnom MSP metodom. Poznato je da je ovakav dvostruko pozitivan genotip korelisan sa najdužim vremenom preživljavanja GBM pacijenata u poređenju sa preostale dve kombinacije statusa *IDH1/MGMT* molekularnih markera, što je potvrđeno i u ovom istraživanju (Molenaar i sar., 2014).

Analizom sekvenci egzona 4 *IDH2* gena svih pacijenta obuhvaćenim ovim istraživanjem i njihovim upoređivanjem sa referentnom sekvencom iz GeneBank[®] baze podataka nije utvrđeno prisustvo najznačajnijih mutacija *IDH2* (*R140* i *R172*) u ispitivanoj grupi. Uzimajući u obzir veličinu ispitivane grupe, kao i činjenicu da je ranije zabeležena učestalost ovih mutacija u GBM izuzetno niska (3.3%), takav rezultat je bio očekivan (Koh i sar., 2014).

5.2.3. Evaluacija statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona

Gen za enzim O⁶-metilguanin-DNK transferazu (*MGMT*) smešten je na q kraku hromozoma 10 (10q26). Njegova osnovna funkcija ogleda se u reparaciji DNK oštećenja nastalih dejstvom alkilirajućih agenasa koja rezultuju alkilacijom O⁶ pozicije guanina u molekulu DNK. Takvom aktivnošću, *MGMT* je direktno suprotstavljen dejstvu alkilirajućih hemoterapeutskih agenasa poput TMZ i derivata nitrozouree koji kroz alkilaciju DNK molekula deluju citotoksično na ćelije tumora (Mansouri i sar., 2019). Kako većinu GBM ćelija odlikuje gubitak q kraka hromozoma 10, aktivnost ovog enzima u ćelijama GBM zavisi od preostalog *MGMT* alela. Pokazano je da epigenetička modifikacija CpG ostrva u okviru promotornog regiona preostalog *MGMT* alela utišava aktivnost ovog gena u ćelijama GBM, rezultujući boljim terapijskim odgovorom na primenu alkilirajućih agenasa (Mansouri i sar., 2019). Zbog toga evaluacija statusa metilacije *MGMT* u okviru *DMT1* i *DMT2* regiona *MGMT* promotora predstavlja jedan od najvažnijih prognostičkih faktora GBM i faktora predikcije odgovora na terapiju alkilirajućim agensima.

5.2.3.1. Konvencionalna MSP analiza

Metoda konvencionalne MSP analize predstavlja jednu od najčešćih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT*, čija je upotreba dokazana brojnim istraživanjima i randomizovanim kliničkim ispitivanjima (Hegi i sar., 2005; Mansouri i sar., 2019; Xia i sar., 2016). Ovu tehniku, koja se zasniva na bisulfitnoj konverziji citozina u uracil u DNK izolatima tumora, opisali su prvi put 1996. godine Herman i saradnici (Herman i sar., 1996). Nakon bisulfitne konverzije, ona podrazumeva PCR amplifikaciju upotrebom specifičnih parova oligonukleotida dizajniranih da obuhvate metilovanu ili nemetilovanu formu višestrukih CpG pozicija unutar promotornog regiona *MGMT* (*DMT2*) (Mansouri i sar., 2019). Nakon PCR amplifikacije, izvršava se vizuelizacija umnoženih PCR produkata metodom gel-elektroforeze radi kvalitativne interpretacije signala metilacije (Mansouri i sar., 2019). Iako je pokazano da rezultati dobijeni upotrebom metode konvencionalne MSP analize imaju prognostičku i prediktivnu vrednost, nju odlikuje manja pouzdanost u odnosu na druge metode poput qMSP i pirosekvenciranja, naročito

pri analizi FFPE uzoraka tumora (Yu i sar., 2020). Sve više dokaza govori u prilog činjenici da je ekspresija *MGMT* proteina zavisna od stepena metilacije *MGMT*, pri čemu registrovani nivo metilacije u uzorcima visokogradusnih glioma varira između 20-45% (Yu i sar., 2020). Uzimajući to u obzir, javila se potreba za prevazilaženjem nedostataka kvalitativne evaluacije statusa *MGMT* konvencionalnom MSP metodom, odnosno njenim unapređenjem u semi-kvantitativnu metodu. U tom cilju, predstavljena je semi-kvantitativna varijanta konvencionalne MSP koja podrazumeva softversku obradu snimaka u ImageJ programu kojom se postiže merenje intenziteta fluorescencije metilovanih odnosno nemetilovanih PCR produkata na snimcima elektroforetskih gelova. Upoređivanjem njihovih intenziteta, omogućena je semikvantitativna podela signala metilacije na nemetilovane ($M/U=0$), slabo metilovane ($M/U<1$) i jako metilovane ($M/U>1$) (Chen i sar., 2020; Hegi i sar., 2005).

5.2.3.1.1. Kvalitativni MSP

U ovom istraživanju, kvalitativna evaluacija statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona prema ranije opisanom protokolu, izvršena je za ukupno 37 FF uzoraka uključujući i kontrolne uzorke. Od toga, 19 (55.88%) uzoraka GBM i visokogradusnih glioma ocenjeno je pozitivno na status metilacije *MGMT*, dok je 15 uzoraka (44.12%) ocenjeno negativno. Kontrolni uzorci hemangiopericitoma, meningioma i leukocita periferne krvi ocenjeni su negativno na prisustvo metilacije u promotornom regionu *MGMT*. Kako grupe pacijenata formirane na osnovu kvalitativnog statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona nije odlikovala statistički značajna razlika u ukupnim vremenima preživljavanja, pristupljeno je dodatnoj homogenizaciji ispitivane kohorte pacijenata. Uzimajući u obzir potvrđene razlike u vremenima preživljavanja različitih grupa pacijenata u zavisnosti od demografskih i kliničkih prognostičkih faktora, kao i rezultate iz ranijih istraživanja, ispitivana grupa je svedena na *IDHwt* grupu pacijenata starijih od 50 godina. Iz takve grupe je potom isključena grupa pacijenata sa izvršenom biopsijom kao jedinim vidom hirurške intervencije (Malmström i sar., 2012; Radke i sar., 2019; Wick i sar., 2012). Unutar preostale grupe koju je činilo 17 pacijenata, kod 7 (41.18%) je detektovan pozitivan status metilacije promotornog regiona *MGMT*. Iako je izračunata srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* bila veća (8.43 ± 5.8 meseci) u poređenju sa grupom pacijenata sa negativnim statusom (5.6 ± 3.98 meseci), prema parametrima

Kruskal-Wallis testa takva razlika nije bila statistički značajna. Međutim, Kaplan-Meier kumulativne krive preživljavanja i rezultati Log-Rank testa ($p=0.35$), upućivali su na mogućnost korelacije statusa metilacije *MGMT* i vremena preživljavanja pacijenata unutar ispitivane grupe.

5.2.3.1.2. Semi-kvantitativni MSP

Kako bi se unapredila pouzdanost rezultata evaluacije statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* konvencionalnom MSP metodom u ovoj studiji, gel-elektroforetski snimci MSP amplifikacije *uMGMT* i *mMGMT* produkata podvrgnuti su semi-kvantitativnoj analizi. Ugledajući se na protokol koji su predstavili Christians i saradnici, vršeno je registrovanje nivoa fluorescencije MSP produkata u ImageJ programu u cilju dobijanja M/U odnosa intenziteta traka koji oslikava relativni odnos količine metilovane i nemetilovane forme promotornog regiona *MGMT* uzorku (M/U odnos) (Christians i sar., 2012). U cilju potencijalnog poboljšanja izvorne semi-kvantitativne metode, izvršena je evaluacija statusa metilacije na dodatna dva načina koja predstavljaju njenu modifikaciju prilagođenu po ugledu na qMSP metode evaluacije (Håvik i sar., 2012; Parrella i sar. 2012).

Prva modifikacija (označena kao PMR1) uključivala je normalizaciju intenziteta fluorescencije *mMGMT* produkta *ALU C4* signalom, a zatim njegovo upoređivanje sa referentnom metilovanom kontrolom u cilju dobijanja procentualne (PMR) vrednosti stepena metilacije. Drugi način (nazvan PMR2) podrazumevao je *ALU C4* normalizaciju M/U odnosa intenziteta fluorescencije za svaki uzorak, a zatim upoređivanje sa *ALU C4* normalizovanim M/U odnosom u referentnoj metilovanoj kontroli.

5.2.3.1.3. Semi-kvanitativna evaluacija na osnovu M/U odnosa intenziteta fluorescencije MSP produkata

Nakon obrade elektroforetskih snimaka korišćenjem ImageJ programa prema originalnoj metodi koji su predstavili Christians i saradnici, u okviru kohorte od 17 pacijenata definisane prilikom kvalitativne MSP analize, kod 10 pacijenata ustanovljeno je potpuno odsustvo metilacije ($M/U=0$), kod 3 pacijenta ustanovljen je nizak nivo metilacije, dok je kod 4 pacijenta registrovan visok nivo metilacije ($M/U>1$) promotornog regiona *MGMT*. U skladu sa tvrdnjom da je vreme preživljavanja GBM pacijenata korelisano sa stepenom metilacije *MGMT*

promotornog regiona, a ne njegovom kvalitativnom ocenom, najduže vreme preživljavanja (11 meseci) registrovano je kod pacijenata sa hipermetilovanim statusom metilacije ($M/U > 1$). Stratifikacija pacijenata na osnovu semi-kvantitativnog stepena metilacije *MGMT* rezultovala je povoljnijim parametrima Kruskal-Walis i Log-Rank testova. Tako je pri upoređivanju ukupnog vremena preživljavanja hipermetilovane ($M/U > 1$) i nemetilovane ($M/U = 1$) grupe Kruskal-Wallis testom, kao i njihovih Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja, dobijena p vrednost bila veoma bliska kritičnoj vrednosti praga značajnosti od 0.05 ($p = 0.06$), ukazujući na njihovu razliku. Međutim, takav rezultat nije dobijen prilikom upoređivanja slabo-metilovane ($M/U < 1$) i nemetilovane grupe pacijenata. Zbog toga bi grupa pacijenata sa niskim stepenom metilacije *MGMT* ($M/U < 1$) mogla biti svrstana u tzv. “sivu” ili “dvosmislenu” zonu blizu granične vrednosti, analognu “sivoj zoni” opisanoj pri kvanitativnim metodama evaluacije statusa metilacije poput qPCR i metoda hromatinske imunoprecipitacije (Bady i sar., 2012; Mansouri i sar., 2019).

5.2.3.1.4. “PMR1” i “PMR2” semi-kvantifikacija signala metilacije

Modifikacije PMR1 i PMR2 originalne semi-kvantitativne metode koju su predstavili Christians i saradnici rezultovale su međusobno identičnom klasifikacijom pacijenata u tri grupe različitog stepena metilacije *MGMT* ($PMR = 0$, $PMR < 1$ i $PMR > 1$). Visoka vrednost međuklasnog korelacionog koeficijenta ($ICC = 0,844$) između komplementarnih merenja PMR1 i PMR2 metode govori o jakom podudaranju dobijenih rezultata. Ispitivana grupa od 17 pacijenata je, upotrebom modifikovanih metoda klasifikovana na sledeći način:

- Deset (10) pacijenata sa negativnom ocenom statusa metilacije *MGMT* ($PMR = 0$), što se u potpunosti podudara sa rezultatima kvalitativne MSP analize i originalnom (M/U) semi-kvanitativnom metodom.
- Jedan (1) pacijent sa slabo-metilovanom ocenom statusa metilacije *MGMT* ($PMR < 1$). Isti pacijent je ocenjen kao pozitivno metilovan prilikom kvalitativne MSP evaluacije, odnosno slabo metilovan prilikom semi-kvantitativne evaluacije M/U metodom.
- Šest (6) pacijenata sa jako-metilovanom (hipermetilovanom) ocenom statusa metilacije *MGMT* ($PMR > 1$). Od toga je 2 pacijenta ocenjeno kao slabo

metilovano na osnovu rezultata izvorne (M/U) semi-kvantitativne metode konvencionalne MSP.

Vreme preživljavanja pacijenata sa hipermetilovanim statusom metilacije *MGMT* bilo je najduže u okviru ispitvane grupe (9.17 ± 5.98 meseci). Statistički parametri dobijeni upoređivanjem srednjih vrednosti ukupnog vremena preživljavanja i kumulativnih kriva preživljavanja hipermetilovane ($PMR > 1$) i nemetilovane ($PMR = 1$) grupe Kruskal-Wallis odnosno Log-Rank testom bili su veoma blizu praga značajnosti. Vrednost statističkih parametara pri analizi rezultata izvorne semi-kvantitativne MSP metode bila je povoljnija u odnosu na njene „PMR“ modifikacije.

5.2.3.2. Kvalitativni MSP FFPE uzoraka

Rezultati kvalitativne *MGMT* MSP evaluacije FFPE uzoraka u potpunosti su se poklopili sa *MGMT* MSP analizom 20 FF uzoraka, dodatno potvrđujući validnost prethodno izvršene evaluacije statusa metilacije *MGMT* u FF uzorcima. Kako je ukupno 10 pacijenata je pripadalo grupi starijih od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, verovatnoća dobijanja validnih statističkih zaključaka bila je veoma umanjena. U okviru te grupe pacijenata, srednje vreme preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* (7.8 ± 6.18 meseci) bilo je duže u odnosu na pacijente sa negativnim statusom metilacije *MGMT* (4.8 ± 5.0 meseci). Upoređivanjem ukupnog vremena preživljavanja i Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja u zavisnosti od statusa metilacije, nije utvrđena statistički značajna razlika između ovih grupa pacijenata. Sličnost rezultata dobijenih kvalitativnom MSP analizom FFPE uzoraka sa rezultatima dobijenim kvalitativnom analizom MSP u FF uzorcima upućuje na potencijalni nedostatak senzitivnosti kvalitativne MSP metode u prepoznavanju lažno pozitivnih uzoraka, koji je naglašavan i u literaturi (Mansouri i sar., 2019).

5.2.3.3. Semi-kvantitativni MSP FFPE uzoraka

Između dve ImageJ opcije merenja intenziteta MSP produkata na elektroforetskim snimcima, „analyze gels“ opcija je rezultovala nešto većim stepenom podudaranja FFPE rezultata sa rezultatima semi-kvantitativne analize FF uzoraka konvencionalnom MSP metodom, ($ICC = 0.5169$). Tako nizak međuklasni korelacioni koeficijent može objasniti zapažanje da je, od ukupno 20 uzoraka čiji je FF uzorak takođe podvrgnut MSP analizi, njih 8 drugačije okarakterisano prema semi-kvantitativnom stepenu metilacije u poređenju sa odgovarajućim FF parnjakom. Pritom je broj uzoraka sa nemetilovanom ocenom statusa ostao potpuno isti, a razlike su se ogledale u razvrstavanju uzoraka u slabo metilovanu ($M/U > 1$) odnosno jako metilovanu ($M/U < 1$) kategoriju. Odstupanje vrednosti M/U odnosa dobijenog analizom FFPE uzoraka od odgovarajućih MSP FF rezultata može se objasniti zapažanjem da je apsolutna vrednost intenziteta fluorescencije FFPE MSP produkata na gelu bila i do tri puta slabija u poređenju sa intenzitetom MSP produkata dobijenih analizom FF uzoraka (Slika 63.). Zbog toga je fluorescencija pozadinskog signala više ometala preciznost merenja intenziteta traka na gelu u poređenju sa kvalitativnom FF MSP analizom, navodeći na pogrešno razvrstavanje onih uzoraka kod kojih je apsolutna vrednost intenziteta fluorescencije traka na gelu bila niska. Uprkos dodatnoj optimizaciji uslova MSP reakcije za amplifikaciju *MGMT* produkata u uzorcima FFPE, primećeno je veliko variranje u kvalitetu dobijenih signala na snimcima gela (Slika 65.). Ovakvi rezultati potvrđuju nepouzdanost evaluacije statusa metilacije *MGMT* promotora konvencionalnom MSP metodom u FFPE uzorcima, koja se često naglašava u literaturi (Mansouri i sar., 2019).

Semi-kvantitativnom MSP analizom FFPE uzoraka u ovoj studiji detektovano je 10 nemetilovanih ($M/U = 1$), 8 slabo metilovanih uzoraka ($M/U < 1$) i 2 jako metilovana uzorka ($M/U > 1$). Od toga je 10 pacijenata potpadalo u grupu pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili kompletnom resekcijom tumorske mase. U okviru takve grupe nije uočena razlika u vremenu preživljavanja između nemetilovane i slabo metilovane grupe pacijenata. Međutim, jedini pacijent sa hipermetilovanom ocenom statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* odlikovao se značajno dužim vremenom preživljavanja (18 meseci) u odnosu na preostale pacijente iz nemetilovane i slabo-metilovane grupe ($4.84.8 \pm 5$ odnosno 5.25 ± 2.75).

Na osnovu analize FFPE uzoraka izvedene u ovom istraživanju, može se zaključiti da je semi-kvantitativna evaluacija pozitivnog statusa metilacije najpouzdanija u detekciji hipermetilovanih uzoraka ($M/U > 1$), dok je slabije metilovane uzorke koji se mogu smatrati „dvosmislenim“ preporučljivo analizirati senzitivnijom metodom poput qMSP.

5.2.3.4. qMSP evaluacija statusa metilacije promotornog regiona MGMT

5.2.3.4.1. Semikvantitativni qMSP – ΔC_t metoda

Evaluacija statusa promotornog regiona *MGMT* semi-kvantitativnom qMSP metodom koju su predstavili Yoshioka i saradnici 2018. godine, izvršena je za 40 FF uzoraka visokogradusnih glioma, kao i tri kontrolna uzorka (meningioma, hemangiopericitoma i leukocita periferne krvi) (Yoshioka i sar. 2018). Od toga je kod 24 pacijenata detektovano prisustvo metilovane varijante *mMGMT* analizom grafika krive topljenja PCR produkata (Slika 72.). Preostalih 16 uzoraka, uključujući i kontrolne uzorke, ocenjeno je negativno na prisustvo metilacije promotornog regiona *MGMT*. Navedeni udeo metilovanih uzoraka bio je blizak učestalosti prisustva metilacije *MGMT* promotora u uzorcima GBM koja iznosi 44.27% prema podacima dostupnim u literaturi (Zhang i sar., 2013).

Izračunavanjem ΔC_t vrednosti - razlike između C_t vrednosti *mMGMT* i *uMGMT* produkata, a zatim njenim upoređivanjem sa graničnom ΔC_t vrednošću izvršena je semi-kvantitativna evaluacija nivoa metilacije kod 24 (60%) uzoraka kod kojih je detektovano prisustvo odgovarajućeg *mMGMT* qMSP produkta.

Prema protokolu predstavljenom u referentnoj studiji, nekoliko ΔC_t graničnih vrednosti uzimano je u obzir pri semi-kvantitativnoj oceni statusa metilacije *MGMT* ($\Delta C_t=0$; $\Delta C_t=1$; $\Delta C_t=2$; $\Delta C_t=4$) (Yoshioka i sar., 2018). Dobijeni rezultati za svaku od ΔC_t graničnih vrednosti su potom međusobno upoređivani.

Po uzoru na konvencionalnu MSP analizu, izvršena je statistička obrada podataka uzimajući u obzir ΔC_t rezultate dobijene za grupu pacijenata starijih od 50 godina sa izvedenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom ($n=21$). Njihovom prezentacijom na dijagramu rasejanja u zavisnosti od ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata može se uočiti obrnuto proporcionalna korelacija između ΔC_t vrednosti i vremena preživljavanja pacijenata. Ipak, treba naglasiti da parametrima linearne regresione analize kao i njenom statističkom

značajnošću ($p = 0.14$) nije nedvosmisleno potvrđena spomenuta korelacija, što može biti posledica male veličine ispitivane populacije pacijenata.

Sve granične ΔC_t vrednosti, osim $\Delta C_t=4$, rezultovale su prisustvom statistički značajnih razlika u ukupnom vremenu preživljavanja između grupa pacijenata formiranim na osnovu semi-kvantitativne ocene prisustva metilacije *MGMT* promotornog regiona. Pritom su najpovoljniji statistički parametri uočeni prilikom uzimanja $\Delta C_t = 2$ za graničnu vrednost razlučivanja prisustva metilacije *MGMT* u analiziranim uzorcima (KW-H(1,21) = 8.6925, $p = 0.0032$; Log Rank = -2.37051 $p = .01776$). Srednja vrednost ukupnog vremena preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* iznosilo je 9.6 ± 4.32 meseci odnosno 4.27 ± 3.37 meseci sa nemetilovanim *MGMT* statusom. Takva razlika je u skladu sa rezultatima prijavljenim u ranijim studijama koje su se odnosile na prognostički i prediktivni značaj stepena metilacije *MGMT* promotora kod GBM pacijenata kao i *IDH1wt* homogene kohorte GBM pacijenata (Radke i sar., 2019; Zhang i sar., 2013). Upoređivanje kumulativnih kriva preživljavanja metilovane i nemetilovane grupe pacijenata Log-Rank testom, pokazana je statistički značajna razlika u vremenima preživljavanja, što potvrđuje prognostički značaj semi-kvantitativnog statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona ΔC_t metodom kod pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom.

5.2.3.4.2. Kvantitativni qMSP – PMR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metoda

Real-Time qMSP metoda bazirana na SYBR-Green ili TaqMan tehnologiji predstavlja (pored pirosekvenciranja) jednu od najpouzdanijih i najčešće korišćenih metoda kvantitativne evaluacije metilacije *MGMT* promotornog regiona u kliničkim istraživanjima i randomizovanim kliničkim ispitivanjima. (Dunn i sar., 2009; Hattermann i sar., 2008; Johannessen i sar., 2018; Malmström i sar., 2012; Mansouri i sar., 2019; Parrella i sar., 2009; Vlassenbroeck i sar., 2008). Kvantitativni qMSP pristup evaluaciji nivoa metilacije *MGMT* promotornog regiona podrazumeva normalizaciju relativnog broja kopija metilovanog *MGMT* PCR produkta nivoom ekspresije endogene kontrole - „housekeeping“ gena poput gena za beta aktin (*ACTB*) ili *ALU-C4* sekvence (Håvik i sar., 2012; Mansouri i sar., 2019). Poput konvencionalne MSP metode, qMSP karakteriše nemogućnost detekcije nepotpunih „mozaičnih“ šablona metilacije promotornog regiona *MGMT*, već jedino potpuno metilovanih DNK sekvenci (Mansouri i sar.,

2019). Još jedan njen nedostatak predstavlja niska pouzdanost rezultata prilikom analize FFPE uzoraka, zbog čega je qMSP metoda u ovom istraživanju iskorišćena za analizu isključivo FF uzoraka tumora.

Kvantitativna analiza qMSP metodom u ovom istraživanju izvršena je prilagođavanjem qMSP Real-Time PCR metode bazirane na „TaqMan“ tehnologiji koju su predstavili Havik i saradnici qMSP analizi baziranoj na Sybr-Green PCR tehnologiji. Pritom su upotrebljavana dva „PMR“ pristupa tzv. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ analizi.

Prvi PMR pristup prilagođavanju metode se sastojao u kvantitativnoj evaluaciji metilacije promotornog regiona *MGMT* putem izračunavanja procentualnog udela nivoa amplifikacije *mMGMT* produkta u odnosu na referentnu pozitivnu kontrolu, odnosno generisanjem PMR vrednosti - “procenta metilovane reference”. Nivo amplifikacije *mMGMT* normalizovan je stepenom *ALU C4* amplifikacije kao endogenom kontrolom, a dobijena PMR vrednost za kontrolni uzorak meningioma iskorišćena je za uspostavljanje granične (nulte) PMR vrednosti.

Korišćenjem ove metode, udeo pozitivno ocenjenih uzoraka na prisustvo *MGMT* metilacije u ispitivanoj grupi od 40 pacijenata iznosio je 50%, čime je pokazan visok stepen poklapanja sa očekivanim udelom metilovanih uzorka među pacijentima obolelim od GBM (44.27%) (Zhang i sar., 2013). Među pacijentima starijim od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase, detektovano je 14 uzoraka sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* promotora i 6 uzoraka sa negativnim statusom. Statistički značajne razlike između vremena preživljavanja ovih grupa pacijenata nisu utvrđene. Takođe, iako se na dijagramu rasejanja korelacije izmerenih PMR vrednosti za datu grupu pacijenata (n=21) može uočiti trend pozitivne korelacije očekivanog vremena preživljavanja pacijenata i detektovane PMR vrednosti, primenom linearne regresione analize nije dostignuta vrednost praga značajnosti od $p=0.05$. Dodatno, prvi pristup kvantitativnoj qMSP evaluaciji statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* pokazao je nizak stepen sličnosti sa konvencionalnom - kvalitativnom analizom (razlika u evaluaciji 22.22% uzoraka; ICC=0.5586). U cilju redukovanja broja pogrešno ocenjenih uzoraka primenom prvog PMR pristupa, izvršena je kalibracija dobijenih rezultata relativnim odnosom količine PCR produkta nemetilovane forme *MGMT* (*uMGMT*) (drugi pristup PMR kvantifikaciji).

Drugi pristup PMR kvantifikaciji stepena metilacije dodatno je uključivao i relativnu kvantifikaciju nemetilovanog *uMGMT* produkta u ispitivanim uzorcima. Tako je za svaki uzorak

izračunavan relativni odnos količine PCR produkta nemetilovane forme *MGMT* (*uMGMT*) i količine nemetilovanog produkta u referentnom kontrolnom uzorku meningioma. Dobijene $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrednosti za *mMGMT* i *uMGMT* korišćene su za relativnu kvantifikaciju *mMGMT* i *uMGMT* u uzorku.

Uključivanjem *uMGMT* signala radi kalibracije PMR vrednosti, detektovano je ukupno 17 (42.5%) uzoraka sa pozitivnim statusom metilacije promotornog regiona *MGMT*, što predstavlja izuzetno blisku vrednost očekivanoj zastupljenosti prisustva metilacije kod GBM pacijenata (44.27%) (Zhang i sar., 2013). Takođe, dobijeni linearni regresioni model prezentovan na dijagramu rasejanja (Slika 90.) sa većom verovatnoćom opisuje korelaciju ukupnog vremena preživljavanja i PMR vrednosti od $p=0.12$ u poređenju sa linearnom regresionim modelom konstruisanim na osnovu rezultata prvog pristupa izračunavanju PMR vrednosti.

Analizom podataka o OS vremenu preživljavanja dve kategorije pacijenata u zavisnosti od statusa metilacije – metilovanog i nemetilovanog i uzimanjem $PMR=0$ vrednosti kao granične vrednosti, nije ustanovljena statistički značajna razlika između dve grupe pacijenata. Međutim, ukupno vreme preživljavanja hipermetilovane grupe pacijenata ($PMR>100\%$) bilo je značajno duže (11.25 ± 6.55 meseci) u odnosu na udružene grupe pacijenata sa nemetilovanim i slabo metilovanim statusom metilacije (5.93 ± 3.62 meseci). Takva razlika je potvrđena njihovim upoređivanjem Kruskal-Wallis testom ($KW-H(1,20) = 3.1167$, $p = 0.0789$), kao i upoređivanjem Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja Log-Rank testom ($\text{Log Rank} = -1.75585$, $p = .07911$), pri čemu su dobijene p vrednosti bile izuzetno blizu praga značajnosti od $p=0.05$.

Ovakav rezultat ukazuje na pozitivnu korelaciju stepena metilacije *MGMT* promotornog regiona i ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata prisutnu u literaturi (Radke i sar., 2019; Sciuscio i sar., 2011). U referentnom istraživanju koje su sprovedli Havik i saradnici pri definisanju nulte PMR vrednosti korišćena je srednja PMR vrednost dobijena analizom 4 kontrolnih uzoraka meningioma, dok je u ovom istraživanju korišćen jedan uzorak meningioma (nije bilo drugih dostupnih uzoraka). Zbog toga je broj dvosmislenih rezultata qMSP analize bio nesumnjivo veći u ovom istraživanju u poređenju sa referentnim istraživanjem. Ovim se može objasniti svođenje opsega pouzdane detekcije pozitivnog statusa metilacije na grupu hipermetilovanih ($PMR>100$) uzoraka u ovom istraživanju.

5.2.3.5. Sumarna analiza evaluacije statusa promotornog regiona *MGMT*

Nakon upoređivanja rezultata dobijenih različitim pristupima, potvrđen je pozitivan status metilacije kod 24 pacijenata obuhvaćenim ovim istraživanjem (53%), dok je kod 21-og pacijenta (47%) utvrđen negativan status metilacije *MGMT*. Navedeni udeo pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije *MGMT* u srpskoj populaciji je u skladu sa rezultima ranije izvedene studije u kojoj je zabeležen udeo od 45.1% pozitivno metilovanih pacijenata na uzorku od 63 pacijenata (Ilić, 2017). U navedenoj studiji je vršena evaluacija statusa metilacije *MGMT* konvencionalnom MSP metodom, a dobijeni rezultati nisu ukazali na njegov prognostički značaj u srpskoj populaciji pacijenata (Ilić, 2017).

Od toga, 24 pacijenata pripadalo je grupi pacijenata starijih od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom. Kod 12 pacijenata iz te grupe detektovano je odsustvo metilacije *MGMT* promotornog regiona primenom svih navedenih metoda i pristupa evaluaciji korišćenih u ovom istraživanju. Kod 7 pacijenata potvrđeno je prisustvo metilacije različitim metodama i pristupima, dok je kod preostalih 5 uzoraka detektovan pozitivan status metilacije, uz odsustvo poklapanja rezultata dobijenih različitim metodama.

Nakon isključivanja pacijenata sa dvosmislenim rezultatima evaluacije statusa metilacije *MGMT* iz ispitivane grupe, uočena je razlika u ukupnom vremenu preživljavanja pacijenata sa pozitivnim statusom metilacije (10 ± 6.28 meseci) i negativnim statusom (5.58 ± 4.07 meseci) koja je bila blizu kritičnoj vrednosti praga značajnosti ($KW-H(1,19) = 1.6555$, $p = 0.1982$). Sličan rezultat dobijen je upoređivanjem Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja Log-Rank testom ($\text{Log-Rank} = -1.38828$ $p = .16505$).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na „dozno zavisnu“ prirodu uticaja statusa metilacije *MGMT* koji je naglašavan u ranijim studijama (Dunn i sar., 2009; Mansouri i sar., 2019; Radke i sar., 2019; Sciuncio i sar., 2011). Do takvog zaključka navodi zapažanje da prilikom razvrstavanja uzoraka na osnovu kvalitativne MSP (i qMSP) dihotomizacije rezultata na uzorke sa „pozitivnim“ i „negativnim“ statusom metilacije, razlike u vremenima preživljavanja dobijenih grupa najčešće nisu pronalazene. Definisanjem dodatnih subkategorija (slabo i jako metilovanih grupa,) u okviru pozitivno ocenjenih uzoraka na prisustvo metilacije *MGMT* postignuto je statistički značajnije razdvajanje u odnosu na nemetilovanu grupu pacijenata. Na osnovu toga se može tvrditi da status metilacije *MGMT* predstavlja kontinualnu a

ne kategoričku prognostičku varijablu. Ranije je pokazano da dihotomizacija kontinualnih predikcionih faktora prilikom multipne regresione analize može proizvesti dvosmislene rezultate, zbog čega nije preporučljiva (Royston i sar., 2006).

Semi-kvantitativni pristupi MSP i qMSP analizi doprineli su povećanju senzitivnosti analize i unapređenju interpretacije vrednosti statusa metilacije *MGMT* promotora kod pacijenata obuhvaćenim ovim istraživanjem. Pri semi-kvantitativnoj modifikaciji MSP analize obradom snimaka gelova u ImageJ programu, pronađena je statistički značajna razlika između pacijenata sa visokim stepenom metilacije *MGMT* promotora ($M/U > 1$; $PMR > 100\%$) i grupe pacijenata sa nemetilovanim statusom ($M/U = 0$; $PMR = 0$). Pritom je statistički najznačajnije razdvajanje postignuto izvornom semi-kvantitativnom metodom koju su predstavili Christians i saradnici, u poređenju sa njenim "PMR" modifikacijama predstavljenim u ovom istraživanju (Christians i sar., 2012). Navedeni rezultat je takođe postignut prilikom analize *FFPE* uzoraka, gde je identifikovani "hipermetilovani" uzorak odlikovalo značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na ostatak analizirane grupe pacijenata.

Semi-kvantitativna qMSP analiza rezultata po protokolu iz publikacije čiji su autori Yoshioka i saradnici rezultovala je statistički značajnom razlikom u ukupnom vremenu preživljavanja između grupa pacijenta sa nemetilovanim i metilovanim *MGMT* promotornim regionom (Yoshioka i sar., 2018). Takođe, konstruisani dijagram rasejanja ΔC_t vrednosti i parametri linearnog regresionog modela ukazuju na to da je ukupno vreme preživljavanja pacijenata zavisno od nivoa metilacije promotornog regiona *MGMT*, u skladu sa iznesenim zaključkom u referentnoj studiji (Yoshioka i sar., 2018).

Iako je uzimanje $\Delta C_t = 2$ za graničnu vrednost razdvajanja metilovanih od nemetilovanih uzoraka rezultovala najpovoljnijim parametrima izvršenih statističkih testova u odnosu na druge granične vrednosti, $\Delta C_t = 0$ i $\Delta C_t = 1$ granične vrednosti su takođe rezultovale povoljnim statističkim parametrima prilikom upoređivanja ukupnog preživljavanja dobijenih grupa pacijenata.

Rezultati kvantitativne qMSP evaluacije upotrebom modifikovane metode koju su predstavili Havik i saradnici, takođe ukazuju na pozitivnu korelaciju stepena metilacije i ukupnog vremena preživljavanja pacijenata (grafik rasejanja *PMR* vrednosti, razlike u OS vremenima između $PMR = 0$ i $PMR > 100$ grupa pacijenata) (Håvik i sar., 2012).

Na osnovu navedenog, može se zaključiti korisnost definisanja ranije predloženih “sivih zona” qMSP analize, koje predstavljaju opseg oko definisane granične vrednosti u kome je niža verovatnoća donošenja validne ocene statusa metilacije *MGMT*. “Siva zona” semi-kvantitativne qMSP evaluacije izvedene u ovom istraživanju je bila u opsegu $\Delta Ct=0-4$ graničnih vrednosti, što znači da bi se uzorci sa $\Delta Ct>4$ vrednošću sa visokom sigurnošću mogli smatrati nemetilovanim, a uzorci sa $\Delta Ct<0$ metilovanim. Po istoj analogiji bi “siva zona” kvantitativne qMSP evaluacije bila smeštena unutar $0\%<PMR<100\%$ zone, a „siva zona“ semi-kvantitativne konvencionalne MSP unutar $0<M/U<1$ odnosno $0\%<PMR<100\%$ opsega vrednosti stepena metilacije *MGMT*. Upadljiva razlika u vremenu preživljavanja semi-kvantitativnih grupa na uzorku od 111 GBM pacijenata sa nemetilovanim i jako metilovanim *MGMT* promotornim regionom (13.4 naspurot 29.93 meseci) koje su uočili Radke i saradnici, može objasniti registrovanje statistički značajnih razlika u vremenu preživljavanja takvih grupa u okviru ovog istraživanja, uprkos malobrojnosti pacijenata u okviru ispitivane kohorte (Radke i sar, 2019). Sa druge strane, u navedenom istraživanju je na istom uzorku uočena manje izražena razlika u vremenu preživljavanja između nemetilovane i slabo-metilovane grupe pacijenata (13.4 u poređenju sa 17.9 meseci), pa je veličina ispitivanog uzorka u ovom istraživanju predstavljala limitirajući faktor njihovog razlikovanja, smeštajući uzorke sa “slabo metilovanom” ocenom u “sivu zonu” evaluacije. Zbog toga je uzorke sa dvosmislenom ocenom statusa preporučljivo dodatno analizirati senzitivnijim metodama, poput qMSP Real-Time analize bazirane na TaqMan tehnologiji ili pirosekvenciranjem, u skladu sa preporučenim algoritmom koji su predstavili Mansouri i saradnici (Mansouri i sar, 2019).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se tvrditi da je vreme preživljavanja pacijenata sa hipermetilovanim (jako metilovanim) statusom metilacije *MGMT* promotornog regiona bilo značajno duže u poređenju sa grupom pacijenata sa nemetilovanim statusom metilacije u okviru *IDHwt* homogene kohorte GBM pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom tumorske mase.

5.2.4. Evaluacija statusa metilacije promotornog regiona *CHI3L1*

CHI3L1 (YKL-40) predstavlja molekularni marker mezenhimalnog podtipa GBM koji promoviše lokalnu invazivnost i malignu transformaciju u gliomima, zbog čega je njegova prekomerna ekspresija povezana sa skraćanjem ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (Qin i sar., 2017; Zhang i sar., 2018). Nivo ekspresije *CHI3L1* predstavlja važan prognostički faktor glioblastoma, a inaktivacija njegove aktivnosti predstavlja jedan od važnijih potencijalnih pristupa u razvoju ciljane terapije glioma (Zhang i sar., 2018).

Rezultati meta-analize nivoa ekspresije *CHI3L1* dobijenih iz 8 studija kojim je obuhvaćen ukupno 1241 GBM pacijent utvrđena je statistički značajna korelacija između prekomerne ekspresije *CHI3L1* i skraćenja ukupnog vremena preživljavanja GBM pacijenata (HR = 1.46, 95%CI 1.33-1.61, $P < 0.001$) (Qin i sar., 2017). Nedavnim istraživanjima naglašena je mogućnost epigenetičkog utišavanja funkcije ovog gena i njegov prognostički uticaj na ukupno vreme preživljavanja GBM pacijenata (Tang i sar., 2020). Tako su Tang i saradnici otkrili da je nivo genske ekspresije *CHI3L1* negativno korelisan sa hipermetilacijom odgovarajućih promotornih regiona *CHI3L1*, a hipometilacija (demetilacija) promotornog regiona *CHI3L1* prikazana je kao specifični i visoko-osetljivi dijagnostički i prognostički marker GBM (Tang i sar., 2020). Chen i saradnici su 2020. godine ukazali na povezanost statusa metilacije *MGMT* i različitog uticaja prekomerne ekspresije *CHI3L1* u matičnim ćelijama GBM (Chen i sar., 2020). Prema rezultatima tog istraživanja, u prisustvu hipermetilovanog *MGMT* promotornog regiona, *CHI3L1* u GSCs deluje kao tumor-supresorni gen, dok u odsustvu hipermetilacije *MGMT*, *CHI3L1* deluje promovišuće na proces tumorigeneze. Kako bi se ispitala potencijalna prognostička uloga statusa metilacije *CHI3L1* u ovom istraživanju, izvršena je evaluacija nivoa metilacije promotornog regiona *CHI3L1* konvecionalnom MSP metodom. Dobijeni elektroforetski snimci gelova obrađivani su u ImageJ programu radi dobijanja semi-kvantitativnih vrednosti nivoa metilacije, po proceduri analognoj semi-kvantitativnoj analizi nivoa metilacije *MGMT* promotrnog regiona koji su predstavili Christians i saradnici (Christians i sar., 2012). Pri takvoj analizi su upotrebljavani specifični setovi oligonukleotida za metilovanu i nemetilovanu formu *CHI3L1* promotornog regiona, dizajnirani prilikom sličnog istraživanja koje su izveli Steponaitis i saradnici 2016. godine (Steponaitis i sar., 2016). Radi ispitivanja

udruženog prognostičkog značaja nivoa metilacije *MGMT* i metilacije *CHI3L1*, formirane su 4 grupe pacijenata na osnovu statusa metilacije ovih molekularnih markera GBM.

U ovom istraživanju, 28 pacijenata je imalo pozitivni status metilacije promotornog regiona *CHI3L1*, dok je kod 12 njih utvrđen negativan status u poređenju sa referentnim kontrolnim uzorkom leukocita periferne krvi zdrave osobe. Analizom dobijenih podataka, samostalni prognostički uticaj nivoa metilacije *CHI3L1* promotornog regiona nije utvrđen (KW-H(1,22) = 0.0998, $p = 0.7521$; Log-Rank = -.260840 $p = .79422$). Isti rezultat je dobijen redukcijom analizirane kohorte pacijenata na grupu pacijenata starijih od 50 godina sa izvršenom parcijalnom ili totalnom resekcijom tumorske mase (KW-H(1,22) = 0.0998, $p = 0.7521$; Log-Rank = -.260840 $p = .79422$). Ovakav rezultat može biti posledica heterogenosti i relativno male veličine ispitivanog uzorka, ali i potencijalne nadekvatnosti dizajniranih oligonukleotida za MSP amplifikaciju. Takođe, ovakvi rezultati mogu ukazivati na to da je aktivnost *CHI3L1* kontrolisana dodatnim regulacionim mehanizmima osim epigenetičke regulacije metilacijom promotornog regiona gena (cirkulišuće mikro RNK – miR-24; miR-449a, miR-342-3p) (Choi i sar., 2018; Deng i sar., 2017; Sarma i sar., 2012; Zhao i sar., 2020).

Radi ispitivanja potencijalne vrednosti udruženog prognostičkog efekta statusa metilacije promotornih regiona *MGMT* i *CHI3L1* gena, formirane su 4 grupe pacijenata u okviru *IDH1wt* homogene kohorte pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom tumorske mase. Kako je broj pacijenata uvrštenih u *uCHI3L1/mMGMT* i *uCHI3L1/uMGM* grupe bio mali (ukupno 5 pacijenata), statističkom upoređivanju su podvrgnute dve najbrojnije grupe pacijenata (*mCHI3L1/mMGMT* i *mCHI3L1/uMGMT*).

Statistički značajna razlika bliska vrednosti praga značajnosti od 0.05 dobijena je upoređivanjem srednjih vrednosti ukupnog vremena preživljavanja (KW-H(1,17) = 3.1279, $p = 0.0770$) i Kaplan-Meier kumulativnih kriva preživljavanja (Log-Rank = -1.59335 $p = .11108$) između nemetilovane *uMGMT* i metilovane *mMGMT* grupe pacijenata ocenjenih pozitivno na prisustvo metilacije promotornog regiona *MGMT*. Pritom je grupu pacijenata sa *mCHI3L1/mMGMT* statusom metilacije odlikovalo duže vreme preživljavanja (9.57 ± 5.38 meseci) u odnosu na grupu sa utvrđenim *mCHI3L1/uMGMT* statusom metilacije (5.2 ± 3.85 meseci). Ovakav rezultat može biti objašnjen pojavom da hipometilacija *CHI3L1* predstavlja nepovoljan prognostički faktor preživljavanja GBM pacijenata (Tang i sar., 2020). Svođenjem ispitivane grupe pacijenata na grupu sa metilovanim promotornim regionom *CHI3L1* poboljšana

je senzitivnost kvalitativnih i semikvalitativnih modifikacija MSP i qMSP metode, uz naglašavanje razlike u vremenima preživljavanja pacijenata između grupa sa pozitivnom i negativnom ocenom statusa metilacije *MGMT*. Korisnost udružene evaluacije statusa metilacije *CHI3L1* i *MGMT* potkrepljuju rezultati istraživanja Akiyama-e i saradnika iz 2014. Godine (Akiyama i sar., 2014). Tom prilikom je na modelu U87 glioblastoma ćelijskih linija rezistentnih na dejstvo Temozolomida pokazano da *CHI3L1* može biti dodatni molekularni faktor koji je, udruženo sa *MGMT*, odgovoran za rezistenciju na terapiju alkilirajućim agensima (Temozolomidom) u glioblastomima i njihovim recidivima (Akiyama i sar., 2014).

Navedeni rezultati su u skladu sa nedavno otkrivenom prirodom funkcionalne interakcije metilacije promotornog regiona *MGMT* i aktivnosti *CHI3L1*, po kome *CHI3L1* ima funkciju tumor-supresornog proteina u prisustvu hipermetlovanog *MGMT* u matičnim ćelijama GBM, dok u odsustvu *MGMT* hipermetilacije ima ulogu u promovisanju tumorigeneze (Chen i sar., 2020). Radi potvrde navedenih rezultata i donošenja pouzdanijih zaključaka, neophodno je izvršiti dodatna istraživanja na većem reprezentativnom uzorku, sa dodatkom preciznije analize genske ekspresije *CHI3L1*.

6. ZAKLJUČCI

1. Starost pacijenata, stepen resekcije tumora i tip primenjene adjuvantne hemioterapije predstavljaju nezavisne prognostičke faktore ukupnog vremena preživljavanja u srpskoj populaciji pacijenata obolelih od GBM.
2. Adjuvantni hemioterapijski protokol baziran na primeni Temozolomida rezultuje značajno dužim vremenom preživljavanja GBM pacijenata (14.63 ± 4.29 meseci) u poređenju sa protokolima baziranim na primeni derivata nitrozouree - PCV (7.45 ± 8.22 meseci) i BCNU (5.21 ± 2.99 meseci) režimima.
3. Registrovana učestalost prisustva *IDH1-R132H* mutacije u srpskoj populaciji GBM pacijenata u skladu je sa učestalošću *IDH1-R132H* mutiranih GBM (5% GBM pacijenata) dokumentovanom u dostupnoj literaturi.
4. Grupu pacijenata sa dokazanim prisustvom *IDH1-R132H* mutacije odlikuje mlađa uzrasna struktura, duže ukupno vreme preživljavanja u odnosu na *IDH1-wt* grupu GBM pacijenata, kao i pozitivan status metilacije *MGMT* promotornog regiona.
5. Semi-kvantitativne pristupe konvencionalnoj MSP metodi i Real-Time qMSP metodi baziranoj na SYBR Green tehnologiji karakteriše visoka pouzdanost detekcije nemetilovanih i jako metilovanih uzoraka, dok je uzorke sa dvosmislenim ocenama bliskih graničnoj vrednosti pozitivne detekcije neophodno analizirati pouzdanijim metodama.
6. Vreme preživljavanja pacijenata sa hipermetilovanim semi-kvantitativnim statusom metilacije *MGMT* promotornog regiona (11.25 ± 6.55 meseci) značajno je duže u poređenju sa grupom pacijenata sa nemetilovanim statusom metilacije (5.93 ± 3.62 meseci) u okviru *IDHwt* homogene kohorte GBM pacijenata starijih od 50 godina, sa izvršenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom tumorske mase.

7. Udruženo određivanje statusa metilacije *CHI3L1* i *MGMT* promotornih regiona uvećava senzitivnost kvalitativnih i semikvalitativnih pristupa konvencionalne MSP i “Real-Time” MSP metode, uz naglašavanje razlika u vremenima preživljavanja pacijenata između grupa sa pozitivnom i negativnom ocenom statusa metilacije *MGMT*. Takvu potencijalnu povezanost neophodno je potvrditi sveobuhvatnijim istraživanjima.

7. LITERATURA

- Ahmadloo N, Kani AA, Mohammadianpanah M, Nasrolahi H, Omidvari S, Mosalaei A, Ansari M. Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2013 Mar;25(1):21-30. doi: 10.1016/j.jnci.2012.11.001. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23499203.
- Aithal MG, Rajeswari N. Validation of housekeeping genes for gene expression analysis in glioblastoma using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Brain Tumor Res Treat.* 2015 Apr;3(1):24-9. doi: 10.14791/btrt.2015.3.1.24. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25977903; PMCID: PMC4426273.
- Akiyama Y, Ashizawa T, Komiyama M, Miyata H, Oshita C, Omiya M, Iizuka A, Kume A, Sugino T, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K. YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol Rep.* 2014 Jul;32(1):159-66. doi: 10.3892/or.2014.3195. Epub 2014 May 16. PMID: 24842123.
- Al-Hussaini, M . Histology of Primary Brain Tumors. In *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*. InTech. (2013). <https://doi.org/10.5772/52356>
- Altmann C, Keller S, Schmidt MHH. The Role of SVZ Stem Cells in Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2019 Mar 29;11(4):448. doi: 10.3390/cancers11040448. PMID: 30934929; PMCID: PMC6521108.
- Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP, Kim AH. Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2014 Dec;37(6):E11. doi: 10.3171/2014.9.FOCUS14521. PMID: 25434380.
- Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich PY, Weller M, Mariani L, Heppner FL, McDonald DR, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012 Oct;124(4):547-60. doi: 10.1007/s00401-012-1016-2. Epub 2012 Jul 19. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2013 Jul;126(1):159. PMID: 22810491; PMCID: PMC3444709.

- Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, Brazauskas P, Al-Qahtani K, Tomkova M, Adam J, Serres S, Lockstone H, Freeman-Mills L, Pfeffer I, Sibson N, Goldin R, Schuster-Böeckler B, Pollard PJ, Soga T, McCullagh JS, Schofield CJ, Mulholland P, Ansorge O, Kriaucionis S, Ratcliffe PJ, Szele FG, Tomlinson I. Expression of Idh1^{R132H} in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer Cell*. 2016 Oct 10;30(4):578-594. doi: 10.1016/j.ccell.2016.08.017. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27693047; PMCID: PMC5064912.
- Barone TA, Gorski JW, Greenberg SJ, Plunkett RJ. Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2009 Oct;95(1):37-48. doi: 10.1007/s11060-009-9904-6. Epub 2009 May 5. PMID: 19415456.
- Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, Brandes AA, Kantor G, Taphoorn MJB, Hassel MB, Hartmann C, Ryan G, Capper D, Kros JM, Kurscheid S, Wick W, Enting R, Reni M, Thiessen B, Dhermain F, Bromberg JE, Feuvret L, Reijneveld JC, Chinot O, Gijtenbeek JMM, Rossiter JP, Dif N, Balana C, Bravo-Marques J, Clement PM, Marosi C, Tzuk-Shina T, Nordal RA, Rees J, Lacombe D, Mason WP, Stupp R. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol*. 2016 Nov;17(11):1521-1532. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30313-8. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27686946; PMCID: PMC5124485.
- Biollaz G, Bernasconi L, Cretton C, Püntener U, Frei K, Fontana A, Suter T. Site-specific anti-tumor immunity: differences in DC function, TGF-beta production and numbers of intratumoral Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol*. 2009 May;39(5):1323-33. doi: 10.1002/eji.200838921. PMID: 19337997.
- Bonneh-Barkay D, Bissel SJ, Kofler J, Starkey A, Wang G, Wiley CA. Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation. *Brain Pathol*. 2012 Jul;22(4):530-46. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00550.x. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22074331; PMCID: PMC3557465.
- Bonnet E, Moutet ML, Baulard C, Bacq-Daian D, Sandron F, Mesrob L, Fin B, Delépine M, Palomares MA, Jubin C, Blanché H, Meyer V, Boland A, Olaso R, Deleuze JF. Performance comparison of three DNA extraction kits on human whole-exome data

- from formalin-fixed paraffin-embedded normal and tumor samples. PLoS One. 2018 Apr 5;13(4):e0195471. doi: 10.1371/journal.pone.0195471. PMID: 29621323; PMCID: PMC5886566.
- Bradl, M. Progenitors and Precursors of Neurons and Glial Cells. In: Janigro D. (eds) The Cell Cycle in the Central Nervous System. Contemporary Neuroscience. Humana Press. 2006 https://doi.org/10.1007/978-1-59745-021-8_3
- Brancaccio M, Edwards MD, Patton AP, Smyllie NJ, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH. Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. Science. 2019 Jan 11;363(6423):187-192. doi: 10.1126/science.aat4104. PMID: 30630934; PMCID: PMC6440650.
- Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, Bertorelle R, Bartolini S, Calbucci F, Andreoli A, Frezza G, Leonardi M, Spagnolli F, Ermani M. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2192-7. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8163. PMID: 18445844.
- Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. Lab Invest. 2004 Apr;84(4):397-405. doi: 10.1038/labinvest.3700070. PMID: 14990981.
- Bujko M, Kowalewska M, Danska-Bidzinska A, Bakula-Zalewska E, Siedecki JA, Bidzinski M. The promoter methylation and expression of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in uterine sarcoma and carcinosarcoma. Oncol Lett. 2012 Sep;4(3):551-555. doi: 10.3892/ol.2012.771. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22970054; PMCID: PMC3439109.
- Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, Lee EQ. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. J Mol Diagn. 2013 Sep;15(5):539-55. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.05.011. Epub 2013 Jul 17. PMID: 23871769.
- Chaul-Barbosa C, Marques DF. How We Treat Recurrent Glioblastoma Today and Current Evidence. Curr Oncol Rep. 2019 Oct 12;21(10):94. doi: 10.1007/s11912-019-0834-y. PMID: 31606796.

- Chen WJ, Zhang X, Han H, Lv JN, Kang EM, Zhang YL, Liu WP, He XS, Wang J, Wang GH, Yu YB, Zhang W. The different role of YKL-40 in glioblastoma is a function of MGMT promoter methylation status. *Cell Death Dis.* 2020 Aug 21;11(8):668. doi: 10.1038/s41419-020-02909-9. PMID: 32820151; PMCID: PMC7441403.
- Cho B, Lee H, Jeong S, Bang YJ, Lee HJ, Hwang KS, Kim HY, Lee YS, Kang GH, Jeoung DI. Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 18;307(1):52-63. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01121-5. PMID: 12849980.
- Choi JY, Yeo IJ, Kim KC, Choi WR, Jung JK, Han SB, Hong JT. K284-6111 prevents the amyloid beta-induced neuroinflammation and impairment of recognition memory through inhibition of NF- κ B-mediated CHI3L1 expression. *J Neuroinflammation.* 2018 Aug 11;15(1):224. doi: 10.1186/s12974-018-1269-3. PMID: 30098604; PMCID: PMC6087013.
- Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, Hillringhaus L, Bagge EA, Rose NR, Leung IK, Li XS, Woon EC, Yang M, McDonough MA, King ON, Clifton IJ, Klose RJ, Claridge TD, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Kawamura A. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep.* 2011 May;12(5):463-9. doi: 10.1038/embor.2011.43. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21460794; PMCID: PMC3090014.
- Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, Wick W, Weiler M. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One.* 2012;7(3):e33449. doi: 10.1371/journal.pone.0033449. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22428052; PMCID: PMC3302822.
- Cikota B, Janežić A, Magić ZM. Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze. *Vojnosanitetski pregled.* 2002; 59(5):551-556.
- Cobbs CS. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae.* 2011 Oct 26;2(1):10. doi: 10.1186/2042-4280-2-10. PMID: 22030012; PMCID: PMC3214144.
- Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino Mdel C, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Tabernero MD. Molecular and Genomic Alterations in

- Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol.* 2015 Jul;185(7):1820-33. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023. Epub 2015 May 11. PMID: 25976245.
- de Ruijter TC, de Hoon JP, Slaats J, de Vries B, Janssen MJ, van Wezel T, Aarts MJ, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC, Van Neste L, Veeck J. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue epigenomics using Infinium HumanMethylation450 BeadChip assays. *Lab Invest.* 2015 Jul;95(7):833-42. doi: 10.1038/labinvest.2015.53. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25867767.
- DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, Kishore U. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol.* 2020 Jul 17;11:1402. doi: 10.3389/fimmu.2020.01402. PMID: 32765498; PMCID: PMC7379131.
- Degl'Innocenti A, di Leo N, Ciofani G. Genetic Hallmarks and Heterogeneity of Glioblastoma in the Single-Cell Omics Era. *Adv Ther (Weinh).* 2020 Jan;3(1):1900152. doi: 10.1002/adtp.201900152. Epub 2019 Dec 1. PMID: 31942443; PMCID: PMC6962053.
- Deng X, Liu Y, Luo M, Wu J, Ma R, Wan Q, Wu J. Circulating miRNA-24 and its target YKL-40 as potential biomarkers in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget.* 2017 Jun 21;8(38):63038-63046. doi: 10.18632/oncotarget.18593. PMID: 28968969; PMCID: PMC5609901.
- Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, Kristiansen G. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.* 2013 Oct 14;8(10):e77771. doi: 10.1371/journal.pone.0077771. PMID: 24155973; PMCID: PMC3796491.
- Dobra G, Bukva M, Szabo Z, Bruszel B, Harmati M, Gyukity-Sebestyen E, Jenei A, Szucs M, Horvath P, Biro T, Klekner A, Buzas K. Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 28;21(15):5359. doi: 10.3390/ijms21155359. PMID: 32731530; PMCID: PMC7432723.
- Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and

- radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Jul 7;101(1):124-31. doi: 10.1038/sj.bjc.6605127. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19536096; PMCID: PMC2713697.
- Erlandsson A, Larsson J, Forsberg-Nilsson K. Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Exp Cell Res*. 2004 Dec 10;301(2):201-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.009. PMID: 15530856.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):793-7. PMID: 10029064.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1148-59. doi: 10.1056/NEJMra072067. PMID: 18337604.
- Eurich K, Segawa M, Toei-Shimizu S, Mizoguchi E. Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation-associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2009 Nov 14;15(42):5249-59. doi: 10.3748/wjg.15.5249. PMID: 19908331; PMCID: PMC2776850.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937. Epub 2018 Dec 6. PMID: 30350310.
- Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, Caeiro C. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 11. PMID: 29251860.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31. doi: 10.1073/pnas.89.5.1827. PMID: 1542678; PMCID: PMC48546.
- Gaur N, Perner C, Witte OW, Grosskreutz J. The Chitinases as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Signals From the CNS and Beyond. *Front Neurol*. 2020 May 27;11:377. doi: 10.3389/fneur.2020.00377. PMID: 32536900; PMCID: PMC7267218.

- Gee TS, Ghani AR, Idris B, Awang MS. Case report: a rare case of pediatric conus medularis glioblastoma multiforme. *Med J Malaysia*. 2012 Aug;67(4):438-41. PMID: 23082462.
- Ghosh M, Shubham S, Mandal K, Trivedi V, Chauhan R, Naseera S. Survival and prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. *Indian J Cancer*. 2017 Jan-Mar;54(1):362-367. doi: 10.4103/ijc.IJC_157_17. PMID: 29199724.
- Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi M, Jaeckle KA, et al. RTOG 0525: A randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(15_suppl):2006-. doi: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.2006.
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, De Lay M, Van Brocklyn J, Ostrowski MC, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell*. 2010 Mar 12;37(5):620-32. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.018. PMID: 20227367; PMCID: PMC3125113.
- Goffart N, Kroonen J, Rogister B. Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)*. 2013 Aug 14;5(3):1049-71. doi: 10.3390/cancers5031049. PMID: 24202333; PMCID: PMC3795378.
- Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, Jensen TK, Pei Y, Wang F, Han X, Chen JF, Schnermann J, Takano T, Bekar L, Tieu K, Nedergaard M. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci*. 2010 Jul;13(7):883-8. doi: 10.1038/nn.2562. Epub 2010 May 30. PMID: 20512135; PMCID: PMC3467968.
- Grossman R, Burger P, Soudry E, Tyler B, Chaichana KL, Weingart J, Olivi A, Gallia GL, Sidransky D, Quiñones-Hinojosa A, Ye X, Brem H. MGMT inactivation and clinical response in newly diagnosed GBM patients treated with Gliadel. *J Clin Neurosci*. 2015 Dec;22(12):1938-42. doi: 10.1016/j.jocn.2015.07.003. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26249244.
- Guequén A, Zamorano P, Córdova F, Koning T, Torres A, Ehrenfeld P, Boric MP, Salazar-Onfray F, Gavard J, Durán WN, Quezada C, Sarmiento J, Sánchez FA. Interleukin-8 Secreted by Glioblastoma Cells Induces Microvascular Hyperpermeability Through NO Signaling Involving S-Nitrosylation of VE-Cadherin and p120 in Endothelial Cells.

- Front Physiol. 2019 Aug 8;10:988. doi: 10.3389/fphys.2019.00988. PMID: 31440166; PMCID: PMC6694439.
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*. 2009 Jan 29;61(2):213-9. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.024. PMID: 19186164; PMCID: PMC2673052.
- Hattermann K, Mehdorn HM, Mentlein R, Schultka S, Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal Biochem*. 2008 Jun 1;377(1):62-71. doi: 10.1016/j.ab.2008.03.014. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18384736.
- Håvik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, Meling TR, Helseth E, Heim S, Lothe RA, Lind GE. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med*. 2012 Mar 6;10:36. doi: 10.1186/1479-5876-10-36. PMID: 22390413; PMCID: PMC3311573.
- Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Mar;2(3):185-93. doi: 10.1038/35058528. PMID: 11256079.
- Hegedus B, Dasgupta B, Shin JE, Emnett RJ, Hart-Mahon EK, Elghazi L, Bernal-Mizrachi E, Gutmann DH. Neurofibromatosis-1 regulates neuronal and glial cell differentiation from neuroglial progenitors in vivo by both cAMP- and Ras-dependent mechanisms. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct 11;1(4):443-57. doi: 10.1016/j.stem.2007.07.008. PMID: 18371380.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331. PMID: 15758010.
- Hegi ME, Gennippen E, Gorlia T, Stupp R, Gilbert MR, Chinot OL, Nabors LB, Jones G, Van Criekinge W, Straub J, Weller M. MGMT Promoter Methylation Cutoff with Safety Margin for Selecting Glioblastoma Patients into Trials Omitting Temozolomide:

- A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 2019 Mar 15;25(6):1809-1816. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3181. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30514777.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4189-99. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5964. PMID: 18757334.
- Held-Feindt J, Hattermann K, Muerköster SS, Wedderkopp H, Knerlich-Lukoschus F, Ungefroren H, Mehdorn HM, Mentlein R. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Exp Cell Res.* 2010 May 15;316(9):1553-66. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.018. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20184883.
- Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, Garrelfs NWC, Strähle J, Heynckes S, Grauvogel J, Franco P, Mader I, Schneider M, Potthoff AL, Delev D, Hofmann UG, Fung C, Beck J, Sankowski R, Prinz M, Schnell O. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun.* 2019 Jun 11;10(1):2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6. PMID: 31186414; PMCID: PMC6559986.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9821-6. doi: 10.1073/pnas.93.18.9821. PMID: 8790415; PMCID: PMC38513.
- Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, Steinbach JP, Hundsberger T, Wick W, Meyermann R, Tan TC, Sommer C, Bamberg M, Reifenberger G, Weller M. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 20;24(27):4412-7. doi: 10.1200/JCO.2006.06.9104. PMID: 16983109.
- Huang LE, Cohen AL, Colman H, Jensen RL, Fults DW, Couldwell WT. IGFBP2 expression predicts IDH-mutant glioma patient survival. *Oncotarget.* 2017 Jan 3;8(1):191-202. doi: 10.18632/oncotarget.13329. PMID: 27852048; PMCID: PMC5352106.

- Huang LE. Friend or foe-IDH1 mutations in glioma 10 years on. *Carcinogenesis*. 2019 Nov 25;40(11):1299-1307. doi: 10.1093/carcin/bgz134. PMID: 31504231; PMCID: PMC6875900.
- Huang WJ, Chen WW, Zhang X. Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches. *Oncol Lett*. 2016 Oct;12(4):2283-2288. doi: 10.3892/ol.2016.4952. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27698790; PMCID: PMC5038353.
- Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, Collins VP. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009 Aug;11(4):341-7. doi: 10.1215/15228517-2009-025. Epub 2009 May 12. PMID: 19435942; PMCID: PMC2743214.
- Ilić, R. Prognostički faktori i savremeni terapijski pristup lečenju pacijenata obolelih od multiformnog glioblastoma. 2018
- Iwamoto FM, Hormigo A. Unveiling YKL-40, from Serum Marker to Target Therapy in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2014 Apr 28;4:90. doi: 10.3389/fonc.2014.00090. PMID: 24809021; PMCID: PMC4009441.
- Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, Cai L, Radoul M, Chaumeil MM, Blough M, Luchman HA, Weiss S, Cairncross JG, Phillips JJ, Pieper RO, Ronen SM. IDH1 Mutation Induces Reprogramming of Pyruvate Metabolism. *Cancer Res*. 2015 Aug 1;75(15):2999-3009. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0840. Epub 2015 Jun 4. PMID: 26045167; PMCID: PMC4526330.
- Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TÅ, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. *MGMT* Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018 Nov-Dec;15(6):437-446. doi: 10.21873/cgp.20102. PMID: 30343277; PMCID: PMC6299788.
- Jovčevska I. Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019 May 20;19(2):116-124. doi: 10.17305/bjbms.2018.3717. PMID: 30114377; PMCID: PMC6535385.
- Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król SK, Gielniewski B. Consequences of *IDH1/2* Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH

- Proteins. *Molecules*. 2019 Mar 9;24(5):968. doi: 10.3390/molecules24050968. PMID: 30857299; PMCID: PMC6429355.
- Kavsan VM, Baklaushev VP, Balynska OV, Iershov AV, Areshkov PO, Yusubalieva GM, Grinenko NP, Victorov IV, Rymar VI, Sanson M, Chekhonin VP. Gene Encoding Chitinase 3-Like 1 Protein (CHI3L1) is a Putative Oncogene. *Int J Biomed Sci*. 2011 Sep;7(3):230-7. PMID: 23675241; PMCID: PMC3614833.
- Kazazi-Hyseni F, Beijnen JH, Schellens JH. Bevacizumab. *Oncologist*. 2010;15(8):819-25. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0317. Epub 2010 Aug 5. PMID: 20688807; PMCID: PMC3228024.
- Koh J, Cho H, Kim H, Kim SI, Yun S, Park CK, Lee SH, Choi SH, Park SH. IDH2 mutation in gliomas including novel mutation. *Neuropathology*. 2015 Jun;35(3):236-44. doi: 10.1111/neup.12187. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25495392.
- Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RG, Yan H, Kaelin WG Jr. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012 Feb 15;483(7390):484-8. doi: 10.1038/nature10898. PMID: 22343896; PMCID: PMC3656605.
- Kol A, Adamsky A, Groysman M, Kreisel T, London M, Goshen I. Astrocytes contribute to remote memory formation by modulating hippocampal-cortical communication during learning. *Nat Neurosci*. 2020 Oct;23(10):1229-1239. doi: 10.1038/s41593-020-0679-6. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32747787.
- Kramář F, Minárik M, Benešová L, Halková T, Netuka D, Bradáč O, Beneš V. IDH1/2 Mutation and MGMT Promoter Methylation - the Relevant Survival Predictors in Czech Patients with Brain Gliomas. *Folia Biol (Praha)*. 2016;62(5):194-202. PMID: 27978414.
- Lakhan SE, Harle L. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*. 2009 Oct 30;3:87. doi: 10.1186/1752-1947-3-87. PMID: 19946563; PMCID: PMC2783086.
- Laurent D, Freedman R, Cope L, Sacks P, Abbatematteo J, Kubilis P, Bova F, Rahman M. Impact of Extent of Resection on Incidence of Postoperative Complications in Patients

- With Glioblastoma. *Neurosurgery*. 2020 May 1;86(5):625-630. doi: 10.1093/neuros/nyz313. PMID: 31342060; PMCID: PMC7594111.
- Le Rhun E, Rhun EL, Taillibert S, Chamberlain MC. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surg Neurol Int*. 2015 Feb 13;6(Suppl 1):S9-S44. doi: 10.4103/2152-7806.151331. Erratum in: *Surg Neurol Int*. 2015 Mar 05;6:37. Rhun, Emilie Le [corrected to Le Rhun, Emilie]. PMID: 25722939; PMCID: PMC4338495.
- Lee JH, Lee JE, Kahng JY, Kim SH, Park JS, Yoon SJ, Um JY, Kim WK, Lee JK, Park J, Kim EH, Lee JH, Lee JH, Chung WS, Ju YS, Park SH, Chang JH, Kang SG, Lee JH. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature*. 2018 Aug;560(7717):243-247. doi: 10.1038/s41586-018-0389-3. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30069053.
- Levison SW, Goldman JE. CHAPTER 1 - Astrocyte Origins. In: Murphy S, editor. *Astrocytes*. Boston: Academic Press; 1993. p. 1-22.
- Li H, Li J, Cheng G, Zhang J, Li X. IDH mutation and MGMT promoter methylation are associated with the pseudoprogression and improved prognosis of glioblastoma multiforme patients who have undergone concurrent and adjuvant temozolomide-based chemoradiotherapy. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016 Dec;151:31-36. doi: 10.1016/j.clineuro.2016.10.004. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27764705.
- Li QJ, Cai JQ, Liu CY. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Feb 20;129(4):464-71. doi: 10.4103/0366-6999.176065. PMID: 26879021; PMCID: PMC4800848.
- Liang J, Lv X, Lu C, Ye X, Chen X, Fu J, Luo C, Zhao Y. Prognostic factors of patients with Gliomas - an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer*. 2020 Jan 15;20(1):35. doi: 10.1186/s12885-019-6511-6. PMID: 31941467; PMCID: PMC6961387.
- Lines J, Martin ED, Kofuji P, Aguilar J, Araque A. Astrocytes modulate sensory-evoked neuronal network activity. *Nat Commun*. 2020 Jul 23;11(1):3689. doi: 10.1038/s41467-020-17536-3. PMID: 32704144; PMCID: PMC7378834.
- Liu Q, Nguyen DH, Dong Q, Shitaku P, Chung K, Liu OY, Tso JL, Liu JY, Konkankit V, Cloughesy TF, Mischel PS, Lane TF, Liao LM, Nelson SF, Tso CL. Molecular

- properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *J Neurooncol.* 2009 Aug;94(1):1-19. doi: 10.1007/s11060-009-9919-z. Epub 2009 May 26. PMID: 19468690; PMCID: PMC2705704.
- Lobera A, Imaging in Glioblastoma Multiforme, Medscape. 2017 <http://emedicine.medscape.com/article/340870-overview#showall>
- Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, von Deimling A, Castresana JS. Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR. *BMC Cancer.* 2008 Feb 25;8:61. doi: 10.1186/1471-2407-8-61. PMID: 18298842; PMCID: PMC2266933.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9. PMID: 27157931.
- Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R; Nordic Clinical Brain Tumour Study Group (NCBTSG). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Sep;13(9):916-26. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6. Epub 2012 Aug 8. PMID: 22877848.
- Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, Lindeman NI, Wen PY, Chakravarti A, Mehta MP, Hegi ME, Stupp R, Aldape KD, Zadeh G. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol.* 2019 Feb 14;21(2):167-178. doi: 10.1093/neuonc/noy132. PMID: 30189035; PMCID: PMC6374759.
- Mansouri A, Karamchandani J, Das S. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 2. PMID: 29251857.
- Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, Wrensch MR, Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B, Ostrom QT, Labreche K, Chen Y, Armstrong G, Liu Y, Eckel-Passow JE, Decker PA,

- Labussière M, Idbaih A, Hoang-Xuan K, Di Stefano AL, Mokhtari K, Delattre JY, Broderick P, Galan P, Gousias K, Schramm J, Schoemaker MJ, Fleming SJ, Herms S, Heilmann S, Nöthen MM, Wichmann HE, Schreiber S, Swerdlow A, Lathrop M, Simon M, Sanson M, Andersson U, Rajaraman P, Chanock S, Linet M, Wang Z, Yeager M; GliomaScan Consortium, Wiencke JK, Hansen H, McCoy L, Rice T, Kosel ML, Sicotte H, Amos CI, Bernstein JL, Davis F, Lachance D, Lau C, Merrell RT, Shildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Scheurer M, Shete S, Lai RK, Claus EB, Olson SH, Jenkins RB, Houlston RS, Bondy ML. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet.* 2017 May;49(5):789-794. doi: 10.1038/ng.3823. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28346443; PMCID: PMC5558246.
- Milijus, D, Zivković, S; Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia 2015, Report No. 17; Institute of Public Health of Serbia: Belgrade, Serbia, 2017
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jan;10(1):23-36. doi: 10.1038/nrn2533. PMID: 19096368; PMCID: PMC2752436.
- Mistry AM. On the subventricular zone origin of human glioblastoma. *Transl Cancer Res.* 2019 Feb;8(1):11-13. doi: 10.21037/tcr.2018.11.31. PMID: 30873355; PMCID: PMC6414072.
- Mittempergher L, de Ronde JJ, Nieuwland M, Kerkhoven RM, Simon I, Rutgers EJ, Wessels LF, Van't Veer LJ. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PLoS One.* 2011 Feb 11;6(2):e17163. doi: 10.1371/journal.pone.0017163. PMID: 21347257; PMCID: PMC3037966.
- Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, Zanon C, Jeuken JW, Boots-Sprenger SH, Wesseling P, Hulsebos TJ, Troost D, van Tilborg AA, Leenstra S, Vandertop WP, Bardelli A, van Noorden CJ, Bleeker FE. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol.* 2014 Sep;16(9):1263-73. doi: 10.1093/neuonc/nou005. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24510240; PMCID: PMC4136888.

- Niklasson M, Bergström T, Jarvius M, Sundström A, Nyberg F, Haglund C, Larsson R, Westermark B, Segerman B, Segerman A. Mesenchymal transition and increased therapy resistance of glioblastoma cells is related to astrocyte reactivity. *J Pathol*. 2019 Nov;249(3):295-307. doi: 10.1002/path.5317. Epub 2019 Aug 31. PMID: 31298733.
- Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open*. 2017 Feb 22;1(6):e000144. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000144. PMID: 28912963; PMCID: PMC5419216.
- Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol*. 2014 Jan;232(2):165-77. doi: 10.1002/path.4282. PMID: 24114756; PMCID: PMC4138801.
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. 2015 Oct;17 Suppl 4(Suppl 4):iv1-iv62. doi: 10.1093/neuonc/nov189. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26511214; PMCID: PMC4623240.
- Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol*. 2020 Oct 30;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200. PMID: 33123732; PMCID: PMC7596247.
- Pala A, Schmitz AL, Knoll A, Schneider M, Hlavac M, König R, Wirtz CR, Coburger J. Is MGMT promoter methylation to be considered in the decision making for recurrent surgery in glioblastoma patients? *Clin Neurol Neurosurg*. 2018 Apr;167:6-10. doi: 10.1016/j.clineuro.2018.02.003. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29425743.
- Park K, Lee SJ. Deciphering the star codings: astrocyte manipulation alters mouse behavior. *Exp Mol Med*. 2020 Jul;52(7):1028-1038. doi: 10.1038/s12276-020-0468-z. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32665584.
- Parker NR, Khong P, Parkinson JF, Howell VM, Wheeler HR. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol*. 2015 Mar 3;5:55. doi: 10.3389/fonc.2015.00055. PMID: 25785247; PMCID: PMC4347445.
- Parrella P, la Torre A, Copetti M, Valori VM, Barbano R, Notarangelo A, Bisceglia M, Gallo AP, Balsamo T, Poeta ML, Carella M, Catapano D, Parisi S, Dallapiccola B, Maiello E,

- D'Angelo V, Fazio VM. High specificity of quantitative methylation-specific PCR analysis for MGMT promoter hypermethylation detection in gliomas. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:531692. doi: 10.1155/2009/531692. Epub 2009 Jun 1. PMID: 19503806; PMCID: PMC2688744.
- Pavlova GV, Baklaushev VP, Ivanova MA, Goriaĭnov SA, Rybalkina EI, Kopylov AM, Chekhonin VP, Potapov AA, Konovalov AN. Modern molecular approaches to diagnosis and treatment of high-grade brain gliomas. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko.* 2014;78(6):85-100. English, Russian. doi: 10.17116/neiro201478685-100. PMID: 25874291.
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014 Oct;94(4):1077-98. doi: 10.1152/physrev.00041.2013. PMID: 25287860.
- Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, Fay M, Nishikawa R, Cairncross JG, Roa W, Osoba D, Rossiter JP, Sahgal A, Hirte H, Laigle-Donadey F, Franceschi E, Chinot O, Golfopoulos V, Fariselli L, Wick A, Feuvret L, Back M, Tills M, Winch C, Baumert BG, Wick W, Ding K, Mason WP; Trial Investigators. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16;376(11):1027-1037. doi: 10.1056/NEJMoa1611977. PMID: 28296618.
- Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res.* 2003 Jan 1;63(1):236-41. PMID: 12517803.
- Priego N, Zhu L, Monteiro C, Mulders M, Wasilewski D, Bindeman W, Doglio L, Martínez L, Martínez-Saez E, Ramón Y Cajal S, Megías D, Hernández-Encinas E, Blanco-Aparicio C, Martínez L, Zarzuela E, Muñoz J, Fustero-Torre C, Piñeiro-Yáñez E, Hernández-Laín A, Bertero L, Poli V, Sanchez-Martinez M, Menendez JA, Soffietti R, Bosch-Barrera J, Valiente M. STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):1024-1035. doi: 10.1038/s41591-018-0044-4. Epub 2018 Jun 11. Erratum in: *Nat Med.* 2018 Jun 19;: PMID: 29892069.

- Qin G, Li X, Chen Z, Liao G, Su Y, Chen Y, Zhang W. Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Mol Neurobiol*. 2017 Jul;54(5):3264-3270. doi: 10.1007/s12035-016-9878-2. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27090900.
- Quick-Weller J, Tritt S, Baumgarten P, Konczalla J, Kashefiolasl S, Noack A, Tichy J, Seifert V, Marquardt G. Positive influence of partial resection on overall survival of patients with overlapping glioblastomas. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017 Oct;161:22-28. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.06.021. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28837843.
- Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, Lenz K, Löbel F, Paschereit F, Heppner FL, Vajkoczy P, Koll R, Onken J. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Jun 5;7(1):89. doi: 10.1186/s40478-019-0745-z. Erratum in: *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Aug 14;7(1):131. PMID: 31167648; PMCID: PMC6549362.
- Rhun EL, Taillibert S, Chamberlain MC. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surg Neurol Int* 13-Feb-2015;6:
- Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2010 Feb;12(2):116-21. doi: 10.1093/neuonc/nop020. Epub 2009 Dec 14. Erratum in: *Neuro Oncol*. 2010 Jun;12(6):617. PMID: 20150378; PMCID: PMC2940581.
- Robel S, Bardehle S, Lepier A, Brakebusch C, Götz M. Genetic deletion of cdc42 reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2011 Aug 31;31(35):12471-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2696-11.2011. PMID: 21880909; PMCID: PMC6703275.
- Robel S, Mori T, Zoubaa S, Schlegel J, Sirko S, Faissner A, Goebbels S, Dimou L, Götz M. Conditional deletion of beta1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis. *Glia*. 2009 Nov 15;57(15):1630-47. doi: 10.1002/glia.20876. PMID: 19373938.

- Robinson C, Kleinschmidt-DeMasters BK. IDH1-Mutation in Diffuse Gliomas in Persons Age 55 Years and Over. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017 Feb 1;76(2):151-154. doi: 10.1093/jnen/nlw112. PMID: 28110298.
- Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Oldrini B, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernytsky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013 May 3;340(6132):626-30. doi: 10.1126/science.1236062. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23558169; PMCID: PMC3985613.
- Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Jun;65(6):529-39. doi: 10.1097/00005072-200606000-00001. PMID: 16783163.
- Rosas-Alonso R, Colmenarejo-Fernandez J, Pernia O, Rodriguez-Antolín C, Esteban I, Ghanem I, Sanchez-Cabrero D, Losantos-Garcia I, Palacios-Zambrano S, Moreno-Bueno G, de Castro J, Martinez-Marin V, Ibanez-de-Caceres I. Clinical validation of a novel quantitative assay for the detection of MGMT methylation in glioblastoma patients. *Clin Epigenetics*. 2021 Mar 9;13(1):52. doi: 10.1186/s13148-021-01044-2. PMID: 33750464; PMCID: PMC7941980.
- Royston P, Altman DG, Sauerbrei W. Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med*. 2006 Jan 15;25(1):127-41. doi: 10.1002/sim.2331. PMID: 16217841.
- Sanli AM, Turkoglu E, Dolgun H, Sekerci Z. Unusual manifestations of primary Glioblastoma Multiforme: A report of three cases. *Surg Neurol Int*. 2010 Dec 22;1:87. doi: 10.4103/2152-7806.74146. PMID: 21206896; PMCID: PMC3011111.
- Sarma NJ, Tiriveedhi V, Subramanian V, Shenoy S, Crippin JS, Chapman WC, Mohanakumar T. Hepatitis C virus mediated changes in miRNA-449a modulates inflammatory biomarker YKL40 through components of the NOTCH signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(11):e50826. doi: 10.1371/journal.pone.0050826. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23226395; PMCID: PMC3511274.

- Sciuscio D, Diserens AC, van Dommelen K, Martinet D, Jones G, Janzer RC, Pollo C, Hamou MF, Kaina B, Stupp R, Levivier M, Hegi ME. Extent and patterns of MGMT promoter methylation in glioblastoma- and respective glioblastoma-derived spheres. *Clin Cancer Res.* 2011 Jan 15;17(2):255-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1931. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21097691.
- Segerman A, Niklasson M, Haglund C, Bergström T, Jarvius M, Xie Y, Westermarck A, Sönmez D, Hermansson A, Kastemar M, Naimaie-Ali Z, Nyberg F, Berglund M, Sundström M, Hesselager G, Uhrbom L, Gustafsson M, Larsson R, Fryknäs M, Segerman B, Westermarck B. Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* 2016 Dec 13;17(11):2994-3009. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.056. PMID: 27974212.
- Simon T, Jackson E, Giamas G. Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. *Oncogene.* 2020 Jun;39(23):4477-4490. doi: 10.1038/s41388-020-1308-2. Epub 2020 May 4. PMID: 32366909; PMCID: PMC7269906.
- Sirko S, Behrendt G, Johansson PA, Tripathi P, Costa M, Bek S, Heinrich C, Tiedt S, Colak D, Dichgans M, Fischer IR, Plesnila N, Staufenbiel M, Haass C, Snappyan M, Saghatelian A, Tsai LH, Fischer A, Grobe K, Dimou L, Götz M. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell.* 2013 Apr 4;12(4):426-39. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.019. Erratum in: *Cell Stem Cell.* 2013 May 2;12(5):629. PMID: 23561443.
- Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer.* 2009 Apr 24;9:123. doi: 10.1186/1471-2407-9-123. PMID: 19393074; PMCID: PMC2679043.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. Epub 2009 Dec 10. PMID: 20012068; PMCID: PMC2799634.
- Spinelli V, Chinot O, Cabaniols C, Giorgi R, Alla P, Lehucher-Michel MP. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. *Presse Med.* 2010 Feb;39(2):e35-44. doi: 10.1016/j.lpm.2009.06.020. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19962851.

- Steponaitis G, Skiriutė D, Kazlauskas A, Golubickaitė I, Stakaitis R, Tamašauskas A, Vaitkienė P. High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival. *Diagn Pathol*. 2016 Apr 27;11:42. doi: 10.1186/s13000-016-0492-4. PMID: 27121858; PMCID: PMC4848844.
- Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*. 2008 Jun 26;58(6):832-46. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.031. PMID: 18579075.
- Stojšavljević M, Tasić G, Nikolić I, Repac N, Janićijević A, Sćepanović V, Rotim K, Rasulić L. GLIOBLASTOMA MULTIFORME BRAIN TUMORS LOCATED IN THE MOTOR CORTEX--SPECIFIC FINDINGS IN COMPARISON WITH LOW GRADE GLIOMAS OF THE SAME LOCALIZATION: ANALYSIS OF A SIXTY PATIENT SERIES. *Acta Clin Croat*. 2015 Dec;54(4):402-8. PMID: 27017712.
- Stosić-Opinčal T, Gavrilov M, Stosić S, Lavrnić S, Perić V, Grujčić D. [FLAIR MR sequence in the diagnosis and follow-up of low-grade astrocytomas]. *Vojnosanit Pregl*. 2005 Jul-Aug;62(7-8):525-8. Serbian. doi: 10.2298/vsp0508525s. PMID: 16171014.
- Struys EA. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: unravelling the biochemical pathway and the genetic defect. *J Inherit Metab Dis*. 2006 Feb;29(1):21-9. doi: 10.1007/s10545-006-0317-9. PMID: 16601864.
- Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T; ALA-Glioma Study Group. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008 Mar;62(3):564-76; discussion 564-76. doi: 10.1227/01.neu.0000317304.31579.17. PMID: 18425006.
- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25 Suppl 3:iii93-101. doi: 10.1093/annonc/mdu050. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24782454.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus

- concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.
- Sui Y, Xiong Y, Jiang J, Karaman MM, Xie KL, Zhu W, Zhou XJ. Differentiation of Low- and High-Grade Gliomas Using High b-Value Diffusion Imaging with a Non-Gaussian Diffusion Model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Sep;37(9):1643-9. doi: 10.3174/ajnr.A4836. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27256851; PMCID: PMC5018419.
- Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8013575. doi: 10.1155/2017/8013575. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28316990; PMCID: PMC5337853.
- Tabei Y, Kobayashi K, Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Sasaki N, Shiokawa Y, Nagane M. Survival in patients with glioblastoma at a first progression does not correlate with isocitrate dehydrogenase (IDH)1 gene mutation status. *Jpn J Clin Oncol*. 2021 Jan 1;51(1):45-53. doi: 10.1093/jjco/hyaa162. PMID: 32888020; PMCID: PMC7767982.
- Taghizadeh H, Müllauer L, Furtner J, Hainfellner JA, Marosi C, Preusser M, Prager GW. Applied Precision Cancer Medicine in Neuro-Oncology. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):20139. doi: 10.1038/s41598-019-56473-0. PMID: 31882734; PMCID: PMC6934769.
- Tang Y, Qing C, Wang J, Zeng Z. DNA Methylation-based Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Glioblastoma. *Cell Transplant*. 2020 Jan-Dec;29:963689720933241. doi: 10.1177/0963689720933241. PMID: 32510239; PMCID: PMC7563836.
- Taylor JW, Schiff D. Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jan;15(1):507. doi: 10.1007/s11910-014-0507-z. PMID: 25394859.
- Tiburcio PDB, Xiao B, Berg S, Asper S, Lyne S, Zhang Y, Zhu X, Yan H, Huang LE. Functional requirement of a wild-type allele for mutant IDH1 to suppress anchorage-independent growth through redox homeostasis. *Acta Neuropathol*. 2018 Feb;135(2):285-298. doi: 10.1007/s00401-017-1800-0. Epub 2017 Dec 29. PMID: 29288440.
- Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, et al. Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? the

- role of the preservation method. *BMC Cancer*. 2012;12(1):12. doi: 10.1186/1471-2407-12-12.
- Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED. Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Curr Biol*. 2017 Apr 3;27(7):1055-1061. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.037. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28343966; PMCID: PMC5380592.
- Upadhyay N, Waldman AD. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol*. 2011 Dec;84 Spec No 2(Spec Iss 2):S107-11. doi: 10.1259/bjr/65711810. PMID: 22433821; PMCID: PMC3473894.
- Urbańska K, Sokołowska J, Szmidi M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(5):307-12. doi: 10.5114/wo.2014.40559. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25477751; PMCID: PMC4248049.
- van Bodegraven EJ, van Asperen JV, Robe PAJ, Hol EM. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *Glia*. 2019 Aug;67(8):1417-1433. doi: 10.1002/glia.23594. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30667110; PMCID: PMC6617972.
- van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idbaih A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 1;16(5):1597-604. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2902. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20160062.
- van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*. 2008 Jun 15;412(3):477-84. doi: 10.1042/BJ20080476. PMID: 18393939; PMCID: PMC2474706.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized

- by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. PMID: 20129251; PMCID: PMC2818769.
- Vinjamuri M, Adumala RR, Altaha R, Hobbs GR, Crowell EB Jr. Comparative analysis of temozolomide (TMZ) versus 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea (BCNU) in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) patients. *J Neurooncol*. 2009 Jan;91(2):221-5. doi: 10.1007/s11060-008-9702-6. Epub 2008 Sep 24. PMID: 18813874.
- Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P; EUROCARE-5 Working Group:. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EUROCARE-5 study. *Eur J Cancer*. 2015 Oct;51(15):2231-2241. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.032. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26421825.
- Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, Migliavacca E, Straub J, Di Stefano I, Moreau F, Hamou MF, Renard I, Delorenzi M, Flamion B, DiGuseppi J, Bierau K, Hegi ME. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn*. 2008 Jul;10(4):332-7. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070169. Epub 2008 Jun 13. PMID: 18556773; PMCID: PMC2438202.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 2009 Sep 16;29(37):11511-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009. PMID: 19759299; PMCID: PMC2768309.
- Walzlein JH, Synowitz M, Engels B, Markovic DS, Gabrusiewicz K, Nikolaev E, Yoshikawa K, Kaminska B, Kempermann G, Uckert W, Kaczmarek L, Kettenmann H, Glass R. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age. *Stem Cells*. 2008 Nov;26(11):2945-54. doi: 10.1634/stemcells.2008-0307. Epub 2008 Aug 28. PMID: 18757298.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1149-53. doi: 10.2353/ajpath.2009.080958. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246647; PMCID: PMC2671348.

- Weaver DR, Emery P. Chapter 39 - Circadian Timekeeping. In: Squire LR, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC, editors. *Fundamental Neuroscience* (Fourth Edition). San Diego: Academic Press; 2013. p. 819-45.
- Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Gliomas. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017 Jun;18(6):e315-e329. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8. Epub 2017 May 5. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2017 Nov;18(11):e642. PMID: 28483413.
- Wichert, S. Transcriptomic approaches in the brain at cell type resolution : Analysis of neuron-glia interaction in *Plp1* and *Cnp1* null-mutant mice. 2009
- Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5874-80. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6497. Epub 2009 Nov 9. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2010 Feb 1;28(4):708. PMID: 19901110.
- Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M; NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jul;13(7):707-15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X. Epub 2012 May 10. PMID: 22578793.
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G. MGMT testing--the challenges for biomarker-based

- glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 2014 Jul;10(7):372-85. doi: 10.1038/nrneurol.2014.100. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24912512.
- Wick W, Winkler F. Regimen of procarbazine, lomustine, and vincristine versus temozolomide for gliomas. *Cancer*. 2018 Jul 1;124(13):2674-2676. doi: 10.1002/cncr.31371. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29698549.
- Wigerup C, Pålman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther*. 2016 Aug;164:152-69. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.009. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27139518.
- Wollmann G, Ozduman K, van den Pol AN. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. *Cancer J*. 2012 Jan-Feb;18(1):69-81. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824671c9. PMID: 22290260; PMCID: PMC3632333.
- Wurm J, Behringer SP, Ravi VM, Joseph K, Neidert N, Maier JP, Doria-Medina R, Follo M, Delev D, Pfeifer D, Beck J, Sankowski R, Schnell O, Heiland DH. Astrogliosis Releases Pro-Oncogenic Chitinase 3-Like 1 Causing MAPK Signaling in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 26;11(10):1437. doi: 10.3390/cancers11101437. PMID: 31561550; PMCID: PMC6826948.
- Xia D, Reardon DA, Bruce JL, Lindeman NI. The Clinical Implications of Inconsistently Methylated Results from Glioblastoma MGMT Testing by Replicate Methylation-Specific PCR. *J Mol Diagn*. 2016 Nov;18(6):864-871. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.06.009. Epub 2016 Sep 15. Erratum in: *J Mol Diagn*. 2017 Mar;19(2):338. PMID: 27639200.
- Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol*. 2014 Dec;16(12):1575-84. doi: 10.1093/neuonc/nou147. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25082799; PMCID: PMC4232088.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PMID: 19228619; PMCID: PMC2820383.
- Yong RL, Wu T, Mihatov N, Shen MJ, Brown MA, Zaghloul KA, Park GE, Park JK. Residual tumor volume and patient survival following reoperation for recurrent

- glioblastoma. *J Neurosurg.* 2014 Oct;121(4):802-9. doi: 10.3171/2014.6.JNS132038. Epub 2014 Jul 25. PMID: 25061868.
- Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, Iwadata Y. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget.* 2018 Jun 12;9(45):27728-27735. doi: 10.18632/oncotarget.25543. PMID: 29963232; PMCID: PMC6021237.
- Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A. O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Front Oncol.* 2020 Jan 17;9:1547. doi: 10.3389/fonc.2019.01547. PMID: 32010632; PMCID: PMC6979006.
- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience.* 2015 Aug 1;65(8):783-797. doi: 10.1093/biosci/biv084. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26955082; PMCID: PMC4776721.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012 May 2;32(18):6391-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012. PMID: 22553043; PMCID: PMC3480225.
- Zhang K, Wang XQ, Zhou B, Zhang L. The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Fam Cancer.* 2013 Sep;12(3):449-58. doi: 10.1007/s10689-013-9607-1. PMID: 23397067.
- Zhang Y, Zhu J. Ten genes associated with MGMT promoter methylation predict the prognosis of patients with glioma. *Oncol Rep.* 2019 Feb;41(2):908-916. doi: 10.3892/or.2018.6903. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30535433; PMCID: PMC6313003.
- Zhang Z, Ma Z, Zou W, Guo H, Liu M, Ma Y, Zhang L. The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *Biomed Res Int.* 2019 Jun 24;2019:9605265. doi: 10.1155/2019/9605265. PMID: 31341912; PMCID: PMC6613026.
- Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Sep 14;5(1):201. doi: 10.1038/s41392-020-00303-7. PMID: 32929074; PMCID: PMC7490424.

8. PRILOZI

LISTA SKRAĆENICA

ACTB - *Beta-Actin*, eng. - beta aktin

AEG-1 - *astrocyte elevated gene-1 protein*, eng. - protein povećane aktivnosti astrocita

AKT2 - AKT serine/threonine kinase 2, eng. - AKT serin/treonin kinaza 2

AKT3 - AKT serine/threonine kinase 3, eng. - AKT serin/treonin kinaza 3

ALS - amiotrofična lateralna skleroze

AMC - *acidic mammalian chitinase*, eng. - kisela sisarska hitinaza

APC - *astrocyte precursor cell*, eng. – prekursor astrocita

ARAF - *serine/threonine protein kinase A-Raf*, eng. – serin/treonin proteinska kinaza A-Raf

ATP - Adenozin-trifosfat

ATRX - *alpha thalassemia/mental retardation Syndrome X-Linked*, eng. - ATRX ATP-zavisna helikaza

B – biopsy., eng. – biopsija

BCNU - *Bis-chloroethylnitrosourea*, eng. – karmustin

BEV – *Bevacizumab*, eng.

BMAL1 - *brain and muscle ARNT-like 1*, eng.

BMI – *Body Mass Index*, eng. – indeks telesne mase

BMP7 - *bone morphogenetic protein-7*, eng. - koštani morfogenetički protein 7

BRAF - *V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, eng. –B1 homolog V-Raf viralnog onkogenog mišjeg sarkoma

CBTRUS - *Central Brain Tumor Registry of the United States*, eng. - Centralni registar za tumore mozga Sjedinjenih Američkih Država

CCL2 - *C-C motif chemokine ligand 2*, eng. – ligand sa C-C hemokinskim motivom 2

CCL22 - *C-C Motif chemokine ligand 22*, eng. – ligand sa C-C hemokinskim motivom 22

CCNU - *1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea*, eng. – lomustin

Cdc42 - *cell division control protein 42*, eng. –protein kontrole ćelijske deobe 42

CDKN2A - *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*, eng. - inhibitor ciklin-zavisne kinaze 2A

CHI3L1 - *Chitinase-3-like protein 1*, eng. - protein 1 nalik hitinazi 3

CHIT1 - *Chitotriosidase 1*, eng. - hitotriozidaza 1

CLOCK - *Circadian locomotor output cycles protein kaput*, eng.

CNS – centralni nervni sistem

CNTF - *ciliary neurotrophic factor*, eng. - cilijarni neurotrofični faktor

CSF-1 - *colony-stimulating factor 1*, eng. - faktor stimulacije kolonija 1

CT - *computed tomography*, eng. - kompjuterizovana tomografija

CTCF - *Corrected total cell fluorescence*, eng. – korigovana vrednost intenziteta fluorescencije

CX3CL1/CX3CR1 - *C-X3-C motif chemokine ligand 1/ C-X3-C motif chemokine receptor 1*, eng. – ligand sa C-X3-C hemokinskim motivom/receptor za ligand sa C-X3-C hemokinskim motivom

CXCL12 - *X-C motif chemokine ligand 12*, eng. - ligand sa C-X-C hemokinskim motivom 12

CXCR4 - *C-X-C motif chemokine receptor 4*, eng. – hemokinski receptor sa C-X-C motivom 4

D-2HG - D-2-hidroksiglutarat

DDR - *DNA damage response*, eng. - odgovor na DNK oštećenje

DMR1 - *differentially methylated region 1*, eng. - diferencijalno metilisan region 1

DMR2 - *differentially methylated region 2*, eng. - diferencijalno metilisan region 2

dNTP - Deoksinukleozid trifosfat

EGFR - *epidermal growth factor receptor*, eng. - receptor za epidermalni faktor rasta

EGFRvIII - *epidermal growth factor receptor variant III*, eng. - receptor epidermalog faktora rasta, varijanta 3

EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija

eNOS - *endothelial Nitric Oxide Synthase*, eng. - azot-monoksid sintaza endotelijalnih ćelija

EOR - *of resection*, eng. - stepen resekcije tumora

EORTC - *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, eng. - Evropska organizacija za istraživanje i terapiju kancera

ERBB2 - *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*, eng. – Erb-B2 receptor proteinske kinaze 2

EUROCARE - *European Cancer Registry*, eng. – evropski registar za rak

EV - *extracellular vesicles*, eng. - ekstracelularne vezikule

FDA - *United States Food and Drug Administration*, eng. - Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država

FF - *fresh frozen*, eng. - sveže zamrznuti uzorci tkiva

FFPE - *formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue*, eng. - tkiva fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinske blokove

FGFR2 - *fibroblast growth factor receptor 2*, eng. - receptor fibroblastnog faktora rasta 2

FGFR3 - *fibroblast growth factor receptor 3*, eng. - receptor fibroblastnog faktora rasta 3

FLAIR - *fluid-attenuated inversion recovery*, eng. - MRI sa prevladavanjem signala cerebrospinalne tečnosti oporavkom inverzije

FOXM1 - *forkhead box M1*, eng.

FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, eng. - fluorescentni rezonantni transfer energije

FSRT - *fractionated stereotactic radiotherapy*, eng. - frakcionisana stereotaktična radioterapija

GABA - *gamma aminobutyric acid*, eng – gama aminobuterna kiselina

GBM – glioblastoma multiforme, lat. – multiformni glioblastom

G-CIMP - *glioma-CpG island methylator phenotype*, eng. - CpG metilacioni fenotip glioma

G-CSF - *granulocyte-colony stimulatory factor*, eng. - faktora stimulacije kolonija granulocita

GDNF - *cell line-derived neurotrophic factor*, eng. – neurotrofični faktor poreklom od glijalnih ćelijskih linija

GEO - *gene expression omnibus*, eng.

GFAP - *glial fibrillary acidic protein*, eng. - glijalni fibrilarni kiseli protein

GIC - *glioma initiating cells*, eng. -glioma inicirajuće ćelije

GLAST - *glutamate aspartate transporter*, eng. - transporter glutamin sintaze

GlcNAc - *N-Acetylglucosamine*, eng. - N-acetilglukozamin

Glut1 - *glucose transporter 1*, eng. - transporter glukoze 1

gp130 - *glycoprotein 130*, eng. – glikoprotein 130

GS - glutamin sintetaza

GSC - *cancer stem cells*, eng. – matične ćelije kancera

GWAS - *Wide Association Studies*, eng. - izučavanja genomskih asocijacija

HCMV - *Human Cytomegalovirus*, eng. - humani citomegalovirus

HFSRT – *hypofractionated stereotactic radiotherapy*, eng. - hipofrakcionisana stereotaktična radioterapija

HIF-1 α - *hypoxia inducible factor 1 α subunit*, eng. - inducibilni faktor hipoksije - 1 α

HPLC - *High performance liquid chromatography*, eng. – tečna hromatografija pod visokim pritiskom

HRM - *High-resolution melt*, eng. – Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije

ICC - *Interclass correlation coefficient*, eng. – međuklasni korelacioni koeficijent

ICD-O - *International Classification of Diseases for Oncology*, eng. – Međunarodna klasifikacija onkoloških bolesti Svetske zdravstvene organizacije

IDH1/2 - *Isocitrate dehydrogenase 1 and 2*, eng. - izocitrat dehidrogenaza 1 i 2

IGFBP2 - *insulin-like growth factor binding protein 2*, eng. – protein vezivanja faktora rasta nalik insulinu

IL13RA2 - *interleukin-13 receptor subunit α -2*, eng. - alfa-2 subjedinica interleukin-13 receptora

IL1 β - *interleukin 1 beta*, eng. – interleukin 1 beta

IL-6 - *interleukin 6*, eng. - interleukin 6

INK4A/Arf - *alternative reading frame protein product of the CDKN2 locus*, eng. - gen za produkt alternativnog okvira čitanja lokusa *CDKN2*

IRS2 - *insulin receptor substrate 2*, eng. - supstrat insulinskog receptora 2

JAK - *Janus kinase*, eng. – janus kinaza

Ki-67 - KI-67 antigen - marker ćelijske proliferacije. Naziv je dobio po početnim slovima grada u kojem je otkriven (*Kiel*, nem.) i rednom broju klona sa mikrotitar ploče iz koje je izolovan (67)

K-Ras - *Kirsten sarcoma virus*, eng. – Kirsten-ov sarcoma virus

LIF - *leukemia inhibitory factor*, eng. - faktor inhibicije leukemije

LKB1/AMPK - *liver kinase B1/adenosine monophosphate-activated protein kinase*, eng. – jetrena kinaza B1/proteinska kinaza aktivirana adenzin-monofosfatom

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*, eng. - mitogenom-aktivirajuća proteinska kinaza

MBP - *maltose binding protein*, eng. - vezivanja maltoze

mCHI3L1- *methylated CHI3L1*., eng. – metilovana varijanta promotornog regiona *CHI3L1*

MCP-3 - *monocyte chemotactic protein-3*, eng. - monocitni hemotaktični proteina 3

MGMT - *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*, eng. - O⁶-metilguanin-DNK transferaza

MHC II - *major histocompatibility complex 2*, eng. – glavni kompleks histokompatibilnosti klase II

mMGMT – *methylated MGMT*., eng. – metilovana varijanta promotornog regiona *MGMT*

MMP2 - *matrix-metalloproteinase 2*, eng. - aktivaciju matriks-metaloproteinaze 2

MR – *maximal (Total) resection*, eng. - maksimalna resekcija

MRI - *magnetic resonance imaging*, eng. - magnetna rezonantna tomografija

MS-MLPA - *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*, eng. - metilaciono specifično višestruko umnožavanje proba nezavisno od ligacije

MSP - *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*, eng. - metilaciono specifična polimerazna lančana reakcija

MT1-MMP - *membrane type 1 metalloproteinase*, eng. - membranska metaloproteinaza tipa 1

MYC- *Myelocytomatosis viral oncogen*, eng. – protoonkogen čije mutacije imaju ulogu u razvijanju Burkittovog limfoma (*Burkitt lymphoma*, eng.).

NCIC - *National Cancer Institute of Canada*, eng. - Kanadski nacionalni institut za kancer

NF1 - *neurofibromin 1*, eng. - neurofibromin 1

NFA1 - *nuclear factor A1*, eng. – nuklearni faktor A1

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, eng. - nuklearni transkripcioni faktor koji interaguje sa enhenserom gena za laki lanac imunoglobulina u aktiviranim B limfocitima

NOA - *The Neurooncology Working Group of the German Cancer Society*, eng.

NOS - *not otherwise specified*, eng.- nije drugačije označeno

NPC - *neural progenitor cells*, eng. – neuralne progenitorne ćelije

NTC – *non template control*, eng. – negativna kontrola (bez DNK matrice)

OD – *optical density*, eng. - optička gustina

Olig2 - *Oligodendrocyte transcription factor 2*, eng. – oligodendrocitni transkripcioni faktor 2

OS - *overall survival*, eng. - ukupno vreme preživljavanja

PARK2 - *parkinson protein 2*, eng. - parkinson protein 2

PCR - *polymerase chain reaction*, eng. - polimerazna lančana reakcija

PDGFRA - *platelet derived growth factor receptor alpha*, eng. - receptor trombocitnog faktora rasta alfa

PDGFRB - *platelet derived growth factor receptor beta*, eng. - receptor trombocitnog faktora rasta beta

PFS - *progression free survival*, eng. - vreme preživljavanja bez progresije bolesti

PHD - *prolyl hydroxylases*, eng. - prolil hidroksilaze

PI3K - *phosphoinositide 3-kinase family*, eng. - gen za fosfatidilinozitol 3-kinazu

PIK3R1 - *phosphoinositide-3-kinase regulatory Subunit 1*, eng. – regulatorna subjedinica 1 fosfatidilinozitol 3-kinaze

PLC - *phospholipase C*, eng. – fosfolipaza C

PMR - *percentage of methylated reference*, eng. - procenat metilovane reference

PMT - proneuralno-mezenhimalna tranzicija

PR – Partial resection, eng. - parcijalna resekcija

PSQ - *Pyrosequencing*, eng. – pirosekvenciranje

PTEN - *phosphatase and tensin homolog*, eng. - homolog fosfataze i tenzina

qMSP - *Quantitative MSP*, eng. - kvantitativni „Real-Time“ MSP

RB1 - *retinoblastoma 1*, eng. - retinoblastom 1

rGBM – *recurrent GBM*, eng. - GBM recidiv

RSR - *stereotactic radiosurgery*, eng. - stereotaktična radiohirurgija

RTK - *receptor tyrosine kinase*, eng. - receptor tirozinske kinaze

RT-PCR - *transcription polymerase chain reaction*, eng.

RTPRD - *receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta*, eng. - tirozin-fosfatazni receptor delta

S-100b - *S-100 calcium binding protein*, eng. - S-100 kalcijum vezujući protein B

SCF - *stem cell factor*, eng. - faktor matičnih ćelija

SCN – *suprachiasmatic uucleus*, eng. - suprahijazmična jezgra

Shh - *Sonic hedgehog*, eng. – „Sonik jež“ (inspiraciju za naziv ovog proteina istraživači su našli u svojevremeno megapopularnom junaku stripova i video igrica (SEGA))

SIP - *siah-1 interacting protein*, eng. – Siah-1 interagujući protein

SNARE - *soluble NSF attachment receptor*, eng

Sox9 - *sex determining region Y-box 9*, eng. - transkripcioni faktor 9 srodan testis determinišućem faktoru SRY

STAT3 - *signal transducer and activator of transcription*, eng. – prenosioac signala i aktivator transkripcije 3

SVZ – *subventricular zone*, eng. – subventrikularna zona

T1W - *T1-weighted sequences*, eng. - T1-mereni snimci

T2W - *T2-weighted sequences*, eng. - T2-merenim snimcima

TACC3 - *transforming acidic coiled-coil containing protein 3*, eng. - transformišuća kisela uporedna proteinska zavojnica 3

TERT - *telomerase reverse transcriptase*, eng. - reverzna transkriptaza telomeraze

TET - *Ten-eleven translocation*, eng.

TGF- α - *transforming growth factor alpha*, eng. - transformišući faktora rasta alfa

TGF- β - *Transforming growth factor beta 1*, eng. – transformišući faktor rasta beta 1

TMB - *tumor mutation burden*, eng. – mutaciono opterećenje tumora

TMZ – *Temozolomide*, eng. - Temozolomid

TNF α - *tumor necrosis factor alpha*, eng. - faktor nekroze tumora alfa

TP53 - *tumor protein P53*, eng. - tumor protein 53

Tregs - *regulatory T cells*, eng. – regulatorne T ćelije

TSC1 - *tuberous sclerosis 1*, eng. - tuberozno sklerozni protein 1

TSC2 - *tuberous sclerosis 2*, eng. - tuberozno sklerozni protein 2

TTF - *Tumor-Treating Fields*, eng. - tumor-tretirajuća polja

U – *units*, eng. - jedinica

uCHI3L1- *unmethylated CHI3L1.*, eng. – metilovana varijanta promotornog regiona *CHI3L1*

uMGMT – *unmethylated MGMT.*, eng. – nemetilovana varijanta promotornog regiona *MGMT*

VEGF-A - *vascular endothelial growth factor A*, eng. - vaskularni-endotelijalni faktor rasta A

WHO - *World Health Organisation*, eng. - Svetska zdravstvena organizacija

WWTR1 - *WW domain containing transcription regulator 1*, eng. – regulator transkripcije 1 sa WW domenom

IZVOD

Glioblastom (GBM) predstavlja najagresivniji i najinvazivniji oblik difuznih glioma. Najčešće se javlja kao primarni tumor mozga, ali može nastati i progresijom od astrocitoma nižeg stepena maligniteta (sekundarni glioblastom, oko 10% GBM).

Njegove histopatološke preparate karakteriše izuzetna morfološka raznovrsnost. Zahvaljujući razvoju molekularne dijagnostike postignut je značajan napredak u rasvetljavanju etiologije ovih tumora i definisanju uspešnijih vidova individualizovanih terapijskih procedura.

Cilj ovog istraživanja predstavljala je procena statusa mutacije gena za izocitrat-dehidrogenazu 1 i 2 (*IDH1* i *IDH2*) i statusa metilacije promotornog regiona gena za O⁶-metilguanin-DNK metiltransferazu *MGMT* i promotornog regiona gena za humani glikoprotein hrskavice (*CHI3L1* ili *YKL*) kao dijagnostičkih, prognostičkih i predikcionih faktora maligniteta kod srpske populacije GBM pacijenata. Pacijenti su operisani na Klinici za neurohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu u periodu od 2013. do 2019. god.

Evaluacija statusa mutacije *IDH1/2* vršena je direktnom metodom sekvenciranja po Sangeru, dok je status metilacije *MGMT* i *CHI3L1* vršen metodom konvencionalne i „Real-Time“ metilaciono specifične polimerazne lančane reakcije (MSP). Starost, stepen resekcije i tip primenjene pomoćne hemioterapije izdvojeni su kao nezavisni prognostički faktori ukupnog vremena preživljavanja pacijenata obolelih od glioblastoma. Takođe, pokazana je superiornost hemioterapijskog protokola baziranog na TMZ u poređenju sa derivatima nitrozouree (PCV i BCNU).

Pozitivan status *IDH1-R132H* mutacije utvrđen je kod 6.67% (3/45) pacijenata. Njih je odlikovalo duže vreme preživljavanja, pozitivan status metilacije *MGMT* i *CHI3L1* i mlađa starosna struktura.

Semi-kvantitativni pristupi MSP metodi unapredili su njenu senzitivnost u evaluaciji statusa metilacije *MGMT* i *CHI3L1*. Vreme preživljavanja pacijenata sa hipermetilovanim semi-kvantitativnim statusom metilacije *MGMT* (11.25 ± 6.55 meseci) bilo je značajno duže u odnosu na nemetilovanu grupu (5.93 ± 3.62 meseci), u okviru *IDH-wt* homogene kohorte GBM pacijenata starijih od 50 godina sa izvršenom maksimalnom ili parcijalnom resekcijom tumorske mase.

Dopunsko određivanje statusa metilacije *CHI3L1* potencijalno uvećava prognostički značaj statusa metilacije *MGMT*, što je neophodno dodatno istražiti sveobuhvatnijom studijom.

SUMMARY

Glioblastomas (GBM) represent one of the most aggressive types of diffuse glioma. Although they usually arise as primary brain tumors, in 10% of GBM cases, they develop from low-grade astrocytomas (secondary GBM).

They express striking morphological heterogeneity, which is often encountered during a histopathological examination. Due to advances in molecular diagnostics, significant progress was made in understanding the pathogenesis of tumor growth and the development of personalized therapeutic protocols.

The aim of this study was to evaluate the diagnostic, prognostic, and predictive properties of the selected markers -IDH1/2 (isocitrate-dehydrogenase 1 and 2) mutation and *MGMT* (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) and *CHI3L1* (Chitinase-3-like protein 1) methylation status of the promoter regions in a Serbian population of GBM patients. Patients operated on the Neurosurgery Clinic (The University Clinical Centre of Niš, Serbia) between 2013 and 2019 were included in this study.

Sanger direct sequencing was used to detect the presence of *IDH1/2* mutations in samples and conventional and Real-Time methylation-specific polymerase chain reaction methods for methylation status evaluation.

Age, the extent of tumor resection, and type of adjuvant chemotherapy were recognized as independent prognostic factors in GBM patients. Furthermore, results suggested the superiority of adjuvant Temozolomide over adjuvant chemotherapy with a nitrosourea-based protocol (PCV and BCNU).

IDH1 mutation was detected in 6.67% (3/45) of patients and was associated with more prolonged overall survival, younger age, and hypermethylation of the *MGMT* and *CHI3L1* promoter.

Semi-quantitative MSP approaches resulted in improved detection sensitivity of *MGMT* methylation status compared to the qualitative MSP method. Among *IDH-wt* homogenous cohort of GBM patients older than 50 years with complete/partial resection of the tumor, overall survival of patients harboring highly methylated *MGMT* was significantly longer in comparison with the unmethylated group.

Complementary evaluation of *CHI3L1* promoter methylation status potentially increases the prognostic value of the *MGMT* methylation status, which should be further investigated in more comprehensive research.

BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA

BIOGRAFIJA

Nikola Jovanović je rođen 16. decembra 1990. u Jagodini. Osnovnu školu Branko Miljković u Nišu završio je sa odličnim uspehom kao nosilac Vukove diplome, a Gimnaziju Svetozar Marković sa odličnim uspehom.

Osnovne akademske studije biologije upisao je 2009. godine na odseku za Biologiju sa ekologijom Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, a završio 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,75. Iste godine upisao je master akademske studije biologije, a zvanje master biolog stekao je 2015. godine sa prosečnom ocenom 9.74. Dobitnik je stipendije Fonda za mlade talente Republike Srbije za 2014. godinu.

Doktorske akademske studije upisuje 2015. godine na odseku za Biologiju sa ekologijom, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, gde je položio sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija (prosečna ocena 10,0).

Od početka 2016. godine biva angažovan u izvođenju laboratorijskih vežbi na predmetima Molekularna biologija (OAS), Osnovi genetskog inženjerstva (MAS), Humana genetika (MAS), Eksperimentalna biohemija (MAS), Forenzička biologija (MAS) i Genotoksikologija (MAS). U zvanje istraživač-pripravnik izabran je 2016. god., a zvanje istraživač-saradnik 2019. god. Kao Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja bio je angažovan na projektu “Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološki aktivnim agensima” (OI 172061), a potom na projektu “Preventivni, terapijski i etički pristup pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije” (III 41018), na kome je od januara 2019. god. bio zaposlen kao istraživač-pripravnik, a od aprila 2019. kao istraživač-saradnik. Od januara 2020. god. zaposlen je kao istraživač-saradnik na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Učesnik je Prve napredne petničke škole molekularne biologije „Kvantitativni PCR“ za studente doktorskih studija, u organizaciji Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Odeljenja za biologiju Istraživačke stanice Petnica.

Dobitnik je povelje povodom Dana Fakulteta, kao jedan od istraživača sa najviše objavljenih radova u 2019. godini.

BIBLIOGRAFIJA**A:Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)**

Zorica S Mitić, Boris Jovanović, Snežana Č Jovanović, Zorica Z Stojanović-Radić, Tatjana Mihajilov-Krstev, **Nikola M Jovanović**, Biljana M Nikolić, Petar D Marin, Bojan K Zlatković, Gordana S Stojanović, *Essential oils of Pinus halepensis and P. heldreichii: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity*, Industrial Crops and Products, vol.140 (2019) 111702. [doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111702>]

B:Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

Boris Jovanović, **Nikola Jovanović**, Vladimir J Cvetković, Sanja Matić, Snežana Stanić, Elizabeth M Whitley, Tatjana Lj Mitrović, *The effects of a human food additive, titanium dioxide nanoparticles E171, on Drosophila melanogaster-a 20 generation dietary exposure experiment*, Scientific reports, vol.8 (1) (2018) 1-12. [doi: <https://10.1038/s41598-018-36174-w>]

Vladimir J Cvetković, Boris Jovanović, Maja Lazarević, **Nikola Jovanović**, Dimitrija Savić-Zdravković, Tatjana Mitrović, Vladimir Žikić, *Changes in the wing shape and size in Drosophila melanogaster treated with food grade titanium dioxide nanoparticles (E171)–A multigenerational study*, Chemosphere, vol.261 (2020) 127787. [doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127787>]

C: Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović, Vladimir J Cvetković, Svetlana Tošić, Jelena Vitorović, Slaviša Stamenković, Vesna Nikolov, Aleksandar Kostić, Nataša Vidović, Miljan Krstić, Tatjana Jevtović-Stoimenov, Dušica Pavlović, *The Impact of MGMT Promoter Methylation and Temozolomide Treatment in Serbian Patients with Primary Glioblastoma*, Medicina, vol.55 (2) (2019) 34. [doi: <https://10.3390/medicina55020034>]

C: Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović, Vladimir J Cvetković, Svetlana Tošić, Jelena Vitorović, Slaviša Stamenković, Vesna Nikolov, Aleksandar Kostić, Nataša Vidović, Tatjana Jevtović-Stoimenov, Dušica Pavlović, *Prognostic significance of MGMT promoter methylation in diffuse glioma patients*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, vol.33(1) (2019) 639-644. [doi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1604158>]

D: Radovi u časopisima od istaknutog nacionalnog značaja (M52)

Nikola M. Jovanović, Vesna Nikolov, Nataša Vidović, Jelena Vitorović, Svetlana Tošić, Vladimir J. Cvetković, Tatjana Mitrović, Tatjana Jevtović-Stoimenov, *Optimizing MSP reaction conditions of MGMT promoter in glioblastoma FFPE samples*, Biologica Nyssana, vol.11(2) (2020) 139-147. [doi: <https://zenodo.org/record/4393973#.YAlhnRZ7mUk>]

E: Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović, Vladimir J. Cvetković, Vesna Nikolov, Svetlana Tošić, Jelena Vitorović, Aleksandar Kostić, Nataša Vidović, Miljan Krstić, Tatjana Jevtović-Stoimenov, Dušica Pavlović, *The methylation status of MGMT in Serbian patients with diffuse glioma*, 6th Congress of the Serbian Genetic Society, (2019) 97.

Cvetković, V.J., Dimitrijević, J., Cvetanović, A., Mitrović, T., **Jovanović, N.**, Stanković, S.S., Žikić, V., *Transferring spotted-wing drosophila from natural environment to laboratory conditions: our first experiences*, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions Stara planina Mt. 20th-23th June, 2019, vol.13 (2019) 126.

Spasov Kristina, Stepić Marija, Vitorović Jelena, Cvetković Vladimir, **Jovanović Nikola**, Dimitrijević Jovana, Stanković Nikola, Mitrović Tatjana, Joković Nataša, *Drosophila larvae exposed to H2O2 as a model of acute oxidative stress for the examination of plants antioxidative potential*, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions Stara planina Mt. 20th-23th June, (2019) 134.

Jovanović, N., Cvetković, V., Mitrović, T., Mladenović, M., Arsić, J., Stanković, M., Stamenković, S., *The influence of ethyl acetate extract of lichen Hypogymnia physodes (L.) Nyl. on survival rate of Drosophila melanogaster*, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Book of Abstracts, (2016) 125.

F: Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

Nikola Jovanović, Vladimir Cvetković, Tatjana Mitrović, Vesna Nikolov, Aleksandar Kostić, Nataša Vidović, Miljan Krstić, Tatjana Jevtović-Stoimenov, *Metilacioni status promotora MGMT kao predikcioni i prognostički faktor kod glioblastoma*, Drugi kongres biologa Srbije / knjiga sažetaka, (2018) 264.

Nikola Jovanović, Jelena Matejić, Nataša Joković, Zorica Stojanović-Radić, Nikola Stanković, Jelena Vitorović, Tatjana Mihailov-Krstev, *Antimikrobna i antioksidativna aktivnost različitih vrsta meda*, Drugi kongres biologa Srbije / knjiga sažetaka, vol.251 (2018)

ИЗЈАВЕ АУТОРА

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

АНАЛИЗА ОДАБРАНИХ МАРКЕРА ГЛИОБЛАСТОМА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Никола, М. Јовановић

**ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

АНАЛИЗА ОДАБРАНИХ МАРКЕРА ГЛИОБЛАСТОМА

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Никола М. Јовановић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

АНАЛИЗА ОДАБРАНИХ МАРКЕРА ГЛИОБЛАСТОМА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Никола М. Јовановић