



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ
ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

ГЕРГАНА СТЕФАНОВА СТАНЧЕВА

ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ
ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА И ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Област на висше образование: 4., „Природни науки, математика и
информатика”

Професионално направление: 4.3. „Биологически науки”

Научна програма „Молекулярна биология“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Чл.кор.проф.д-р Ваньо Митев, дм, дбн

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:

Доц.д-р Радка Кънева

д-р Теодора Горанова

София 2015

Дисертационният труд съдържа 248 страници, 78 фигури и 70 таблици.
Цитирани са 781 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрата по Медицинска Химия и Биохимия при Медицински Университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедрата по Медицинска Химия и Биохимия при Медицински Университет – София.

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от Съвета за медицинска наука на Медицински Университет – София и Фонд Научни Изследвания към МОН.

Публичната защита ще се състои на 14.05.2015 от 13:00 часа във П^{ра} аудиторията на Предклиничен Университетски Център (ПУЦ), Медицински Университет – София, ул. “Здраве”2.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата Медицинска Химия и Биохимия, Център по Молекулна Медицина, Медицински университет – София, 14^{-ти} етаж, СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. Здраве № 2.

Посвецавам този труд от цялото си сърце на моето семейство!

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторът на този труд би искал да благодари на своя научен ръководител чл.кор.проф. д-р Ваньо Митев, на научните си консултанти доц. д-р Радка Кънева и д-р Теодора Горанова, както и на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които през цялото време освен колеги бяха и истински учители.

Специални благодарности към д-р Теодора Горанова, д.б., без чиято експертна, колегиална и приятелска подкрепа осъществяването на настоящия дисертационен труд не би бил възможен.

Благодарности към екипа на проф. д-р Н. Габровски от клиниката по Неврохирургия към УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, които помогнаха за събирането на необходимата група пациенти, прецизното хирургично отстраняване на туморните тъкани и тяхното качествено съхраняване, както и за осигурената детайлна информация за пациентите, за да се осъществи това проучване.

Благодарности към доц. д-р М. Каменова и екипа ѝ от клиника по "Клинична патология, консервиране на тъкани и съдебна медицина", УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, който помогнаха за събирането, поставянето на коректна хистологичната диагноза на избраната група пациенти, извърши и анализира имунохистологичните изследвания, чието качество и яснота биха привлекли вниманието на всеки професионалист в тази област по света.

Благодарности към моето семейството и всички близки хора за дългогодишната подкрепа и разбиране!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

Кирилица:

2-HG	2-хидроксиглутарат
α-KG	α-кетоглутарат
АА	Анапластичен астрцитом
АК	Аминокиселина
АОА	Анапластичен олигоастрцитом
АОД	Анапластичен олигодендроглиом
АМФ	Аденозин монофосфат
АТФ	Аденозин трифосфат
ГБМ	Глиобластома мултиформе
ГТФ	Гуанозин трифосфат
ГН	Геномна нестабилност
ДА	Дифузен астрцитом
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
дНТФ	Дезоксинуклеотидтрифосфати
ИКМ	Извънклетъчния матрикс
КА	Карбокси анхидраза
КЖ	Качеството на живот
КТ	Компютърна томография
МГ	Малигнените глиоми
ММП	Матрикс металопротеинази
МСН	Микросателитна нестабилност
МСН-В	Висока степен на микросателитна нестабилност
МСН-Н	Ниска степен на микросателитна нестабилност
МСС	Микросателитна стабилност
НБК	Намален брой копия
н.дв.	Нуклеотидни двойки
НС	Нервната система
ОД	Олигодендроглиом
ОА	Олигоастрцитом
РНК	Рибонуклеинова киселина
СЗО	Световната Здравна Организация
СПИН	Синдром на придобитата имунна недостатъчност
УБК	Увеличен брой копия
ХН	Хромозомната нестабилност
ЦНС	Централната Нервна Система
ЯМР	Ядрено- магнитен резонанс

Латиница:

A	Аденин
Arg	Аргинин
aCGH	Сравнителна геномна хибридизация
EGFR	Епидермалния растежен фактор
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
IDH1/IDH2	Изоцитрат дехидрогеназа 1/2
CAIX	Карбокси анхидраза IX (CAIX)

CIC	Capicua ген
C	Цитозин
CIMP	метилаторният фенотип на CpG островите
CNVs	Вариациите в броя копийни ДНК
CpG	Цитозин-фосфат-гуанин
ddH₂O	Двойно дестилирана вода
FLT1(VEGFR-1)	Fms-like tyrosine kinase 1/ Vascular endothelial growth factor receptor 1
FUBP1	Far Upstream Element {FUSE} Binding Protein 1
G	Гуанин
HIF1A/ARNT/	хипоксия-индуцирания фактор 1/ arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
HIF2A/EPAS1/	endothelial PAS domain protein
HIF3A/IPAS/	inhibitory PAS domain protein
His	хистидин
HIV	Human immunodeficiency virus
HMG	high-mobility group
HREs	hypoxia-response elements
HRM	High-resolution melting
IgE	Имуноглобулин E
IL-3/4	Интерлевкин-3/4
JHDMs	Jumonji-C domain histone demethylases
KDR(VEGFR-2)	Kinase insert domain receptor, Vascular endothelial growth factor receptor 2
Leu	левцин
LOH	Загуба на хетерозиготност
Lys	Лизин
KPS	Karnovsky performance status
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDM	Murine Double Minute ген
MGMT	O6-метилгуанин метил-трансферазния ген
MLH1	Mut L homologue 1 (белтък от MMR)
MMP-9	Матрикс металопротеиназа-9
MMR	Mismatch репарационна система варианти
MSH2	Mut S homologue 2 (белтък от MMR)
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF1/2	Неврофиброматоза 1/2
PET	Позитронна емисионна томография

PDGFRA Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PI3K фосфатидил инозитол 3- киназа
PTEN Phosphatase and tensin homolog
RTK рецепторните тирозин киназа
PCR Полимеразна Верижна Реакция
PIP3 фосфатидил-инозитол трифосфат
Pro Пролин
RB1 Ретинобластома 1
SNP single nucleotide polymorphism/
 единични нуклеотидни полиморфизми
SOX *SRY-type HMG box* гени
T тимин
TCGA The Cancer Genome Atlas
TGF- β 2 Transforming growth factor- β 2
TGF- α Transforming growth factor- α
TET2 ten-eleven translocation
 methylcytosine dioxygenase
TMZ Темозоломид
TP53 Tumor Protein 53 ген
TSC1/2 Туберозна склероза 1/2
UV ултравиолетови лъчи
VEGFA съдовия ендотелен растежен
 фактор А
VHL von Hippel-Lindau белтъка

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ.....	11
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	12
1.1. КЛЕТКИ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА.....	12
1.1.1. ТИПОВЕ ГЛИАЛНИ КЛЕТКИ В ЦНС.....	12
1.2. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ГЛИОМИ.....	14
1.3. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ.....	15
1.4. ЕТИОЛОГИЯ И РИСКОВИ ФАКТОРИ.....	16
1.4.1. БИОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ И ФАКТОРИ НА СРЕДАТА, СВЪРЗАНИ С ГЛИАЛНИ ТУМОРИ	16
1.4.1.1. ВЪЗРАСТ И ПОЛ.....	17
1.4.1.2. ОБЛЪЧВАНЕ С ЙОНИЗИРАЩО И НЕЙОНИЗИРАЩО ЛЪЧЕНИЕ	17
1.4.1.3. ДРУГИ ВЪНШНИ ФАКТОРИ.....	17
1.4.2. ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ, СИНДРОМИ И ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНИЕ	17
1.4.2.1. МАЛИГНЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ.....	17
1.4.2.2. ГЕНЕТИЧНИ СИНДРОМИ И НАСЛЕДСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ	18
1.4.2.3. АСТМА, АЛЕРГИЯ, ДРУГИ АТОПИЧНИ СЪСТОЯНИЯ И ИНФЕКЦИИ	18
1.5. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ.....	19
1.5.1. ОПЕРАТИВНО ЛЕЧЕНИЕ.....	19
1.5.2. ЛЪЧЕТЕРАПИЯ.....	19
1.5.3. ХИМИОТЕРАПИЯ.....	20
1.6. ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ.....	20
1.6.1. ГЕНЕТИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ.....	20
1.6.2. МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ.....	21
1.6.3. ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ.....	22
1.7. МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНО И ПРЕДИКТИВНО ЗНАЧЕНИЕ.....	23
1.7.1. КЛИНИЧНИ ФАКТОРИ.....	23
1.7.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ.....	24
1.7.2.1. ДНК МУТАЦИИ.....	25
1.7.2.1.1. ИЗОЦИТРАТ ДЕХИДРОГЕНАЗИТЕ.....	25
1.7.2.1.2. TP53.....	27
1.7.2.2. СТРУКТУРНИ ИЗМЕНЕНИЯ.....	29
1.7.2.2.1. ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ.....	29
1.7.2.2.1.1. Амплификации.....	29
1.7.2.2.1.2. Делеции.....	30
1.7.2.2.1.3. 1p и 19q коделеционни събития.....	31
1.7.2.3. ЕПИГЕНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ МАЛИГЛЕНИ ГЛИОМИ.....	32
1.7.2.3.1. MGMT ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ.....	33
1.7.2.3.2. МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ (MCH, MSI) ПРИ ГЛИОМИ.....	34
1.7.2.4. ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ.....	36
1.7.2.4.1. ТУМОРНА ХИПОКСИЯ.....	36
1.7.2.4.1.1. Хипоксия индуцирани фактори (HIFs)	36
1.7.2.4.1.2. Карбокси анхидраза IX (CAIX)	38
1.7.2.4.2. ТУМОРНА АНГИОГЕНЕЗА.....	39
1.7.2.4.2.1. Съдовия ендотелен растежен фактор A (VEGFA) и неговите рецептори.....	39
1.7.2.4.2.2. Рецептор на епидермалния растежен фактор (EGFR)	41
1.7.2.4.2.3. Трансформация растежен фактор-β (TGF- β)	43
1.7.2.4.3. ТУМОРНА ПРОГРЕСИЯ.....	44
1.7.2.4.3.1. SOX (SRV-type HMG box) суперсемејството.....	44
1.7.2.4.3.2. Матрикс металопротеиназа 9 (MMP-9).....	46
1.8. ОБОБЩЕНИЕ.....	47

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	48
2.1. ЦЕЛ	48
2.2. ЗАДАЧИ	48
2.2.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ	48
2.2.1.1. СЪЗДАВАНЕ НА ГЛИОМНА БИОБАНКА	48
2.2.1.2. СЕКВЕНЦИОНЕН АНАЛИЗ НА <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> И <i>TP53</i> ГЕНИТЕ	48
2.2.2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЗАГУБАТА НА ГЕНЕТИЧЕН МАТЕРИАЛ В ХРОМОЗОМИ 1 И 19	48
2.2.3. АНАЛИЗ ЗА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА <i>MGMT</i> ГЕНА	48
2.2.4. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ	48
2.2.5. ГЕННО-ЕКСПРЕСИОННИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ПОДБРАНИ КАНДИДАТ- ГЕНИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ	49
2.2.6. ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ В ТЪРСЕНЕ НА НОВИ БИОМАРКЕРИ	49
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	50
3.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ	50
3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ	50
3.3. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ	51
3.3.1. ЛАЗЕРНА МИКРОДИСЕКЦИЯ НА РАКОВИ И НОРМАЛНИ КЛЕТКИ	51
3.3.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК	52
3.3.2.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ЧРЕЗ ПОЛУАВТОМАТИЗИРАНА СИСТЕМА СHEMA ^{MAG} IC MAGNETIC SEPARATION MODULE I	52
3.3.2.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ БИОПСИЧЕН МАТЕРИАЛ	53
3.3.2.2.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ СВЕЖА ТЪКАН	54
3.3.2.2.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ ПАРАФИНОВО БЛОКЧЕ	55
3.3.3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВОТО НА ПОЛУЧЕНАТА ДНК	55
3.3.4. БИСУЛФИТНО ТРЕТИРАНЕ НА ДНК	56
3.3.5. ИЗОЛИРАНЕ НА РНК	58
3.3.5.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВОТО НА ПОЛУЧЕНАТА РНК	59
3.3.6. ОБРАТНА ТРАНСКРИПЦИЯ И СИНТЕЗ НА кДНК	60
3.4. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА	61
3.4.1. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	61
3.4.1.1. КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	63
3.4.2. ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА	64
3.4.3. МУТАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА ГЕНИТЕ <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> И <i>TP53</i>	65
3.4.3.1. СИСТЕМЕН ХОД	65
3.4.3.2. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ (ПО SANGER)	65
3.4.3.3. ЗАГУБА НА ХЕТЕРОЗИГОТНОСТ (LOH)	67
3.4.4. MLPA АНАЛИЗ ЗА ТЪРСЕНЕ НА ЗАГУБИ В ХРОМОЗОМИ 1 И 19	69
3.4.5. АНАЛИЗ ЗА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА <i>MGMT</i> ГЕНА	74
3.4.5.1. СИСТЕМЕН ХОД	74
3.4.5.2. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ТОПЕНЕ С ВИСОКА РЕЗОЛЮЦИЯ НА ДНК	74
3.4.5.3. БИСУЛФИТНО СЕКВЕНИРАНЕ	76
3.4.6. АНАЛИЗ ЗА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ	76
3.4.7. ГЕННО-ЕКСПРЕСИОННИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ПОДБРАНИ ГЕНИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ	79
3.4.7.1. СИСТЕМЕН ХОД	79
3.4.7.2. PCR В РЕАЛНО ВРЕМЕ (REAL-TIME PCR)	79
3.4.8. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ (aCGH) ПРИ ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ	81
3.5. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ	85
3.5.1. СТАТИСТИЧЕСКА ПРОВЕРКА НА ХИПОТЕЗАТА	86
3.5.1.1. НУЛЕВА ХИПОТЕЗА (H ₀)	86
3.5.1.2. МЕТОД χ^2	86

3.5.1.3. ТЕСТ НА ФИШЕР (FISHER'S TEST)	87
3.5.2. ТЕСТОВЕ ЗА ПРОМЕНЛИВИ С МНОЖЕСТВО ИЗМЕРВАНИЯ.....	88
3.5.2.1. ТЕСТ НА МАН-УИТНИ (MANN-WHITNEY)	88
3.5.2.2. АНАЛИЗ НА КРУСКАЛ-УОЛИС (KRUSKAL-WALLIS H)	88
3.5.3. КОРЕЛАЦИОННИ АНАЛИЗИ.....	89
3.5.3.2. КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ НА ПИЪРСЪН (PEARSON)	89
3.5.3.3. СПИРМАН (SPEARMANN) КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ.....	89
3.5.4. АНАЛИЗ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА.....	90
3.5.4.1. КАПЛАН-МАЙЕР (KAPLAN-MAYER) КРИВИ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	90
3.5.4.2. LOG-RANK ТЕСТ.....	90
3.5.4.3. КОКС-РЕГРЕСИОНЕН АНАЛИЗ.....	90
3.5.4.4. КОЕФИЦИЕНТ НА РИСК (HAZARD RATIO, HR)	91
3.5.5. ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ ОТ aCGH.....	92
3.5.5.1. КЛЪСТЕРИРАНЕ.....	92
3.5.5.1.1. ЙЕРАРХИЧНО КЛЪСТЕРИРАНЕ.....	92
3.5.5.2. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ.....	94
3.5.5.2.1. STAC (Significance Testing for Aberrant Copy number)	94
3.5.5.2.2. GISTIC.....	94
 4. РЕЗУЛТАТИ	 96
 4.1. ГЛИОМНА БИОБАНКА	 96
4.1.1. ГЛИОМНА ДНК БАНКА.....	96
4.1.2. ГЛИОМНА РНК БАНКА.....	96
4.2. ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ	97
4.3. СЕКВЕНЦИОНЕН АНАЛИЗ - IDH1, IDH2 И TP53	98
4.3.1. СИСТЕМЕН ХОД.....	98
4.3.2. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНИТЕ IDH1 И IDH2.....	99
4.3.2.1. LOH.....	101
4.3.3. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНА TP53.....	104
4.3.4. ОЦЕНКА НА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ В IDH1, IDH2 И TP53.....	112
4.4. АНАЛИЗ ЗА НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q	115
4.4.1. СИСТЕМЕН ХОД.....	115
4.4.2. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ, ПОЛУЧЕНИ ОТ MLPA МЕТОДА ЗА ДЕЛЕЦИИ В 1p И 19q ХРОМОЗОМНИ РАМЕНА.....	115
4.5. АНАЛИЗ НА MGMT ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ	123
4.5.1. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ТОПЕНЕ С ВИСОКА РЕЗОЛЮЦИЯ НА ДНК.....	123
4.5.2. ПОТВЪРЖДАВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЧРЕЗ БИСУЛФИТНО СЕКВЕНИРАНЕ.....	124
4.5.3. АНАЛИЗ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТ И MGMT ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ.....	124
4.6. АНАЛИЗ НА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ	126
4.7. АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ	130
4.7.1. HIF1a, HIF2a и HIF3a.....	131
4.7.2. CAIX.....	131
4.7.3. KDR, FLT1 и VEGFA.....	133
4.7.4. MMP9.....	134
4.7.5. EGFR.....	134
4.7.6. TGF-β2.....	134
4.7.7. SOX гени.....	137
4.8. ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ	141
4.8.1. ПОДБОР НА ПАЦИЕНТИ.....	141
4.8.2. ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ ОТ aCGH.....	141
4.8.2.1. АНАЛИЗ НА ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q.....	143
4.8.2.2. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ.....	144
4.8.2.2.1. STAC.....	144
4.8.2.2.2. GISTIC.....	145

4.8.2.3. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ.....	147
4.8.2.4. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПАЦИЕНТИТЕ ПО ГРУПИ.....	148
4.8.2.4.1. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД ГРУПИТЕ ПОЛУЧЕНИ ПРИ СЛНС.....	148
4.8.2.4.2. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД <i>IDH1/2</i> МУТАЦИОННИЯ СТАТУС.....	151
1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В <i>IDH1/2</i> С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	151
2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В <i>IDH1/2</i> С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	152
 5. ОБСЪЖДАНЕ.....	 157
 5.1. ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	157
5.2. <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> И <i>TP53</i> В МАЛИГНЕНИТЕ ГЛИОМИ.....	158
5.3. НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q	163
5.4. <i>MGMT</i> ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ И МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ.....	168
5.5. ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ.....	171
5.6. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ (aCGH)	182
5.5.1. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ.....	182
5.5.2. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ.....	191
5.5.3. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД <i>IDH1/2</i> МУТАЦИОННИЯ СТАТУС.....	199
1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В <i>IDH1/2</i> С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	199
2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В <i>IDH1/2</i> С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	202
 6. ИЗВОДИ.....	 208
 7. ПРИНОСИ.....	 209
7.1. ПРИНОСИ С НАУЧНО – ФУНДАМЕНТАЛЕН ХАРАКТЕР.....	209
7.2. ПРИНОСИ С НАУЧНО - ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР.....	209
7.3. ПРИНОСИ С МЕТОДИЧЕН ХАРАКТЕР.....	209
7.4. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР.....	209
 БИБЛИОГРАФИЯ.....	 210
 ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	 247
 ПРИЛОЖЕНИЯ	

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът е една от водещите причини за смърт в целия свят. Почти всеки трети човек ще развие рак на определен етап от живота си. Мозъчните тумори, в частност малигнените глиоми (МГ), които представляват най-често срещаните първични малигнени неоплазии се характеризират с висока смъртност. В същото време пред днешната медицина сериозен клиничен и терапевтичен проблем представлява хетерогенността както в клиничните характеристики, така и в поведението на глиалните тумори. Така при пациенти със сходни клинични данни (хистологична диагноза, локализация на тумора, обем, КТ/ЯМР, възраст и т.н.) се наблюдават разлики в поведението на тумора – някои неоплазии са много по-агресивни и резистентни към лечението, което води до бързо влошаване качеството на живот (КЖ) и кратка преживяемост. Следователно съществува необходимост от нови, прецизни методи за характеризиране на мозъчните тумори, които да отразяват поведението им и да се основават на показатели с по-добра прогностична стойност.

В последните години голям брой проучвания са проведени върху глиомите и в резултат на това са предложени различни прогностични фактори. Въпреки това, повечето изследвания са фокусирани върху индивидуални маркери и не са изследвали корелациите между тях, които биха посочили най-добрите показатели за прогнозиране на преживяемостта, КЖ и ефикасността на лечението. Поради тези причини темата на този дисертационен труд е опит да се обвържат хирургичните, клиничните и молекулните аспекти на малигнените глиални тумори с фокус върху тяхната прогностична и предиктивна стойност. В търсене на обективни прогностични и предиктивни фактори, настоящето проучване анализира данни засягащи различни показатели както демографски (възраст, пол и т.н.) и клинични (степен на резекция, туморна локализация и т.н.), така също генетични (мутации или експресионни промени в различни гени), геномни (вариации в броя на ДНК копията) и епигенетични (промоторно метилиране).

Целта на настоящия дисертационен труд е да изследва подробно молекулните основи засегнати в малигнените процеси на глиалната туморогенеза, както и да проучи потенциални кандидат-биомаркери с прогностична и предиктивна стойност при български пациенти с малигнени глиални тумори. Това ще подпомогне избора на терапия и консултирането на пациентите. Изучаването на факторите, влияещи върху ефикасността на лечението, ще доведе до индивидуален избор на лечение при всеки пациент.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. КЛЕТКИ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА

Централната Нервна Система (ЦНС) е изградена от два вида клетки – неврони и клетки с общото название невроглия или просто глия („glia” от гръцки “лепило”). Клетките на глията, за разлика от невроните, не генерират електропотенциали, наричат се глиоцити и според местоположението си се разделят на централни, локализирани в ЦНС (макроглия, микроглия и епендимоцити), и периферни, намиращи се в периферната нервна система (сателитни и Шванови клетки). Докато невроните са отговорни за уникалните функции на нервната система, глиалните клетки, са тези, които осигуряват изхранването на нервната система (НС), подържането на хомеостазата ѝ и формирането на миелина. Установено е, че те отговарят и за изолирането на невроналните процеси, контрол на заобикалящата невроните среда, а също така взимат участие в процеса на невронната поправка. Освен това, глиални клетки играят фундаментална роля по време на ембрионалното развитие на нервната система чрез осигуряване на скелет за мигриращите неврони и нарастващите аксони ^(1, 2). Досега широко приетата хипотеза, че глиалните клетки превъзхождат по брой 100-те милиарда неврони, присъстващи в човешкия мозък и то в съотношение 50 глиални клетки на един неврон ⁽³⁾, наскоро беше подложена на съмнение, като според последните хипотези приблизително една глиална клетка се пада на един неврон ^(2, 4). Независимо от съотношението на клетките намиращи се в ЦНС, значението на глията остава безспорно и изучаването на техния пълен функционален диапазон продължава да буди научен интерес ^(2, 5, 6). Въпреки че глиалните клетки не могат да изпращат насочени сигнали на дълги разстояния, те могат да произвеждат кратки електрически сигнали чрез мембранно-разположените си калциеви канали. Тези сигнали се разпространяват бързо, повлиявайки много неврони почти едновременно. Освен това освобождаването на невротрансмитери е процес зависим от извънклетъчните концентрации на Ca^{2+} , като по този начин глиалните клетки пряко участват и в координиране на синаптичната активност ^(2, 4, 6, 7).

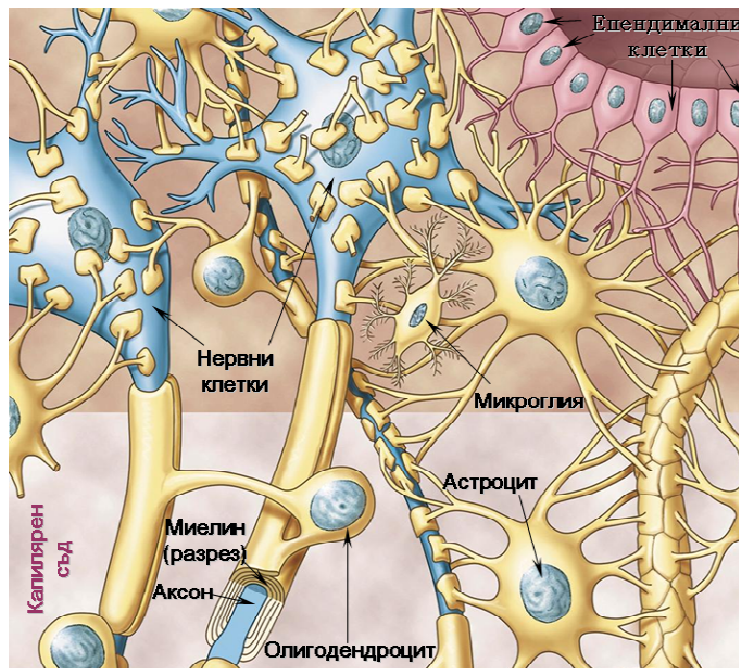
1.1.1. ТИПОВЕ ГЛИАЛНИ КЛЕТКИ В ЦНС

Глиалните клетки, намиращи се в ЦНС, се делят основно на два основни вида: макроглия (астроцити, олигодендроцити) и микроглия (микроглиоцити), всеки от които се отличава, както във функционално, така и в структурно отношение (*Фиг.1.1*) ⁽²⁾. Астроцитите или "звездоподобните клетки" са най-многобройните и разнообразни клетки в ЦНС, показвайки хетерогенност, както във функционално, така и в морфологично отношение. Астроцитите биват два типа - протоплазмени астроцити, локализирани в сивото мозъчно вещество, отличаващи се с бързата си реакция при изпълнението на голяма последователност от свързани процеси, и фиброзни астроцити, по-често наблюдавани в бялото мозъчно вещество, характеризиращи се като по-бавно действащи и свързани с изпълнението на по-малка последователност от процеси.

Астроцитите допринасят, както за поддържане на извънклетъчното pH чрез редуциране на CO_2 ⁽⁸⁾, така и за контролирането на извънклетъчното осмотично налягане чрез поддържане на мозъчния воден баланс ⁽⁹⁾. Многобройните процеси, в които астроцитите участват, както и множеството контакти, които образуват с капилярите и останалата част от нервната система, правят тези клетки най-подходящи за ефективен обмен на молекули и йони.

Механизмите за контрол на извънклетъчен осмоларитет включват обмен на малки неутрални молекули и транспорт на вода през специални канали, наричани аквапорини, намиращи се в мембраната на астроцитите ^(10, 11). Този факт, заедно с възможността им да установяват плътен контакт с неврони, капиляри и цереброспиналната течност ги поставя в уникалната позиция да контролират средата, в която неврони нормално функционират и да подпомагат създаването на напълно функционираща кръвно-мозъчна бариера ⁽¹²⁻¹⁵⁾. Невроналната хомеостаза е от решаващо значение поради изключителната им чувствителност към промени в концентрацията на йони и невротрансмитери, и на факта, че тези промени могат

да станат значими при много малко допълнителни количества от даденото вещество в много ограничено извънклетъчно пространство. Извънклетъчната невротрансмитерна концентрация през цялото време трябва да се поддържа много ниска, за да може освобождаването им от синаптичната мембрана да генерира значителна промяна в невротрансмитерната концентрация⁽²⁾.



Фигура 1.1. Видове глиялни клетки⁽¹⁶⁾

Олигодендроцитите се намират както в сивото, така и в бялото вещество на мозъка. В сравнение с астроцитите те притежават по-малко на брой израстъци. Поради присъщата им морфологична хетерогенност олигодендроцитите през годините са били класифицирани по различен начин включително според броя на процесите, в които участват, дебелина на миелиновата обвивка, която образуват, плътност на цитоплазмата и слепване на ядрения хроматин⁽¹⁷⁾. Функцията на повечето олигодендроцити е свързана с производството на т.нар. миелин (състоящ се от 80% липиди и 20% белтъци), който участва в образуването на миелиновите обвивки около аксоните. По този начин аксоните биват изолирани и се ускорява транспорта на нервните импулси⁽²⁾. Аксоните с най-дебелите миелинови обвивки провеждат нервните импулси с най-висока скорост - около 120 метра/сек, за разлика от тези, които не притежават миелинова обвивка и провеждат импулсите с най-бавна скорост - 1 метър/сек^(2, 17). Миелиновата обвивка в ЦНС се състои почти изцяло от множество слоеве олигодендроцитна мембрана (наречени ламели), която в процеса на образуването си около аксона притиска цитоплазмата по такъв начин, че разположението на мембранните пластове да стане максимално близо едно до друго⁽²⁾. Интересно е да се отбележи, че един олигодендроцит може да участва в образуването на миелиновата обвивка на до 50 аксона, както и миелиновата обвивка на един аксон може да бъде образувана от повече от един олигодендроцит^(17, 18).

Микроглията е изградена от клетки, които се срещат в нервната тъкан, но имат мезодермален произход. Микроглияните са по-малки по размер от останалите глиялни клетки, с ниско съдържание на цитоплазма, неправилна форма на тялото и притежават къси и тънки шиповидни израстъци. Тези клетки предпазват невроните от вируси, туморни образувания и бактерии. Микроглияните клетки обикновено се смятат за имунните клетки на ЦНС⁽¹⁹⁾ и са единствените останали в нея хематопоеични клетки, които са с моноцитен произход. В здравата мозъчна тъкан, микроглияните клетки имат разклонена морфология и са латентни⁽²⁰⁾. По време на ранното невронално развитие или в резултат на някакъв вид патология, водеща до увреждане на мозъка (травма, аксотомия, исхемия, дегенерация на ЦНС

и др), микроглията се активира, което води до промяна в морфологията, до придобиването на фагоцитна функция и производството на провъзпалителни цитокини⁽²¹⁾.

Епендимоцитите са епителни цилиндрични клетки, които покриват кухините на мозъчните стомахчета и изграждат централния канал на гръбначния мозък. Тези клетки са способни да произвеждат, транспортират и секретират цереброспинална течност (ликвор). Отскоро се дискутира потенциалната възможност местоположението на тези клетки да е подходящо и за невронални стволови клетки^(22, 23).

1.2. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ГЛИОМИ

Мозъчните тумори са интракраниални твърди неоплазии, които възникват и се развиват в централния мозък или гръбначномозъчния канал. Те могат да възникнат във всяка от структурите или клетъчните типове в черепната кухина, включително мозък, менинги, хипофиза, череп, стволови клетки, глиални клетки, невроните и т.н. Глиомите произлизат от глиални клетки или техни предшественици⁽²⁴⁾ и представляват по-голяма част от злокачествените тумори на мозъка⁽²⁵⁾.

Световната Здравна Организация (СЗО) публикува класификация на туморите при хората, която е и универсален стандарт за класифициране и стадиране на неоплазиите в ЦНС⁽²⁶⁾. Според тази класификация глиомите представляват малигнени тумори, засягащи клетките изграждащи невроглията. Глиалните тумори растат чрез локална експанзия с различна степен на инфилтрация или инвазия. Те метастазират предимно в рамките на ЦНС, като екстракраниални метастази се наблюдават много рядко⁽²⁷⁾. На база на микроскопската структура и предполагаемия ембриологичен произход на туморните клетки, глиомите се класифицират в три основни групи: астроцитомы, ологодендроглиомы и смесени олигодендроглиомы. Въз основа на наличието или липсата на характерни показатели определящи степента на туморна малигненост, като плътност на клетките, ядрен атипизъм, митоза, микроваскуларна пролиферация и некроза, съгласно СЗО, глиомите се класифицират на СЗО клас I (пилцитен астроцитом), клас II (ниско стадийни глиомы), клас III (анапластични глиомы или АА) до клас IV (глиобластома мултиформе - ГБМ и глиосарком)⁽²⁸⁾.

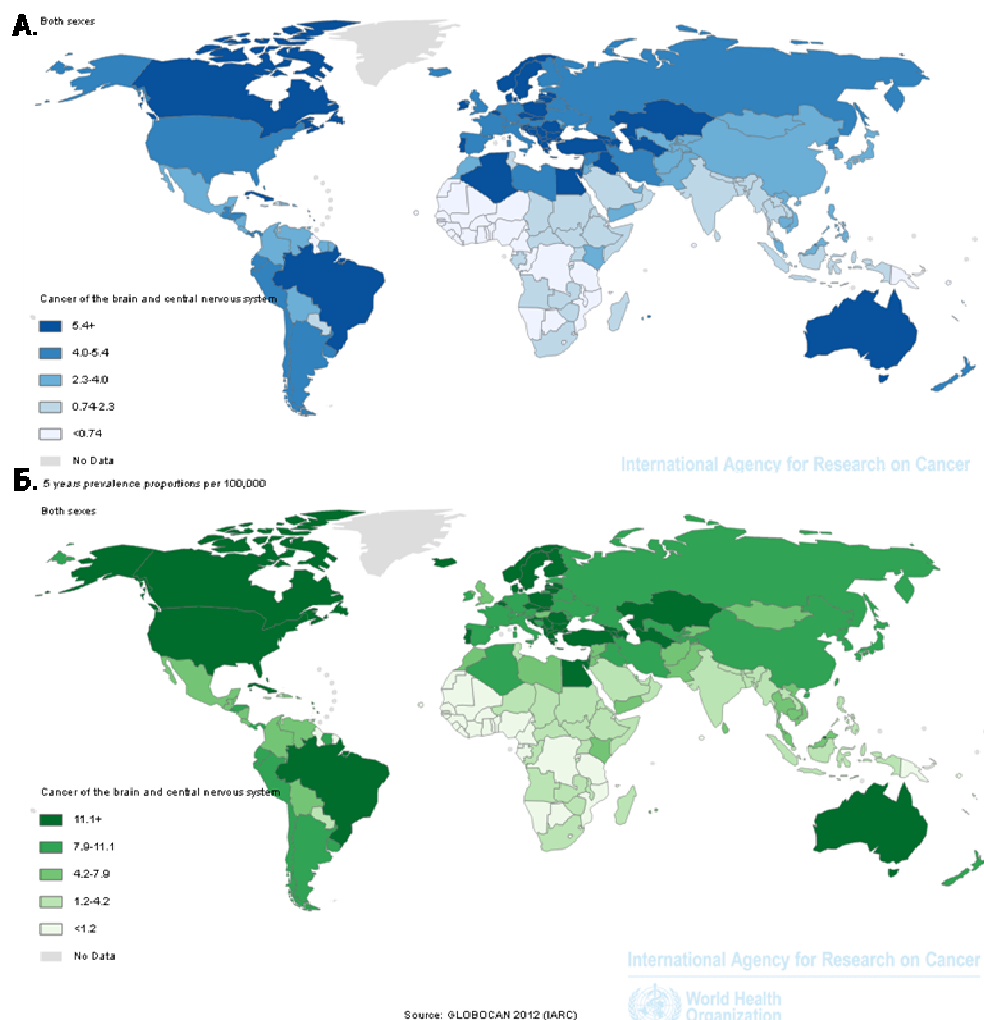
ГБМ се делят на две подгрупи, първични (*de novo* възникнали) и вторични^(29, 30). Първичните ГБМ представляват по-голямата част (над 90%) от диагностицираните случаи. Те се развиват много бързо, без клинични или хистопатологични доказателства за наличието на по-рано съществуващ, по-ниско стадийен туморен предшественик^(26, 31-33). От друга страна вторичните ГБМ имат история на злокачествена прогресия от по-нисък туморен СЗО клас например дифузен астроцитом или ДА (СЗО клас II) или АА (СЗО клас III), като над 70% от СЗО клас II глиомы се трансформират в заболявания СЗО клас III/IV в рамките на 5-10 години от първоначалното им диагностициране⁽³¹⁾. Само около 5% от ГБМ биват класифицирани като вторични и се наблюдават по-често при по-млада кохорта от пациенти (средна възраст 45 години) в сравнение с пациенти с първични ГБМ (средна възраст 60 години)^(26, 29, 31). Интересното е, че независимо от различната им клинична история, първични и вторични ГБМ са морфологично и клинично неразличими, а прогнозата за изхода от заболяването и при двете е еднакво неблагоприятна, след извършване на възрастова корекция в групите^(26, 31, 34).

1.3. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

През последните години данните показват, че честотата на първичните мозъчни тумори се увеличава. Над 60% от първичните тумори на мозъка са глиомы, минимум две трети, от които се диагностицират в напреднал стадий. По смъртност сред раковите заболявания се нареждат на второ място след левкемията⁽³⁵⁾. Глиомите засягат всички възрасти и представляват 20% от всички детски злокачествени заболявания. Малигнените глиомы (МГ) представляват приблизително 70% от първичните малигнени мозъчни тумори при възрастните. ГБМ са приблизително 60 до 70% от МГ, на АА се падат 10-15%, а на анапластични олигодендроглиомы (АОД) и анапластични олигоастроцитомы (АОА) – 10% от случаите на МГ. Едва 1% до 5% от глиомите могат да бъдат класифицирани като наследствени. МГ се срещат

по-често при мъжете, отколкото при жените и са свързани с висока заболяемост, и смъртност, като средната преживяемост за пациенти с ГБМ е около 12 месеца, а за пациентите с анапластична глиома варира между 2 и 5 години⁽³⁶⁾.

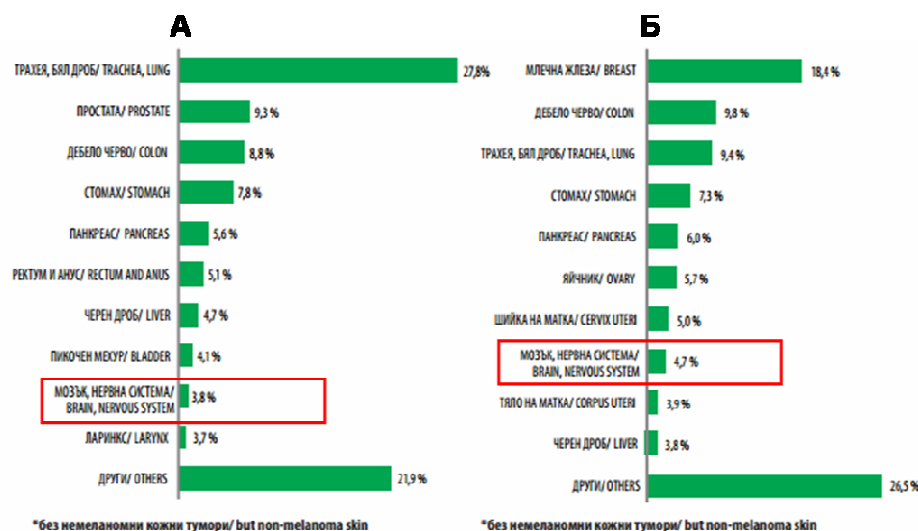
Честотата на възникване на глиомите се различава значително в различните европейски региони (*Фиг.1.2.А*). Годишната заболяемост в Европейския съюз е 4.8 на 100 000 за астроцитомите, 0.4 за олигодендроглиомите, 0.2 за епендимомите и ембрионални тумори.



Фигура 1.2. Световна карта показваща разпределението на хората с тумори в мозъка и ЦНС на 100 000 души според: **А.** честота на годишната заболяемост; **Б.** процентно разпределението на 5 годишната относителна преживяемост⁽³⁷⁾

Петгодишната относителна преживяемост е 14.5% за астроцитни тумори, 54.5% за олигодендроглиомите, 74.2% за епендимомите. Преживяемостта е относително по-висока в Северна и Централна Европа, отколкото в Източна Европа⁽³⁵⁾. С изключение на пилоцитните астроцитомите преживяемостта при пациентите с глиома е изключително ниска. По-малко от 3% от пациенти с ГБМ са все още живи 5 години след поставяне на диагноза⁽³⁵⁾.

Според последните епидемиологични данни публикувани в “Българския национален раков регистър за 2011г.” са регистрирани 656 нови случая на мозъчни тумори, от които 363 мъже и 293 жени - това са 8.9 на 100 000 души от населението (10.1 на 100 000 при мъже и 7.8 на 100 000 при жени), като от тях 70.9% са морфологично доказани, а 16.5 % са посмъртно установени⁽³⁸⁾. При мъжете мозъчните тумори се нареждат на девето място (3.8%) по процентно разпределение на най-честите причини за смърт от злокачествени заболявания. При жените процентът е по-висок (4.7%) и мозъчните тумори се нареждат на осмо място (*Фиг.1.3*).



Фигура 1.3. Процентно разпределение на най-честите причини за смърт от злокачествени заболявания в България през 2011 г. при: **А.** мъже; **Б.** жени ⁽³⁸⁾

Най-много нови случаи при мъжете се диагностицират между 55-70 годишна възраст (24-27.4/100 000), а при жените между 70-75 години (21/100 000). Според “Българския национален раков регистър за 2011г.” смъртността от злокачествени новообразувания в мозъка и ЦНС в България за 2011г. са били 9.5 на 100 000 (разпределено по пол, както следва – мъже 10.3/100 000 и жени 8.7/100 000). Петгодишна относителна преживяемост (%) на пациентите с мозъчни тумори, диагностицирани през периода 2000–2007 в България е 16.9% (мъже 15.5%, жени 18.7%), а наблюдаваните случаи от злокачествени новообразувания в главния мозък (600 броя) в Националния раков регистър са били сравнително по-малко от очакваните 772 за 2011г. (95% CI=706-838). За 2014г. очаквания брой нови случаи са 788 (95% CI=626-951), което е с 16 повече от очакваните за 2011г. През 2010г. ново диагностицираните случаи на мозъчни тумори в България са били 7.5 на 100 000 (при мъже 7.9/100 000 и при жени 7.2/100 000), докато световните тенденции са били 5 на 100 000 (5.6/100 000 при мъже и 4.4/100 000 при жени) ⁽³⁸⁾.

1.4. ЕТИОЛОГИЯ И РИСКОВИ ФАКТОРИ

Мозъчният карцином, подобно на другите форми на рак, е мултифакторно заболяване. Причините за възникването на тумори, засягащи ЦНС, все още не са изяснени, въпреки че множество категории рискови фактори са били изследвани в голям брой епидемиологични, географски и етнически проучвания ^(39, 40).

1.4.1. БИОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ И ФАКТОРИ НА СРЕДАТА, СВЪРЗАНИ С ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

1.4.1.1. ВЪЗРАСТ И ПОЛ

Най-силният известен рисков фактор за развитие на тумори в мозъка и ЦНС е напредналата възраст, въпреки че някои видове тумори по-често се диагностицират при по-млади пациенти. Полът се проявява като друг рисков фактор - инвазивните мозъчни тумори по-често се срещат при мъжете, а неинвазивните, които обикновено са доброкачествени, по-често при жените ⁽⁴¹⁾.

1.4.1.2. ОБЛЪЧВАНЕ С ЙОНИЗИРАЩО И НЕЙОНИЗИРАЩО ЛЪЧЕНИЕ

Йонизиращо лъчение, наричано още йонизираща радиация, е поток от заредени и електроненутрални частици, и фотони, които могат да йонизират веществата, през които преминават. Йонизиращи лъчи са алфа- и бета-частиците, гама-лъчите, рентгеновите лъчи, тежките йони, електроните, протоните, и др. Нейонизиращо лъчение представлява

ултравиолетовия спектър на видимата светлина (включително и лазерната светлина), инфрачервените, микровълновите, и радиочестотните вълните. Границата между йонизиращото и нейонизиращото лъчение не е строго определена, тъй като различните молекули и атоми могат да се йонизират от различни източници⁽⁴²⁾.

За първи път връзката между риска от развитието на МГ и йонизиращо лъчение е описана в проучване с израелски деца, подложени на лъчетерапия представляваща лечение на дерматомикоза от типа "*тиней педис*". Подложени са били на облъчване с дози от 1 Gy до 6 Gy в областта на скалпа, последвано от дозозависимо увеличение честотата на мозъчните тумори, както на менингиома (относителен риск –RR=9.5, 95% CI=3.5-25.7), така и на глиома (RR=2.6, 95% CI=0.8-8.6)⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Проучвания изследващи хората, които са били подложени на радиацията и оцелели след атомните бомби в Хирошима и Нагасаки са показали също увеличение в честота не само на менингиом, но и като цяло на злокачествените заболявания, засягащи ЦНС⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Друга хипотеза за наличието на сериозен рисков фактор се свързва с широкото приложение на мобилните комуникации, поради използването на радиочестотно нейонизиращо лъчение в близост до мозъка. Голямо проучване INTERPHONE, включващо както пациенти (2765 глиоми и 2409 менингиоми), така и контроли⁽⁴⁹⁾, след повече от 10 години наблюдения не откри наличието на ясна асоциация нито с възникването на глиом, нито с менингиом. Единственият установен увеличен риск от развитието на МГ се наблюдава при силно увеличена употреба на мобилен телефон (общо време на разговор над 1640 часа (OR/Odds Ratio=1.40, с 95% CI=1.03-1.89)⁽⁵⁰⁾.

1.4.1.3. ДРУГИ ВЪНШНИ ФАКТОРИ

Изследвани са и редица други потенциални рискови фактори, като например излагането на нитрозамини^(51, 52), електромагнитни полета⁽⁵³⁻⁵⁵⁾, травма на главата⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾, и епилепсия⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾, показващи противоречиви резултати и без ясна асоциация с риска от развитие на мозъчни тумори. Пушенето също е изследвано като потенциален рисков фактор за развитието на МГ, но такава връзка отново не е установена^(62, 63).

1.4.2. ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ, СИНДРОМИ И ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНИЕ

1.4.2.1. МАЛИГНЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Рискът от развитие на МГ или менингиома е съответно 10-20 и 12 пъти по-висок при хора боледували от малигнено заболяване, засягащо ЦНС в детството си или като възрастни, в сравнение с останалата популация^(64, 65). Рискът е по-висок и при хора диагностицирани в детството си с друг вид солиден тумор (с локализация извън ЦНС)⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾, не-Ходжкинов лимфом⁽⁶⁸⁾, левкемия (по-конкретно остра лимфобластна левкемия)^(64, 69), меланом⁽⁷⁰⁾, тироиден⁽⁶⁴⁾, или рак на простатата⁽⁶⁴⁾. Прилагането на лъчетерапия или химиотерапия при лечение на малигнени заболявания също се свързва с увеличено развитие на тумори в мозъка или ЦНС^(71, 72).

1.4.2.2. ГЕНЕТИЧНИ СИНДРОМИ И НАСЛЕДСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Генетично предразположение към възникване на първични мозъчни тумори се свързва единствено с редки наследствени синдроми водещи до туморни заболявания, като Неврофиброматоза тип 1 и 2 (NF1, NF2), Li-Fraumeni синдром, Синдром на Cowden (множествен хамартом), Туберозна склероза 1 и 2 (TSC1, TSC2), Ретинобластома 1 (RB1), Синдром на Turcot, von Hippel-Lindau синдром и Gorlin-Goltz синдром (невусен базалноклетъчен карцином). Тези синдроми се срещат с ниска честота в популацията и са отговорни за по-малко от 2% от МГ^(73, 74). Унаследяват се по автозомно-доминантен път, улеснявайки проследяване семейната история на заболяването. Пациентите с родственик от първа линия (родител, брат/сестра или дете), диагностициран с глиом имат 77% увеличен риск от развитие на глиом. При засегнат брат или сестра увеличението на риска за заболяемост е от 2.2 до 2.6 пъти^(75, 76). Въпреки това, по-голяма част на мозъчните тумори се появяват спорадично⁽⁷³⁾.

1.4.2.3. АСТМА, АЛЕРГИЯ, ДРУГИ АТОПИЧНИ СЪСТОЯНИЯ И ИНФЕКЦИИ

Редица проучвания са показали, обратнопропорционална връзка между риска от развитие на глиома и наличието на atopични заболявания, като астма, алергия и екзема^(57, 77-84). При мета-анализ публикуван през 2011г, включващ резултати от 12 проучвания се установява, че алергиите могат значително да намалят риска от развитие на МГ⁽⁸⁵⁾. Изследванията показват, че риска намалява с 31-45% за всяко ново atopично заболяване при даден пациент^(86, 87). В повечето изследвания нивата на IgE, обективен инструмент за оценка на алергичните състояния, се съотнасят с риска от развитие на МГ. Установено е, че рискът се увеличава обратнопропорционално на нивата на IgE⁽⁸⁸⁻⁹³⁾. Изглежда, че при пациенти с ГБМ, функцията на имунните клетки се променя и вместо да предотвратяват образуването на тумори, механизмите на имунитета даже съдействат за тези процеси⁽⁹⁴⁾. Наблюдаваната асоциация между atopичните заболявания и понижения риск от развитие на глиом, се свързва и с наличието на имунни активатори иницирани в резултат на atopичното заболяване, които се предполага, че могат да проявяват антитуморен ефект. Цитокините IL-4 и IL-13 играят основна роля в алергичната реакция чрез стимулиране на В-клетъчния синтез на IgE и провокиране епителното производство на проеозинофилни хемокини⁽⁹⁵⁾. Тези цитокини биват подложени на позитивна регулация в резултат на алергията и/или астмата, и едновременно с това са изключително важни белтъци в ГБМ биологията⁽⁹⁶⁻⁹⁹⁾. В едно проучване, пациентите с ГБМ, имащи високи нива на IgE са показали удължаване на преживяемостта с 9 месеца, отколкото тези с нормални нива⁽¹⁰⁰⁾. Автоимунните заболявания също корелират обратнопропорционално с риска от развитие на ГБМ (OR=0.49, 95% CI=0.35-0.69) най-значимото, от което е диабетът^(77, 101).

Други проучвания показват, че пациенти с предшестващо инфекциозно заболяване имат относителен риск (RR) 0.72 (95% CI=0.61-0.85) от развитие на ГБМ. Рискът от развитие на мозъчен тумор приблизително се удвоява при хора с HIV вирус, в сравнение с общата популация, и е около пет пъти по-висок при хора със СПИН^(59, 102).

Въпреки значителните изследвания в областта, получените резултати са много различни между отделните проучвания, вероятно поради малките размери на изследваните проби, малките по брой групи и тяхната разнородност, както и наличието на смесени или не добре отдиференцирани видове тумори⁽¹⁰³⁾.

1.5. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

За поставянето на правилната диагноза на мозъчните тумори е необходимо извършването на редица изследвания. Задължителният минимум от изследвания включва неврологичен преглед, компютърна томография (КТ) и ядрено-магнитен резонанс (ЯМР). Допълнителна информация може да се получи от рентгенография, ангиография, електроенцефалография и лумбална пункция, хормонални изследвания и биопсия. Включването на информация получена от проведен аминокиселинен PET (Positron emission tomography) скенер е ценен инструмент за оптимизиране на клиничните резултати⁽¹⁰⁴⁾. Окончателната диагноза за вида на тумора се поставя чрез хистологично охарактеризиране от опитен патолог на материал, отделен по време на хирургичната интервенция⁽¹⁰⁵⁾.

Актуалните възможности за лечение на глиом включват хирургична, лъчева- и химиотерапия. За целите на лечението е необходимо отстраняването на възможно най-много туморни клетки (с помощта на неврохирургична операция), унищожаването на колкото се може повече от туморните клетки, останали след операцията (с лъче- и химиотерапия); поддържане на оцелялата след терапията популация от туморни клетки в неделящо, латентно състояние толкова дълго, колкото е възможно (с лъче- и химиотерапия). Въпреки това, възможностите за лечение са различни в зависимост от редица фактори, включително от вида, големината, местоположението и степента на малигненост на тумора, възрастта на пациента и общото му здравословно състояние⁽¹⁰⁵⁾. Лечението на глиалните тумори бива:

1.5.1. ОПЕРАТИВНО ЛЕЧЕНИЕ

Хирургично лечение включва процедури като биопсия и макроскопска резекция (частична или тотална), осигурявайки тъкан за туморно диагностициране и стадиране, както и

за изследване на молекулярните му характеристики. Видът на хирургичната намеса зависи от клиничното и функционално състояние на пациента, туморна локализация и размер. Тоталната хирургична резекция се препоръчва, когато е възможно, за повечето видове мозъчни тумори (40% - 50%), тъй като е доказано, че удължава общата преживяемост⁽¹⁰⁶⁾. Основни цели на оперативното лечение са поставяне на точна хистологична диагноза, облекчаване симптомите, породени от нарастващия тумор в ограниченото пространство на черепната кутия, подобряване на общото неврологично състояние, повишаване на ефективността на последващата адювантна терапия, и подобряване на общата преживяемост^(106, 107). Ако тумора не може да бъде напълно отстранен, тъй като е разположен в близост до чувствителни зони в мозъка, се извършва частична резекция, отстраняваща максимална част от тумора, без това да застрашава живота. Флуоресцентно-насочената резекция (Gliolan) е нова технология, продуцираща флуоресценция, която може да се детектира в самия тумор по време на оперативната резекция, увеличавайки степента на резекция, а оттам и нарастване в средната обща преживяемост на пациентите⁽¹⁰⁸⁾.

1.5.2. ЛЪЧЕТЕРАПИЯ

Постоперативната лъчетерапия се препоръчва като стандартно лечение за пациенти с МГ, като намалява процента на туморните клетки и удължава общата преживяемост⁽¹⁰⁹⁾. Лъчетерапията обикновено идва от устройство извън тялото (външно облъчване) и използва лъчи с високоенергийни частици, като например рентгеновите лъчи, насочени в областта на тумора или обхващаща и граничната зона около него, с цел унищожаване на туморните клетки. Ионизиращите лъчения водят до различен тип засягане на молекулата на ДНК, включващи късане на връзки, разрушаване на нуклеотидни бази и въглехидратни остатъци^(110, 111). Shibutani и сътр изучават един от най-честите индуцирани ДНК повреди чрез формиране на база 8-оксогуанин, която се свързва с аденина (А). Това свързване може да бъде отстранено, но ако се задържи по-дълго време води до клетъчна апоптоза, индуцирана от Mismatch репарационната система (ММР)⁽¹¹²⁾. Стандартният протокол включва обща доза от 54-60 Gy за целия курс на лечение, състоящ се от 30 облъчвания в рамките на 6 седмици и дневна доза, варираща от 1.8 до 2.0 Gy^(113, 114).

1.5.3. ХИМИОТЕРАПИЯ

Химиотерапията използва лекарствени препарати унищожавачи или нарушаващи деленето на бързоделещите се клетки, каквито са и туморните. Клетъчното делене е процес предхождан от репликацията и рекомбинацията на ДНК. Целта на химиотерапевтичните вещества е по време на тези процеси да се инициират грешки в ДНК молекулата на туморните клетки, което да доведе до трайно увреждане на ДНК, последвано от клетъчна смърт. Според приетите международни стандарти за лечение на мозъчните тумори, химиотерапия се прилага след провеждане на неврохирургична интервенция или лъчетерапия. При назначаването на химиотерапевтичен режим, за лечение на първични мозъчни тумори могат да бъдат използвани препарати като Темозоломид (TMZ), Кармустин (BCNU), Ломустин (CCNU), Прокарбазин, Винкристин и лекарства на основата на платина (цисплатина и карбоплатина). Понякога Ломустин, Прокарбазин и Винкристин се използват едновременно и тази комбинация на химиотерапевтични лекарства е известен като PCV режим⁽¹¹⁵⁾. Химиотерапията доказано води до увеличаване продължителността живота на пациентите с МГ. Изследване активността на гена *MGMT* чрез анализ на промоторното му хиперметиране разкрива група от пациенти, които биха се повлияли най-пълно от прилагането на TMZ^(116, 117).

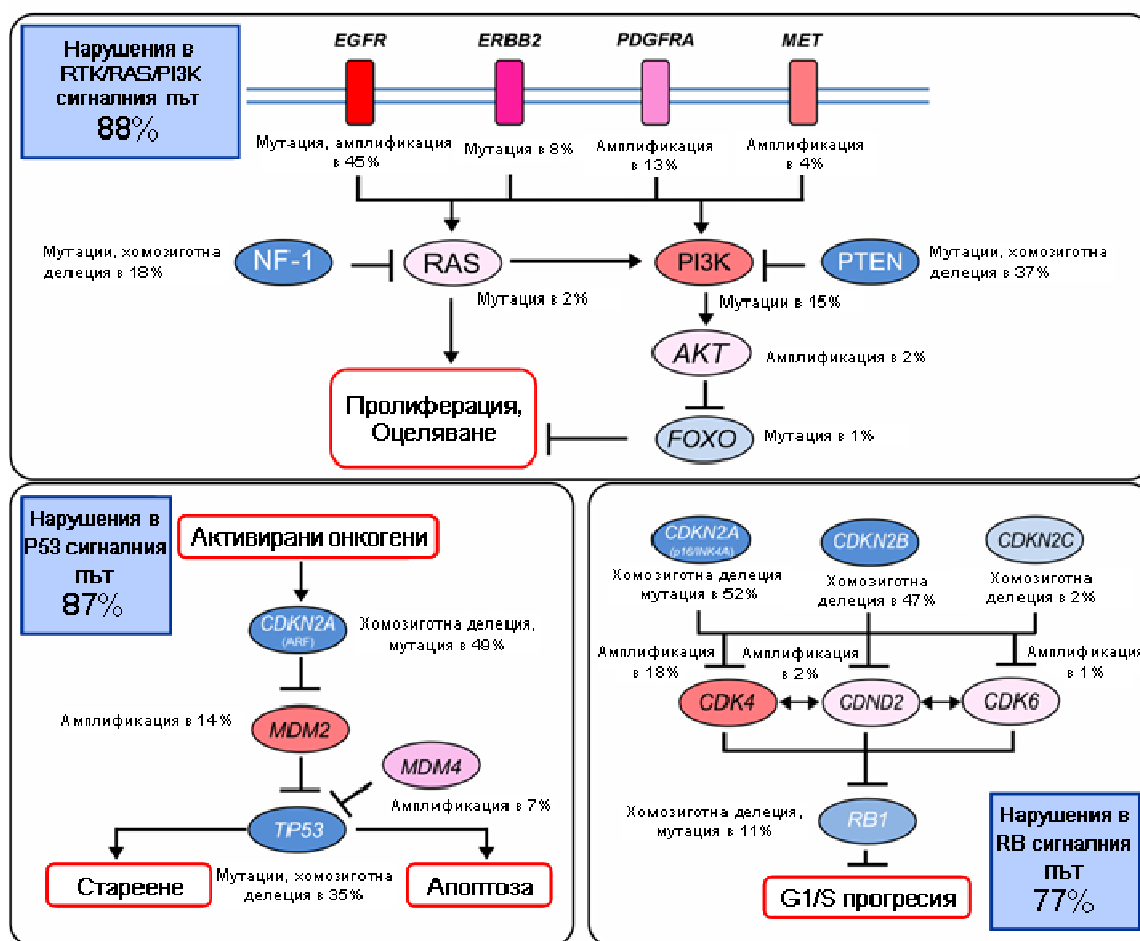
Лечението на глиомите включва усилията на мултидисциплинарен екип за осигуряване на интегриран модел на грижа. Оперативната намеса и лъчетерапията са основните методи, използвани за лечение на глиоми. В типичните случаи, пациентите започват облъчвания в рамките на 2 до 4 седмици след резекция на тумора⁽¹¹⁸⁾. Въпреки, че химиотерапията не е ефективен метод за първа линия терапия при ниско-стадийните мозъчни тумори, тя е един от основните методи на лечение при контрол на развитието при високо-стадийни глиоми. Стандартното лечение за пациенти с ГБМ започва с неврохирургична резекция, последвано от едновременното облъчване и химиотерапия с TMZ⁽¹¹⁹⁾. След 2009 г. Европейската Организация за Изследване и Лечение на Рака (EORTC) и Националният Раков Институт на Канада (NCIC) съобщават, че прилагането на лъчетерапия и съпътстващо лечение с TMZ,

последвано от адювантна TMZ терапия подобрява значително средната и 5-годишната преживяемост при пациенти с ГБМ, в сравнение с прилагането само на лъчетерапия. Този протокол вече е приет международен стандарт при лечението на пациенти с първични глиални тумори.⁽¹¹⁷⁾

1.6. ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

1.6.1. ГЕНЕТИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ

TCGA проектът (The Cancer Genome Atlas) използвайки интегративен подход анализира общите генетични изменения в генома на ГБМ установи, че три основни сигнални пътя са засегнати в по-голямата част от първичните ГБМ. Тези пътища са показани на **Фиг.1.4**⁽¹²⁰⁾.



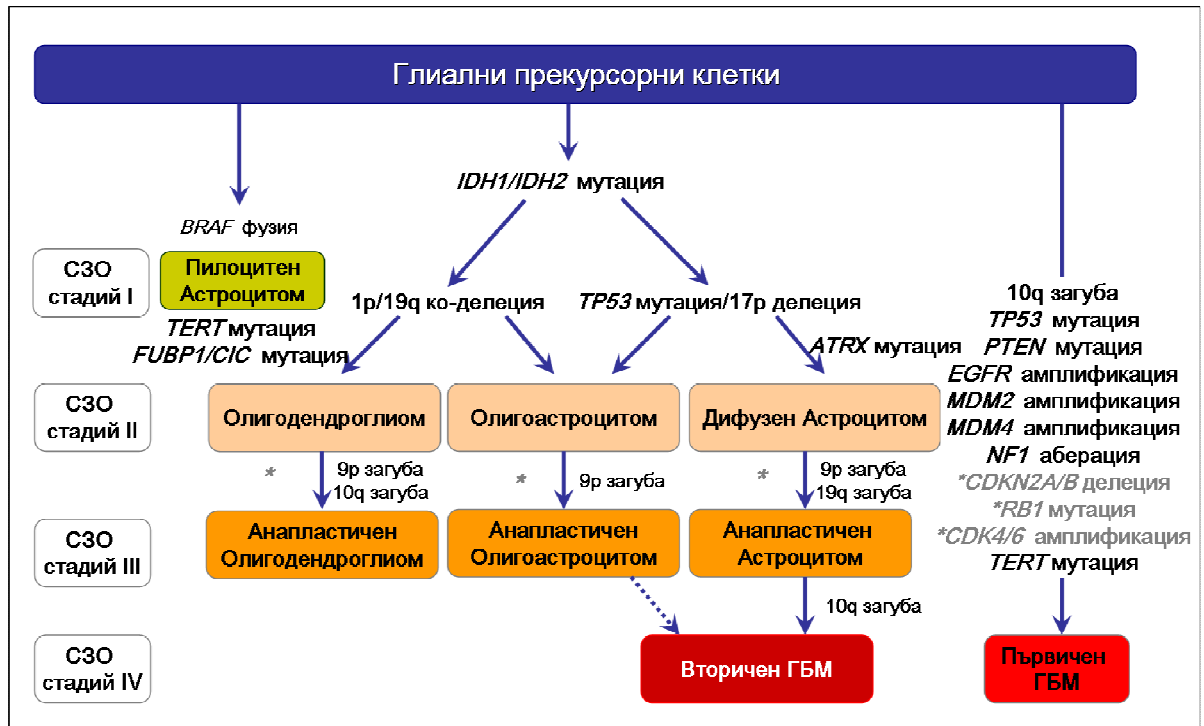
Фигура 1.4. Аберации, засягащи основните генетични пътища: **А.** RTK/RAS/PI(3)K; **Б.** p53. **В.** RB; Модифицирана от Ohgaki⁽¹²¹⁾

1) EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K пътя е ключов сигнален път в клетъчната пролиферация и увеличава клетъчната преживяемост особено при първичните ГБМ⁽¹²²⁾. TCGA проекта показва, че общата честота на генетични изменения в EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K пътя при ГБМ е 88%, 45% от които се дължат на аберации в EGFR, 36% на тези в PTEN (мутации - в до 40% от ГБМ, преобладавайки в първичните), 15% на PI3K мутации, 18% NF1 аберации и 2% RAS мутации⁽¹²⁰⁾.

2) TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF} път – установено е, че 87% от общата честота на генетични промени се дължат на изменения именно в този сигнален път при първични ГБМ, като 35% от тях се дължат на TP53 аберации, 14% на MDM2 амплификацията, 7% на MDM4 амплификацията, или 49% на p14^{ARF} промените⁽¹²⁰⁾.

3) p16^{INK4a}/CDK4/RB1 пътя изглежда е един от важните пътища, както за първични, така и за вторични ГБМ. RB1 контролира прогресията от G1 в S фаза на клетъчния цикъл. Общата

честота на генетични промени в RB1 сигналния път при първични ГБМ е 78%, като 52% от тях се дължат на $p16^{INK4a}$ хомозиготни делеции или мутации, 47% на $p15^{INK4b}$ хомозиготна делеция, 18% на $CDK4$ амплификация, 11% на $RB1$ мутации или хомозиготна делеция⁽¹²⁰⁾. Седемдесет и четири процента от ГБМ имат увреждания и в трите сигнални пътя.



Фигура 1.5. Модел на глиалната туморогенеза; Модифицирана от Ohgaki⁽¹²¹⁾

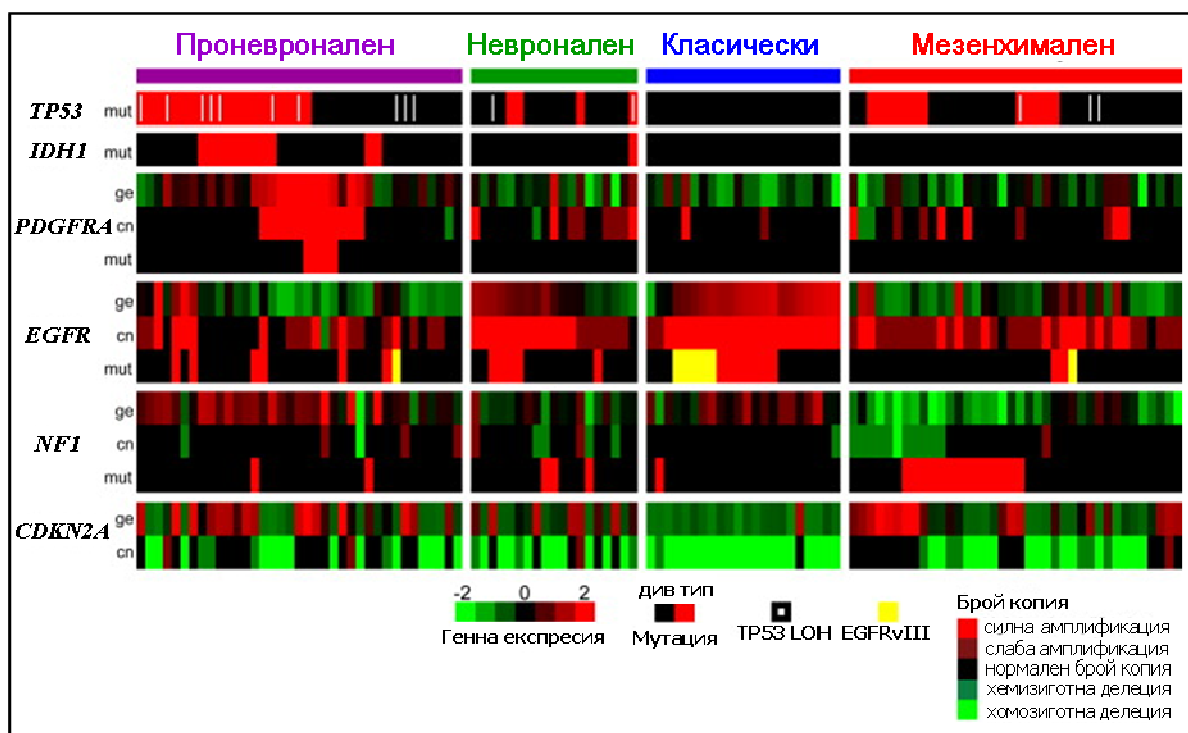
Изследване проведено през 2008 година с високо-резолютивни методи, доведе до откритието на мутации в ген, за пръв път асоцииран с възникването на ракови заболявания. Той кодира цитозолната изоформа на ензим - изоцитрат дехидрогеназа ($IDH1$), важен участник в Цикъла на трикарбоксилатите киселини, изявяващ се като тумор-специфичен кандидат ген. Наблюдават се при 12% от пациентите с ГБМ, като показва значима връзка с различни клинични характеристики: по-млада възраст и по-добра клинична прогноза⁽²⁹⁾.

Една от отличителните характеристики на туморите е, че дори и в рамките на един вид раково заболяване се наблюдава огромна степен на хетерогенност. Сериозно предизвикателство представлява туморното определяне и категоризиране, в общ подтип не само поради наличието на обща патохистологична диагноза, но и по други показатели обясняващи сходната преживяемост и отговор към терапия.

1.6.2. МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА НА ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

Последните проучвания са фокусирани върху разкриване на молекулярната биология на МГ, поради трудностите, които комплексната биология и молекулярната хетерогенност на тези тумори предизвикват при разработването на ефективна терапия за лечението им. Голямо постижение от последните години е класификацията на МГ, базирана на сходство в генно-експресионните им профили. Микрочиповата технология позволи създаването на нова класификация, по-детайлно характеризираща иначе хетерогенната група от ГБМ. Молекулярното субтипизиране на МГ дава нова надежда да се осъществи прилагането на персонализирана терапия подходяща за конкретната субгрупа и така да се подобри ефективността на лечението.

Проведено изследване от Verhaak и сътр⁽¹²³⁾ доведе до разграничаването на четири субгрупи от ГБМ, наречени Проневронална, Невронална, Класическа и Мезенхимална, различаващи се по генната експресия, клинични характеристики, отговор към терапията и изход от заболяването (Фиг.1.6).



Фигура 1.6. Визуализация на генно-експресионните профили, разграничаващи хетерогенната група от ГБМ на четири подгрупи, различаващи се по клинични характеристики, отговора към терапията и преживяемост; Модифицирана от Verhaak⁽¹²³⁾

Класическата група се характеризира с необичайно високи нива на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR), намиращ се на повърхността на част от клетките. При свързването му с EGF се произвеждат сигнали за инициране на клетъчния растеж. Мутации, засягащи *EGFR* водят до неговото непрекъснато активиране. Промени в *EGFR* са отбелязани и в другите групи, но не с такава висока честота. Освен това в тази група не се наблюдават мутации в гена *TP53* (кодиращ белтък, свързан с клетъчната апоптоза и потискане на клетъчния растеж), най-често мутираният ген при ГБМ. Класическата група се характеризира клинично с най-дълга продължителност на живот, като резултат от силно агресивното лечение.

За разлика от туморите в класическата група, висока честота на мутациите в *TP53* гена се наблюдава в Проневроналната група (54%). Характеризира се и като групата с най-висока честота на мутации в *IDH1* гена. Мутации и свръхекспресия на друг ген – *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide) се оказват уникална характеристика единствено за тази група. Тя се отличава и с по-ранна възраст на заболяемост, както и със сравнително удължена продължителност на живот, но за разлика от другите групи това не е в резултат от провеждането на агресивна терапия.

Мезенхималната подгрупа се характеризира с най-често срещаните мутации в туморсупресорните гени *NF1* (37%), *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) и *TP53*. Пациентите в тази група имат значително увеличение на общата преживяемост в резултат на провеждането на силно агресивна терапия.

Невроналната група не се характеризира с наличие на отличаващи я мутации в други гени или в процентното съотношение на мутации на гени засегнати и в другите групи. В нея се наблюдава и експресия на гени, които са типични за нормалните клетки на ЦНС. Пациентите в тази група са с най-напреднала възраст и подобно на класическата и мезенхималната групи след провеждането на силно агресивно лечение се забелязва подобрене в преживяемостта, но не в такава степен.

1.6.3. ГЕНОМНИ ИЗМЕНЕНИЯ

Хетерогенността на мозъчните тумори доведе до необходимостта от по-доброто познаване на молекулярната им патогенезата, която в последните години се развива бързо. Многобройни геномни промени бяха идентифицирани като събития характеризиращи различните СЗО класове глиоми. Астроцитомите, стадий СЗО II, III и IV се характеризират най-често с геномна аберация водеща до увеличен брой копия (УБК) на хромозома 7, (*EGFR* и *PDGFA*), в комбинация с наличието на загуба на една от половите хромозоми. В СЗО клас II астроцитомите, структурните аномалии са рядко наблюдавани събития, в повечето случаи засягащи хромозомни рамене 1p и 19q. Едно от най-ранните събития в туморогенезата на МГ са мутация или алелна загуба на хромозома 17p (*TP53*). Свръхекспресията на *PDGFR* също корелира със загубата на хетерозиготност в 17p. При около 30% от астроцитомите е идентифицирана алелната загуба на хромозомен участък 22q, но досега не е били идентифициран ген, имащ отношение към възникването и прогресията на заболяването. Други хромозоми, проявяващи алелни загуби при астроцитомите включват хромозома 1, 3 и 13. Всяка алелна загуба идентифицирана в тези проучвания представлява вероятно място кодиращо туморсупресорни гени, които очакват да бъдат потвърдени и идентифицирани.

При голям брой АА УБК засяга хромозоми 19 и 20, докато събития от типа намален брой копия (НБК) са най-чести за хромозоми 10, 22, и една от половите хромозоми. Събитията от типа УБК и НБК при анапластичните астроцитомите са по-ясно изразени, както и броя на структурните аномалии. Повечето точки на прекъсване се появяват върху късото (p) рамо на хромозоми 1, 3 и 9 (1p32, 1p36, 3p21, 9p21 и 9p22) с подобни такива в дългото (q) рамо на хромозоми 6 и 7 (6q21 и 7q22) и по-рядко в хромозомни участъци 5p13, 15q11, 17p11 и 19q12.1. Промени, които бележат прехода от астроцитом към АА включват алелните загуба на 9p, 11p, 13q (*RB*) и 19p. Амплификации установени в хромозома 12 (12q13-14) се срещат при около 15% от СЗО клас III (АА) и клас IV (ГБМ) тумори. Редица гени, локализирани в тези области, са известни участници свързани с промени в регулацията на клетъчния цикъл. Алелната загуба на хромозомен район 19q13.2-13.3 се явява общо събитие за А, ОД и ОА, въпреки че вероятно намиращия се там туморсупресорен ген все още не е идентифициран. Други хромозоми характеризиращи се с НБК включват хромозоми 1, 11p15pter и 3p21. При ГБМ освен УБК на хромозома 7, това на хромозома 20 е по-често събитие при ГБМ, отколкото в АА. Най-честите характерни промени, засягат УБК на хромозоми 7 и 20, както и НБК на хромозоми 10, 22, и една от половите хромозоми. Като цяло, промените в броя копия повлияват повече загубата на генетичен материал за разлика от амплификациите на хромозоми (например, загуба на хромозоми 9, 13 и 14).

Много от по-горе изброените и наблюдавани изменения, засягащи гени и геномни региони, са детектирани и при редица други малигнени неоплазии, но при глиомите част от тях са описани като характерни за тях събития. Има данни за значима корелация на някои от тях с хистологичната диагноза и туморния стадий, както и за потенциалната им роля като диагностични и биомаркери с предиктивна и/или прогностична значимост.

1.7. МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНО И ПРЕДИКТИВНО ЗНАЧЕНИЕ

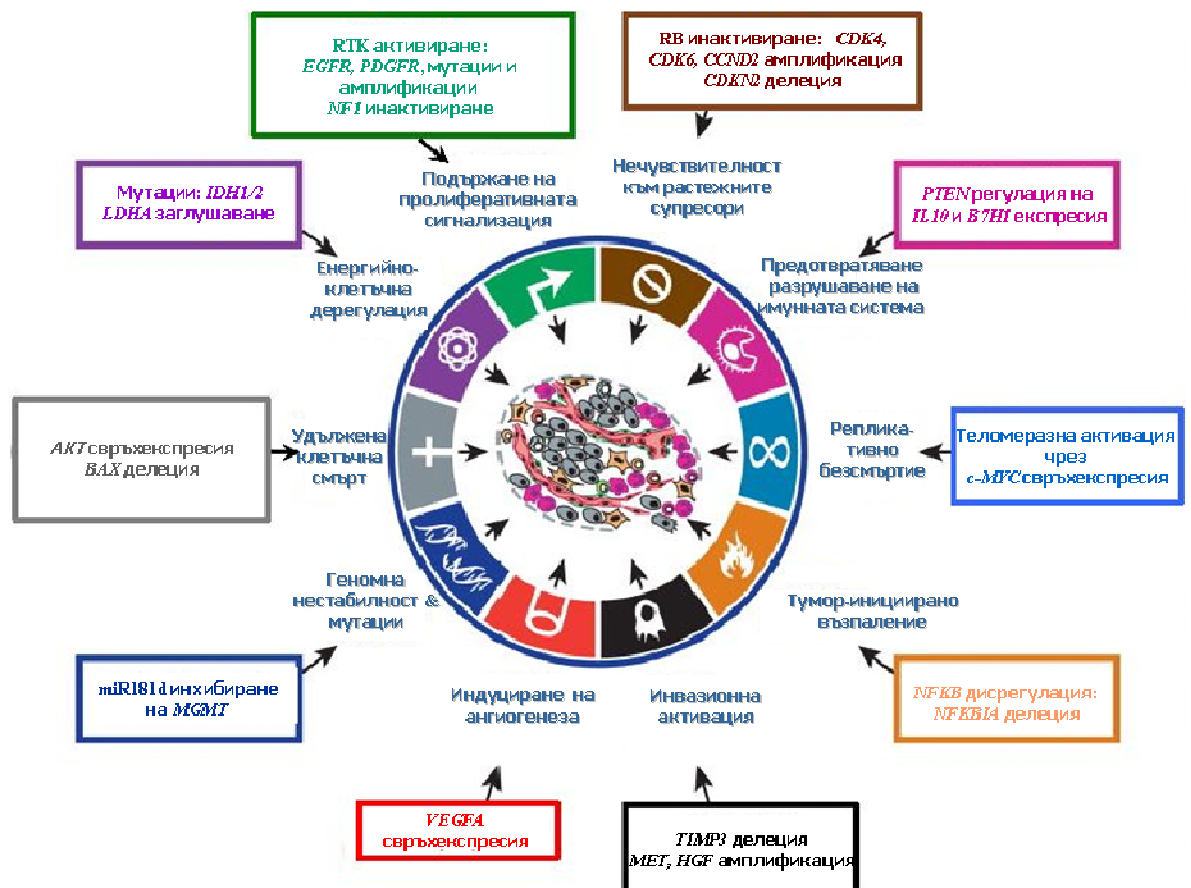
Прогностичният маркер е клинична или биологична характеристика, която е обективно измерима и дава информация за вероятния изход от заболяването ако не бъде проведена терапия. Такива прогностични маркери са полезни за идентифициране на пациенти със злокачествени заболявания, които са изложени на по-висок риск от рецидив на заболяването и следователно са потенциални кандидати за адювантна терапия. За разлика от тях предиктивният фактор е клинична или биологична характеристика, която дава информация за очакваната полза от проведеното лечение (независимо дали е свързано с намаляване размера на тумора или увеличаване на преживяемостта). Тези предиктивни фактори могат да бъдат използвани за идентифициране на групи пациенти, които имат най-голяма вероятност да се повлияят от провеждането на конкретна терапия⁽¹²⁴⁾.

1.7.1. КЛИНИЧНИ ФАКТОРИ

До момента клиничните фактори показали изразена прогностична значимост, свързваща се с МГ, са малко на брой. Освен хистологичния тип на тумора (олигодендроглиомите са с по-добра прогноза, отколкото смесени глиомы, които от своя страна, имат по-добра прогноза, в сравнение с астроцитом) и туморния стадий, следващите по важност клинични фактори, допринасящи за благоприятната прогноза, включват ранната възраст на диагностициране, полът, хистологичната диагноза, степента на малигненост, локализацията, оперативното отстраняване на тумора, високата Karnovsky performance status (KPS) и добрия когнитивен статус^(117, 119, 125, 126). Възрастта на пациента⁽¹²⁷⁾ и общото състояние по KPS при поставянето на диагнозата⁽¹²⁸⁾ оказват такова влияние върху прогнозата, каквото имат СЗО стадия и хистологичната диагноза. По-добра преживяемост се наблюдава при пациенти, по-млади от 45 години⁽¹²⁹⁾, докато високата стадия по СЗО корелира с клинична прогресия и понижена преживяемост^(31, 130, 131). Лечението на глиомите включва хирургическа резекция на тумора, последвана от лъче- и химиотерапия, които упражняват контрол върху туморния растеж при повечето пациенти^(132, 133). Степента на хирургична резекция повлиява преживяемостта⁽¹³⁴⁾, като макроскопски тоталната резекция води до по-благоприятна такава⁽¹³⁵⁾.

1.7.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ

В последните години интересът към геномните характеристики на глиалните тумори е голям. Проектът TCGA стартира през 2006г. с основна цел да установи молекулните основи на рака. Първият вид тумор, който става обект на изследване на TCGA е ГБМ. Молекулното профилиране на ГБМ включва анализ спектъра от мутации, вариациите в броя копия на ДНК варианти (CNVs), хромозомните пренареждания и метилирането на ДНК⁽¹²⁰⁾ (Фиг.1.7). Parson и сътр (2008)⁽²⁹⁾ също публикуват резултати от интегриран геномен анализ, който включва ДНК секвениране, анализ на CNVs и генната експресия.



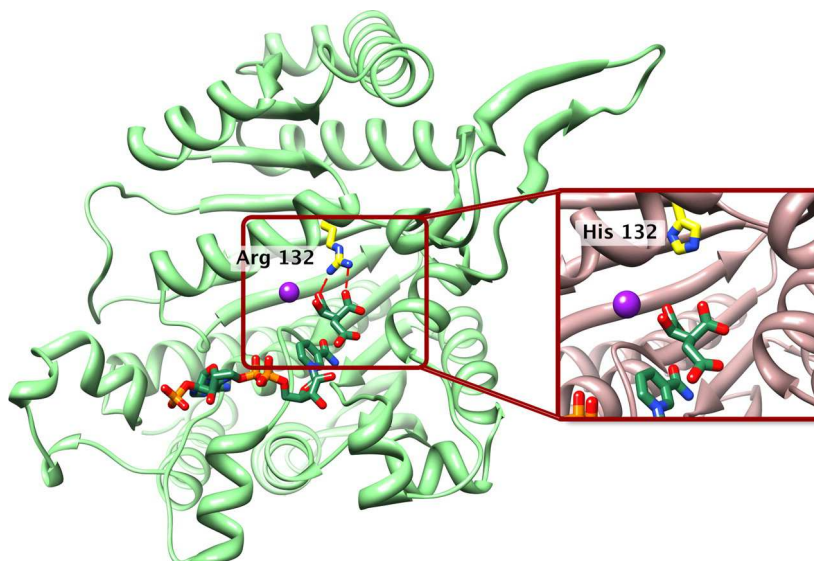
Фигура 1.7. Връзка на гените, открити от проекта TCGA и отношение им към туморния фенотип; Модифицирана от Hanahan⁽¹³⁶⁾.

Този подход за пръв път доведе до установяване на гени, които се асоциират с ГБМ⁽²⁹⁾. Два тъканно-базирани биомаркера бяха успешно въведени в клиничната практика и предоставят прогностична/предикативна информация за пациенти с ГБМ-и: промоторния статус (метилян или не) на Об-метилгуанин метил-трансферазния ген (*MGMT*)⁽¹³⁷⁾ и мутациите, засягащи гена изоцитрат дехидрогеназа (*IDH*) 1 или 2 (мутирал или див тип)⁽¹³⁸⁾.

1.7.2.1. ДНК МУТАЦИИ

1.7.2.1.1. ИЗОЦИТРАТ ДЕХИДРОГЕНАЗИТЕ

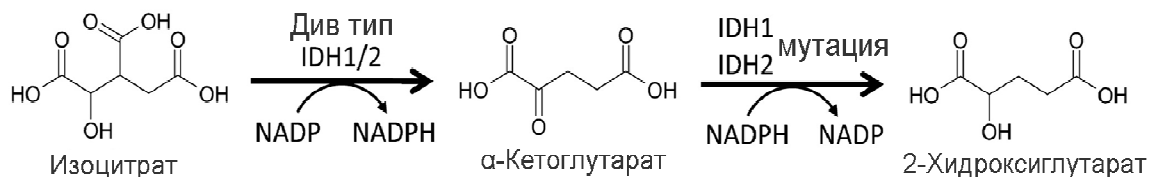
IDH1 е ген, локализиран на 2q33.3 и кодиращ изоцитрат дехидрогеназа 1, ензим, катализиращ окислителното декарбоксилиране на изоцитрат до α -кетоглутарат с едновременната продукция на NADPH⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾. При хората съществуват пет вида изоцитрат дехидрогеназни гени три, от които са локализирани в митохондриите. Изоцитрат дехидрогеназа 1 е хомодимер с две ензимно-активни места, локализиран в цитозола и пероксизомите. Смята се, че основната функция на *IDH1* е синтеза на NADPH, необходим за редукционни реакции и за синтеза на липиди⁽¹³⁹⁾. В изследването на Zhao и сътр⁽¹⁴²⁾ е установено, че наличието на *IDH1* мутация понижава афинитета на ензима към неговия субстрат чрез образуване на каталитично неактивни хетеродимери. Специфични за глиомите «missense» соматични мутации в *IDH1* винаги засягат аминокиселината аргинин в кодон 132 и се означават най-общо като R132⁽¹⁴³⁾. Тя е една от аминокиселините, които принадлежат към еволюционно високо-консервативен регион, разположен в активния център на ензима, където става свързването с изоцитрата⁽¹⁴⁴⁾. R132 мутации, наблюдавани в екзон 4 на *IDH1* гена, са установени при повече от 70% от СЗО стадий II и III астроцитомии, олигодендроглиомии, както и вторични ГБМ^(140, 145, 146), които са резултат от прогресията на предшестващи ги мозъчни тумори в по-ранен стадий, но се откриват рядко при тумори извън нервната система^(140, 147). Най-често наблюдаваната мутация е превръщането на аргинин 132 в хистидин (R132H) **Фиг.1.8**.



Фигура 1.8. Моделна структура на *IDH1* ензима – локализация на аминокиселината в кодон 132 (аргинин в дивия тип и хистидин в мутантния белтък), в активния център на ензима и образуване на H-връзка с ензимния субстрат -изоцитрат. В активния център на нормалния *IDH1* ензим се образува H-връзка между изоцитрат, кофактор NADP и калциевите йони (лилава сфера). В дясно е показан мутираният белтък, чийто АК остатък е твърде далеч от изоцитрата и не може да образува връзка с него; Модифицирана от Morris⁽¹⁴⁸⁾

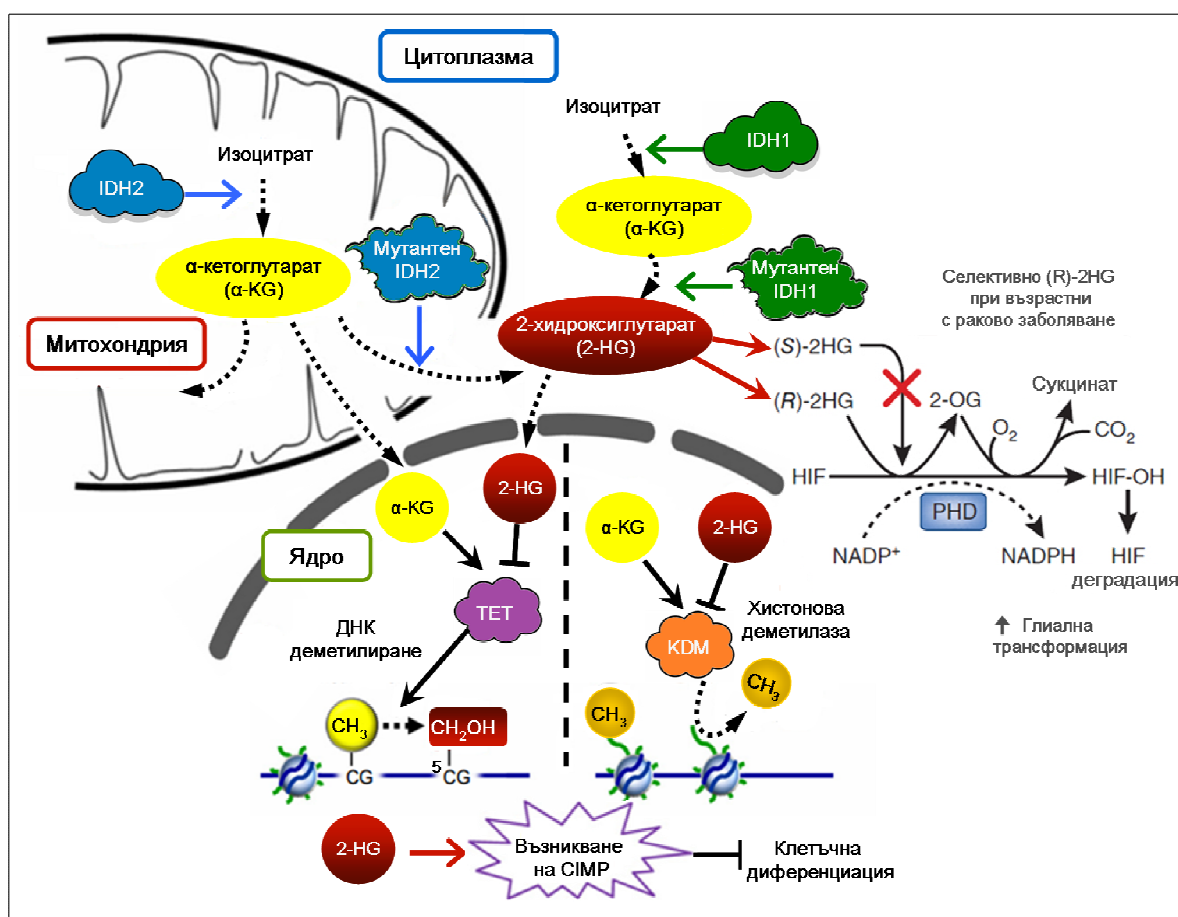
Структурни изследвания показват, че вследствие на това събитие, остатъци в активния център претърпяват структурни промени в съответствие с намалената нужда от оксидативна декарбоксилация на изоцитрата и това води до придобиване на способност за превръщане на α -кетоглутарат (α -KG) в 2-хидроксиглутарат (2HG) – **Фиг.1.9**. Доказано е, че повишеното

натрупване на 2HG може да доведе до повишен риск от злокачествени тумори на мозъка при пациенти с вроден дефект в 2HG метаболизма ⁽¹⁴⁹⁾.



Фигура 1.9. Окислителното декарбоксилиране на изоцитрат до α -KG с едновременната продукция на NADPH от дивия тип ензим IDH1/IDH2 и превръщането на α -KG в 2HG под действие на мутирания ензим IDH1/IDH2; Модифицирана от Gross⁽¹⁵⁰⁾

Експресията на мутантния IDH1 ензим води до значително редуциране производството на α -кетоглутарат, но за разлика от тях, нивата на α -субединицата на хипоксия-индуцирания фактор 1 (HIF1 α) се увеличават значително⁽¹⁵¹⁾. В действителност транскрипционният фактор HIF1 α се регулира от α -кетоглутарат, в резултат на което при МГ с наличие на мутирал *IDH1* се установяват по-високи нива на HIF1 α в сравнение с пациентите, при които се наблюдава див тип *IDH1*. Това е показателно, че *IDH1* може да функционира като туморсупресорен ген и инактивирането му чрез мутация вероятно допринася за туморогенезата чрез индукция на HIF1 пътя⁽¹⁴²⁾.



Фигура 1.10. Модел на IDH1/IDH2 мутационната индукция на хиперметилаторен фенотип (CIMP). Мутации в IDH1 и IDH2 водят до продуцирането на 2-хидроксиглутарат (2-HG), инхибитор на α -KG зависимите диоксигенази, включително хистонов деметилази и TET белтъчното семейство. Мутациите в IDH1/IDH2 гените са причина за CIMP чрез инхибиране на TET-медираната продукция на 5-хидроксиметилцитозин, която е първата стъпка към ДНК деметилирането; Модифицирана от Kondo ⁽¹⁵²⁾

От друга страна в туморите, носещи *IDH1/IDH2* мутации се натрупват големи количества на онкомабола (R)-2HG, чиято роля в клетъчната трансформация се свързва със способността му да заменя α -KG като ко-субстрат на пролил хидроксилазите (PHD), ензими действащи върху HIF системата. Това води до производството на сукцинат, преминавайки през α -KG като междинно съединение. Смята се, че високите нива на клетъчния 2HG активират хидроксилирането на HIF α , което от своя страна води до намалена експресия на HIF и повишена глиомна трансформация. В допълнение, натрупването на 2HG в *IDH1* и *IDH2* мутиралите клетки е свързано с епигенетични промени чрез инхибиране на TET2 (ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase) и JHDMs (Jumonji-C domain histone demethylases) (Фиг.1.10)⁽¹⁵³⁾.

Генетични изменения са детектирани и в ДНК последователността, кодираща активния център на IDH2 (митохондриална NADP+ зависима изоцитрат дехидрогеназа 2), разположена в хромозомен регион 15q26.1. Подобно на IDH1, този ензим функционира като димер. Последните научни открития показват, че IDH2 е основният катализатор на окислението на изоцитрат до α -кетоглутарат в цикъла на лимонената киселина⁽¹³⁹⁾. Мутации в *IDH2* са открити единствено в аргинин на позиция 172, която е аналогична на аргинин 132 в *IDH1*. Мутациите в *IDH1*, както и тези в *IDH2*, са предимно хетерозиготни, упражняват доминиращо негативен ефект и имат соматичен произход^(144, 154). Наскоро бяха публикувани данни за наличие на мутации в *IDH1* гена и в хомозиготно състояние^(155, 156).

Изследване на пациенти, претърпели повече от една операции и рецидивиращо заболяване показва, че мутационното събитие в *IDH1* гена никога не настъпва след възникването на TP53 мутациите, което предполага, че *IDH1* мутацията е много по-ранно събитие в глиоманезата. Наличието на мутации и в двата гена, *IDH1* и *TP53*, се наблюдава в 63% от нискостадийните дифузни астроцитомите, но едва при 10% от пилоцитните астроцитомите и 5% от първичните ГБМ⁽¹⁵⁷⁾.

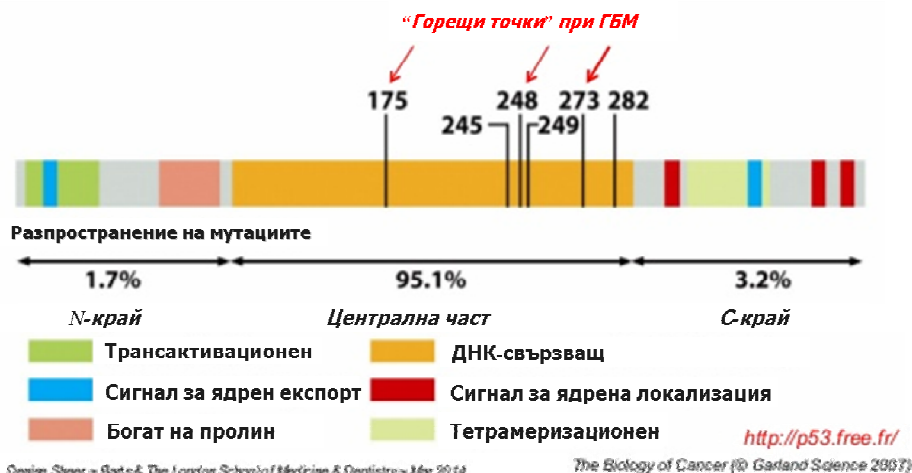
IDH1/IDH2 мутации са установени при 54% от астроцитомите, при 65% от олигодендроглиомите, при 50% от вторичните и само при 3% от първичните ГБМ⁽¹⁵⁸⁾. Високата честота на *IDH1/IDH2* мутации във вторичните ГБМ и тяхното почти напълно отсъствие в първичните ГБМ е в подкрепа на аргументите, че въпреки хистологичните си прилики, тези подтипове са клинично и генетично различни⁽¹⁵⁷⁾. Тези мутации изглежда са от съществено значение за преживяемостта на пациентите, но директната връзка с тях все още не е изяснена. Пациенти с АА и ГБМ показват значително по-дълга обща преживяемост при наличието на мутации в гените *IDH1* или *IDH2*. Те са характерни за по-млади пациенти - средна възраст 34 години за пациенти с АА, в сравнение с носителите на див тип - средно 53 годишна възраст⁽¹⁴⁰⁾. Hartmann и сътр показват, че липсата на мутации в *IDH1* при АА, ОА и ОД СЗО III-ти стадий е значим показател за лоша прогноза⁽¹³⁹⁾. При пациентите с ГБМ и мутирал *IDH1/IDH2* се наблюдава удължаване на средната преживяемост с 3.8 години в сравнение с 1.1 години при пациенти с див тип *IDH1*⁽²⁹⁾.

Въз основа на мутациите в тези два гена могат да бъдат разработени нови терапевтични решения при пациенти с вторичен ГБМ и при малка част от тези с първичен ГБМ, които ги притежават, особено след като наскоро бе показано, че инхибирането на ензима IDH2 води до увеличаване чувствителността на туморните клетки към химиотерапевтичните средства⁽¹⁴¹⁾.

1.7.2.1.2. TP53

p53 е туморсупресор с изключителна роля, който участва в регулацията на клетъчния цикъл, контролира оцеляването и стареенето на клетката, апоптозата, диференциацията, и участва в много ключови физиологични и патологични процеси. p53 се намира в ядрото на клетките, където се свързва директно с ДНК. При възникване на ДНК повреда в клетката от агенти като токсични химикали, радиация, или ултравиолетови (UV) лъчи, този протеин играе важна роля в определянето на това дали ДНК ще бъде поправена или увредената клетка ще получи сигнал за самоунищожение (апоптоза)⁽¹⁵⁹⁾.

p53 е идентифициран през 1979г. от Arnold Levine, David Lane и William Old е наименуван според молекулната му маса, която е 53kDa^(160, 161). Белтъкът p53 се състои от четири субединици, всяка, от които условно е разделена на няколко домена, които са с различна функция (Фиг.1.11).



Фигура 1.11. Схематично представяне структурата на p53: N-терминален регион (1-94 аминокиселина), Централен регион (ДНК-свързващ – 102-292 аминокиселина) и C-терминален регион (363-393 аминокиселина); Модифицирана от <http://p53.free.fr/>

TP53, заедно с p63 и p73, са част от малко генно семейство, което има ключова роля за развитието, диференциацията и състоянието на клетката в условия на стрес. Той се експресира в много ниски нива в ядрата на нормалните клетки. В активно състояние, във вид на хомотетрамер, p53 белтъкът се акумулира в ядрото и действа като мултифункционален транскрипционен фактор, репресиращ или активиращ експресията на множество други гени, участващи в прогресията на клетъчния цикъл, апоптозата, отговора на стресови сигнали, неоваскуларизация, диференциацията и ДНК поправка⁽¹⁶²⁾. След увреждане на ДНК, TP53 се активира и действа като транскрипционен регулатор, водещ до активиране транскрипцията на редица гени един, от които е *p21^{WAF1}*. Той е стоп белтък, отговорен за свързване на циклин-зависима киназа и инхибира клетъчния преход от пресинтетична G1 към синтетичната S фаза на клетъчното делене. По този начин, мутантния TP53 не е в състояние да предотврати клетъчната репликация, което води до неконтролиран туморен растеж. Основен регулатор на TP53 е MDM2 (murine double minute 2). В клетки, които не са подложени на стрес, нивата на TP53 се поддържат в ниски концентрации, чрез непрекъснато му разграждане. MDM2 се свързва с TP53 и предотвратява неговото действие, като го транспортира от ядрото в цитозола. MDM2 действа и като убиквитинираща лигаза, свързвайки ковалентно към TP53 убиквитин и по този начин го маркира за протеозомно разграждане. От друга страна p14^{ARF} инхибира MDM2, и високите му нива стабилизират TP53, който от своя страна активира p21^{WAF1/CIP1}-комплекса. Това води до инхибиране на клетъчния цикъл последвано от блокиране на CDK2/cyclin E (CCNE1)-медираното RB1 фосфорилиране⁽¹⁶³⁾.

Често в тумори с мутации в *IDH1* или *IDH2* се откриват и такива в TP53 (в 80% от случаите на АА и ГБМ)^(146, 157). Мутациите в гена TP53 са характерни за около 50% от всички тумори⁽¹⁶⁴⁾ и за над 35% от глиомите^(29, 165). Днес в различните база данни може да бъде открита информация за над 15 000 TP53 мутации при спорадични тумори, съобщени в над 6 000 публикации, както и за още над 201 мутации при полови клетки. Мутациите в TP53, които водят до ракови формации са предимно „missense” замени, неравномерно разпределени по дължината на молекулата, предимно в ДНК-свързващия домен, екзони 5-8 („hot-spots”)⁽¹⁶⁶⁾. Едва 15% от мутациите се намират извън 5-8 екзон. Тези мутации са с най-голяма честота при анапластичните астроцитомии - 64.3%, последвани от ГБМ, при които честотата е 25.9%. Останалите 12% се разпределят между другите видове мозъчни тумори. Мутациите в TP53 гена са рядко срещани при първичните ГБМ - 11%, докато при вторичните процентът им е значително по-висок – 67%. Това подкрепя идеята, че има поне два пътя, които водят до развитието на мултиформен ГБМ – 1) *de novo* път, при който не възникват TP53 мутации и 2) вторичен, прогресивен път, при който TP53 мутира⁽¹⁶⁷⁾. Въпреки, че аберации в TP53 силно се асоциират с вторичните ГБМ, в сравнение с другите диагностични маркери, той има по-слабо изразена роля в разграничаването на първичните от вторичните ГБМ, като се има предвид, че свръхекспресията му е наблюдавана в около 25% от първичните ГБМ⁽¹⁶⁸⁾. Това води до

противоречиви резултати за TP53 като индивидуален прогностичен маркер. Докато някои проучвания показват връзката му с по-лоша преживяемост при пациенти с ГБМ, за които е характерна увеличена експресия на TP53, редица мета-анализи отхвърлят наличието на такава корелация⁽¹⁶⁵⁾. От друга страна, мутации в два кодона, 248 и 273, на гена *TP53* се свързват с благоприятна прогноза при ГБМ⁽¹²¹⁾.

1.7.2.2. СТРУКТУРНИ ИЗМЕНЕНИЯ

Промени в нормалното количество на ДНК, включително CNVs и алелни дисбаланси, се смятат за отличителен белег на раковите заболявания. В резултат на промени в броя хромозомни копия и загуба на хетерогенност се засяга генната транскрипция, както на важни онкогени, така и на туморсупресорни гени. Разкриването на специфични хромозомни промени може да подпомогне идентифицирането на гени, чиито аномални функции могат да допринесат за туморогенния процес. CNV-та, засягащи ДНК, са чести събития при ГБМ и засягат значителна част от туморния геном. Оценка на ДНК-овите CNV-та, с помощта на високо-резолютивни технологии в изследвания на голям брой туморни проби позволи точното характеризиране на фокални CNV-та в целеви райони.⁽¹⁶⁹⁾

1.7.2.2.1. ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ

Хромозомните аберации са аномалии засягащи структурата или броя на хромозомното съдържимо в клетката. Малигнените заболявания все повече биват определяни като хетерогенна съвкупност от болести, чието възникване и прогресия е иницирано от промяна във функцията на гени, управляващи ДНК репарацията, геномната стабилност, клетъчна пролиферация, апоптозата, адхезията, инвазията и ангиогенезата^(136, 170).

С използването на съвременните молекулярно-биологични технологии, като FISH (fluorescence in situ hybridization), сравнителна геномна хибридизация (aCGH), SNP базиран чип (single nucleotide polymorphism arrays) и т.н, откриването на хромозомни аберации отговорни за първоначалното или повторно възникване на туморите, се осъществява с много по-бързи темпове. Към днешна дата, ГБМ са били подложени на най-детайлно геномно профилиране в сравнение с всеки друг вид тумор⁽¹⁷¹⁾. В литературата случайните транслокации при ГБМ са много редки събития⁽¹⁷²⁾. Поради това сред хромозомните аберации, от гледна точка изследване генезиса на глиомите, най-голям интерес представляват амплификациите и делециите⁽¹⁷³⁾.

1.7.2.2.1.1. Амплификации

Амплификация на гена *EGFR* е една от отличителните черти на първичните ГБМ⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁶⁾, както беше описано вече в предходните части. Фокалната амплификация на *EGFR* корелира с *EGFR* свръхекспресия или мутации и делеции в *EGFR* гена, последващо от активиране на PI3K/Akt пътя^(175, 177), което от друга страна се асоциира с лоша прогноза⁽³⁴⁾. Свидетелство за активиране на RTK/RAS/PI3K сигналния път се съобщава при 88% от туморите, включително и тези с неочаквано наличие на мутации или делеции в гените *NF1* (18%) и *PIK3R1*, който кодира p85a - регулаторна субединица на PIK3CA⁽¹⁷¹⁾. Освен това, амплификацията на цялата хромозома 7, съдържаща *EGFR*, *MET*⁽¹²⁰⁾ и неговия лиганд HGF е установена, че корелира с активирането на гените зависими от *MET*^(171, 175). Забележително е, че удвояването на генетичния материал съдържащ се в хромозома 7 и амплификацията на *EGFR* са били наблюдавани при пациенти с по-къса продължителност на живот^(174, 178), въпреки, че до този момент прогностичното значение на тези промени не са еднозначно доказани при ГБМ^(176, 178, 179).

Амплификацията на 12q13-15, където са кодирани онкогените *Cdk4* и *MDM2*, води до нарушаване на два от основните пътища свързани с глиалната канцерогенеза – RB и p53^(120, 175, 180, 181). Повреди в p53 сигналния път е се наблюдава в 87% от пробите, вследствие на делеции в гените *CDKN2A* (49%), *MDM2* (14%) и *MDM4* (7%) амплификация, както и мутации и делеции на гена *TP53* (35%)^(29, 171, 182, 183). В RB пътя са описани нарушения в 78% от пробите в резултат на делеционни събития засягащи членовете на CDKN2 семейството: амплификация на *CDK4* (18%), *CDK6* (1%), и *CCND2* (2%); както и на мутация или делеция на *RBI* (11%)⁽¹⁷¹⁾. Освен

това, големите асоциативни проучвания разкриват наличието на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в *CDKN2A* и *CDKN2B*, които са идентифицирани като рискови фактори за развитието на глиом ⁽¹⁸³⁻¹⁸⁵⁾. Гените, кодиращи рецепторните тирозин кинази *KIT*, *KDR*, и *PDGFRA*, разположени в съседство на хромозомна позиция 4q12, често се наблюдават ко-амплифицирано състояние ⁽¹⁸⁶⁾. Около 30% от глиомите показват експресионен профил, свързан с промени в PDGFR сигналния път ⁽¹⁸⁷⁾. Например, *PDGFRA* амплификацията се открива в 15% от всички тумори ^(34, 123) притежаващи такава, 40% притежаващи интрагенна делеция ⁽¹⁸⁸⁾ една, от които засяга екзони 8 и 9, водещо до скъсен с 243 б.дв. екстрацелуларен белтъчен домен ⁽¹⁸⁹⁾. Точкови мутации в *PDGFRA* се свързват с амплифицирането на гена, но за разлика от тези в *EGFR*, се наблюдават по-рядко. Повишено фосфорилиране на АКТ е наблюдавано при над 85% от ГБМ ⁽¹⁹⁰⁾. Активирането на тази каскада, независимо от наличието на тирозин-киназен рецептор в ГБМ може да се случи чрез мутация или амплификация на *PIK3CA* (p110a) ^(122, 191), и *PIK3CD* (p110d) са също свръхекспресирани в част от глиомите ⁽¹⁹²⁾. Други силно амплифицирани райони, например 1q и 12p хромозомните области, съдържат онкогени като *Akt3* ^(120, 193) и *CCND2* ^(120, 175).

Свръхекспресия на с-Мус е често наблюдавана в различни видове тумори, включително ГБМ, и обикновено е резултат от хромозомна транслокация, включваща гените на с-Мус в допълнение към генната му амплификация ⁽¹⁹⁴⁾. В проучване изследващо фибробластни клетъчни линии, трансфектирани с SV40 LT, беше установено, че нивата на експресия на с-Мус и *SP1* се асоциират с нивата на теломеразната активност в различни етапи на трансформацията ⁽¹⁹⁵⁾. До скоро се смяташе, че транскрипционната регулация на *hTERT* е главният регулиращ механизъм на теломеразата. Оказа се, че едновременното действие на с-Мус и *SP1* е отговорно за промоторното активиране на *hTERT* ⁽¹⁹⁵⁻²⁰⁰⁾. По този начин, позитивната регулация на тези критични фактори на транскрипцията може, поне отчасти, да е отговорно за теломеразното активиране по време на канцерогенезата ⁽²⁰¹⁾.

Таблица 1.1. Амплификационни аберации с висока честота при ГБМ

Райони с амплификация	Засегнат ген (Литература)
1q	<i>AKT3</i> ^(120, 193)
3q	<i>PIK3CA</i> ^(29, 120, 175)
4q	<i>PDGFR</i> ^(120, 180)
7p	<i>EGFR, MET, HGF, CDK6</i> ^(29, 120, 175, 180, 181)
8q	<i>c-MYC</i> ⁽¹⁹⁴⁾
12q	<i>CDK4, MDM2</i> ^(120, 175, 181)

1.7.2.2.1.2. Делеции

Загуба на хетерозиготност (LOH) на хромозома 10q е най-често наблюдаваната геномна промяна, както при първичните, така и при вторични ГБМ ^(176, 182) и се свързва с наличието на лоша прогноза ^(174, 176). Често наблюдаваните райони със загубата на различни региони в хромозома 10 включват гените *PTEN*, *MGMT* ^(121, 176) и *ANXA7*, инхибитор на *EGFR* ⁽²⁰²⁾. *PTEN* е пряк антагонист на PI3K сигналния път и е един от най-често засегнатите гените в малигнените заболявания. Претърпява различни генетични, епигенетични и геномни промени при около 50% от глиоми, което води до повишаване активността на PI3K сигналния път, както и на други пътища влияещи се от него ⁽²⁰³⁾.

Друг често делетиран инхибитор на EGFR сигналния път е *NFKBIA*, който се намира върху хромозома 14. Неговата загуба също се асоциира с по-кратка преживяемост ⁽²⁰⁴⁾ освен това, загуба на хромозома 9p, която съдържа различни туморсупресорни гени, включително *CDKN2A*, *CDKN2B* и *PTPRD*, често се наблюдава ^(176, 180, 205) особено в групата от пациенти показващи много ниска преживяемост ^(174, 178). Делецията на *CDKN2A* и *CDKN2B* често се наблюдава в комбинация с делеция на *CDKN2C*, локализиран в хромозомен район 1p32, който кодира и друг важен белтък на клетъчния цикъл - p18INK4C ⁽²⁰⁶⁾. LOH на хромозома 1p се откриват при първични и вторични ГБМ ⁽²⁰⁷⁾. Дългогодишните предположения за наличието на туморсупресорни гени в късото рамо на хромозома 1 (1p) наскоро бяха подплатени с откриването на два кандидат гена - *CIC* и *FUPBI* ⁽²⁰⁸⁾. Коделецията на 1p и 19p често се

наблюдава в олигодендроглиоми, и особено при тези показали продължителна преживяемост⁽¹⁷⁸⁾ и наличие на транслокации⁽²⁰⁹⁾. Въпреки, че това коделеционно събитие се наблюдава и при ГБМ, подобни силни асоциации не са идентифицирани в тази група. Наличие на 19p LOH е често наблюдавано събитие при вторични ГБМ^(174, 207) и може да бъде показател за по-дълга преживяемост⁽¹⁷⁴⁾.

Честите алелни загуби в хромозомния участък 22q са явен показател за наличието именно там на потенциални туморсупресорни гени са намерени при първични и вторични ГБМ⁽²¹⁰⁾. Сред наблюдаваните LOH на 22q се отличават две локализации на минимално делетирал район в 22q12.3-13.2 и 22q13.31, срещани при първичните и по-голямата част от вторичните ГБМ. Наблюдаваната делеция в 22q12.3 засяга мястото в генома, където се кодира гена за човешкия тъканен инхибитор на металопротеиназа-3 (human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 -TIMP-3). Експресията на *TIMP-3* инхибира металопротеазната дейност, потиска миграцията и инвазията на ГБМ⁽²¹¹⁾, и делецията му подпомага инвазивността⁽²¹⁰⁾.

Таблица 1.2. Делеционни аберации с висока честота при ГБМ

Райони с делеции	Засегнат ген (Литература)
9p	<i>CDKN2A, 2B</i> ^(120, 175, 181)
10q	<i>PTEN, MGMT, ANXA7</i> ^(29, 120, 180, 181)
13q	<i>RB</i> ^(120, 180)
17p	<i>P53, NF1</i> ^(120, 175, 180)
19q	<i>BAX</i> ^(180, 207)
22q	<i>TIMP3</i> ⁽²¹⁰⁾

Важно е да се отбележи, че различните аберационни събития (делеции и амплификации) съществуват във взаимовръзка. Например, *NFKBIA* делеции и *EGFR* амплификацията са взаимно изключващи се събития, което предполага, че тези събития водят до взаимноизключващи се функции в ГБМ патогенеза⁽²⁰⁴⁾. Анализ моделите на едновременното наличие на различни делеции и амплификации доведе до разкриването на геномни области със синергични тумор-иницииращи въздействия⁽²¹²⁾. От друга страна анализ на общите модели, при които се наблюдава освен едновременното наличие на определени райони и точно обратното взаимното изключване на присъствието им при ГБМ предполага общи пътища, които са били засегнати в процеса на канцерогенезата.

1.7.2.2.1.3. 1p и 19q коделеционни събития

Между центромерните региони на двете хромозоми 1 и 19 има голяма хомоложност, което предполага механизъм за небалансирана транслокация⁽²⁰⁹⁾. Подобни транслокации на цели рамена са наблюдавани в няколко вродени неопластични заболявания. Хипотезата за центромерна нестабилност е в основата на много наблюдавани в солидни тумори транслокации на цели хромозомни рамена^(209, 213). В солидните тумори образуването на такива транслокации може да бъде провокирано от промени в метилирането на ДНК веригата и/или под действие на хистонови модификации. Една от причините за генното заглушаване или деактивиране на важни гени при туморите е т.нар. промоторно хиперметиране⁽²⁰⁹⁾. Тези епигенетични изменения могат да бъдат в основата на центромерна нестабилност^(214, 215). Това се подкрепя и от факта, че коделецията на 1p и 19p силно корелира с хиперметирането на голям брой гени⁽²⁰⁹⁾.

Коделеция на хромозомните рамене 1p/19q за първи път е открита при олигодендроглиални тумори през 1994г.^(151, 216). Cairncross и сътр установяват хипочувствителност на пациенти с анапластична олигодендроглиома, които имат загуба на 1p и особено при коделеция на 1p и 19q⁽²¹⁷⁾. Коделецията на 1p и 19q е молекулярно-генетичната характеристика на ОД, обикновено включваща целите хромозомни рамена и на двете хромозоми. Докато единичната загуба на 19q се среща в астроцитомите, коделецията на 1p/19q (особено делеция, която включва целите рамене) се среща рядко при други глиоми, различни от ОД. Комбинираната загуба на 1p/19q се открива в 50% до 80% от случаите, при които диагнозата е олигодендроглиома - около 85% от пациентите с ниско-стадийна ОД и 65% с АОД имат едновременна загуба на 1p/19q хромозомните рамена⁽²¹⁸⁾. Честотата на коделецията

1p/19q е значително по-ниска (20% - 30%) при дифузни глиоми и глиоми с неизяснена хистоморфология^(216, 219, 220). Едновременната загуба на 1p и 19q се асоциира с добра прогноза не само при ОД, но и при астроцитомите, въпреки че при тях това увреждане е по-рядко⁽²²¹⁾.

Туморите с делеция на целите хромозомни рамена 1p и 19q се характеризират с по-добра прогноза от тези с частична загуба или без загуба на хромозомен материал⁽²¹⁷⁾. Освен това, алелната загуба на хромозомното рамо 1p или комбинираната загуба на 1p и 19p са добри прогностични фактори за отговора към химиотерапия. Въпреки че механизмът, чрез който загубата на генетична информация в хромозомите води до химиочувствителност остава неясен се смята, че алелните загуби демаскират инактивирани туморсупресорни гени, които се намират в оставащите алели⁽²¹⁷⁾.

Загуба на 1p/19q се свързва и с наличието на други генетични промени в глиомите. Често в тумори с мутации в *IDH1* или *IDH2* се откриват също *TP53* мутации или делеции на хромозоми 1p и 19q⁽¹⁵⁷⁾. Мутациите в гена *TP53* са често срещани в туморите с астроцитен произход, но никога не се наблюдават при тумори с 1p/19q коделеция, т.е. те са взаимно изключващи се събития^(29, 168). Наличието на 1p/19q загубата се свързва и с по-ниските експресионни нива на гена *MGMT*^(220, 222, 223).

1.7.2.3. ЕПИГЕНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ МАЛИГНЕНИ ГЛИОМИ

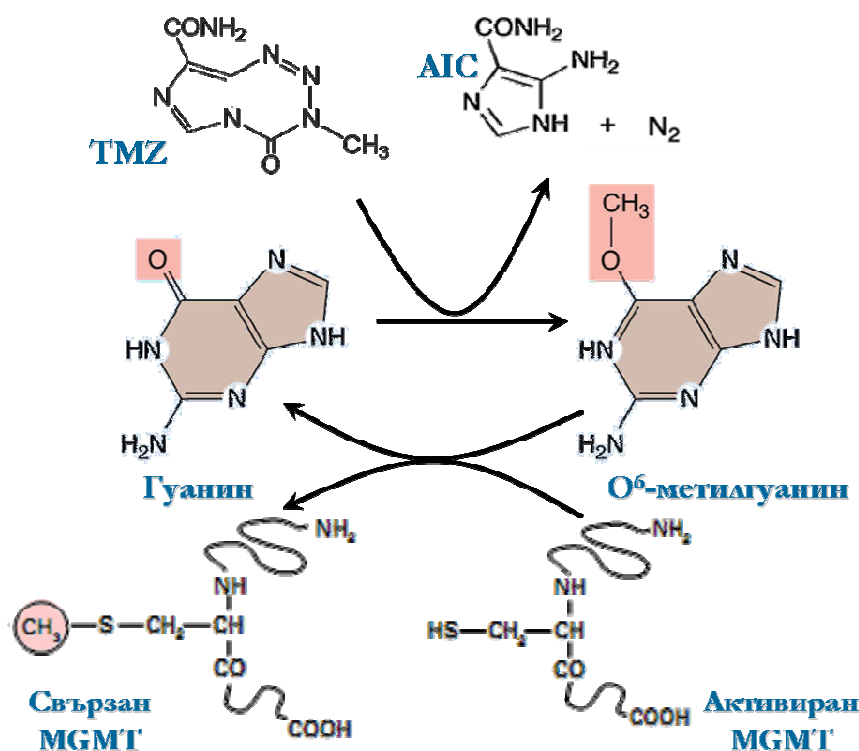
Нарушения в епигенетични механизми, като промоторно хиперметиране, модификации на хистоновите белтъци, или експресия на не-кодиращи РНК-и, са спрягани като изключително важни в канцерогенезата. Тези епигенетични промени представляват нещо подобно на "третия път" в хипотезата на Knudson за механизма на инактивиране на туморсупресорните гени, както дерегулация в генната експресия, без това да е обусловено от генетични промени. Известно е вече, че почти всички видове ракови клетки се характеризират с множество епигенетични аномалии, които в комбинация с генетичните изменения засягат редица клетъчни процеси, като клетъчна пролиферация и инвазия, инактивиране на туморсупресорни гени и т.н. Това е и причината в наши дни епигенетичните промените да са толкова широко изследвани, колкото и тези с генетична етиологията при малигнените неоплазии. Епигенетичните фундаментални компоненти на раковите клетки включват ДНК метилиране; нуклеозомно ремоделиране; и серия от хистоновите модификации, като ацетилиране, метилиране, сумоилиране и други, засягащи ключови аминокиселинни остатъци в тези белтъци. Тези епигенетични промени водят до структурни промени в хроматина, което от своя страна води до аномална генна експресия и туморогенеза⁽²²⁴⁾.

Промените в метилирането на ДНК са друга отличителна черта при злокачествените заболявания, като на фона на цялостното ДНК хипометилиране се наблюдават райони от ДНК последователността, т. нар. CpG острови, с увеличена степен на хиперметиране. Цитозин-фосфат-гуанин (CpG) островите са участъци от ДНК, в която цитозинът е свързан с гуанин чрез фосфодиестерна връзка и се формират CpG динуклеотидни структури, повтарящи се многократно в промоторната област на гените. Метилирането на 5'-въглеродния атом на цитозина е форма на епигенетична модификация, променяща регулацията на генната експресия, което от своя страна, води до промени в хроматиновата структура и транскрипционно потискане на генната експресия. При бозайниците 70% до 80% от цитозиновите остатъци в CpG островите са метилирани⁽²²⁵⁾. Смята се, че еволюционни процеси са довели до спонтанното деаминиране на метилирания цитозин и превръщането му в тимин^(226, 227). При хората CpG островите в промоторните области са неметилирани, което позволява гените да се експресират нормално^(228, 229). Промоторното хиперметиране на CpG островите обикновено води до транскрипционно заглушаване на свързания с промотора ген⁽²³⁰⁾. Въпреки, че метилаторния фенотип на CpG островите за първи път е идентифициран при колоректален карцином⁽²³¹⁾, през изминалото десетилетие терминът хиперметилаторен фенотип (CIMP) многократно е използван, за да се опише промоторно хиперметиране на CpG островите и в други видове тумори, включително ГБМ и други глиални тумори⁽²³²⁻²³⁷⁾. Няколко изследвания отбелязват епигенетични промени между първичните и вторични ГБМ-и. Цялостно вторичните ГБМ-и се характеризират с по-висока честота на промоторно метилиране⁽¹²¹⁾. Пример за това е промоторното хиперметиране на *RB1* гена, установено приблизително 3 пъти по-често при вторичните ГБМ-и⁽²³⁸⁾. Наскоро бе демонстрирано, че соматични мутации засягащи *IDH1*,

често срещани при глиомите, водят до възникването на CIMP фенотип при първичните астроцитомии чрез ремоделиране на метилома (*Фиг. 1.10*)⁽²³⁹⁻²⁴¹⁾. Установено е, че CIMP фенотипа може да бъде полезен като биомаркер за ранното откриване на раковите заболявания в кръв и други телесни течности, за предсказване на прогнозата, отговора към терапия и за мониториране появата на рецидивизиращо заболяване⁽²⁴²⁾.

1.7.2.3.1. MGMT ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ

MGMT генът е локализиран в хромозомен район 10q26 и кодира Об-метилгуанин метилтрансфераза, ензим участващ в ДНК репарацията⁽¹³⁷⁾. Алкилиращите химиотерапевтични лекарства са използвани в лечението на пациенти със злокачествени глиомы в продължение на много години. TMZ добавя метилова група на Об-позиция в молекулата на нуклеотида гуанин, което води до ДНК увреждане и клетъчна смърт. Активният MGMT осигурява поправката на алкилираните гуанинови остатъци в повредените ДНК участъци, като необратимо прехвърля метилова група от Об-позиция на модифицирания гуанин (G) върху своя цистеинов остатък (*Фиг. 1.12*)^(243, 244).



Фигура 1.12. Механизъм на действие на ензима MGMT

При загуба функцията на MGMT, клетките имат намалена способност да поправят повреди в базата G предизвикани от действието на алкилиращи агенти, в резултат на което възниква мутация, при която G се свързва неправилно с базата A, а това води до активиране на “mismatch” репарационната (MMP) система и апоптоза⁽²⁴⁵⁾. През 2005г. Negi и сътр.⁽²⁴⁶⁾ съобщават, че генното заглушаване на *MGMT* подобрява преживяемостта при пациенти с ГБМ, при които е била проведена едновременно химиотерапия с алкилиращия препарат TMZ и лъчетерапия. Следователно високите нива на активно действащия *MGMT* в раковите клетки спомагат за намаляване цитотоксичния ефект на TMZ и за създаването на т.нар. резистентен фенотип^(247, 248). Епигенетичното заглушаване на този ген чрез промоторното му хиперметиране води до намаляване на експресията на MGMT белтъка и съответно до понижената му ДНК репарираща способност. Това, от своя страна, инхибира способността на клетката да поправи алкилираната ДНК верига и по този начин позволява по-ефективното действие на алкилиращите лекарства^(137, 249).

MGMT промоторното хиперметиране се среща в различните стадии на глиома и се счита, че е маркер с прогностична и предиктивна стойност^(246, 248, 250-253). В изследване през

2005г. е установено, че 49% от пациентите с диагноза ГБМ и метилиран *MGMT* ген, след провеждане на терапия с TMZ и лъчелечение показват над 2 годишна обща преживяемост в сравнение с групата, при която не е било наблюдавано *MGMT* промоторно хиперметилиране⁽²⁴⁶⁾. Корелация с прогнозата е докладвана също при педиатрични ГБМ-и, ниско-стадийни глиоми, а най-често при анапластичните глиоми (СЗО клас III)^(250, 251, 253-255). Въпреки че метилационния статус на *MGMT* може да се промени с прогресията на заболяването, прогностична му значимост се отнася само за първичните МГ⁽²⁵⁶⁾. При пациенти с ГБМ, редица изследвания потвърждават не само прогностичната значимост на *MGMT* промоторното метилиране, но и неговата предиктивна такава при проведена химиотерапия с TMZ^(179, 246, 248, 252, 257, 258). За разлика от тях, при анапластичните астроцитомы *MGMT* метилационният статус има отношение само към прогнозата на заболяването, но не и към терапевтичния отговор^(250, 255). Проучване на Rivera и сътр установява, че наличието на *MGMT* метилиране има връзка с терапевтичния отговор при самостоятелно прилагане на лъчетерапия, дори и при липсата на адювантно лечение с алкириращ химиотерапевтик⁽²⁵⁹⁾.

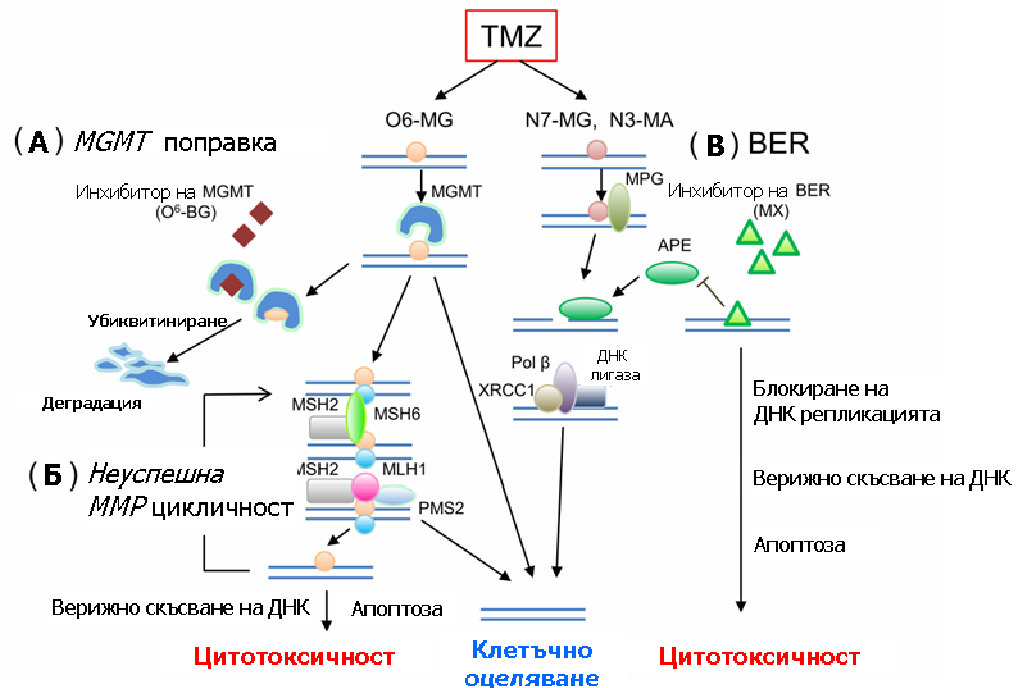
Промоторното метилиране на *MGMT* се свързва с ефективност на терапията с TMZ при първото му прилагане^(246, 260), но не и при рецидив⁽²⁶¹⁾. Изследвания върху молекулярните механизми, водещи до развитие на рецидивиращо заболяване, доведоха до откриването на мутационни събития наблюдавани в гени от MMR системата, които оказват влияние и върху процеса на *MGMT* метилиране. В действителност, при пациентите с хипермутационен статус на MMR гени и с метилиран *MGMT* промотор се наблюдава натрупване на множество GC към AT транзиции в CpG островите, за разлика от пациентите с хипермутационни тумори и неметилиран *MGMT* промотор.

1.7.2.3.2. МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ (MCH, MSI) ПРИ ГЛИОМИ

Геномната нестабилност играе основна роля в патогенезата на множеството солидни тумори^(262, 263). Една от формите на геномна нестабилност е хромозомната (ХН), характеризираща се с множество дупликации и делеции в специфични хромозомни региони⁽²⁶²⁾. В ГБМ, ХН се свързват главно с два сигнални пътя, обикновено характеризиращи се или с мутации в *TP53*, или с амплификация на онкогена *EGFR*. Втората форма на геномна нестабилност е МСН, която се изразява обикновено в наличие на мутации свързани с дължината на микросателитните последователности, както в некодиращи, така и в кодиращи региони на гени, като *PTEN*, *TGF-βR-II*, *IGFIR* и *BAX*⁽²⁶⁴⁻²⁶⁷⁾.

Сателитната ДНК (около 10%), характеризираща се с клъстерна организация, представлява високо повторени последователности, локализирани в някои центромерни и теломерни райони. Микросателитите представляват къси нуклеотидни последователности (1-6 б.дв.), тандемно повторени 10-50 пъти. Около 100 000 микросателита са разпръснати из целия човешки геном. Обикновено, но не винаги, те са некодиращи последователности⁽²⁶⁸⁾. Всички показват Менделов тип на унаследяване и висока полиморфност, дължащи се на разлики в броя на повторените единици. Микросателитите са високо полиморфни, но дължините на отделните повтори са еднакви за всички клетки на един индивид. С термина "микросателитна нестабилност" се означава промяната на тази дължина като резултат от инсерция или делеция на едно или повече копия на повтора в рамките на микросателита. Смята се, че причината е "приплъзването" на ДНК-полимеразата при репликацията⁽²⁶⁹⁾. Затова МСН е причислена към т.нар. репликационни грешки (replication errors – RER).

МСН е резултат от инактивирането на гените формиращи ДНК mismatch репарационната система^(265, 270, 271), което е било наблюдавано в наследствени синдроми, като наследствен неполипозен колоректален рак (HNPCC) с честота до 90%^(265, 271). В тези случаи дефектът се дължи на мутации или епигенетично заглушаване в герминативните клетки на mismatch репарационните гени, и по-конкретно - *MLH1* и *MSH2*. Смята се, че не е необходимо да се търсят мутации в ММР-гените, ако не е установена микросателитна нестабилност. Въпреки това, в спорадични злокачествени заболявания МСН без мутации в тези гени е била наблюдавана при карциноми на дебелото черво (15%), недребноклетъчен белодробен карцином (35%), на главата и шията (28%), рак на стомаха (10%), и рак на простатата (8.5%)⁽²⁷²⁻²⁷⁶⁾.



Фигура 1.13. MGMT и други ДНК репарационни механизми поправят повредите в молекулата на ДНК, предизвикани от метилиращи терапевтични лекарства, TMZ в клетките; Модифицирана от Liu⁽²⁸³⁾

В ГБМ, MSH се открива с честота в диапазона 5-50%⁽²⁷⁰⁾. Направено е предположение, че MSH разстройва регулацията на клетъчния цикъл, в резултат на което става възможно развитието на карцином от клетки с нерегулиран растеж⁽²⁷⁷⁾. При туморите с висока степен на MSH обикновено не се открива функционална MMR система. Няколко изследвания потвърждават, че почти 100% от неоплазиите със загуба на MLH1 или MSH2 белтъка показват висока степен на MSH. Около 8% от туморите с висока степен на MSH имат запазена експресия на hMLH1 и hMSH2⁽²⁷⁸⁾. Забележително е, че в тези спорадични тумори, MSH не е свързана с наличието на мутации в mismatch репарационната система, а с промоторно хиперметиране на mismatch репарационните гени водещо до инактивирането им. MSH се наблюдава по-често при ГБМ, произхождащи от по-малко злокачествени глиомы - стадий II или III, които обикновено притежават TP53 мутации, но не и EGFR амплификация⁽²⁷⁰⁾. Имайки това предвид, дезактивацията на туморсупресорните гени може да представлява крайната фаза в злокачествена трансформация на клетки, която бива провокирана от увеличаването на геномната нестабилност вследствие на ранната инактивация на ДНК mismatch репарационния ген MLH1.

Сравнително ниската честота на микросателитна нестабилност при деца и възрастни с високо-стадийните глиомы предполага, че участието на дефектите в MMR за резистентността към алкилиращи агенти е ограничено^(279, 280). Въпреки това, поради важната роля, която MMR система играе в клетъчния отговор на промяна в ДНК има данни за нейната функция като значима за терапевтичния ефект на химиотерапевтични средства при MSH тумори. Употребата на метилиращи агенти като Streptazocin и TMZ са с по-слаб ефект върху MSH клетки, отколкото върху такива с нормално функционираща MMR система. Както стана по-горе вече ясно клетките, които са дефицитни на ензима MGMT, проявяват висока чувствителност към метилиращите агенти. Този ефект най-вероятно се дължи на разпознаването на O6-метилгуанин-тимин базите от MSH2/MSH6 комплекса, който активира апоптозата. Moertel предполага, че MMR системата разпознава настъпилите промени в ДНК, които не могат да бъдат поправени, блокира клетката в перманентна G2/M фаза и чрез p53-зависимия път тласка клетката към апоптоза⁽²⁸¹⁾. Humbert и сътр през 1999 наблюдават, че клетки, които са дефицитни по MMR система и MGMT са 50-100 пъти по-резистентни към метилиращи агенти от тези с нормално функционираща MMR система⁽²⁸²⁾.

Наличието на дефицит на ММР системата и *MGMT* промоторното метилиране биха могли да бъдат значими фактори с клинични последици в контекста на лечението – повишава се възможността пациентите, подложени на първа линия терапия да развият не само резистентност към терапията, но и ММР хипермутационен фенотип. Фактът, че ново диагностицирани ГБМ с деактивиран *MGMT* реагират добре на лечение с алкилиращи агенти, отчасти се дължи на иницирането на множество ММР цикли, които се опитват безуспешно да поправят алкилираните гуанини. Това, от своя страна, води до клетъчна смърт, но и до натрупване на мутации в ММР гени, които са локализирани в CpG богати региони, но извън промоторните области⁽¹²⁰⁾. Така първоначалното метилиране на *MGMT* може, от една страна, да усилва мутационния спектър, който засяга ММР гените, а от друга - увеличава селективния натиск върху загубата на клетъчната ДНК репарационна функция, достигайки до крайния резултат – развитието на рецидивирани, агресивни тумори с хипермутационен фенотип⁽²³⁹⁾. Тези открития подчертават важността за разработването на селективни стратегии, насочени към клетките с дефицит в ММР система, в комбинация с алкилиращи агенти, за да се предотврати или сведе до минимум появата на резистентност към лечение⁽¹²⁰⁾.

1.7.2.4. ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

В последните години популярност добиха генетичните изследвания върху глиалните тумори^(29, 120), с помощта на които бяха установени генетични маркери за прогнозиране преживяемостта на пациентите. Освен прогностични фактори на ниво ДНК, са установени и голям брой такива на ниво генна експресия, т.е. РНК. Редица проучванията показват, че профилиране базирано на експресионния профил корелира по-добре с прогнозата, отколкото хистологията, и дори може да се използва за по-прецизно предсказване прогнозата за пациентите^(284, 285). В действителност така беше доказана хетерогенността на заболяването показвайки, че в хистологично ограничаваната СЗО група на ГБМ се установяват множество подвидове⁽¹⁸³⁾. Свърхекспресията, както и понижаваната генна експресия при ГБМ в сравнение с нормалната мозъчна тъкан или ниско-стадийни глиомы може да служи като показател за гени, които участват в процесите на туморна хипоксия (*HIF1α*, *HIF2α*, *HIF3α*, *CAIX* и т.н.), ангиогенеза (*VEGFA*, *KDR*, *FLT1*, *TGF-β2*, *EGFR* и т.н.), метастазиране (например ре-иницииране на невронални стволови клетки – *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *MMP9* и т.н.) и др. спомагащи глиоматогенезата⁽¹⁷³⁾.

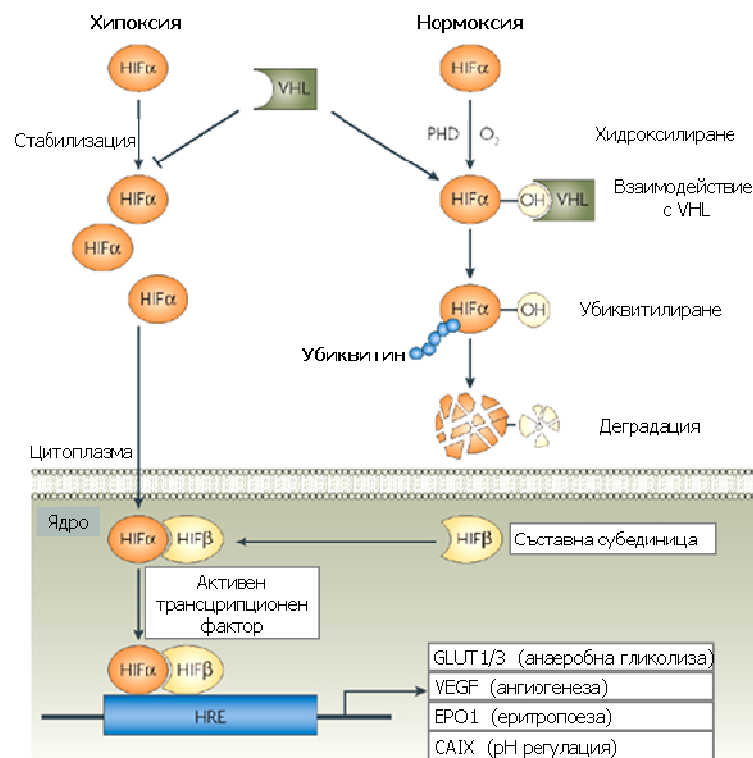
1.7.2.4.1. ТУМОРНА ХИПОКСИЯ

Кислородът играе централна роля в клетъчната биология, а човешките клетки изискват постоянно и адекватно снабдяване с него. Кислородът функционира като терминален акцептор на електрони в митохондриалната дихателна верига, където се генерира АТФ, необходим в повечето биохимични процеси⁽²⁸⁶⁾. Туморната хипоксия е процес, в който туморните клетки са подложени на недостатъчна кислородна концентрация в сравнение със здравите тъкани. При туморния растеж бързо се достига до максималния капацитет за доставка на хранителни вещества и кислород на кръвоносните съдове обкръжаващи тумора, оставяйки части от него с кислородна концентрация значително по-ниска, отколкото в останалите. Хипоксичната микросреда се получава поради възможността бързо пролифериращите туморни клетки да консумират свободния кислород на разстояние 70-150 μm от кръвоносни съдове, като по този начин се ограничава дифундирането му в останалата част от туморната тъкан⁽²⁸⁷⁾. С цел да се поддържа непрекъснатия туморен растеж и пролиферация в условията на хипоксия, раковите клетки променят своя метаболизъм, като реагират по един от двата начина: или клетъчната пролиферация се ограничава с поява на апоптоза и некроза, или адаптирайки се към стреса на хипоксичната околна среда туморът става по-агресивен⁽²⁸⁸⁾, но също така и по-устойчив на стандартното лечение (лъче- или химиотерапия)⁽²⁸⁶⁾.

1.7.2.4.1.1. Хипоксия-индуцирани фактори (HIFs)

Ангиогенезата е най-често наблюдавания адаптационен отговор към тъканна хипоксия, която се среща при голям брой събития – от ембрионално развитие до туморен растеж. По принцип, ангиогенезата е зависима от акумулирането на т.нар. хипоксия-индуцирани фактори

(hypoxia inducible factors, HIFs), които са основните регулатори на кислородната хомеостаза⁽²⁸⁹⁾. HIFs са семейство от базични спирала-примка-спирала-PAS (bHLH-PAS) транскрипционни фактори, които в активното състояние са под формата на хетеродимер, всеки съдържащ една конститутивно експресирана HIF β субединица (или arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) и една, силно регулируема HIF α субединица⁽²⁹⁰⁾. В момента са известни три изоформи на HIF α субединицата - HIF1 α ⁽²⁹¹⁾, HIF2 α (или endothelial PAS domain protein - EPAS1)⁽²⁹²⁾, и HIF3 α (или inhibitory PAS domain protein - IPAS)⁽²⁹³⁾. HIF1 α и HIF2 α са сравнително добре охарактеризирани^(289, 290, 294), имащи сходна доменна организация, отличаваща се с наличието на основен N-терминален ДНК-свързващ домен, HLS и PAS домени, отговорни за взаимодействието с HIF β и два трансаактивационни домени (N- и C-терминален) отговарящи за взаимодействието с други транскрипционни корегулатори. Освен това, N-терминалният трансаактивиращ домен съдържа допълнително и кислород-зависим деградиращ домен (ODD)⁽²⁹⁵⁾. Скорешни изследвания доказаха, че независимо от голямото сходство в структурата, регулацията и припокриващи се спецификации, HIF1 α и HIF2 α имат и различни отличителни характеристики по отношение на физиологичните индуктори и транскрипционни мишени⁽²⁹⁶⁻³⁰⁰⁾. Регулацията на HIF3 α е още по-сложна и неизяснена⁽³⁰¹⁾. Той действа като доминиращ негативен регулатор транскрипцията на HIF1 α и HIF2 α ^(293, 302). Докато HIF1 α се експресира във всички органи и тъкани, то HIF2 α експресията се ограничава едва в съдовия ендотел, чернодробния паренхим, пневмоцити тип II в белите дробове и епителните клетки в бъбреците⁽³⁰³⁾.



Фигура 1.14. Механизъм на хипоксия-индуцирана генна експресия; Модифицирана от Supuran⁽³⁰⁴⁾

Установено е, че HIF α субединиците биват регулирани чрез различни механизми, повечето от които са кислород-зависими, предимно на нивото пост-транслационна модификация и белтъчна стабилност. При нормоксия, HIF хетеродимерите не се откриват в голямо количество, поради кислород-зависимото хидроксилуване на двата пролинови остатъци, локализирани в ODD и последващата протеазомна деградиация на HIF α субединицата. Хидроксилуването на HIF α субединицата от своя страна води до взаимодействието ѝ с VHL (von Hippel-Lindau) белтъка, и E3 убиквитин лигазния комплекс, който насочва HIF α към убиквитин-зависимо протеазомно разграждане⁽³⁰⁵⁾. В състояние на хипоксия се инхибира процеса на HIF α -хидроксилуване, което води до стабилизиране на HIF1 α и HIF2 α .

зависимото хидроксилиране на HIF α е спрегнат процес с превръщането на 2-оксоглутарат и O₂ до сукцинат и CO₂ в цикъла на Кребс, като по този начин високите нива на сукцинат забавят действието на PHD ензима, а следователно и до HIF α стабилизиране. След това HIF α субединиците се транспортират в ядрото, където хетеродимеризират с HIF β и редица ко-регулатори, образувайки транскрипционен комплекс с HREs (hypoxia-response elements) в промоторните области на прицелните гени и транскрипционната им активация⁽²⁹⁰⁾. Акумулирането на HIF при хипоксия им позволява да активират експресията на множество гени, инициращи ангиогенния процес, сред които основна роля има VEGF-A.

Освен основната роля на кислорода като регулатор на HIF, са открити и различни допълнителни странични растежни фактори и цитокини, като епидермалния растежен фактор, инсулина, инсулин-подобният растежен фактор, ангиотензин 2, тромбин, и др. Сред кислород-независимите регулаторни механизми е открита връзка между HIF1 α и TP53, при която се наблюдава TP53-медирано HIF1 α разграждане. Все пак е необходимо да отбележим, че механизмът не е абсолютно кислород-независим, тъй като повишената експресия на TP53 се обуславя от продължителна хипоксия^(306, 307). В допълнение, скорошни проучвания изследващи глиомите показват, че честа наблюдавана хетерозиготна мутация в гените IDH1 и IDH2 води до понижени нива на 2-оксоглутарат и образуване на онкометаболита (R)2-HG, който инхибира активността на ензима PHD⁽³⁰⁸⁾.

1.7.2.4.1.2. Карбокси анхидраза IX (CAIX)

При много от туморите е потвърдено, че хипоксията предизвиква експресия на карбокси анхидраза IX (CAIX). Карбокси анхидразите (КА-и) са цинк-съдържащи металоензими, които принадлежат към физиологично важно семейство, състоящо се от над 13 различни анхидрази⁽³⁰⁹⁾. Те катализират обратимото хидратиране на въглеродния двуокис в реакцията $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ⁽³¹⁰⁾. КА-и се произвеждат в различни тъкани, където участват в няколко биологични процеса - оказват влияние на дихателните процеси, регулират киселинно-алкалния баланс и хомеостазата, костната резорбция, образуването на урея, глюконеогенезата, транспорта на CO₂ и йони, в няколко биосинтетични метаболитни пътища, и във формирането на гръбначно-мозъчната течност⁽³¹¹⁾. Вътреклетъчните КА-и улесняват неутрализирането на внесения в цитоплазмата бикарбонат и протони чрез генериране на CO₂. CO₂ свободно дифундира през клетъчната мембрана в екстрацелуларното пространство, където се свързва с извънклетъчни КА-и и се превръща обратно в бикарбонат и протон. Целият процес е еквивалент на този, в който участват протонните транспортери в клетките и допълнително допринася за ацидоза, която е отличителен белег на солидните тумори^(309, 312, 313).

CAIX е каталитично активната изоформа, локализирана в плазмената мембрана и съдържаща централен каталитичен СА домен, трансмембранен домен и къса -COOH терминална цитоплазматична опашка. Структурата, която прави CAIX различен от другите изоензими е протеогликан-подобният район в NH₂-терминалния край, който е в състояние да въздейства върху клетъчната адхезия⁽³¹⁰⁾.

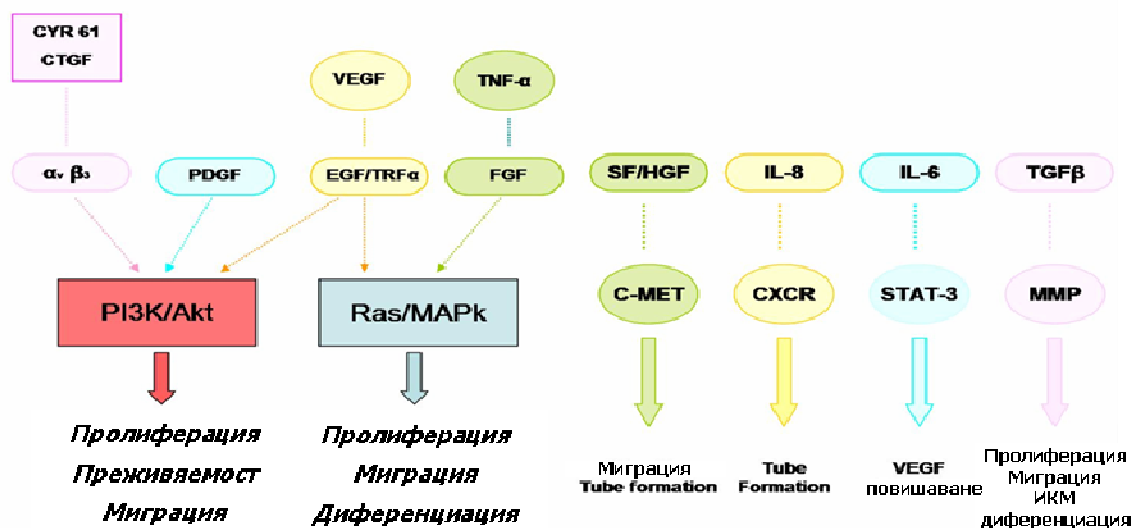
Високите експресионни нива на CAIX са наблюдавани при голям процент карциноми на шийката на матката и на бъбреците, и в по-малка степен, при други видове тумори, като карциноми на гърдата, главата и шията, белия дроб, колоректален карцином, тумори на мозъка и др. т.е, в тъкани, където експресията на CAIX обикновено липсва⁽³⁰⁹⁻³¹¹⁾. Свърхекспресията на CAIX се смята за потенциален независим предиктор на лоша преживяемост, специфичен при астроцитомите, карциноми на шийката на матката и др⁽³⁰⁹⁾. CAIX рядко се експресира постнатално в нормалните тъкани или само при високо специализирани клетки. Нормалната мозъчна тъкан показва слаба или липса на CAIX експресия, с изключение на епителните клетки на хороидалния плексус. За тъканите и клетките, нормално експресирани CAIX, като стомашно-чревния епител и този в жлъчния мехур, е установено, че губят експресията си по време на канцерогенеза⁽³¹¹⁾.

Експресията на CAIX бива предизвикана от хипоксия. Това транскрипционно активиране осъществено чрез HIF1 фактора, който се натрупва в тъканите в резултат на хипоксия, започва най-рано два часа след активирането на HIF1 и присъства в продължение на няколко дни, дори след като е потисната експресията на HIF1 (Фиг.1.14)^(311, 312, 314). Високата експресия на CAIX в тумори като астроцитомите и олигодендроглиомите, показва, че тези ензими участват в процес на

инвазия, която се улеснява от подкиселяване на извънклетъчното пространство и отслабване на междуклетъчната адхезия^(309, 315). Това го прави потенциален хистологичен и прогностичен биомаркер за някои тумори, включително дифузни астроцитомы⁽³¹⁰⁾. В тези тумори, хирургичното лечение често е невъзможно или неадекватно, и прогнозата на пациентите остава лоша⁽³⁰⁹⁾. Туморната хипоксия има връзка с резистентността към радио- и химиотерапия, и неприложимост на конвенционалната терапия⁽³⁰⁹⁾. Поради това CAIX се очертава като един от най-обещаващите ендогенните маркери за клетъчната хипоксия и очертава потенциална целева група за противораково лечение⁽³¹⁶⁾.

1.7.2.4.2. ТУМОРНА АНГИОГЕНЕЗА

Сърдечно-съдовата система, представлява най-голямата мрежа в тялото ни осигуряваща доставка на хранителни вещества, кислород и имунни клетки, както и отстраняване на отпадните метаболити. Образуването ѝ настъпва рано по време на ембрионалното развитие и е резултат от два строго регулирани процеса, а именно васкуло- и ангиогенеза. В зряла възраст, по-голямата част от съдове са в покой и физиологичната ангиогенеза се появява само, за да се поддържа хомеостазата, и целостта на тъканите по време на костния растеж, менструалния цикъл, бременност, възпаление, и зарастване на рани⁽³¹⁷⁾.



Фигура 1.15. Схематично изображение на медиаторите, участващи в глиалната ангиогенеза⁽³¹⁸⁾

Освен това ангиогенезата може да се наблюдава и при патологични състояния. Недостатъчният съдов растеж и анормална съдова регресия са в основата на много болести, като исхемия на мозъка и сърцето, невродегенеративни заболявания, хипертония и прееклампсия. От друга страна силно увеличената ангиогенеза се свързва с възникването на редица възпалителни и очни заболяване, водещи до слепота, затлъстяване и рак⁽³¹⁷⁾. Биологичните основи на съдова пролиферация в МГ са сложни, с участието на много ангиогенни растежни фактори и техните рецептори, особено при ГБМ.

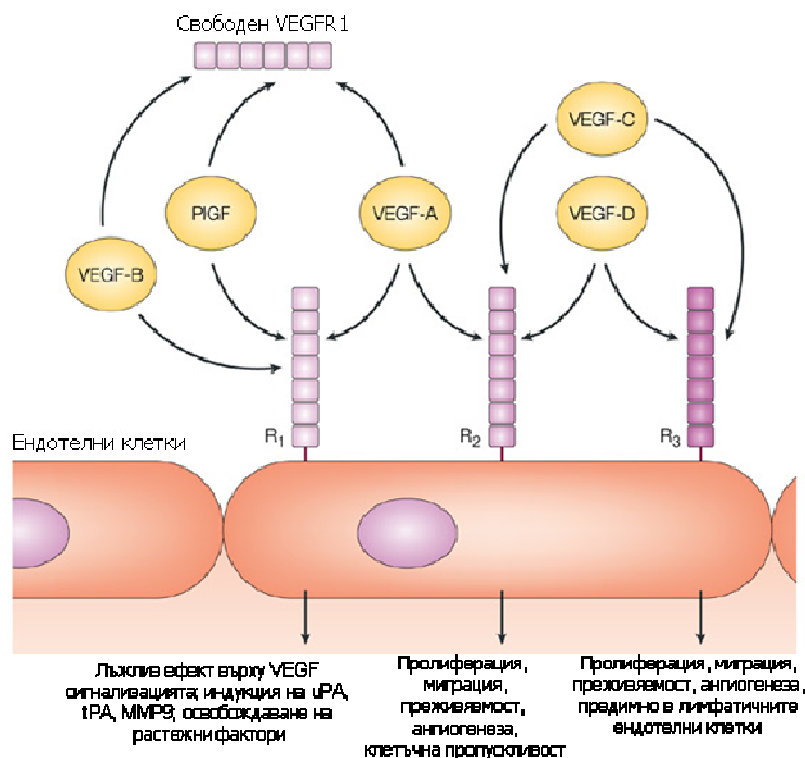
1.7.2.4.2.1. Съдовият ендотелен растежен фактор А (VEGF-A) и неговите рецептори

Съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) е много добре познат ангиогенетичен фактор и е известно, че играе централна роля в неоваскуларизация^(319, 320). VEGF е дифузен хомодимерен гликопротеин продуциран от нормални и неопластични клетки. VEGF семейството се състои от шест молекули: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, и плацентарен растежен фактор (placenta growth factor – PlGF)⁽³²¹⁾. VEGF-A е преобладаващия и най-критичен регулатор на развитието на съдовата система. Самият VEGF-A е протеин, който има редица функции, включващи медиация и промоция на ангиогенезата, повишаване на съдовия пермеабилитет, увеличаване растежа и миграцията на ендотелните клетки,

инхибиране на апоптозата. Установено, е че при туморогенезата процеса на ангиогенеза е силно асоцииран с растежа и метастатичния потенциал на туморите. VEGF-A е най-често изследвания ангиогенен фактор при повечето малигнени заболявания. Най-високите му експресионни нива се наблюдават при ГБМ⁽³²²⁻³²⁴⁾.

Дейността на членовете от VEGF семейството се осъществява чрез посредничеството на три тирозин-киназни рецептора: VEGFR1 (ген: *Flt-1*), VEGFR2 (ген: *KDR/Flk-1*) и VEGFR3^(321, 325, 326). VEGFR2 участва предимно в съдова пропускливост и VEGF-A-стимулираната митогенеза на ендотелните клетки, докато ролята на VEGFR1 е комплексна и зависи от условията на средата. PLGF и VEGF-B се свързват селективно с VEGFR1, докато VEGF-C и VEGF-D активират VEGFR2 и VEGFR3, като водят до стимулиране на ангио- и лимфогенезата^(321, 325, 327).

VEGF се експресира от туморни клетки, докато тирозин-киназните му рецептори, VEGFR рецептори 1 и 2, са експресирани на повърхността на ендотелните клетки, особено при ГБМ. Тези рецептори регулират, както физиологичната, така и патологичната ангиогенеза, като всеки от тях играе различни роли в този процес чрез различаващи се молекулни механизми^(292, 293). Афинитетът на VEGFR-1 към VEGF-A е много висок, но тирозин-киназната му активност е сравнително слаба, което води до слабо стимулиране пролиферацията на притежаващите го клетки. Друга важна особеност на *Flt-1* е, че кодира, освен иРНК на самия рецептор, така и на по-къс водно разтворим протеин, който притежава само екстрацелуларен домен. С негова помощ може да бъде инхибиран не само VEGF-A, но и други членове от VEGF семейството (Фиг.1.16).



Фигура 1.16. Роля на VEGF рецепторните тирозин-кинази в ендотелни клетки; Модифицирана от Ferrara⁽³²⁸⁾

По този начин VEGFR-1 има уникална характеристика едновременно, както на негативен регулатор чрез водно-разтворимия лиганд, така и на позитивен регулатор с тирозин-киназната си част. Каскадата протичаща вътре в клетката не е напълно изяснена поради по-слабата биологична активност на този рецептор в клетъчни култури. Изследвания върху миши модели водят до следната предполагаема последователност на метастатичния процес: първо се наблюдава VEGFR-1 киназно-зависима инфилтрация на макрофаги; второ се увеличава експресията на MMP-9 и накрая метастазите се загнезждат. Самите металопротеинази отдавна се свързват с процесите на метастазиране, но за тях започват да се появяват и данни за участието им в туморната ангиогенеза^(329, 330).

От друга страна VEGFR-2 е основния сигнален трансдуктор на ангиогенезата. VEGFR-2 позитивните ендотелни прекурсори са изключително важни за диференциацията им до зрели съдови ендотелни клетки. Постнатално VEGFR-2 се експресира основно върху съдовите ендотелни клетки, както и върху такива, които могат да бъдат прогениторни за ендотелните (329). Доказано е, че VEGF-A стимулира VEGFR-2 чрез обратна положителна връзка, като VEGFR2 се експресира 3.5-пъти повече в туморните съдове спрямо нормалните. От друга страна повечето туморни клетки не експресират VEGFR-2, с изключение на саркома на Капоши при пациенти със СПИН (329, 331, 332).

VEGF е основен регулатор на ангиогенезата, регулиращ от множество цитокини - включително TGF- β , EGF и PDGF, както и туморсупресорните гени VHL (von Hippel Landau) и p53. Двата тирозин-киназни рецептора VEGFR-1 и VEGFR-2 са способни, както да предизвикат съдов пермеабилитет, така могат да са отговорни за нарушаване на кръвно-мозъчната бариера и възникването на едема при ГБМ-ите. VEGF се секретира от туморни клетки и такива свързани с VEGF рецептори върху ендотелните клетки. VEGF е прицелна молекула разположена по-долу във веригата на множеството активирани сигнални пътища при ГБМ-ите, например EGFR и Akt. VEGF се регулира от туморните клетки намиращи се в пряка близост до регионите с некроза, вероятно в резултат на некроза-индуцирана хипоксия, тъй като хипоксията е процес водещ увеличаване производството на VEGF. Експресията на VEGF лигандите и рецепторите е увеличена при МГ (333, 334) и силно корелират с повишената микросъдова плътност, намаления апоптичен индекс, увеличената честота на метастазиране, с туморния стадий, намаляване на общата преживяемост и съответно с лоша прогноза (322-324).

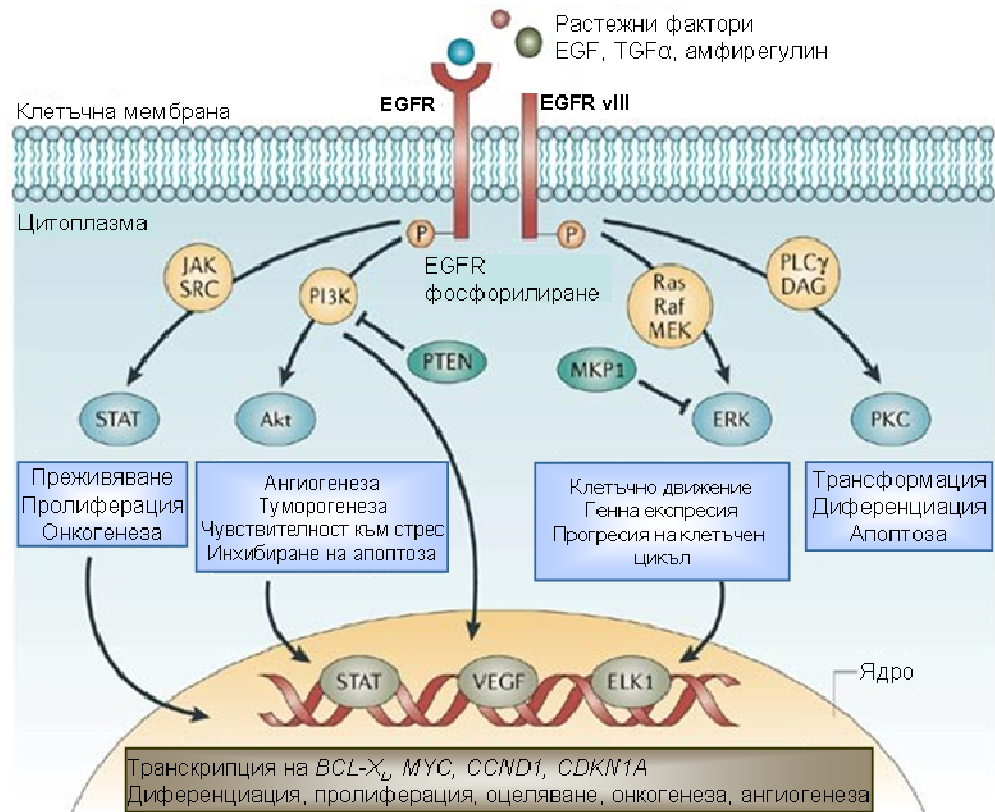
1.7.2.4.2.2. Рецептор на епидермалния растежен фактор (EGFR)

Генът *EGFR* е локализиран върху хромозомен район 7p12 и кодира епидермалния растежен фактор (Epidermal growth factor receptor - EGFR), който представлява 170 kDa трансмембранен тирозин-киназен рецепторен белтък. Принадлежи към ErbB/EGFR семейство, състоящо се от четири члена при бозайници (EGFR, известен също като ErbB1 или HER1; ErbB2, известен също като HER2/Neu; ErbB3, известен също като HER3 и ErbB4, известен също като HER4), които се счита, че са дивергирали от един общ предшественик (335, 336). Структурата на всеки от членовете включва: лиганд-свързващ ектодомен с два богати на цистеин области, един трансмембранен регион и цитоплазмен тирозин-киназен (ТК) домен (337). Тези четири рецептора използват 13 различни лиганда за правилното провеждане на извънклетъчни сигнали във вътреклетъчни (335). Най-често срещаните лиганди за HER рецептори са членове на епидермален растежен фактор (EGF, като хепарин свързващия EGF-подобен растежен фактор, амфирегулин, епирегулин, бетацелулин) и трансформиращи α растежен фактор (TGF α) (338). Членовете на ErbB/EGFR семейството контролира различни клетъчни процеси, включително клетъчния растеж, пролиферация, миграция, адхезия, диференциация и апоптоза (339).

Свързването на съответния лиганд към рецептора в лиганд-свързващото място предизвиква рецепторна хомо- или хетеродимеризация, при която се наблюдава конформационна промяна, активираща междуклетъчен ТК домен (340). Това води до автофосфорилиране на рецепторната цитоплазмена опашка и до формирането на активна фосфатидил инозитол 3-киназа (PI3K) в клетъчната мембрана. Тя фосфорилира фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата до фосфатидил-инозитол трифосфат (PIP3), който инициира сигнално-трансдукционна каскада, и активира транскрипцията на гени, водещи до клетъчна пролиферация и повишена клетъчна преживяемост чрез блокиране на апоптозата. От друга страна PTEN потиска активността на PIP3 сигнал, като по този начин инхибира клетъчната пролиферация (336).

Ролята на EGFR (див тип) рецепторната свръхекспресия в злокачествената прогресия на глиалните тумори е широко разискван в литературата. Високата експресия на *EGFR* може да предизвика аномална пролиферация на клетките и съответно неопластичен фенотип. Наблюдава се в много видове рак, като карцином на белия дроб (341), рак на гърдата (342), на глава и шията (343), както и в глиоми (344). Неговото стимулиране може да бъде в резултат, както на генна амплификация и/или на повишена транслация, така и на лиганд-независима активация

индуцираща фосфорилирането на протеина^(345, 346). Приблизително една трета от ГБМ с EGFR генна амплификация притежават и специфичната EGFR делеция наречена вариант III (EGFRvIII), която включва вътрегенна загуба на екзони от 2 до 7 (кодон 6-273), водеща до получаването на скъсен белтъчен продукт с 267 аминокиселини и до загубата на извънклетъчния лиганд-свързващ участък^(347, 348). Това води до невъзможността за свързването му със специфичните за него лиганди, а то от своя страна до неговата конститутивна активност (Фиг.1.17)⁽³⁴⁹⁾.



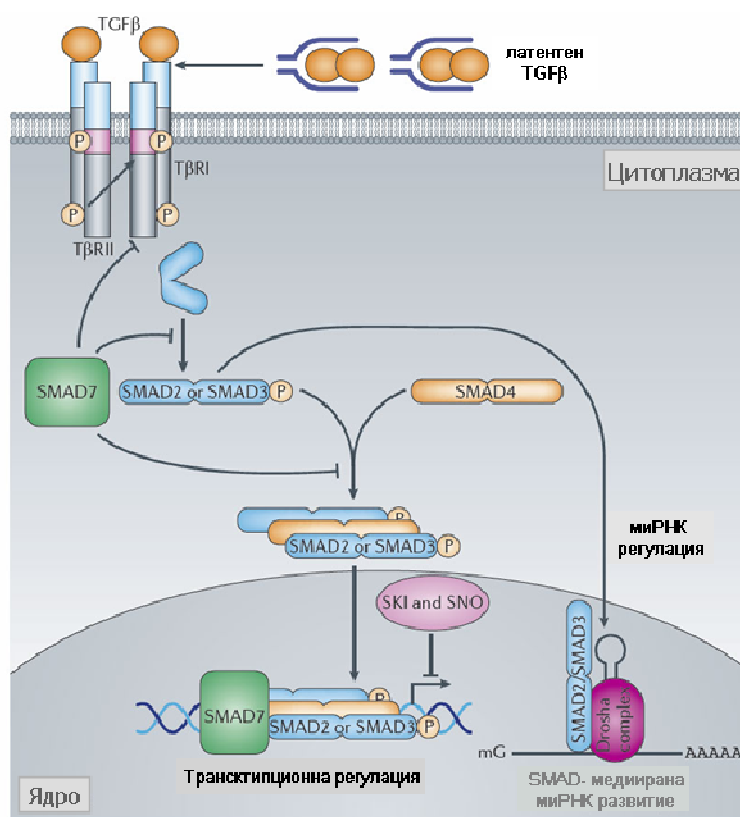
Фигура 1.17. Механизъм на действие на активирания EGFR и конститутивно активирания EGFR вариант III; Модифицирана от Nyati⁽³⁵⁰⁾

EGFR е най-често амплифицирания онкоген в астроцитните тумори, наблюдаван е при 50-60% от пациентите с МГ⁽³⁵¹⁾. ГБМ с EGFR генна амплификация показват свръхекспресия, както на ниво иРНК, така и на ниво белтък, което предполага, че активирането на този сигнален път е неразделна част от злокачествената прогресия. При глиомите, фокалното амплифициране на EGFR се наблюдава в изключително висока степен (над 20 копия)⁽¹⁷¹⁾. Активирането на EGFR води до активиране на прицелните за EGFR молекули по протежението на сигналния път в ГБМ, включително и пътя Shc-Grb2-Ras, който улеснява митогенезата, намалява апоптозата, и регулира ангиогенезата. Въпреки това, Watanabe и сътр отбелязват, че EGFR свръхекспресията се наблюдава при 63% от първичните ГБМ, само в 10% от вторичните и едва в няколко анапластични астроцитомите^(157, 352). Предполага се, че степента на малигненост при астроцитомите е в положителна корелация с концентрацията на протеина EGFR и с EGFR генната амплификация⁽³⁵³⁾. Интересно е, че в първични ГБМ увеличената експресия на гена EGFR често е съпроводена и с увеличено количеството на лигандите, свързващи се специфично с него. Това предполага наличието на автокринна обратна връзка, отговорна и за неподвластността на EGFR сигнализация на външна регулация⁽¹²¹⁾.

Някои автори установяват, че свръхекспресията на дивия тип EGFR е независим прогностичен показател за преживяемостта⁽³⁵⁴⁻³⁵⁶⁾, докато други показват липсата на такава⁽³⁵⁷⁾. Четири проучвания идентифицират увеличената експресия на гена EGFR като лош предсказващ преживяемостта фактор⁽³⁵⁸⁻³⁶⁰⁾, като едно от тях показва ефекта само при пациенти развили болестта под 45 годишна възраст⁽³⁶¹⁾.

1.7.2.4.2.3. Трансформация растежен фактор- β (TGF- β)

Трансформацият растежен фактор- β (Transforming growth factor- β -TGF- β) и сигналните му пътища участват в растежа на клетките, ембриогенезата, диференциацията, морфогенезата, формирането на екстрацелуларния матрикс, заздравяването на раните, имунния отговор и апоптозата в голямо разнообразие от клетки, включително епителни клетки. Рецептори за TGF- β (TBRs) се експресират в почти всички клетки на бозайници, включително раковите клетки. TBR I и -II са серин-треонин протеин кинази, фосфорилиращи Smad транскрипционните фактори и образуващи комплекси с тях ⁽³⁶²⁾. Единствената известна функция за рецептор тип II е да активира рецептори тип I. Smad2 и Smad3 се свързват с активираните TBR I рецептори, където се фосфорилират и активират от TBR I киназа. След активирането, двете молекули Smad формират хетеродимерен комплекс наречен Smad4, който се насочва към ядрото, за да участва в трансактивирането на специфични таргетни гени (Фиг.1.18) ^(363, 364).



Nature Reviews | Drug Discovery

Фигура 1.18. Схематично представяне на SMAD-зависимия TGF- β сигналния път; Модифицирана от Akhurst ⁽³⁶⁵⁾

TGF- β играе роля в потискане на пролиферацията в епителните клетки, астроцити и имунни клетки, чрез два механизма: потискане експресията на циклин-зависими кинази (cdks) и негативна регулация на cdk активността чрез въвеждане на cdk-инхибитори, p15, p27 и Cip/WAF1/p21 ⁽³⁶⁶⁾. Той се счита за туморсупресорен фактор. От друга страна, някои злокачествени тумори, включително глиоми, селективно губят възможността TGF- β да инхибира пролиферацията и по този начин избягват TGF- β цитостатичния отговор. В тези случаи, TGF- β действа като онкогенен фактор при тумори в напреднал стадий (включително и при глиоми) и може да предизвика инвазия, ангиогенеза, метастазиране, и потискане на антитуморния имуен отговор ⁽³⁶⁷⁾. По този начин, TGF- β има двойна роля в онкогенезата, и в зависимост от вида и стадия на тумора, той може да действа като туморсупресор или като тумор-иницииращ фактор ^(364, 368).

Проучванията през последните десет години са установили, че членове на TGF- β

суперсемейството играят критична роля в морфогенезата и спецификацията на клетъчните линии по време на мозъчното развитие ⁽³⁶⁹⁾. При глиомите, повишените нива на TGF- β 2 в тумори и в плазмата на пациентите са свързани с напреднал етап на заболяване и лоша прогноза ⁽³⁷⁰⁾. TGF- β функционира като туморсупресор в ранните етапи от развитието на тумори и като туморен инициатор в по-късните етапи на туморогенезата. Висока TGF- β -Smad активност се наблюдава при по-агресивни, високо пролиферативни глиомы и при пациенти с такива тумори води до лоша прогноза ⁽³⁶⁷⁾.

TGF- β е секреторен протеин, който съществува в най-малко три изоформи, наречени TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3. TGF- β 2 изоформата е идентифицирана като ключов фактор в прогресията на злокачествени глиомы. TGF- β 2 се свързва с имуносупресорното състояние на пациенти с ГБМ, и следователно е отговорен за загубата на туморната чувствителност към имунния отговор ⁽³⁶⁹⁾. Kjellman и сътр. предполага, че TGF- β 2 има специално значение в по-късните стадии на злокачествени заболявания, докато TGF- β 1 и TGF- β 3 са важни по време на ранните етапи на развитието на тумора. Два допълнителни патомеханизми, в които експресията на TGF- β 2 играе роля в тумора и които се свързват с лоша клинична прогноза, са индуцирането на промени в екстрацелуларния матрикс и подпомагането на инвазивния растеж и проникване извън засегнатата тъкан, включващо неоваскуларизация ⁽³⁷¹⁾. Познаването на тези патомеханизми на прогресия при злокачествените глиомы дава възможност за развиване на терапевтични стратегии, които да противодействат на TGF- β 2 активността ⁽³⁷²⁾. TGF- β 2 е най-мощният известен имуносупресор. Лошата прогноза на злокачествено заболяване в ЦНС се дължи и на липсата на мощни агенти, с адекватна туморна специфика. Прицелната терапия, насочена към специфичните клетъчни рецептори дава възможността за създаване на нови терапевтични агенти с по-голяма туморна специфичност в сравнение с конвенционалната химиотерапия.

1.7.2.4.4. ТУМОРНА ПРОГРЕСИЯ

Според редица автори появата и прогресията на мозъчните тумори е в резултат появата на ракови стволови клетки, които имат способността да се самообновяват неограничено и са отговорни за стартирането, развитието и за рецидива на тумора ⁽³⁷³⁾. Туморните стволови клетки имат по-бавен темп на делене, което може да ги направи по-устойчиви на лечение и по-късно отново да доведе до генериране на туморни образувания ⁽³⁷⁴⁾. Това води до необходимостта за изследването на нови маркери характерни за тези клетки и използване им за по-ефективно лечение, и като прогностични маркери.

1.7.2.4.3.1. SOX (SRY-type HMG box) суперсемейството

Интересни кандидат-маркери с прогностична стойност са белтъци от SOX суперсемейството. SOX (SRY-type HMG box) суперсемейството се състои от транскрипционни фактори, които съдържат HMG (high-mobility group) домен и имат важна роля в процесите свързани с растежа ⁽³⁷⁵⁾. HMG доменът се състои от 79 аминокиселини и съдържа ДНК-свързващ мотив, който взаимодейства с малката извивка на ДНК спиралата и това води до значително прегъване на ДНК веригата. Освен HMG домена, SOX белтъците съдържат и други домени, които играят роля в транскрипционната регулация, осъществявайки я чрез сложни взаимодействия с различни специфични фактори ⁽³⁷⁶⁾. При бозайниците са открити 20 различни SOX гена, които са разделени в десет подгрупи (от А до J) ⁽³⁷⁷⁾, показвайки както разлики в експресията в различните системи, така и в различните етапи на развитие на ЦНС, включващо ембрионалното и това в зряла възраст. Освен това SOX белтъците участват в различни клетъчни процеси, като клетъчната пролиферация, оцеляване и диференциацията на различни видове тъкани и клетки включително, и стволовите ⁽³⁷⁷⁾. Те са ангажирани в различни видове заболявания едно, от които е рака. SOX гените са идентифицирани в различни видове мозъчни тумори и се предполага, че могат да се използват като маркери имащи прогностична стойност.

Белтъците от SOXB групата (SOX1-3, SOX14 и SOX21) се експресират сравнително рано в новоразвиващия се мозък в различна степен и по-различно време от развитието. Един от първите SOX протеини, който се експресира по време на ембриогенезата е SOX2. SOX2 е

важен ген в ранните етапи на ембрионалното развитие на нервната система и увреждане му води до ембрионална смърт почти веднага след имплантирането⁽³⁷⁸⁾. Последните литературни данни разкриват, че клетките отговорни за инициране на мозъчната туморогенеза са слабо диференцирани, което допълнително прави SOX2 интересен обект на изследвания⁽³⁷⁹⁾. При възрастни индивиди, SOX2 се открива главно в невронните стволови клетки и в недиференцирани прекурсори⁽³⁷⁵⁾, въпреки че рядко може да се открие и в някои диференцирани неврони⁽³⁸⁰⁾. Има данни, че SOX2 се открива във всички видове глиоми - от I до IV стадий, в епендимомите, в различни видове мозъчни тумори при деца⁽³⁸¹⁻³⁸³⁾. Тези данни определят функцията на SOX2, като важна за самовъзпроизвеждането и клетъчна пролиферация, както на невронни стволови клетки, така и на раковите стволови клетки.⁽³⁸⁴⁾ Има няколко изследвания, в които вследствие инхибиране на експресията на SOX2 при глиоми⁽³⁸⁵⁾ от различни агенти, като например специфични инхибитори за GSK3 β , се потиска туморогенезата.

SOX5 и SOX6, принадлежащи към SOXD група, също се експресират в активно развиващата се ЦНС и се откриват главно при олигодендроцитни прекурсори, олигодендроцити и неврони⁽³⁸⁶⁾. Stolt и сътр показват, че SOX5 и SOX6 участват в регулирането на олигодендроцитната диференциация, а когато започне процеса на терминална диференциация SOX5 и SOX6 биват експресионно потиснати. Освен при глиома експресията на SOX6 е установена и при медулобластома и невроцитомата⁽³⁸⁷⁾. Нивата на SOX6 иРНК в различни видове глиоми са различни. Публикувано е, че SOX6 има по-високи експресионни нива на иРНК при олигодендроглиоми в сравнение с астроцитомите. В ГБМ експресионните нива са понижени в сравнение с мозъка на нормален възрастен индивид и астроцитомите C3O II и III стадии, където нивата са леко повишени или понижени⁽³⁸⁷⁾. Загубата на експресия на SOX6 показва значима връзка с лошата прогноза при пациенти с плоскоклетъчни карциноми на хранопровода. SOX6 белтък предизвиква арест на клетката във фаза G1/M на клетъчния цикъл чрез активиране на p53 и p21WAF1/CIP1 в комбинация с инхибирането на циклин D1/CDK4, циклин A, и b-катенин действайки по туморсупресорен механизъм⁽³⁸⁸⁾. Тези констатации показват, че SOX6 може да се използва като прогностичен маркер и потенциална терапевтична цел.

Сравнително малко се знае за ролята на SOX8 в мозъчната туморогенеза. Експресията на SOX8 е значително повишена при повечето от олигодендроглиалните тумори. Астроцитомите с нисък стадии на развитие, също показват повишени транскрипционни нивата на SOX8. Експресията му е увеличена при астроцитомите с ниска степен на развитие, докато при астроцитомите степен III е по-хетерогенна, а при ГБМ е по-ниска, отколкото в нормалния мозък⁽³⁸⁷⁾. Освен това SOX8 се експресира и при медулобластоми. По-често SOX8 се наблюдава в по-слабо диференцирани клетки, което обяснява и нормалната му експресия в микроглията, както и при олигодендроцитните предшественици⁽³⁸⁹⁾. Експресионните нива на SOX8 е значително по-високо при олигодендроглиомите, тумори с 1p/19q коделеции и тумори с мутации в IDH1 гена. Като цяло, експресионния модел на SOX гените в глиоми е хетерогенен и съвместим с по-слабо диференцирани глиомни клетки, в сравнение с нормалните такива. При олигодендроглиомите преживяемостта на пациенти, показващи високи SOX8 нива на експресия е значително по-добра, отколкото при тези с ниски нива.

SOX9 се открива, както при педиатричните мозъчни тумори, така и в мозъчни тумори при възрастни. При педиатрични епендимомите SOX9 е свръхекспресиран. При медулобластомите някои автори откриват понижена експресия на SOX9 гена, докато други - повишена. Нивото на SOX9 иРНК в олигодендроглиалните тумори е по-ниско в сравнение с тези в мозъка на възрастни индивиди и при астроцитомите⁽³⁸⁷⁾. Интересно е да се отбележи, че намалената експресия на SOX9, последвано от дефосфорилиране на Akt предполага наличие на връзка помежду им⁽³⁹⁰⁾, а Akt сигналния път често бива засегнат при мозъчните тумори⁽³⁴⁾. Генът SOX9 се експресира в аномално количество и при рак на простатата, като понижената му експресия води до потискането растежа на клетките, а свръхекспресията на SOX9 усилва клетъчната пролиферация и инвазия^(391, 392). В допълнение, високите иРНК нива на SOX9 се наблюдават значително по-често при глиоми в напреднал стадий на развитие, отколкото при тези в начален. Освен това повишената експресия на SOX9 гена значително корелира с ниски стойности на KPS. Общата преживяемост при пациенти с високи експресионни стойности на

SOX9 е по-ниска от тази при пациентите с понижена експресия на *SOX9*. Публикувани са данни, че експресията на *SOX9* е независим прогностичен фактор за пациенти с глиоми. Има данни, че иницирането на понижена експресия на *SOX9* би могло да инхибира растежа на клетките, предизвиквайки арест на клетката във фаза G2/M на клетъчния цикъл и инициране на апоптозата в туморните клетки. Показано е, че експресията на *SOX9* е тясно свързана с лоша клинична прогноза на пациенти със злокачествени глиоми ⁽³⁹³⁾.

1.7.2.4.3.2. Матрикс металопротеиназа 9 (ММР-9)

Матрикс металопротеиназите (ММР-и) са голямо семейството от 25 цинк-зависими ендопептидази. Тяхната структура обикновено се състои от три пептидни домена: пропептиден, цинк-съдържащ каталитичен (изключение правят ММР-7 и ММР-26) и С-терминален хемопексин-подобен, които определят тяхната субстратна специфичност ⁽³⁹⁴⁾. Установено е, че ММР-и функционират като разграждат структурни компоненти на извънклетъчния матрикс (ИКМ), но притежават и други разнообразните биологични свойства, които са далеч отвъд обикновената деградация на ИКМ ^(395, 396). Те разграждат голям брой различни субстрати, включително други ММР-и, цитокини, фактори на растежа (напр. TGF), рецептори и други не-ИКМ белтъци ^(396, 397), и според тяхната склонност към разграждане на различни субстрати се делят на пет групи (матрилизин, колагеназа, желатинази, стромелизин и мембранни ММР (MT-MMPs), независимо от наличието на функционално припокриване ⁽³⁹⁴⁾.

ММР-2 (желатиназа А, 72 kDa) и ММР-9 (желатиназа В, 92 kDa) са членовете изграждащи групата на желатиназите. Притежават три повтора с фибронектинов тип II мотив в каталитичния си домен, благодарение на които се осъществява взаимодействието с колагена и желатина. Двата ензима участват не само в механичното отстраняване на структурните протеини в извънклетъчния матрикс, но също така са в състояние да регулират множество клетъчни процеси, включително клетъчния растеж, апоптоза, ангиогенеза, метастазната инвазия и имунния отговор, чрез сегментиране на прекурсорите на растежни фактори, клетъчно-адхезионните молекули, клетъчно-повърхностни рецептори и други биоактивни белтъци ⁽³⁹⁸⁾. ММР-2 и ММР-9 са ензими показващи сходство в много отношения, но и различаващи се в експресионната си регулация, гликозилиране, про-ензимната и субстратна активация ⁽³⁹⁹⁾.

Желатиназите играят роля в широк спектър от физиологични и патологични състояния, включително при растежа на туморните клетки, миграцията, инвазията им и в активирането на каскади на сигналната трансдукция, подпомагащи тумор-клетъчната пролиферация, преживяемостта и ангиогенезата в туморите и най-вероятно са необходими за отключването ѝ по време на туморната неоваскуларизация ⁽⁴⁰⁰⁾. Те са важни за създаване на среда подходяща за образуване и поддържане растежа на първичните и метастатичните тумори и най-често са свързани със злокачествения фенотип на туморните клетки ^(398, 401-403). Инвазивността на неопластичните клетки при глиома е свързана с експресията на ММР-9 ⁽⁴⁰⁴⁾. Промяна в ММР-9 експресията е наблюдавана при 64% от случаите на ГБМ като повишената експресия на този протеин корелира значително с хистологично по-високия стадий на злокачественост ⁽⁴⁰⁰⁾. Свърхекспресията на ММР-9 е негативен независим прогностичен фактор, свързан с по-висок риск от рецидив при тотална глиална резекция ^(397, 405). Инхибирането на тези протеинази драстично намалява инвазивността на глиомните клетки *in vitro* и *in vivo*. ММР инхибиторите са потенциални кандидати за блокиране на глиомната миграция и инвазия. Ефикасността на ММР инхибиторите, например marimastat, в комбинация с алкилиращ агент TMZ е тествана в клинично изпитване (фаза II) при пациенти с рецидивиращ ГБМ, като е показало свободна от прогресия преживяемост, превишаваща литературните данни с 6 месеца ⁽³⁹⁷⁾.

1.8. ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИТЕ ДАННИ

Първичните мозъчни тумори са пример за новообразувания със средна честота, но висока смъртност. Всяка година при около 3.9/100 000 мъже и 3.0/100 000 жени в света се открива мозъчен тумор (GLOBOCAN 2012). Много от тях умират в рамките на 12 месеца. Според „Годишник на заболяемостта от злокачествени новообразувания в България за 2011г.“, честотата и смъртността от първични мозъчни тумори в България за 2011г. са били съответно 8.9 и 9.4 на 100 000 души.

Лечението на глиомите включва хирургическа резекция на тумора, последвана от лъче- и химиотерапия. Операцията подобрява състоянието на болния, особено по отношение на главоболието и припадъците, а лъче- и химиотерапията упражняват контрол върху туморния растеж при повечето пациенти. Някои проучвания установяват позитивна корелация между степента на туморна резекция и продължителността на живот на пациентите с малигнени глиомы. Според други автори, ранната възраст на развитие на глиома и добрият KPS (Karnofsky Performance Scale) резултат благоприятстват изхода от това заболяване. Въпреки усилията на учените в тази област, прогнозата за пациентите с глиом остава лоша със средна преживяемост от 40 седмици за глиобластом (ГБМ) и 120 седмици за АА и значително влошаване качеството на живот (КЖ).

В последните години интересът към геномните характеристики на глиалните тумори е голям. За установяване на молекулните основи на глиомите са използвани данни за мутациите в ДНК, вариациите в броя на ДНК копията (CNVs), хромозомните пренареждания, метилиране на ДНК и генната експресия при ГБМ. Този подход доведе до установяване на гени, които доскоро не са били асоциирани с ГБМ, напр. *IDH1*. Три основни сигнални пътя са засегнати при ГБМ: 1) EGFR/ PTEN/ PIK3CA път; 2) RB1/ CDK4 път; и 3) P53 път. Седемдесет и четири процента от ГБМ имат увреждания и в трите сигнални пътя. Освен това, TCGA потвърждава по-ранните данни за връзка между метилирането на *MGMT* промотора и отговора към терапията с Темозоломид, като установява, че резистентността към терапията е свързана със статуса на mis-match поправящата система. Shirahata и сътр (2009) предлагат експресията на 58 гена като прогностичен маркер. Изследванията върху олигодендроглиомы установяват връзка между делецията на хромозома 1p и 19q и благоприятния изход. По-дълга преживяемост е наблюдавана и при ГБМ с делеция на 1p и 19q. Често срещана особеност на олигодендроглиомите с дълга преживяемост са делециите на хромозоми 1p и 19q. Едновременната загуба на 1p и 19q се асоциират с добра прогноза не само при олигодендроглиомите, но и при астроцитомите, въпреки че при тях това увреждане е по-рядко. Според McLendon и сътр, туморите с делеция на целите хромозомни рамена 1p и 19q се характеризират с по-добра прогноза от тези с частична загуба или без загуба на хромозомен материал.

Високата смъртност предопределя социалната значимост на МГ. Затова, дори и най-малкият напредък в областта на диагностика, лечение или прогноза имат значима стойност.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Изследване на молекулните основи на малигнените глиални тумори и анализ на кандидат-биомаркери с прогностична и предиктивна стойност.

2.3. ЗАДАЧИ

2.3.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

2.3.1.1. СЪЗДАВАНЕ НА ГЛИОМНА БИОБАНКА

2.3.1.2. СЕКВЕНЦИОНЕН АНАЛИЗ НА *IDH1*, *IDH2* И *TP53* ГЕНИТЕ

- Оптимизиране на условията и изследване за мутации в *IDH1* и *IDH2*;
- Оптимизиране на условията и секвенционен анализ в кодиращата област на гена *TP53*;
- Определяне на честотата на носителство;
- Статистическа обработка на резултатите. Търсене на връзка между носителския статус и клиничните, хистологични и биологични характеристики на туморите.

2.3.2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЗАГУБАТА НА ГЕНЕТИЧЕН МАТЕРИАЛ В ХРОМОЗОМИ 1 И 19

- Оптимизиране на условията за MLPA анализ и изследване на всички случаи с глиални тумори;
- Анализ на корелациите между наличието на делеции в 1p и/или 19q хромозомни рамена с клинични, хистологични, генетични и биологични характеристики на туморите.

2.3.3. АНАЛИЗ ЗА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА *MGMT* ГЕНА

- Оптимизиране на условията и изследване за промоторно хиперметиране на *MGMT* гена с анализ чрез топене с висока резолюция на ДНК (HRMA);
- Оптимизиране на условията и потвърждение на резултатите чрез метода на Бисулфитно секвениране;
- Анализ на корелациите между промоторно хиперметиране на *MGMT* гена и клинични, хистологични и биологични характеристики на туморите.

2.3.4. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ

- Анализ на панел от 5 микросателитни маркера в здрава и туморна тъкан и определяне на MSH статуса на пациентите;
- Анализ на корелациите между микросателитната нестабилност и клинични, хистологични и биологични характеристики на туморите.

2.3.5. ГЕНО-ЕКСПРЕСИОННИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ПОДБРАНИ КАНДИДАТ-ГЕНИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

- Подбор на група от пациенти и гени за анализ;
- Оптимизиране на условията и изследване генната експресия на избраните гени;
- Статистическа обработка на резултатите. Търсене на връзка между генната експресия и клинични, хистологични и биологични характеристики.

2.3.6. ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ В ТЪРСЕНЕ НА НОВИ БИОМАРКЕРИ

- Подбор на група от пациенти;
- Изследване на геномни аберации при тумори чрез сравнителна геномна хибридизация и анализ на получените резултати за наличието на делеции/амплификации.
- Клъстерен анализ на получените данни за молекулно профилиране на изследваните тумори.
- Анализ на геномните аберации, специфични за подгрупи от тумори според генетичните им характеристики, *IDH1/IDH2* мутации и връзка с общата им преживяемост

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Пациентите са насочени от Клиника по Неврохирургия на УМБАЛСМ "Н.И.Пирогов". В настоящото изследване бяха включени 199 пациента, от които 92 жени и 107 мъже, с клинично и хистологично доказана диагноза (астроцитом, олигодендроглиом, олигоастроцитом II и III клас и пациенти с първични или вторични глиобластоми).

Таблица 3.1. Клинични показатели на изследваните пациенти/тумори

Параметър		Брой (N)
Пол	Мъже	107
	Жени	92
Възраст (средна), години		11-85 (53)
Вид на операцията	Тотална резекция	93
	Субтотална резекция	85
	Частична резекция	19
	Биопсия	2
Тип тумор	Астроцитом	187
	Олигоастроцитом	6
	Олигодендроглиом	11
Локализация на тумора	Лява	83
	Дясна	104
	Билатерална	11
Степен на тумора	IV (вторични)	153 (23)
	III	38
	II	18
	I	3
KPS (средно)		20-90 (80)
Преживяемост (средна), месеци		0.1-269.73 (23.06)

Към настоящия момент в ЦММ е изградена глиална туморна биобанка, състояща се от туморна и нормална тъкан – съдържаща 212 броя туморни и 8 проби от нормална тъкан от общо 199 пациента.

3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

Различни неврохирургични техники бяха приложени, за да се осигурят стандартизирани условия за максимално отстраняване на тумора с минимален риск за пациента и същевременно, високо качество на туморните проби. Туморната тъкан, отстранена по време на операцията им, беше замразена на -80°C и съхранявана в това състояние. Високото качество на пробите предопредели прецизността на резултатите и даде възможност проучвания на ДНК и РНК ниво.

За провеждане на генетичния анализ беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки, свеж оперативен материал (проби) или парафинови блокчета (проби) от мозъчна тъкан. Кръвта се взима 30 мин. до 1 час след хранене, с цел увеличаване на броя на левкоцитите в кръвта, в пластмасова епруветка с K_3EDTA (етилен диамин тетраацетат) или хирудин ($25 \mu\text{g/ml}$) като антикоагулант. Съхранява се при $+4^{\circ}\text{C}$ в продължение на максимум 48 часа. Ако не може да бъде обработена в този период от време, се замразява при -20°C .

С цел дълготрайно съхранение, по-голямата част от изолираната ДНК беше замразена и се съхранява в създадената по време на проекта глиомна ДНК банка в Центъра по Молекулна

Медицина на -80°C . Останалата част от материала използвахме за генетичен анализ. Свежият оперативен материал се съхранява при -80°C , а парафиновите блокчета при стайна температура.

Към настоящия момент глиалната биобанка в ЦММ съдържа следните биологични проби:

- ДНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 212 броя проби;
- бисулфитно-модифицирана ДНК биобанка от болни с глиални тумори - съдържаща 212 броя проби
- РНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 70 броя проби;
- κДНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 70 броя проби;

3.3. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ

3.3.1. ЛАЗЕРНА МИКРОДИСЕКЦИЯ НА РАКОВИ И НОРМАЛНИ КЛЕТКИ

Установяването на високо-специфични маркери за туморното поведение изисква сравняване на ракова проба с нормална. Туморните тъкани, обаче, съдържат освен раковите, нормални и стромални клетки, което затруднява анализа. Публикациите от последните години, изучаващи туморните биомаркери, се фокусират върху вариациите в броя на ДНК копията ^(120, 406), но в проучванията си техните автори използват ДНК, изолирана от туморна тъкан с поне 70% ракови клетки, т.е. замърсени с нормални клетки. В резултат на това и данните за геномни нарушения са неточни. За да се преодолее този недостатък на изследванията, трябва да се отделят само ракови клетки от туморните тъкани и да се изолира ДНК от тях. Това може да стане чрез лазерна микродисекция на туморни клетки.

Използвана апаратура:

- Хладилна центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf);
- Системата за лазерна микродисекция PALM MicroBeam System, Carl Zeiss (Germany).

Принцип:

За целите на настоящия проект беше използвана системата за лазерна микродисекция PALM MicroBeam System, Carl Zeiss (Germany). Тя се използва за ултра чисто изолиране на проби и се характеризира със заснемане с висока резолюция, базирана на микроскоп с високо качествена оптична система, лазер за безконтактно и защитено от контаминация вземане на проби, дигитална камера за заснемане на флуоресцентни и светлинно-микроскопски изображения, набор от филтри за работа с флуоресценция и динамичен фокус, позволяваща оптимално протичане на работния процес, като позволява лесно интегриране на отделните стъпки при единичен експеримент и в режим на автоматизация; множество разнообразни приложения – изолиране на клетки от архивни материали и живи култури, за изолиране и изследване на ДНК, РНК и протеини.

Всички отделени след операция мозъчни тумори, които бяха замразени на -80°C до 15 мин. след екстракцията им в туморната биобанка на Клиниката по Неврохирургия, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов” и определени като подходящи за настоящето изследване в Отделението по патоморфология на УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, бяха хистологично определени и изследвани за наличие на нормална мозъчна тъкан. От тъканите, при които бяха намерени нормални мозъчни клетки в общата туморна маса, бяха изготвени нетрайни хистологични препарати, оцветени по стандартния метод с хематоксилин и еозин. С помощта на системата за лазерната микродисекция от тези препарати бяха отделени нормалните от туморните клетки. Лазерен лъч изрязва маркираната област от нормалните клетки, след което я катапултира в епруветка. Вземането на пробите се осъществява по начин, който не позволява контакт между предметното стъкло и колекторния съд, което предотвратява контаминация. Чрез лазерна микродисекция бяха отделени туморни и нормални проби, които да бъдат използвани за различни последващи анализи.

3.3.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК

3.3.2.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ЧРЕЗ ПОЛУАВТОМАТИЗИРАНА СИСТЕМА CHEMAGIC MAGNETIC SEPARATION MODULE I (CHEMAGEN)

Основни компоненти на системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)- (*Фиг.3.1*) са подвижен модул и магнитна глава. Върху подвижния модул се поставят: контейнер с чисти накрайници, епруветки с проби и епруветки с поредица от буфери. Магнитната глава носи метални пръчици (родове), които имат способността да се намагнитизират. За изолиране на ДНК се използва специален набор от реактиви, който включва различни буфери, както и магнитни частици (M-PVA Magnetic Beads).

Използвани реактиви: Таблица 3.2.

Етап	Компоненти	Количество за 1 реакция (ml)
1	венозна кръв	6-8
	Лизиращ буфер	7-9
	Протеаза	25-50 μ l
2	Свързващ магнитни частици буфер	25
	Магнитни частици	800 μ l
Промиване	Миеш буфер 3	15
	Миеш буфер 4	15
	Миеш буфер 5	15
	Миеш буфер 6	22.5
Елуиране	Елуиращ буфер - съдържа 10 mM Трис – HCl pH=8.0 TE буфер pH=8.0	500 – 1000 μ l

Използвана апаратура:

- Хладилна центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex - Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell).
- Системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)

Принцип:

Отделянето на ДНК молекулите от останалите клетъчни компоненти става с помощта на магнитни частици. Магнитните частици се свързват с ДНК молекулите в пробата. При включване на електромагнита на апарата, родовете се намагнитизират и привличат магнитните частици от разтвора. Всеки от тях е снабден с пластмасов накрайник за еднократна употреба и магнитните частици (заедно с ДНК молекулите) полепват по външната им страна. Принципът на действие на магнитните частици е следният: магнитните частици съдържат матрица от поливинилов алкохол, който впоследствие се карбоксилира, за да може лесно да свързва белтъци, нуклеинови киселини и други аминокиселини-лиганди. Магнитните частици с –COOH групи могат да се свързват с полимерни или неполимерни молекули, които съдържат аминокиселини-групи. Първото задължително условие е активирането на –COOH матрицата. За тази активация рН на средата трябва да бъде между 4.7 и 6. Среда с рН>7.5 е необходимо да се избягва.

Намагнитизираните родове прехвърлят магнитните частици (и свързаните с тях ДНК молекули) през различни промиващи буфери. При потапяне в определен буфер, електромагнитът се изключва, при което магнитните частици се отделят от накрайниците. След това се включва електромоторът, родовете започват да се въртят и по този начин магнитните частици (заедно с ДНК) се диспергират в целия обем на разтвора. След това електромоторът се изключва, а електромагнитът се включва и магнитните частици (заедно с ДНК) отново полепват по външната страна на накрайника (*Фиг.3.1*). По този начин свързаната с магнитните частици ДНК се промива в няколко промиващи буфери, след което започва етапа на елуиране на ДНК.

Елуирането протича по следния начин: по време на въртенето на металните родове ДНК молекулите се отделят от магнитните частици и остава в елуиращия буфер. Впоследствие магнитните частици отново поелепват по външната страна на найкрайниците. Последният етап се състои в автоматично отделяне на използваните найкрайници от металните родове. Крайният резултат е получаване на чиста геномна ДНК с висока концентрация.



Фигура 3.1. Общ вид и принцип действието на полуавтоматизираната система Chemagic Magnetic Separation Module station I (Chemagen) за изолиране на ДНК от венозна кръв

Етапи:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (натриев додецил сулфат - детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действие на протеиназата);
- Свързване на освободената от ядрата ДНК към магнитните частици;
- Отделяне на комплекса ДНК-магнитни частици от кръвно-клетъчния лизат;
- Няколкократно промиване с етанол съдържащи буфери;
- Освобождаване на пречистената ДНК от магнитните частици;

Процедура

- Получаване на клетъчен лизат - във всяка 50 ml епруветка се смесват определени количества венозна кръв с лизиращия буфер до 15 ml
- Прибавяне на 25 µl протеаза. Разрушаване на клетъчните стени- активно смесване 20 мин.
- Прибавяне на Свързващ буфер (25ml) и магнитни частици (800 µl). Активно смесване 10 мин.
- Промиване на комплекса ДНК-магнитни частици последователно в Буфери от 3 до 6.
- Елуиране на ДНК в елуиращ Буфер ЕВ (в зависимост от 500 до 1000µl)

Позициите на подвижния модул са номерирани във възходящ ред и в различните позиции се поставят епруветки със съответния буфер

3.3.2.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ БИОПСИЧЕН МАТЕРИАЛ

Използвани Реактиви: Таблица 3.3.

Етап	Реактиви	Количество за 1 реакция
Подготовка (за пара-финовите блокчета)	Ксилен (ксилол)	1 ml
	95% етанол	2 ml
Изолиране	ATL –тъканен лизис буфер	180 µl
	Протеинкиназа К	20 µl
	AL лизис буфер	180 µl
	95% етанол	200 µl
Пречистване	AW1 – пречистващ буфер	500 µl
	AW2 - пречистващ буфер	500 µl
Елуиране	AE/ATE* – елуиращ буфер	120 µl

* при използване на QiAmp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN)

QiAmp DNA Mini kit (QIAGEN) за свеж материал; QiAmp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN) за материал архивиран чрез включването им в парафин.

Използвана Апаратура:

- Хомогенизатор - ULTRA-TURRAX T10 basic Dispenser (IKA);
- Хладилна Центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf);
- Микроцентрофуга Micro CL 21 (Thermo Fisher Scientific);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell);
- Термоблок ThermoE (Bioer);
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders);

Етапи:

- Подготовка на пробите за изолиране;
- Депарафиниране на FFPE пробите (само за архивирани тъкани);
- Лизиране на мозъчната тъкан;
- Колонно сепариране и пречистване на ДНК;
- Елуиране на ДНК;

3.3.2.2.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ СВЕЖА ТЪКАН

Процедура:

- Свежа тъкан - 10 mg свежа туморна тъкан се хомогенизира в 180 µl буфер ATL (тъканен лизис буфер) с помощта на хомогенизатор и хомогенатът се поставя в микроцентрофужна епруветка. След това се добавят 20 µl протеиназа К.
- Пробите се вортексират до пълно миксиране на съставките. Това е необходимо условие за пълното разграждане на белтъците и освобождаване на ДНК.
- Пробите се инкубират на 56°C за една нощ до пълно лизиране на белтъците. При необходимост се добавя още протеиназа К.
- След пълното лизиране на пробите, те се вортексират и към всяка от тях се добавят по 180µl AL буфер (лизисен буфер). Отново се вортексират, инкубират се за 10 мин. на 70°C. Следва вортексиране за смесване на съставките. Ако в разтворените проби се наблюдават неразтворени парчета от тъканта, се центрофугират за 5 мин. на максимална скорост – 14 000 rpm и супернатантата се пренася в нова микроцентрофужна епруветка.
- Добавят се 200µl 95% етанол към всяка проба и се вортексират енергично.
- Цялото количество от центрофужните епруветки се прехвърля в надписани колонки за изолиране на ДНК.
- Центрофугират се на 8 000 rpm за 1 мин. Течността от колекторната епруветка се изхвърля.
- Силика-базираната мембрана на колоната се промива:
 1. *Първо промиване* – добавят се 500µl буфер AW1. Центрофугираме – 8 000 rpm за 1 мин. Течността от колекторната епруветка се изхвърля.
 2. *Второ промиване* – добавят се 500µl буфер AW2. Центрофугираме – 14 000 rpm за 3 мин. Изхвърляме течността от колекторната епруветка.
- Изсушаване на найлоновата мембрана Центрофугира се за 1 мин. на 14 000 rpm. По този начин се премахва остатъчният етанол от колоните с ДНК. Изхвърля се колекторната епруветка.
- Колонките се преместват в нови центрофужни епруветки от 1.5µl.
- Елуиране на високо-пречистена ДНК – Колоните се поставят в микроцентрофужни епруветки от 1.5ml Добавя се 40µl AE буфер (елуиращ буфер) и се инкубира на стайна температура за 5-10 мин.
- Центрофугиране – 8 000 rpm за 1 мин.
- Елуирането се повтаря още два пъти с останалото количество AE буфер (80µl). За получаване на по-висок добив и по-високи концентрации на ДНК от съответната проба, към колонката с ДНК се добавя само половината от количеството елуиращ буфер. Следва инкубиране на стайна температура за 3 мин. и центрофугиране. След това се добавя втората

половина от количеството елуиращ буфер. Инкубира се и се центрофугира отново. По този начин 85–100 % от свързаната към мембраната в колонката ДНК се елуира в стандартен обем с висока концентрация.

3.3.2.2.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ ПАРАФИНОВО БЛОКЧЕ

Процедура:

Парафинови блокчета (FFPE) – при тях се извършва първо депарафинизиране.

- Прави се срез на микротом с дебелина 5-10 μm и се поставя в 1.5ml епруветка тип „Eppendorf”.
- Към епруветката се прибавя 1ml ксилол. Остава се на стайна температура за 30 минути.
- Центрофугира се 5 мин. на 14 000 rpm или оборота/минута.
- Супернатантата се изхвърля
- Повтарят се предходните три стъпки.
- Към утайката се прибавя 1ml 96% етанол. Остава се на стайна температура за 15 минути.
- Центрофугира се 5 минути на 14 000 rpm.
- Супернатанта се изхвърля.
- Повтарят се предходните три стъпки.
- Към утайката се прибавя 1ml дестилирана вода.
- Центрофугира се при същите условия.
- Суши се 37°C за 10 мин. до пълното изпаряване на етанола.
- Към пробата се прибавят:
 - 20 μl Протеиназа К (20ng/ml)
 - 180 μl ATL тъканен лизиращ буфер
- Инкубира се за 3-24 часа на 56°C, като се следи за разграждането на материала през 30 мин.
- След пълното лизиране на пробите, те се вортексират и се инкубират за 1ч. на 90°C. Следва вортексирание за смесване на съставките.
- Добавят се 180 μl AL буфер (лизисен буфер). Отново се вортексират.
- Добавят се 200 μl 95% етанол към всяка проба и се вортексират енергично.
- След тази стъпка изолирането продължава по протокола на изолиране на ДНК от свежа тъкан.

3.3.3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВОТО НА ПОЛУЧЕНАТА ДНК

Концентрацията на изолираната геномна ДНК беше измерена автоматично чрез спектрофотометър NANODROP ND-1000 (Thermo Scientific). Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda = 260 \text{ nm}$ от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК. Отношението на абсорбциите, измерени съответно при λ_{260} и λ_{280} , показва чистотата на ДНК и трябва да е между 1.7 и 2.0. Стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2.0 – примеси от РНК. Отношението A_{230}/A_{260} дава представа за съдържанието на захари и трябва да бъде в диапазона от 0.3 до 0.9 (стойности над 0.9 показват наличие на остатъчни захари).

Качеството на изолираната ДНК, както и добива, се оценяват след електрофореза в 0.8% агарозен гел срещу стандарти с известни концентрации.

Използвана апаратура:

- Спектрофотометър - NanoDrop ND-1000

Процедура:

Разтворената във вода или АЕ-буфер ДНК се измерва, като се отчита абсорбцията при 280/260 nm.

Апаратът автоматично изчисляване на концентрацията на ДНК въз основа на формулата:

$$C = \frac{E_{260} \times R}{\epsilon \times l}$$

C - концентрация на ДНК ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 E_{260} - екстинкция при 260 nm
 R – разреждане, l - ширина на кюветата
 ϵ - десетичен моларен екстинкционен коефициент (за ДНК $\epsilon=26$)

Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено посредством тестване на агарозна гел електрофореза върху 0.8 % агарозен гел и 1X TBE (трисборатен буфер). Визуализацията на фрагментите е осъществена посредством използване на етидиев бромид с концентрация 0.05 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Чрез електрофорезата се определя целостта на геномната ДНК и полуколичествено нейната концентрация като се използват и контроли. При наличие на “пътека” (smearing), съставена от множество фрагменти, се прави изводът, че ДНК е деградирала и не може да се използва за анализ.

3.3.4. БИСУЛФИТНО ТРЕТИРАНЕ НА ДНК

Използвани реактиви:

EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)

Таблица 3.4. Компоненти на бисулфитната реакция

Етап	Компоненти	Количество за 1 реакция (μl)
Бисулфитна реакция	ДНК (100 ng - 2 μg)	x
	RNase-free вода	20-x
	Бисулфитен микс	85
	ДНК Протекторен буфер	35
	Краен обем	140
Колонно пречистване	Буфер BL	560
	Буфер BW	500
	Буфер BD	500
	Буфер EB	40

Използвана Апаратура:

- Хомогенизатор - ULTRA-TURRAX T10 basic Dispenser, IKA.
- Хладилна Центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf)
- Микроцентруфуга Micro CL 21 (Thermo Scientific);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell).
- Термоблок ThermoE (Bioer)
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders)

Принцип:

ДНК може да се определи дали е метилирана чрез предварителна обработка с натриев бисулфит. Инкубирането на ДНК с натриев бисулфит води до превръщането на неметиления цитозин в урацил, докато метилираният цитозин остава непроменен. Така бисулфитното превръщане дава възможност за разграничаване на неметираната от метилираната ДНК последователност (*Табл.3.5*).

Таблица 3.5. Промяна в неметираната и метилираната ДНК последователности при бисулфитно превръщане

	Оригинална секвенция	След бисулфитно превръщане
Неметирана ДНК	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Метирана ДНК	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Най-критичната стъпка за правилното определяне на статуса на ДНК секвенциите е пълното превръщане на неметираните цитозини. Това се постига чрез инкубиране на ДНК в концентриран разтвор на бисулфит при висока температура и ниско рН. Последващо

пречистване е необходимо за премахване на бисулфитната сол и химикалите, използвани при превръщането, тъй като те инхибират по-нататъшните реакции.

EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) дава възможност за бърза, лесна и осъвременена 6-часова процедура за ефективно превръщане и пречистване на количество от минимум 1 ng ДНК. Protect Buffer предпазва ДНК от фрагментация по време на бисулфитното превръщане, като едновременно с това я денатурира. Той съдържа рН-чувствителна боя, която дава доказателство, че е достигнато необходимото рН за цитозиновото превръщане.

PCR програмата за бисулфитното превръщане включва оптимизирани серии от редуващи се инкубационни стъпки – необходими за ДНК денатуриране с последваща сулфатизация и цитозиново деаминиране. Това е необходимо за постигане на високи нива на цитозиновото превръщане (99%). Десулфатизацията накрая се постига чрез удобна стъпка с използването на колонен метод, спомагащ и за пречистването.

Етапи:

- Денатурация на геномната ДНК;
- Бисулфитно ДНК превръщане;
- Пречистване на бисулфитната ДНК;

Процедура:

- Приготвяне на бисулфитната реакционна смес в 200µl PCR епруветки:
 1. Към всяка опаковка бисулфитен микс се прибавя 800µl RNase-free вода. Следва вортексиране до пълното разтваряне на микса.
 2. Приготвя се бисулфитна реакционна смес (Табл.3.6)

Таблица 3.6. Програма за бисулфитно превръщане

Етап	Време (мин)	Температура°C
Денатурация	5	99°C
Инкубация	25	60°C
Денатурация	5	99°C
Инкубация	85	60°C
Денатурация	5	99°C
Инкубация	175	60°C
Изчакване	∞	20°C

➤ Пречистване:

- Миксът се прехвърля в 1.5ml епруветка и се прибавят 560µl Буфер BL. Смесват се добре.
- Миксът се прехвърля в колонка. Следва центрофугиране на колонката за 1 мин. на максимална скорост. Течността в колекторната епруветка се изхвърля.
- Прибавят се 500µl Буфер BW и колонката се центрофугира за 1 мин. на максимална скорост. Течността в колекторната епруветка се изхвърля.
- Прибавят се 500µl Буфер BD и колонката се инкубира за 15 мин. на стайна температура.
- Колонката се центрофугира за 1 мин. на максимална скорост. Течността в колекторната епруветка се изхвърля.
- Прибавят се 500µl Буфер BW и колонката се центрофугира за 1 мин. на максимална скорост. Течността в колекторната епруветка се изхвърля.
- Повтаря се предходната стъпка 6. Колекторната епруветка се изхвърля.
- Колонката се поставя в нова 2ml епруветка и се центрофугира за 1 мин. на максимална скорост за отстраняване на останалата течност.
- Колонката се поставя в чиста 1.5ml епруветка и се инкубира за 5 мин. на 56°C.
- Прибавят се 20µl Буфер EB за елуиране на пречистената ДНК в 1.5ml епруветки. Следва центрофугиране за 1 мин. на максимална скорост.

3.3.5. ИЗОЛИРАНЕ НА РНК

Използвани реактиви: RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Таблица 3.7. Реактиви, използвани при изолирането на тотална РНК

Етап	Реактиви	Количество за 1 реакция (µl)
Изолиране	14.3 М β-меркаптоетанол	6
	RLT –лизис буфер	600
	70% етанол	1 обем (~600)
	AL лизис буфер	180 µl
Колонно пречистване	95% етанол	200 µl
	RW1 – пречистващ буфер	700 µl
	RW2 - пречистващ буфер	1000 µl
Елуиране	вода свободна от РН-ази	40 µl

Използвана Апаратура:

- хомогенизатор - ULTRA-TURRAX T10 basic Dispenser, IKA.
- Охлаждаща центрофуга Centrifuge 5810 (Eppendorf)

Принцип:

За провеждане на експресионния анализ беше използвана тотална иРНК, изолирана от замразена туморна тъкан. Изолирането на РНК от туморна тъкан беше извършено с помощта на готов кит за екстракция на пречистена РНК с цел намаляване времето за извършването на дейността, получаване на високомолекулна РНК с добро качество и без наличие на нежелани онечистващи вещества, следвайки препоръките на производителя Qiagen на принципа на колонният метод на екстракция.

Етапи:

- Подготовка на пробите за изолиране;
- Хомогенизиране на тъканта с хомогенизатор;
- Лизиране на мозъчната тъкан;
- Колонно-сепариране и пречистване на РНК;
- Елуиране на РНК;

Процедура:

- Отделяне на не повече от 30mg тъкан
- Прехвърляне на пробата в 1.5ml епруветка и прибавяне на 600µl RLT буфер
- Хомогенизиране на тъканта с хомогенизатор
- Пробата се центрофугира 3 мин. на 14 000 оборота/мин. – центрофуга Centrifuge 5810, Eppendorf. Супернатантата се прехвърля в нова 1.5 ml епруветка.
- Прибавяне на 1 обем 70% етанол и се разбърква чрез внимателно пипетиране.
- Прехвърляне цялото количество в свободна от ензими, разграждащи РНК колонка - RNase free spin column. При обем на сместа от супернатанта и 70% етанол по-голям от 700µl – прехвърлянето се извършва на два пъти.
- Центрофугиране на 10 000 оборота за 15 секунди. Премахване на отделената течност от епруветката (collection tube).
- Прибавяне на 700µl RW1 буфер. Центрофугиране на 10 000 оборота за 15 секунди. Изхвърляме отделената течност от епруветката (collection tube).
- Прибавяне на 500µl RPE буфер. Центрофугиране на 10 000 оборота за 15 секунди. Изхвърляме отделената течност от епруветката (collection tube).
- Прибавяме на 500µl RPE буфер. Центрофугиране на 10 000 оборота за 2 минути. Изхвърляме отделената течност от епруветката (collection tube).
- Слагаме нова 2ml епруветка. Центрофугиране на 14 000 оборота за 1 минути.
- Колонката се премества върху нова 1.5ml епруветка. Прибавя се 40µl вода свободна от ензими, разрушаващи РНК (RNase free water). Центрофугиране на 10 000 оборота за 1 минута.
- Повтаряме предната стъпка с прибавяне на 20µl вода.

- Измерване концентрацията на получената тотална РНК на спектрофотометър - NanoDrop ND 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Съхраняване на пробите с РНК в хладилник на -80°C до пристъпване към следващата стъпка.

3.3.5.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВОТО НА ПОЛУЧЕНАТА РНК

Използвани реактиви и разтвори:

Таблица 3.8. Използвани реактиви

Използвани реактиви	Състав	Количество	ddH ₂ O
10 x MOPS buffer (pH=7.0)	200 mM MOPS	10.475 g	до 250 ml
	50 mM натриев ацетат	2.05 g	
	10 mM ЕДТА	0.93 g	
0.8% денатуриращ агарозен гел	Агароза	0.8 g	до 100 ml
	10xMOPS буфер	10.0 ml	
	дH ₂ O	90.0 ml	
	37% Формалдехид	1.8 ml	за 100 ml гел
	Етидиев бромид 10mg/ml	2.5-5 µl	
Буфер за провеждане на разделянето	10xMOPS буфер	100 ml	до 1000 ml
	37% Формалдехид	20 ml	
Денатуриращ микс	10xMOPS буфер	65 µl	за 100 ml гел
	37% Формалдехид	13 µl	
	Формамид	22 µl	
Разтвор за нанасяне на пробите 10x	0.25% brimphenol blue	0.25 g	до 100 ml
	15% Ficoll или	15 g	
	30% глицерол	30 g	

Използвана Апаратура:

- рН метър (InLab);
- Хладилна центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex - Press-to-mix (Snijders);
- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27);
- Нивелирана маса за изливане на гел;
- Вана за хоризонтална гел електрофореза (Science-Plus-UK);
- Стартови гребени с размер на зъбите 5 x 1mm;
- Термоблок ThermoE (Bioer)
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фото-документационна система и UV–трансилюминатор с дължина на вълната 315nm (MiniBisPro - Bio Imaging Systems)

Принцип:

За определяне на качеството на иРНК се използват обикновено денатуриращи гелове, тъй като едноверижна иРНК има склонността да образува големи и много на брой вторични структури. Това значително се отразява на скоростта на миграцията върху гел в допълнение към голямата дължина на иРНК, за разлика от ДНК, която е предимно линейни. Денатуриращите гелове обикновено съдържат формалдехид или карбамид, който образува водородни връзки с нуклеотидните бази и спомагат РНК да стане едноверижна.

Етапи

- Приготвяне на подходящите разтвори и гел;
- Денатуриране на пробите
- Нанасяне на денатуриращия гел
- Визуализация на разделените фрагменти

Процедура:

- Приготвяне на подходящите разтвори се извършва според **Табл.3.8**

При приготвяне на агарозния гел, прибавянето на 37% формамид и Етидевия бромид става след като е разтопена агарозата – при достигане охлаждане до 50°C.

- Денатуриране на пробите

1. Смесване на 5 µg интактна РНК в 9 µl прясно приготвен денатуриращ микс.
2. Денатурацията се извършва на 55°C за 15 мин.
3. Прибавяне на 4 µl от буфера за нанасяне на пробите 10x
4. Нагряване на пробите на 70°C за 10 мин. последвано от рязко охлаждане на 4°C за 3 мин.
 - Провеждане на електрофорезата се извършва на 40Ah за 1 час
 - Визуализация на разделените фрагменти

3.3.6. ОБРАТНА ТРАНСКРИПЦИЯ И СИНТЕЗ НА κДНК

Използвани реактиви:

High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)

Таблица 3.9. Състав на 2x мастер микс за обратна транскрипция

Етап	Компонент	Количество (µl) за една реакция
<i>Подготовка на РНК</i>	РНК (до 3 µg)	x
	Свободна от РН-ази вода	10-x
<i>Обратна транскрипция – синтез на κДНК</i>	10X RT Buffer	2.0
	25X dNTP Mix (100mM)	0.8
	MultiScribe Ензим-Обратна Транскриптаза	2.0
	RNase Inhibitor	1.0
	Nuclease-free H ₂ O	1.0
Общо		20.0

Използвана Апаратура:

- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Микроцентрифуга Micro CL 21 (Thermo Scientific)

Принцип:

В RT-PCR, матричната иРНК първо се превръща в комплементарна ДНК (κДНК) с помощта на ензим обратна транскриптаза. След това κДНК се използва като матрица за експоненциално амплифициране с PCR метода. До сега RT-PCR е най-чувствителния метод за откриване наличието на РНК. Използването на RT-PCR за откриване на РНК транскрипти води до революция в изследванията на генната експресия поради следните причини: 1) прави теоретично възможно установяването практически на всеки генен транскрипт; 2) елиминира необходимостта от голямо количество изходен материал, недостатък на Northern Blot анализа; 3) създаде възможност за толерантност към частичното разграждане на РНК, докато РНК секвенцията в областта на праймерите е непокътната;

Етапи

- Подготовка на РНК пробата
- Провеждане на реакция на обратна транскрипция

Процедура:

Извършва се синтез на κДНК на базата на тотална иРНК, изолирана от свежа тъкан, с помощта на ензим обратна транскриптаза по протокол на производителя.

- Подготовка на РНК проби с подходяща концентрация, еднаква за всички реакции.
- Подготовка на 2x мастер микс за обратна транскрипция (2X RT master mix) с реактиви от кита, на лед, според **Табл.3.7**. Смесване и кратко центрофугиране.

- Провеждане на обратна транскрипция на PCR апарат по следната програма:

Таблица 3.10.

Температура	Време (мин)
25°C	10
37°C	120
85°C	5
4°C	изчакване/∞

- Съхраняване на готовите проби в хладилник на -20°C до пристъпване към следващата стъпка.

3.4. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА

3.4.1. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод в молекулярната биология и молекулната диагностика. Методът е разработен от К. В. Mullis през 1985 г. и представлява ензимно амплифициране (намножаване) на специфична ДНК нуклеотидна последователност в *in vitro* условия. В рамките на няколко часа е възможно да се синтезират милиони копия от желаната ДНК последователност, като за целта се използват специфични олигонуклеотидни праймери и ензим ДНК полимераза.

Използвани Разтвори и реактиви:

Таблица 3.11. Реактиви за PCR реакцията, използвани в хода на изследването

Компоненти	Количество (μl)
ДНК 30 ng/μl	1
Праймер F (10 pmol)	0.8
Праймер R (10 pmol)	0.8
2xRed Taq	5
dH ₂ O	2.4
Краен обем	10

Използвана Апаратура:

- Апарат за PCR-амплификация Veriti 96-well (ABI) или Bioer Gene Pro (Harlow scientific)

Етапи:

Полимеразната верижна реакция е изключително чувствителен и изисква само няколко ДНК молекули в една реакция. Затова е много важно да се избягва контаминация с чужда ДНК, присъстваща в лабораторията (бактерии, вируси или човешки източници). Започва с първоначална продължителна денатурация, която цели разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК (2 до 5 мин. при 92 до 95°C). Амплифицирането на желания участък се осъществява при многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура, всеки от който включва следните три стъпки:

- **Термична денатурация (denaturation)** - целта е да настъпи пълна денатурация на двойноверижните ДНК молекули до получаване на едновержни матрици необходими за процеса на амплификация. Продължителността на тази стъпка обикновено е от 10 сек. до 1 мин., а необходимата температура от -90 до 98°C осигуряващ пълно разделяне на двойноверижната ДНК;

- **Хибридизация (annealing)**- осъществява се между праймерите и комплементарните им участъци от матричната, едновержна ДНК. Температурата за осъществяване на това взаимодействие е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и

дължината на използваните праймерни секвенции. Емпирично температурата на хибридизация на праймерите може да бъде изчислена по следната формула:

$$T^{\circ}\text{C хибридизация} = \{(A+T)_{x2} + (G+C)_{x4}\} - 5^{\circ}\text{C}$$

➤ **Синтез (elongation)** – под действието на полимеразата се осъществява синтез на нова ДНК верига, комплементарна на матричната ДНК верига в посока 5'→3'. Температурата на този етап се определя от особеностите на използвания ензим така, че да се осигури най-високата ДНК-полимеразна активност на ензима. Обикновено тази температура е 72°C. Продължителността на тази стъпка се определя от очакваната дължина на PCR продукта (1 мин. за PCR продукт с големина 1 кб, при използване на *Taq* полимеразата).

➤ **Краен продължителен синтез** - Полимеразната верижна реакция завършва с този етап (5 до 10 мин. при 72°C), с цел да се осигури цялостно изграждане на някои частични синтезирани ДНК фрагменти.

➤ **Оценка на продуктите получени в резултат на PCR реакцията**, електрофоретично разделяне на 2% агарозен гел (вж. т. 3.4.2).

Принцип:

Полимеразната верижна реакция (PCR) се състои в *in vitro* ензимно размножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Методът е разработен от Kary Mullis в 1985г, като през 1993 г. той получава и Нобелова награда за откритието си. PCR е ключова техника, използвана при повечето анализи в молекулярната медицина. Той е и в основата на MSP. При стандартния метод се използват два вида праймери – прав и обратен. Първият се свързва с кодиращата верига (в посока 5'-3'), а другият се свързва с не кодиращата (в посока 3'-5'). Тези праймери (около 20 бази) хибридизират със срещуположните вериги и служат като субстрат на полимеразата, създаваща комплементарни вериги чрез добавка на нуклеотиди. 4-те вида нуклеозидтрифосфати, полимеразата, матрицата, праймерите, магнезиев дихлорид и подходящ буфер оформят реакционната смес. Амплификацията протича в 20-40 повтарящи се цикъла, всеки състоящ се от 2-3 термични стъпки: денатурация на двойно верижната ДНК (93-95°C), свързване на олигонуклеотидните праймери към двата края на прицелна секвенция (50-70°C), копиране на желаната последователност чрез удължаване на праймерите от термостабилната (*Taq*) полимеразата (70-75°C). Секвенцията между праймерите може да се копира множество пъти. Амплифицираните фрагменти може да се разделят на агарозна гел електрофореза според размера си, както и чрез високо ефективна течна хроматография и капилярна електрофореза. Визуализацията става след оцветяване на гела с етидиев бромид или SYBR Green и флуоресценция на УВ светлина (трансилюминатор).

Във всяка амплификационна реакция участват:

- **ДНК** – едноверижна матрица за осъществявания процес, получена след термична денатурация на геномната ДНК.

- **Термостабилна ДНК полимераза (*Taq* полимераза)** – осъществява процеса на размножаване на желаната ДНК последователност. За първи път е изолирана от микроорганизма *Thermophilus aquaticus*. Ензимът *Taq* полимераза е термостабилен и запазва своята активност 45-60 мин. при 94°C – т.е. през целия амплификационен процес. Оптималната температура за синтез с *Taq* полимеразата е 72°C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е от 1 до 5 U. Катализира синтеза на нови ДНК вериги в посока 5'→3'.

- **Праймери** (зародиши) – представляват къси синтетични олигонуклеотиди (14–40 нуклеотида), комплементарни на ограничаващите размножаваната последователност участъци. От тях започва синтезата на ДНК при всеки нов цикъл на PCR-реакцията. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0.1–1.0μM. Секвенциите на използваните в настоящата работа праймери са представени в **Табл. 3.12.**

Таблица 3.12. Секвенциите на праймерите за амплификация на гените *IDH1*, *IDH2* и *TP53*

Праймер	Секвенция	б.дв.	T _{ан} °C
<i>IDH1_F</i>	5'- ATGAGCTCTATATGCCATCACTG -3'	498	62-64°C
<i>IDH1_R</i>	5'- TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT -3'		
<i>IDH2_F</i>	5'- ATTCTGGTTGAAAGATGGCG -3'	313	60-66°C
<i>IDH2_R</i>	5'- TGTGGCCTTGTACTGCAGAG -3'		
<i>TP53_ex.2,3F</i>	5'- GGAAGTGTCTCATGCTGGA-3'	367	64-69°C
<i>TP53_ex.2,3R</i>	5'- TCAGAGGACCAGGTCCTCA -3'		
<i>TP53_ex.4F</i>	5'-ACCTGGAGGGCTGGGG -3'	411	63-67°C
<i>TP53_ex.4R</i>	5'- GCCAGGCATTGAAGTCTCATG-3'		
<i>TP53_ex.5F</i>	5'- CTTTGCTGCCGTCTTCCAGTT -3'	334	63-69°C
<i>TP53_ex.5R</i>	5'- TCAGTGAGGAATCAGAGGCCT -3'		
<i>TP53_ex.6F</i>	5'- CTGGGGCTGGAGAGACGACA -3'	257	70-72°C
<i>TP53_ex.6R</i>	5'- CTGCTCACCTGGAGGGCCACT -3'		
<i>TP53_ex.7F</i>	5'- ACAGGTCTCCCCAAGGCGCA -3'	243	70-72°C
<i>TP53_ex.7R</i>	5'- GGTCAGAGGCAAGCAGAGG -3'		
<i>TP53_ex.8F</i>	5'- ATGGGACAGGTAGGACCTGA -3'	259	58-63°C
<i>TP53_ex.8R</i>	5'- GTGAATCTGAGGCATAACTGC -3'		
<i>TP53_ex.9F</i>	5'-GGAGACCAAGGGTGCAGTTA -3'	279	63-69°C
<i>TP53_ex.9R</i>	5'- CCAGGAGCCATTGTCTTTGA -3'		
<i>TP53_ex.10F</i>	5'-ACCGTCATAAAGTCAAACAATTG -3'	384	56-60°C
<i>TP53_ex.10R</i>	5'-GAAGGCAGGATGAGAATGGA -3'		
<i>TP53_ex.11F</i>	5'-TGTCATCTCTCCTCCCTGCT -3'	257	56-64°C
<i>TP53_ex.11R</i>	5'- GGGACAAAGCAAATGGAAGT-3'		

• **Дезоксирибонуклеозид трифосфати (dNTPs)** – dATP, dGTP, dTTP, dCTP. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно на принципа на комплементарност на базите в структурата на ДНК. Задължително условие е четирите типа dNTP да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес. Оптималната концентрация е 20-200 μ M за всеки нуклеотид.

• **Реакционен буфер** – осигурява подходящото pH=8.3–9.0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10-50 mM Tris-HCl с pH=8.3-9.0; до 50mM KCl и 0.5-5.0 mM MgCl₂. Освен това, може да съдържа и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти (като DMSO – диметил сулфооксид), бетаин (триметилглицин) и други. Компонентите на буфера могат да варират качествено и количествено, в зависимост от изискванията на конкретната Taq полимераза.

Проведена е оптимизация на условията чрез вариране на температурата на анилинг и времето за амплификация. След оптимизация на температурата на хибридизация на двата праймера, бяха определени следните условия за амплификация:

- начална денатурация 95°C - 5 мин.
 - 95°C - 30 сек.
 - 54-70°C - 40 сек.
 - 72°C - 40 сек.
 - краен синтез 72°C - 10 мин.
- } 40-45 цикъла

3.4.1.1. КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. За положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, за която е известно, че се амплифицира за даден маркер. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. От друга страна в отрицателната контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се

замества с ddH₂O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

3.4.2. ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

Използвани Реактиви и Разтвори:

Таблица 3.13. Състав и количество на използваните реактиви и разтвори при работа с агарозна гел електрофореза

Използвани реактиви	Състав	Количество	ddH ₂ O
5 x TBE buffer (pH=8.0)	90 mM Tris HCl	54 g	до 1000 ml
	90 mM борна киселина	27.5 g	
	1 mM ЕДТА	4.76 g	
0.8% агарозен гел	Агароза	0.8 g	до 100 ml
	TBE буфер	20 ml	
2% агарозен гел	Агароза	2 g	до 100 ml
	TBE буфер	20 ml	
3% агарозен гел	Агароза	3 g	до 100 ml
	TBE буфер	20 ml	
Етидиев бромид 10mg/ml	----	1 g	до 100 ml
Разтвор за нанасяне на пробите 10x	0.25% bromphenol blue	0.25 g	до 100 ml
	15% Ficoll или	15 g	
	30% глицерол	30 g	

Използвана Апаратура:

- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27);
- Нивелирана маса за изливане на гел;
- Вана за хоризонтална гел електрофореза (Science-Plus-UK);
- Стартови гребени с размер на зъбите 5 x 1mm;
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фото-документационна система и UV–трансилюминатор с дължина на вълната 315nm (MiniBisPro - Bio Imaging Systems)

Принцип:

Хоризонталната агарозна гел електрофореза представлява метод за разделяне, идентификация и пречистване на ДНК фрагменти. Методът позволява ДНК фрагментите да се разделят един от друг в зависимост от тяхната молекулна маса. Тази техника е използвана за определяне качеството и количеството на амплификационните продукти. За приблизителна оценка на дължината на ДНК фрагментите се използва молекулен маркер (ladder). Това е смес от ДНК фрагменти с известна, точно определена дължина. За целта е необходимо преди началото на електрофорезата маркерът да се нанесе успоредно с анализираните проби. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН ДНК фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анод). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите зависи от молекулната им маса, от концентрацията на агарозния гел, температурата, състава и йонната сила на използвания буфер и др. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минимално и ДНК фрагментите се придвижват по-бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва TBE буфер. След приключване на електрофоретичното разделяне, е необходима визуализация на ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид (0.5 µg/ml) се интеркалира между базите в молекулата на ДНК и позволява визуализиране на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина с дължина на вълната $\lambda = 315 \text{ nm}$. Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор.

Етапи:

- Приготвяне на необходимия % агарозен гел

- Нанасяне на пробите върху него
- Протичане на електрофоретичното разделяне на амплифицирания продукт
- Визуализация на разделените по молекулна маса на амплифицирани продукти

Процедура:

- Приготвяне и отмерване на необходимите количества стартови реактиви и разтвори-агароза и 5xTBE буфер. Разтапяне на агарозата.
- Прибавяне на етидевият бромид при достигане на подходяща температура на хомогенната смес.
- Изливане на сместа в подходящо сглобена вана с поставени пластмасови гребени, оформящи стартовете.
- След като гела е стегнал и изстинал се отделя от ваната за изливане и се поставя във ваната за електрофоретично разделяне напълнена с пресен 1xTBE буфер.
- Смесване на 3µl PCR продукта с 3µl разтвор за нанасяне на пробите 10x и нанасянето им на гела. В един от стартовете на гела се нанася и молекулен маркер. Дължината на продуктите от PCR реакцията се идентифицират с помощта на **молекулни маркери**. В настоящата работа бяха използван 3 молекулни маркер с дължина 50–1000 б.дв. за MS-PCR, 100-1000 б.дв за PCR и 500-2500 б.дв за тестване на РНК интактност (New England BioLabs).
- Електрофоретично разделяне при 140 W до 30 мин.
- Визуализиране на разделените фрагменти чрез UV- визуализираща система.

3.4.3. МУТАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА ГЕНИТЕ *IDH1*, *IDH2* И *TP53*

3.4.3.1. СИСТЕМЕН ХОД:

1. Изолиране на геномна ДНК от туморна тъкан (т.3.3.2)
2. Провеждане на PCR (виж т.3.4.1)
3. Хоризонтална гел електрофореза (виж т.3.4.2)
4. Директно секвениране
5. Загуба на хетерозиготност

3.4.3.2. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ (ПО SANGER)

Сканиращите методи могат да открият наличието на мутация в изследвания алел, но не дават информация за нейната природа. Точното ѝ определяне може да стане чрез директно секвениране на изследваната ДНК.

Използвани Реактиви:

Таблица 3.14. Реактиви, използвани при секвенирането и преутаяването

Използвани реактиви	Състав	Количество за 1 реакция (µl)
<i>ExoSap</i>	Exonuclease 20 U/µl	0.6 µl
	Sap (Phosphatase) 1 U/µl	
	TE буфер	0.6 µl
	PCR продукт	1.5 µl
<i>Секвенционна реакция</i>	пречистен PCR продукт	2.7 µl
	5x Секвенционен Буфер	2.0 µl
	Big Dye v3.1 500 bp	0.4 µl
	Праймер (10 pmol)	0.4 µl
	dH ₂ O	4.5 µl
	Краен обем	10.0 µl
<i>Преутаяване</i>	1.5 M натриев ацетат	2.0 µl
	1mM EDTA	1.0 µl
	95% етанол	25.0 µl
	70% етанол	35.0 µl

Използвана Апаратура:

- Центрофуга 5810R за плаки (Ependorf).
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Устройство за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

Принцип:

Секвенирането на PCR продуктите е референтен метод за директен ДНК анализ. При него, определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин, те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява на ДНК полимеразата след тази база да продължи да синтезира ДНК фрагмента. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатурираща полиакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията.

Етапи

- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR
- Пречистване на продукта с ExoSAP
- Секвенционна реакция
- Преутаяване на секвенционните продукти
- Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции
- Анализ на получените резултати

Процедура:

• Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR

PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните маркери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да са чисти, без неспецифични, допълнителни продукти.

• Пречистване на продукта с ExoSAP

Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP, с цел премахване на dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – екзонуклеаза I и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP). Екзонуклеазата разгражда неизползваните праймери и едноверижни ДНК фрагменти, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез смесването му в съотношение 1:1 със стерилен TE буфер (0.6 µl ExoSap + 0.6 µl TE буфер) и директното му добавяне към PCR продукта в съотношение 15 µl PCR продукт: 1.2 µl смес ExoSAP + TE буфер. Сместа се инкубира с програма ExoSAP, на PCR апарат, при следните условия:

- 37°C - 30 мин.
- 80°C - 15 мин. (инактивиране на двата ензима)

Пречистените проби могат да се съхраняват на -20 °C за кратък период.

• Секвенционна реакция

Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1, (Applied Biosystems), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. ДНК-полимеразата е термостабилна ДНК-полимераза, толерантна към високи солеви концентрации и с висока процесивност. Към 3'-края на всеки от четирите вида дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един

от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при $\lambda=488$ nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери (*Табл.3.10*). Следва размножаване на фрагмента. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация. Условията за тази PCR реакция са:

- 95°C – 3 мин.
 - 95°C – 20 сек.
 - 55°C – 20 сек.
 - 60°C – 2 мин.
 - 60°C – 5 мин.
- } 30 цикъла

- **Преутаяване на секвенционните продукти**

Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависимост от броя проби, преутаяването може да се направи в епруветки или на плака. Включва два етапа:

1. Преутаяване - към пробите се добавя натриев ацетат, ЕДТА и 95% етанол. Така приготвените проби се оставят да инкубират за 15 минути на тъмно. След това се центрофугират на 3 000 gcf за 30 мин. и се отстранява супернатантата.

2. Пречистване - пробите се промиват със 70% етанол. Центрофугират се на 1650 gcf за 20 мин, отстранява се супернатантата. Така приготвените утайки се изсушават на стайна температура и се разтварят с 14µl високо дейонизиран формамид.

- **Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции:**

Секвенционните реакции се обработват и отчитат след нанасяне на автоматичния секвенатор ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosistem). Крайният резултат е файл, съдържащ информация за анализираната проба и електрофореграма, съдържаща ДНК секвенцията. Анализ на получените резултати извършихме с помощта на Codon Code Aligner (IN-COR Inc)

3.4.3.3. ЗАГУБА НА ХЕТЕРОЗИГОТНОСТ (LOH)

LOH анализа се основава напълно на принципите на микросателитната нестабилност и може да бъде доказан чрез използването на микросателитни маркери специфични за изследвания район, последван от фрагментен анализ. Провежда се PCR-базирана амплификация на ДНК, изолирана от нормална тъкан и ДНК, изолирана от туморна тъкан. Провежда се електрофоретично разделяне и визуализация на алелите. Анализът е информативен в случаите на хетерозиготно носителство. LOH се определя като намаляване на интензитета (височината и площта) на единия алел от амплифицирания продукт от туморната тъкан с поне 50% в сравнение с другия от нормалната тъкан.

Използвани реактиви и апарати, както и процедура виж т.3.4.7.

Принцип:

По време на настоящето изследване проект при един от пациентите мутацията в кодон 132 беше открита в хомозиготно състояние. Хомозиготна мутация в *IDH1* (R132G) досега е била установена при един случай на левкемия⁽⁴⁰⁷⁾ и само при едно изследване на мозъчни тумори⁽¹⁵⁵⁾. Откриването на хомозиготна мутация и в гена *IDH2* при друг пациент доведе до необходимостта за потвърждаването им. За изпълнението на настоящата цел бяха подбрани високо специфични и информативни микросателитни маркера, намиращи се от двете страни на изследваните райони (*Табл.3.15*) Микросателитният анализ включва изследване на няколко микросателитни маркера чрез PCR и автоматичен фрагментен анализ (виж т.3.4.7).

Първоначално беше проведена оптимизация на условията за PCR анализ чрез вариране концентрациите на MgCl₂, dNTPs, праймери и температурата на анилинг. В *Табл.3.14* са посочени секвенциите на използваните праймери и установените оптимални температури на анилинг за съответните ДНК фрагменти.

Таблица 3.15. Характеристика на избраните микросателитни маркери

Хромо- зома №	Маркер	D номер	Локус	Повтор	Хетерози- готност	Вр		GenBank номер
						Мин	Макс	
2	AFM266vc5	D2S325	<i>SLEB2, BP23 PIKFYVE</i>	-(CA)n-	0.81	190	214	Z23888
	AFMa351zd1	D2S2242	-	-(CA)n-	0.86	181	205	Z53007
	AFMa246xc5	D2S2208	<i>PLEKHM3</i>	-(CA)n-	0.88	164	196	Z52696
	AFM157xg9	D2S2178	<i>LOC710477</i>	-(CA)n-	0.60	167	181	Z51041
	AFMb297ya9	D2S2274	-	-(CA)n-	0.63	254	276	Z53413
15	AFMb027wd5	D15S996	<i>IQGAP1</i>	-(CA)n-	0.72	166	207	Z53142
	AFM078zf7	D15S116	-	-(CA)n-	0.86	164	184	Z16535
	AFM282wg5	D15S202	-	-(CA)n-	0.84	226	246	Z24009
	AFM224xe11	D15S127	-	-(CA)n-	0.85	114	147	Z17013

Таблица 3.16. Секвенции на праймерите и оптимални температури на анилинг (T_{an}) за всеки амплифициран ДНК фрагмент

Ген	Праймер	Секвенция	б.дв.	T_{an}
<i>IDH1</i>	D2S325_F	HEX 5'-AGCTTCAGAAATGCCGTTG-3'	202	55°C
	D2S325_R	5'-CCAGTCTTCAGAGATAACAGGG-3'		
	D2S2242_F	6-FAM 5'-GAGATAGCACCATTGCACC-3'	191	55°C
	D2S2242_R	5'-CCTGGCTGACAAGTGAAAC-3'		
	D2S2208_F	HEX-5'-CTATTTGTAACATGCGGGA-3'	174	55°C
	D2S2208_R	5'-AGCTAAGTACCTGCTCAGGAAA-3'		
	D2S2178_F	6-FAM 5'-AGCTCAGTAAACTCTCTAGTGAACA-3'	172	55°C
	D2S2178_R	5'-GAATAAATGTTTCTTCATTGCCC-3'		
<i>IDH2</i>	D2S2274_F	6-FAM 5'-AAGCTCTTTGTCTGTGGG-3'	254	55°C
	D2S2274_R	ACCTAATCAGGTCTCCATTG		
	D15S996_F	6-FAM 5'-GAAGGATGGTTTGAGCCC-3'	196	55°C
	D15S996_R	5'-ACTTAGGAATAATCATTACTGGCAT-3'		
	D15S116_F	HEX 5'-AGCTCCAACCTCCGCCCTCC-3'	178	55°C
	D15S116_R	5'-AGGGGTGTTACATCGCGGGT-3'		
	D15S202_F	HEX 5'-AACCTGGGTGGCACAGTGAG-3'	234	55°C
	D15S202_R	5'-CAGGACCTTGCACAGGC-3'		
	D15S127_F	6-FAM 5'-CCAACCACACTGGGAA-3'	128	55°C
	D15S127_R	5'-AACAGTTGCCACGGT-3'		

При поръчването на микросателитните праймери беше съобразено тяхното белязване с флуоресцентни багрила. Това са багрила, които при облъчване със светлина излъчват светлина с определена дължина на вълната. Белязането на праймерите беше съобразено така, че в една PCR реакция да може да се извърши амплифицирането на 3 или 4 фрагмента едновременно, както и на последващото им електрофоретично разделяне. За *IDH1* маркерите бяха оптимизирани да се провеждат в две реакции - в едната се амплифицират 2 маркера, а в другата 3 маркера. За разлика от тях четирите маркерите за *IDH2* бяха оптимизирани да се амплифицират и анализират в рамките само на 1 мултиплексна реакция. За всеки микросателитен маркер ДНК от туморната тъкан на един пациент се сравнява с ДНК от нормалната тъкан на същия пациент. Например за гена *IDH2* четирите маркера се амплифицират в една реакция за туморната ДНК и в друга за нормалната за всеки пациент.

Етапи:

- Изолитране на ДНК от нормална и туморна тъкан на един и същ пациент (виж.т.3.3.2)
- Провеждане на PCR реакция (виж т.3.4.1)

- Хоризонтална агарозна гел електрофореза (виж т.3.4.2)
- Фрагментен анализ (виж т.3.4.7)

3.4.4. MLPA(MULTIPLEX LIGATION- DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) АНАЛИЗ ЗА ТЪРСЕНЕ НА ЗАГУБИ В ХРОМОЗОМИ 1 И 19

Мултиплексният амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA) е количествен метод, който се използва за едновременна детекция на копийни варианти в максимум 50 различни ДНК последователности в една мултиплекс базирана полимеразна верижна реакция (MRC-Holland). Използваният от нас SALSA MPLA KIT P088-B1(lot 0608) и B2(0112) oligodendroglioma 1p-19q probmix съдържащи 43 MLPA сонди, в които се включват девет контролни фрагменти, четири количествени ДНК фрагмента (Q-фрагменти), три контролни фрагмента за денатурацията на ДНК (D-фрагменти), един X-фрагмент, един Y-фрагмент, контролни проби, специфични за други участъци от генома и хибридизационни проби за гените, намиращи се в 1p и 19q рамената.

Основните приложения на този метод са:

- Детекция на големи хромозомни пренареждания – дупликации и делеции;
- Откриване на промени в броя копия в субтеломерните региони и в хромозомите;
- Определяне на метилационния статус на различни гени;
- Количествено определяне на иРНК;

Използвани Реактиви и Разтвори:

Таблица 3.17. Реактиви, използвани при MLPA анализ

Използвани реактиви	Състав	Количество за 1 реакция (µl)
Денатурация	ДНК (30ng/µl)	1.65
	TE буфер	3.35
Хибридизация	SALSA пробмикс	1.5
	SALSA MLPA буфер	1.5
Лигазна реакция	Лигазен буфер А	3.0 µl
	Лигазен буфер В	3.0 µl
	Лигаза-65	1.0 µl
	dH ₂ O	25.0 µl
PCR амплификация	dH ₂ O	7.5 µl
	SALSA PCR праймерен микс	2.0 µl
	SALSA полимераза	0.5 µl
Фрагментен анализ	PCR	x µl
	LIZ 500	0.4 µl
	дейонизиран формамид	14-(x+0.4) µl

Използвана Апаратура:

- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders)
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

Принцип:

Анализът за търсене на големи делеции, засягащи 1p и 19q беше проведен с помощта на кит, разработени от фирмата MRC-Holland (Amsterdam, Holland): SALSA MLPA Probemix P088-B1/B2 Oligodendroglioma 1p-19q, съответно, следвайки инструкциите на производителя. Принципът на анализа се състои в подбор на специфични сонди, които хибридизират с участък

от геномната ДНК - обектът на изследване. Всяка т. нар. „проба” от кита се състои от два олигонуклеотида (сонди), като и двата съдържат последователности, комплементарни на определени участъци от интересувания ни ген в едната си част, а в другата – универсална секвенция. Двете сонди са подбрани така, че да хибридизират с прицелната геномна секвенция в непосредствена близост една до друга. Само когато и двете сонди хибридизират с таргентните им секвенции може да се извърши лигиране по време на лигазната реакция. След лигирането сондата става една молекула, която се амплифицира по време на PCR- реакцията. Всяка отделна сонда в MLPA пробмикса генерира ампликон с уникална дължина. Броят на лигираните продукти е показател за броя на таргентните секвенции. Пробите, които не са лигирали съдържат само единия праймер, те не могат да се амплифицират и не генерират сигнал.

Таблица 3.18. Подробна характеристика на пробите заложиени в кита P088-B2 отнасящи се за хромозоми 1 и 19

Дължина (нт)	SALSA MLPA проба	Ген / Екзон	Част от секвенцията (12нт преди и след лигиращото място)	Разстояние до следващата проба
Хромозома 1				
391	03062-L01761	TNFRSF4 / екзон 5	GCCGGCCAGCAA-TAGCTCGGACGC	0.61 Mb
178	02890-L07968	GNB1 / екзон 3	CTAAGATCGGAA-GATGAGTGAGCT	0.73 Mb
346	04693-L04071	TNFRSF14 / екзон 8	CAATACCCTCAT-TCACGGGGAGGA	1.08 Mb
328	01682-L01262	TP73 / екзон 1	GAGACCCGGGTG-TCAGGAAAGATG	4.41 Mb
454	02189-L02365	PARK7 / екзон 7	AGAGCAGCGAAC-TGCGACGATCAC	4.02 Mb
400	04885-L04269	MFN2 / екзон 10	CGCAGAAGGCTT-TCAAGTGAGGAT	16.37 Mb
319	01866-L01425	PTAFR / екзон 4	CATCTTCATCGT-GTTCAGCTTCTT	22.68 Mb
283	02877-L02344	FAF1 / екзон 4	GGACCTGCATTT-AATCCAGCAAGT	5.79 Mb
160	02876-L02343	PPAP2B / екзон 1	CCCCTTGGACTT-TAGAACGATTTA	3.34 Mb
337	02875-L02342	CYP2J2 / екзон 2	GGACCAAACTT-TGGGAACCGCCC	22.07 Mb
274	02872-L02339	LPHN2 / екзон 20	GATGCTTCATCT-TTAATGCACAGC	6.90 Mb
256	02871-L02338	GTF2B / екзон 2	CAGATGCGATTT-TAGTGGAGGACT	9.03 Mb
373	02870-L02337	DPYD / екзон 1	CTGCTGTCACCT-GGCTCTCTGGCT	16.89 Mb
474	01032-L00604	NRAS / екзон 5	TGATGGGACTCA-GGGTTGTATGGG	5.28 Mb
130	05745-L05183	NOTCH2 / екзон 5	GGGGTCAACACT-TACAACGTCCGC	34.04 Mb
центромер				
310	01917-L01461	LMNA / екзон 3	GGCTGCAGACCA-TGAAGGAGGAAC	41.22 Mb
427	06961-L06541	CRB1 / екзон 5	GGAATGTGTGGA-GCTGTCTCTCAGA	4.01 Mb
190	06557-L06115	TNNT2 / екзон 7	TTTGCTTCCTCT-TCTTCTTCATCT	
Хромозома 19				
142	02488-L02236	SMARCA4 / екзон 35	CGTCTTGACGTC-GGTCTTCACCAG	0.46 Mb
212	02314-L01805	LDLR / екзон 4	TCTGTGACTCAG-ACCGGGACTGCT	23.93 Mb
центромер				
166	02881-L02348	CCNE1 / екзон 11	GATGGTTCCATT-TGCCATGGTTAT	2.76 Mb
184	02882-L02349	PDCD5 / екзон 1	CGAGGAGCTTGA-GGCGCTGAGGAG	3.09 Mb
239	02883-L02350	UPK1A / екзон 4	GGATTGCCATCT-TCTGCGGCTTCT	5.69 Mb
364	02889-L02356	TGFB1 / екзон 3	GAGTGGTTATCT-TTTGATGTCACC	3.73 Mb
409	03221-L02651	ZNF296 / екзон 2	TCATGGACCACA-AGAAGCTGGGCT	3.80 Mb
220	02887-L02354	PPP1R15A / екзон 2	GATGTGGATAGT-GAGGATAAGGAA	0.08 Mb
301	00348-L00174	BAX / екзон 4	TCCCCCGAGAG-GTCTTTTCCGA	960 Mb
265	02705-L02853	CHMP2A / екзон 3	CCTCAAGATCCA-GACACTCAAGTC	

Нехибридизиралите проби не трябва да бъдат отстранявани, тъй като те не могат да бъдат лигирани и амплифицирани. При използване на голям брой проби, чиито амплификационни продукти са с различна дължина, те могат да бъдат амплифицирани в една единствена реакция и подложени на количествен анализ след разделяне на гел електрофореза⁽⁴⁰⁸⁾. В **Табл.3.18** и **3.19** са показани броя проби за изследваните гени в съответните хромозомни региони включени в кита от производителя, тяхното местоположение и секвенциите съответно в хромозома 1p и 19q, както и контролите разположени извън изследваните райони.

Таблица 3.19. Хибридизационни проби на SALSA MLPA P088-B2 Oligodendroglioma кута

Дължина (нт)	SALSA MLPA проби	Хромозомна позиция			
		контрола	1p	1q	19p 19q
64-70-76-82	Q-фрагменти: качество ДНК; видими само при по-малко от 100 ng количество на ДНК				
88-92-96	D- фрагменти: Слаби сигнали на 88 или 96 нт фрагмент показва непълна денатурация				
100	X- фрагмент: : Специфичен за X хромозомата				
105	Y- фрагмент: Специфичен за Y хромозомата				
130	NOTCH2 проба05745-L05183		1p12		
135	Контролна проба03972-L03359	9q21			
142	SMARCA4 проба02488-L02236			19p13.2	
148	Контролна проба 03267-L02704	3q29			
154	Контролна проба00580-L00145	8q24			
160	PPAP2B проба02876-L02343		1p32.2		
166	CCNE1 проба02881-L02348				19q12
171	Контролна проба04245-L03600	2p16			
178	GNB1 проба02890-L07968		1p36.33		
184	PDCD5 проба02882-L02349				19q13.11
190	TNNT2 проба06557-L06115			1q32.1	
202	Контролна проба01245-L00793	14q24			
212	LDLR проба02314-L01805			19p13.2	
220	PPP1R15A проба02887-L02354				19q13.33
230	Контролна проба02134-L01627	3p25			
239	UPK1A проба02883-L02350				19q13.12
247	Контролна проба02453-L01897	15q21			
256	GTF2B проба02871-L02338		1p22.2		
265	CHMP2A проба02705-L02853				19q13.43
274	LPHN2 проба02872-L02339		1p31.1		
283	FAF1 проба02877-L02344		1p32.3		
292	Контролна проба02524-L01955	17q11			
301	BAX проба00348-L00174				19q13.33
310	LMNA проба01917-L01461			1q22	
319	PTAFR проба01866-L01425		1p35.32		
328	TP73 проба01682-L01262		1p36.32		
337	CYP2J2 проба02875-L02342		1p32.1		
346	TNFRSF14 проба04693-L04071		1p36.32		
355	Контролна проба05665-L05117	8q13			
364	TGFB1 проба02889-L02356				19q13.2
373	DPYD проба02870-L02337		1p21.3		
382	Контролна проба01550-L00993	5q22			
391	TNFRSF4 проба03062-L01761		1p36.33		
400	MFN2 проба04885-L04269		1p36.22		
409	ZNF296 проба03221-L02651				19q13.32
418	Контролна проба02670-L02137	11q22			
427	CRB1 проба06961-L06541			1q31.3	
434	Контролна проба05290-L04670	14q22			
444	Контролна проба00678-L00124	12p13			
454	PARK7 проба02189-L02365		1p36.23		
463	Контролна проба03042-L02417	13q14			
474	NRAS проба01032-L00604		1p13.2		
481	Контролна проба01060-L00628	17q21			

Етапи (Фиг.3.2.):

- Денатурация на двуверижните молекули ДНК
- Хибридизация на SALSA MLPA сонди
- Лигиране на SALSA MLPA сонди
- Полимеразна верижна реакция - Намножаване на лигираните сонди чрез PCR
- Разделяне на амплифицираните продукти с капилярна електрофореза
- Анализ на данните

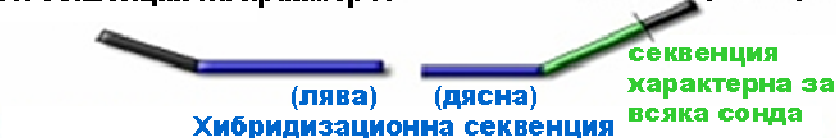
1. SALSA MLPA проби

Синтетичен олигонуклеотид
50-60 б.дв

Олигонуклеотид получен от M-13
60-450 б.дб.

PCR секвенция на праймер X

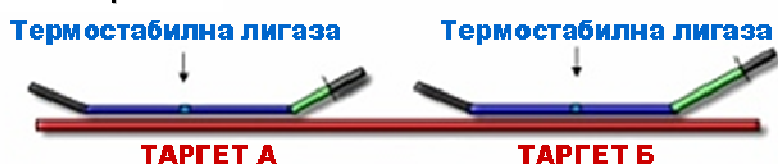
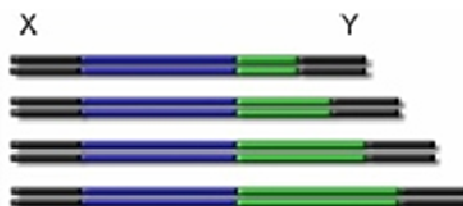
PCR секвенция на праймер Y



2. Хибридизация



3. Лигиране

4. PCR амплификация с универсални праймери X и Y
експоненциална амплификация само на лигираните проби

Фигура 3.2. Етапи при MLPA анализа: 1- SALSA MLPA проби; 2- Хибридизация на двете части на всяка проба към таргетните им секвенции на денатурираната ДНК. 3- Лигиране на пробите от термостабилна лигаза; 4- Амплификация – универсални праймери се използват за размножаване на всички лигирани проби

Процедура:

- Създават се разрезки от ДНК пробите, разтворени в dH₂O до 5 µl, краен обем, и крайната необходима концентрация е в обема - 50ng.
- Приготвените ДНК се денатурира претърпяват денатурация до 25 минути на 98°C, след което се охлаждат до 25°C
- Приготвя се смес от SALSA P088 пробмикса и MLPA буфера.
- Върху PCR апарата в епруветките се добавя хибридизационния микс от 3 µl. за всяка ДНК проба. Реакционната смес се инкубира със специфичните сонди, съдържащи проби специфични за 1p и 19q рамената проби
- Инкубиране за 20 минути на 54°C
- Превключване на подготвителната лигазната реакция програма
- Прибаване на 32 µl лигазна смес към всяка реакционна смес. След протичането на лигазната реакция, така получената реакционна смес на този етап може да се съхранява минимум една седмица на 4°C.
- В нова 0.2 ml PCR епруветка се приготвя PCR смес. Пробите се съхраняват на тъмно и на температура 4°C за една седмица или за по-дълго се съхраняват на -20°C. Програмите, при които бяха проведени по-горе изброените етапи по-подробно са описани в **Табл.3.20**.

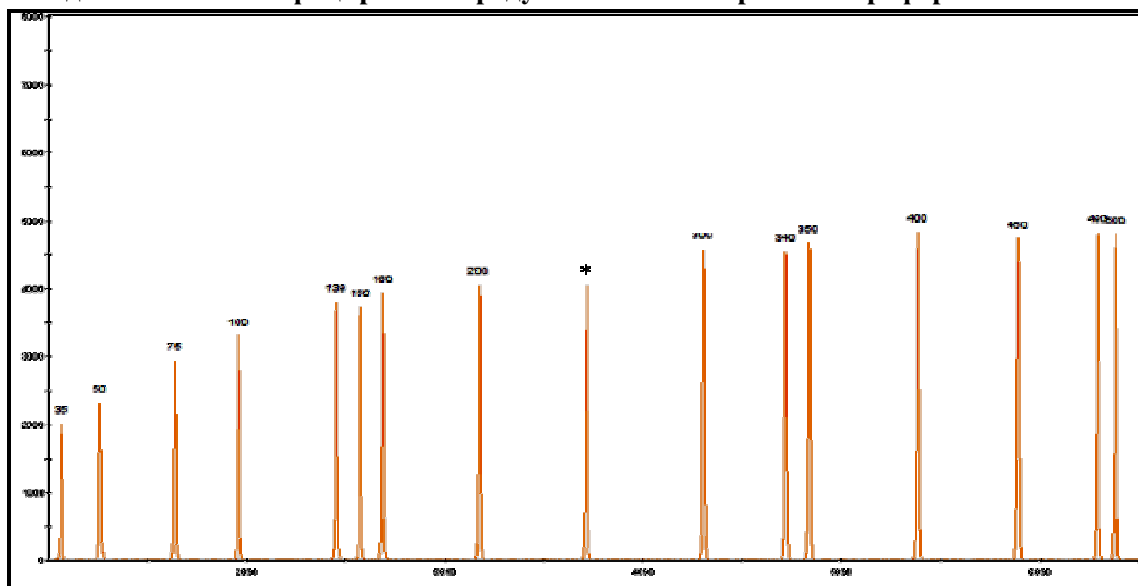
Таблица 3.20. Програми за провеждане на MLPA

Програми	Етап	Температура (°C)	Време
Денатурация	1	105	температура на капака на апарата
	2	98	20-25 мин.
	3	25	Изчакване/∞
*Хибридизация	1	105	температура на капака на апарата
	2	98	1 мин.
	3	60	16-18 часа
Подготовка на лигазната реакция	1	105	температура на капака на апарата
	2	54	5 мин
	3	54	изчакване/∞
Лигазната реакция	1	54	15 мин
	2	98	05 мин
	3	20	изчакване/∞
PCR програма	1	105	температура на капака на апарата
	2	95	10:00 сек
	3	95	00:30 сек
	4	60	00:30 сек
	5	72	01 мин
	6	72	20 мин
	7	15	изчакване/∞

} 35 цикъла

* времето на хибридизация не трябва да бъде по-малко от 16-18 часа (една нощ), за по-малко от 12 часа хибридизацията е непълна

- Разделяне на амплифицираните продукти с капилярна електрофореза



Фигура 3.3. Визуализация на броя и дължината на пиковите съдържащи се в GeneScan 500 LIZ[®]

Анализът на MLPA реакциите става с помощта на капилярна секвенционна гел електрофореза, като за определяне на размера на получените фрагменти, към всяка проба се прибавя вътрешен стандарт GeneScan 500-LIZ флуоресцентен стандарт с емисионен максимум 655nm за размер. Той се състои от 16 едноверижни ДНК фрагмента със следните размери: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 и 500 бази (Фиг.3.3).

Анализ на резултатите извършихме с помощта на софтуер - Coffalyser software V8.0. (MRC Holland) и Gene Mapper V4.0 (ABI)

3.4.5. АНАЛИЗ ЗА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА MGMT ГЕНА

3.4.5.1. СИСТЕМЕН ХОД:

1. Бисулфитно превръщане на геномна ДНК (т.3.3.4)
2. Анализ чрез топене с висока резолюция на ДНК (High Resolution Melting Analysis, HRMA)
3. Бисулфитно секвениране

3.4.5.2. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ТОПЕНЕ С ВИСОКА РЕЗОЛЮЦИЯ НА ДНК (HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS, HRMA)

Използвани реактиви

Таблица 3.21. Необходими реактиви за анализ

Етап	Компоненти на реакционната смес	Количество за една реакция(µl)
Провеждане на PCR	бисулфитна ДНК (20 ng/rnx)	x
	10x Буфер	2.5
	5 mM dNTP	0.5
	MgCl ₂	0.6
	Праймер F 10 pM	0.3
	Праймер R 10 pM	0.3
	Hot start Taq-полимераза 5 U/ µl	0.3
	dH ₂ O	19.9-x
	Syto 9	0.6
	Краен обем	25.0
Контроли на PCR продукт	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) -100% метилирана(Qiagen)	x
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl)(Qiagen) 50% метилирана	0.4
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) 100% неметилирана(Qiagen)	13.6-x

Използвана апаратура:

- Апарат за PCR-амплификация в реално време RotorGene 6000 (Qiagen).
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders)

Принцип:

Методът се базира на факта, че едноверижни ДНК фрагменти (носеци или не мутация), които се различават дори по един нуклеотид, формират различни конформационни структури. Тези ДНК фрагменти с различна конформация се движат с различна скорост в електрофоретично поле и по този начин могат да бъдат идентифицирани.

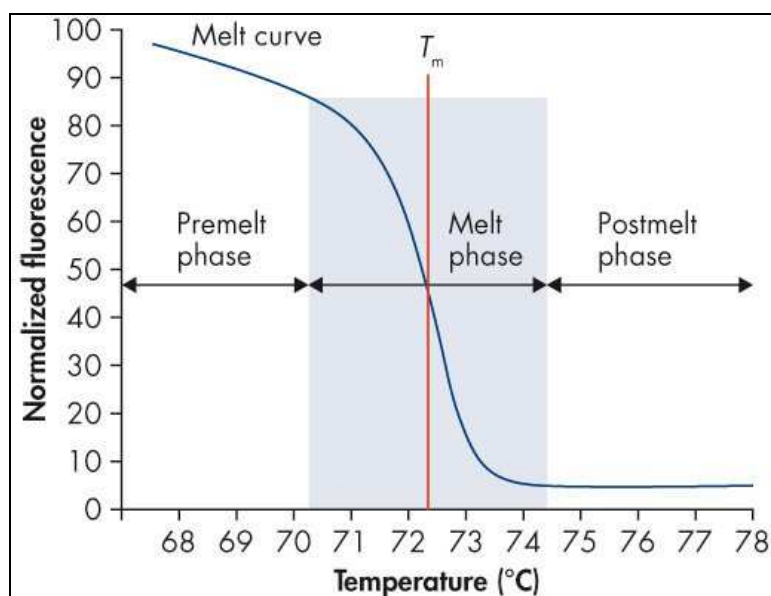
Анализът чрез топене с висока резолюция (HRM) представлява високо ефективен и бърз метод за детекция на мутации, полиморфизми и епигенетични промени в двойно - верижната структура на ДНК. Първоначално е бил разработен за SNP генотипиране⁽⁴⁰⁹⁾, но в последствие набира широка популярност и за идентифициране и на друг вид генетични аберации. Тази техника се основава на поведението на дисоциация на ДНК в резултат на постепенно повишаване на температурата. Профилът на топене на ДНК зависи от съдържанието на цитозин и гуанин и общото разпределение на базите в нуклеотидната секвенция. Районите, които са богати на аденин и тимин, се топят по-бързо, в сравнение с тези, които са богати на цитозин и гуанин.

Таблица.3.22. Основни класове единични базови замени и процентното им разпределение в човешкия геном

Клас SNP :	Базова замяна:	Разлика в температурата на топене на хомозиготните проби:	Процентно разпределение при човек:
I	C/T и G/A	Голяма: $>0.5^{\circ}\text{C}$	64%
II	C/A и G/T		20%
III	C/G		9%
IV	A/T	Много малка: $<0.2^{\circ}\text{C}$	7%

При анализа чрез топене с висока резолюция прицелният участък от геномната секвенция се генерира чрез амплификация и след това се подлага на топене при условия на постепенно повишаване на температурата в малки интервали от време. Подобно на много PCR техники в реално време, HRM използва способността на някои багрила да флуоресцират без да инхибират PCR реакцията, когато са инкорпорирани в двойноверижна ДНК⁽⁴⁰⁹⁾. SYTO 9 представлява ново поколение флуоресциращо багрило, което се интеркалира в двойноверижната структура на ДНК. SYTO 9 може да се използва във високи концентрации без да повлияе протичането на реакцията, като показва еднаква склонност за свързване с области, богати на гуанин/цитозин и аденин/тимин, без предпочитания към типа последователност. Това превръща SYTO 9 в най – подходящото флуоресциращо багрило за HRM анализи на различни амплификационни продукти.

При провеждане на анализа, температурата се увеличава постепенно от ниска към висока. Флуоресценцията на третото поколение флуоресциращо багрило (SYTO 9) се измерва непрекъснато и се представя графично като функция от температурата. Повишена флуоресценция се измерва само тогава, когато багрилото е свързано с ДНК. При по-ниски температури флуоресценцията е висока, тъй като ДНК е двойноверижна. При повишаване на температурата ДНК започва да се денатурира в резултат на топене на двойноверижната структура. При този процес багрилото се освобождава и флуоресценцията постепенно намалява. При анализиране на резултатите температурата на топене (T_m) на дадена проба се наблюдава в т. нар. фаза на топене. При тази фаза промяна във флуоресценцията е най-голяма. Когато ДНК се стопи напълно, се наблюдава рязък спад в нивото на флуоресценцията (Фиг.3.4).



Фигура 3.4. Основни фази при топенето на двойноверижна ДНК. Синята крива показва типичен профил на топене на ДНК. Във фазата на топене се измерва T_m – температурата на топене

Промяната във флуоресценцията на багрилото е показател за увеличаването на концентрацията ДНК по време PCR реакцията, а също така се използва и за проследяване профила на топене на ДНК по време на HRM анализа. HRMA дори позволява откриването на много фини разлики между две ДНК секвенции ниво дори само един нуклеотид.

Едно от приложенията на HRM технологията е за анализ на метилиране чрез сравняване на профилите на топене на неизвестни проби с профилите на напълно метилиран и неметилиран модели амплифицирани след бисулфит модификация. Методът включва обработка на изолираната ДНК с натриев бисулфит, което беше извършено с Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek). При тази реакция неметилираният цитозин в ДНК се превръща в урацил, докато метилираният цитозин се запазва, т.е. получават се различни ДНК последователности. Следва амплификация чрез PCR с помощта на праймери, специфични за изследвания промоторен район, но с минимален брой CG последователности (**Табл.3.23**).

Таблица 3.23. Секвенции на праймерите за MS HRM и оптимални температури на анилинг (T_{an}) за метилираната и неметилираната контролна ДНК.

Праймер MS-HRM	Секвенция	Вр	T_{an}
<i>MGMT_HRM_F</i>	5'- GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT -3'	115	59°
<i>MGMT_HRM_R</i>	5'- AACGACCCAAACACTCACCAAA -3'		C

Този процес напълно следва етапите и процедурите на полимеразната верижна реакция (виж т.3.4.1). Програмата на MS-HRM анализа е:

- начална денатурация 95°C - 5 мин.
 - 95°C - 10 сек.
 - 61°C - 20 сек.
 - 72°C - 20 сек.
 - краен синтез 72°C - 2 мин.
 - HRM 65-90°C – 0.1°C/сек
- } 40 цикъла

3.4.5.3. БИСУЛФИТНО СЕКВЕНИРАНЕ

MS-HRM дава информация за наличието на метилирането в изследваните ДНК-и като цяло, но чрез него не може да се установи точно кои CpG места са засегнати. Потвърждаването на резултатите от MSP може да се извърши с помощта на бисулфитно секвениране. Този процес напълно следва принципите, етапите и процедурите на директното секвениране, както и използваните апарати и реактиви. Разликата от директното секвениране, описано в т.3.4.3.2, е вида на използваната ДНК матрица, която при директното секвениране е геномна, докато при бисулфитното е вече бисулфитно превърната чрез обработка с натриев бисулфит. Така се получават различни секвенции за метилираната и за неметилираната ДНК.

3.4.6. АНАЛИЗ ЗА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ

Използвана апаратура:

- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Устройство за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

Използвани реактиви

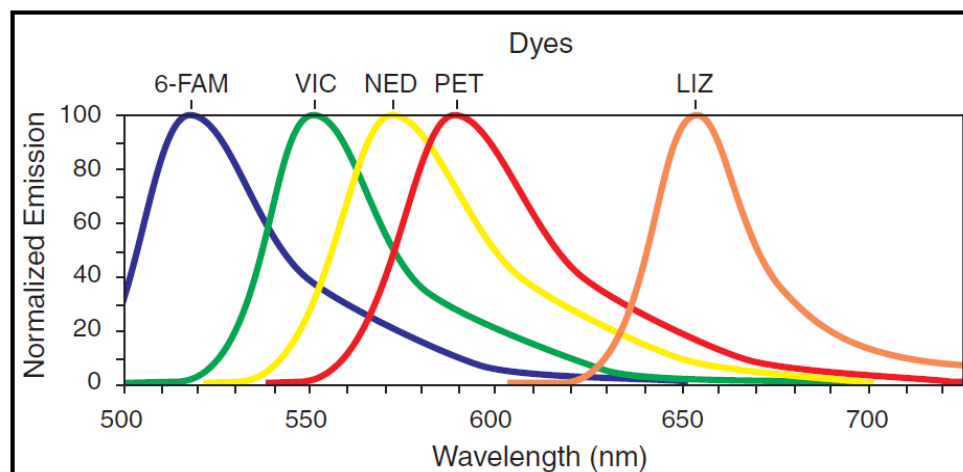
Таблица 3.24. Необходими реактиви за анализ на микросателити

Етап	Компоненти на реакционната смес	Количество за една реакция(µl)
Провеждане на PCR	ДНК 30 ng/µl	1.0
	Буфер 10x (+MgCl ₂)	1.0
	Праймер F 10 pM	0.5
	Праймер R 10 pM	0.5
	dNTP 5 mM	0.2
	Hot start Taq-полимераза 5 U/ µl	0.05
	dH ₂ O	6.75
	Краен обем	10.0
Фрагментен анализ	PCR-продукт	x
	LIZ 500	0.4
	Формаид	13.6-x
	Краен обем	14.0

Принцип:

Микросателитният анализ включва изследване на няколко микросателитни маркера чрез PCR и автоматичен фрагментен анализ. За всеки микросателитен маркер туморната тъкан на един пациент се сравнява с нормалната тъкан на същия пациент. Промяната в дължината на микросателита се означава като микросателитна нестабилност.

Анализът за микросателитна нестабилност беше извършен с помощта на панел от 5 маркера (BAT26, D5S346, D18S35, D2S123 и FGA), разположени в различни участъци на генома. Всеки маркер се амплифицира с помощта на двойка праймери, от които праймерът за амплификация в права посока (forward) е флуоресцентно белязан в 5'-края. Това дава възможност за отчитане на амплифицираните продукти чрез автоматичен фрагментен анализ.



Фигура 3.5. Емисионни спектри на най-често използваните флуоресцентните багрила

Етапи:

- Амплификация чрез PCR технология ;
- Тестване на амплифицираните продукти на 2%-ен агарозен гел;
- Разделяне на амплифицираните продукти чрез използване на флуоресцентна автордиография на автоматичен секвенатор (ABI Prism 3130 xl – Applied Biosystems) или Фрагментен анализ;
- Обработка на получените резултати;
- Отчитане на туморите, показали микросателитна нестабилност по изследвания маркер;

Процедура:

➤ Амплификация чрез PCR технология;

В проведените експерименти по оптимизиране на условията за PCR последователно бяха променени три основни параметъра:

- концентрация на $MgCl_2$;
- температура на анилинг;
- време за синтез;
- концентрация на праймерите и дезоксинуклеотидите, което доведе до специфично амплифициране на изследваните маркери (D18S35, D5S346, BAT26, D2S123 и FGA). Реакционната смес включва посочените в **Табл.3.24** реактиви. В **Табл.3.25** са посочени секвенциите на праймерите, използвани за микросателитния анализ.

Таблица 3.25. Секвенции на праймерите за микросателитен анализ

Маркер	Секвенции на праймерите	н.дв.	Т°С
<i>D5S346</i>	F: 5'-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG-3' R: 5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGTT-3'	100 - 130	56-60°C
<i>BAT26</i>	F: 5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' R: 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'	115 - 119	56-58°C
<i>D18S35</i>	F: 5'-AGC TAG ATT TTT ACT TCT CTG-3' R: 5'-CTG GTT GTT GTA GAT GCC TGA-3'	138 - 156	59-63°C
<i>D2S123</i>	F: 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' R: 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'	194 - 224	58-60°C
<i>FGA</i>	F: 5'-CCATAGGTTTTGAACTCACAG-3' R: 5'-CTTCTCAGATCCTCTGACAC-3'	164 - 224	59-63°C

- Провеждане на 2%-на агарозна електрофореза с цел установяване наличие на продукт с очакваната дължина на фрагментите.

- Фрагментен анализ - Разделяне на амплифицираните продукти чрез използване на флуоресцентна капилярна електрофореза на автоматичен секвенатор (ABI Prism 3130 xl – Applied Biosystems); При приготвянето на сместа за фрагментен анализ (**Табл.3.24**) трябва да се съобрази силата на PCR продукта, детектиран с агарозна електрофореза. В много случаи е необходимо да се направи разреждане на PCR продукта с дестилирана вода, за да може апаратът правилно да отчете сигнала.

- Определяне на големината на алелите и сравняване между контролните ДНК, изолирани от кръв или нормална чревна тъкан с тези от туморната тъкан. Анализът беше извършван с помощта на GeneMapper Software.

- Обработка на получените резултати.

При анализа освен микросателитна нестабилност може да се отчете и загуба на хетерозиготност (LOH) като загубата на алел може да бъде установена чрез пресмятане на съотношенията между височините на пиковете на нормалните и туморни алели, при повтори, които са хетерозиготни в нормалната проба. Изчислението се прави по следната формула:

$$LOH = \frac{\frac{\text{(Височина на пика на нормален алел 2)}}{\text{(Височина на пика на нормален алел 1)}}}{\frac{\text{(Височина на пика на туморен алел 2)}}{\text{(Височина на пика на туморен алел 1)}}}$$

Наличие на LOH се наблюдава при отношение по-малко от 0.5 и повече от 2.0: $0.5 > LOH > 2$

3.4.7. ГЕННО-ЕКСПРЕСИОННИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ПОДБРАНИ ГЕНИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ ПРИ ГЛИАЛНИ ТУМОРИ

3.4.7.1. СИСТЕМЕН ХОД

- Изолиране на тотална РНК (виж т.3.3.5);
- Провеждане на обратна транскрипция и синтез на кДНК (виж т.3.3.6);
- Провеждане на PCR в реално време;
- Генно-експресионен анализ

3.4.7.2. PCR В РЕАЛНО ВРЕМЕ (REAL-TIME PCR)

Използвани реактиви

Таблица 3.26.

Етап	Компонент	Количество (µl) за една реакция
Приготвяне на 10xQuantiTect Primer Assay	TE буфер (pH=7.4)	1100
	лиофилизиран QuantiTect Primer Assay	-
PCR в реално време	2X QuantiTect SYBR Green Reaction Mix	5
	10X QuantiTect Primer Assay	1
	кДНК (50ng/µl)	1
	Nuclease-free H ₂ O	3
	Общо	10.0

Използвани апаратура

- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- Устройство за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems);

Принцип:

Полимеразната верижна реакция (PCR) е един от най-мощните технологии в молекулярната биология. Използването на PCR, специфични последователности в ДНК или кДНК матрица могат да бъдат копирани или "амплифицирани", много хиляди до милиони пъти. В традиционния PCR, качествено и количествено определяне на амплифицираната последователност се извършва в края на PCR реакцията след последния цикъл, с помощта на гел електрофореза с етидиев бромид, който обикновено предотвратява по-нататъшно PCR намножаване и анализ на изображението. Техниката количествен PCR в реално време е разработена подобрявайки някои от недостатъците на традиционния PCR, като количеството на ДНК се измерва след всеки цикъл чрез използването на флуоресцентни маркери, които са включени в PCR продукт. Увеличението на флуоресцентен сигнал е правопрпорционален на броя на двойно-верижна ДНК молекули (ампликони) генерирани в експоненциална фаза на PCR реакцията. Флуоресцентни репортери се инкорпорират само в двойно-верижна ДНК или са молекули, свързани с PCR праймери или сонди, които впоследствие стават част от новосинтезирания продукт. Промяна във флуоресценцията по време на реакцията се определя чрез инструмент, който комбинира термични цикли с възможност за флуоресцентно сканиране. Чрез построяване на флуоресценция срещу номера на цикъла, в реално време PCR инструмент генерира графика на намножаването (amplification plot), която визуализира натрупването на PCR продукт за периода на действие на цялата PCR реакцията.

Етапи:

- Провеждане на PCR в реално време;
- Генно-експресионен анализ

Процедура:**➤ Провеждане на PCR в реално време**

1. Разтваряне на праймерите за съответните гени в предварително подготвен *ex tempore* TE буфер с рН=7.4.
2. Приготвяне на real-time PCR микс
3. В PCR в реално време реакциите концентрацията на кДНК се унифицира до 200ng за всяка.
4. Проведе се генно-експресионен анализ на 14 гена *CAIX*, *EGFR*, *FLT-1*, *HIF1a*, *HIF2a*, *HIF3a*, *KDR*, *MMP9*, *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *TGF-β2* и *VEGFA* и два гена ендогенни контроли – *TBP* и *GAPDH*, при група от туморни тъкани (59 мозъчни тумора) в сравнение с контролна група от периферна не съдържаща туморна мозъчна тъкан (14 тъканни проби от пациенти с мозъчен тумор). За всеки ген в серията бяха заложени и по три негативни контроли, при които кДНК се замества с RNase-free вода.
5. Извършване на PCR в реално време с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) според следната програма:

Таблица 3.27.

Стъпки	Температура°C	Време (мин)
Първична денатурация	95°C	10
Денатурация	95°C	0:15
Хибридизация/Синтез*	60°C	1

} 45 цикъла

* събиране на информация за флуоресценцията за всеки цикъл

➤ Генно-експресионен анализ

Методът се базира на принципите на Real-Time PCR, който позволява прецизно количествено определяне на кДНК по време на амплификационната реакция чрез проследяване на количеството на флуоресцентно багрило - SYBR Green I. С него се отчитат всички двойноверижни ДНК продукти на реакцията, като с продуцирането на нови двойноверижни ампликони флуоресцентният сигнал на SYBR Green багрилото нараства.

Количественият анализ се състои в измерване на количеството на определена нуклеинова киселина по време на циклите на амплификация. Това се осъществява с помощта на софтуерът SDS v.2.2.2 предназначен за използване с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Софтуерът използва $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метод за относителната оценка на експресията. За всеки изследван ген изчислява:

$$\Delta C_t = C_t (\text{ген}) - C_t (\text{енд.к.}), \text{ където енд.к.} - \text{ендогенна контрола}$$

Това се прилага с цел по-точна количествена оценка на информационната РНК като така се компенсират разлики в тоталната РНК, добавена към реакцията. Стойността за C_t (енд.к.) се определя от софтуерът за експресията на гените *TBP* и *GAPDH* подбрани да бъдат използват като ендогенни контроли.

Методът дава възможност за сравнение на няколко групи проби – в случая две групи от тумори (тумори с четвърти стадий и такива с втори-трети стадий) с група от контроли (нормални тъкани). За всяка група се изчислява:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{експ.гр.}) - \Delta C_t (\text{контр.гр.})$$

Накрая за всеки ген се калкулира колко пъти е променена експресията (fold change или Relative Quantification-RQ) на експерименталната в сравнение с контролната група. Прилага се формулата:

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Ако последната стойност е над 2.000 тя се представя като положителна промяна в експресията (повишение, fold upregulation) на съответния ген. Ако е под 0.500 промяната е с отрицателна стойност (понижение в експресията, fold downregulation) и се изчислява по формулата $-1/2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.4.8. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ (aCGH) ПРИ ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ

Генетичните промени като точкови мутации, CNV на участъци от генома и структурни промени (напр. генно-фузионните събития) са отличителни характеристики на раковите заболявания. CNV възникват като соматични промени в генома на туморните клетки чрез различни механизми и могат да бъдат наблюдавани в различна степен в почти всички видове ракови заболявания. Досега, най-често използваните методи за откриване на CNV са техниките хромозомна и микрочипова CGH ⁽⁴¹⁰⁾. В настоящата работа беше използвана една от най-широко разпространените микрочипови платформи – олигонуклеотидни микрочипове.

Използвани реактиви:

Таблица 3.28.

Етап	Компонент	Количество (µl) за една реакция
Подготовка на ДНК пробите	геномна ДНК (0.2-1 µg)	26.0
	dH ₂ O	
	Случайно избрани праймери	5.0
Cy3 и Cy5 Белязване на ДНК	5x Реакционен буфер	10.0
	10x dNTP	5.0
	Cy3- dUTP или Cy5-dUTP	3.0
	Ехо (-) Klenow	1.0
	Краен обем	19.0
Пречистване на белязаните ДНК-и MinElute PCR	PB Буфер	250
	PE Буфер	750
	EB Буфер	21
Хибридизационна реакция	Cy3/Cy5 геномна ДНК смес	39.0
	Cot-1 ДНК (1 mg/ml)	5.0
	Agilent 10x блокиращ агент	11.0
	Agilent хибридизиращ буфер	55.0
	Краен обем	110.0
Микрочип	Agilent SurePrint G3 Човешки CGH	
	Микроарей 4x180K	-
Промиване	Agilent Oligo aCGH Миеш Буфер 1	600 ml
	Agilent Oligo aCGH Миеш Буфер 2	300 ml
	ацетонитрол	300 ml

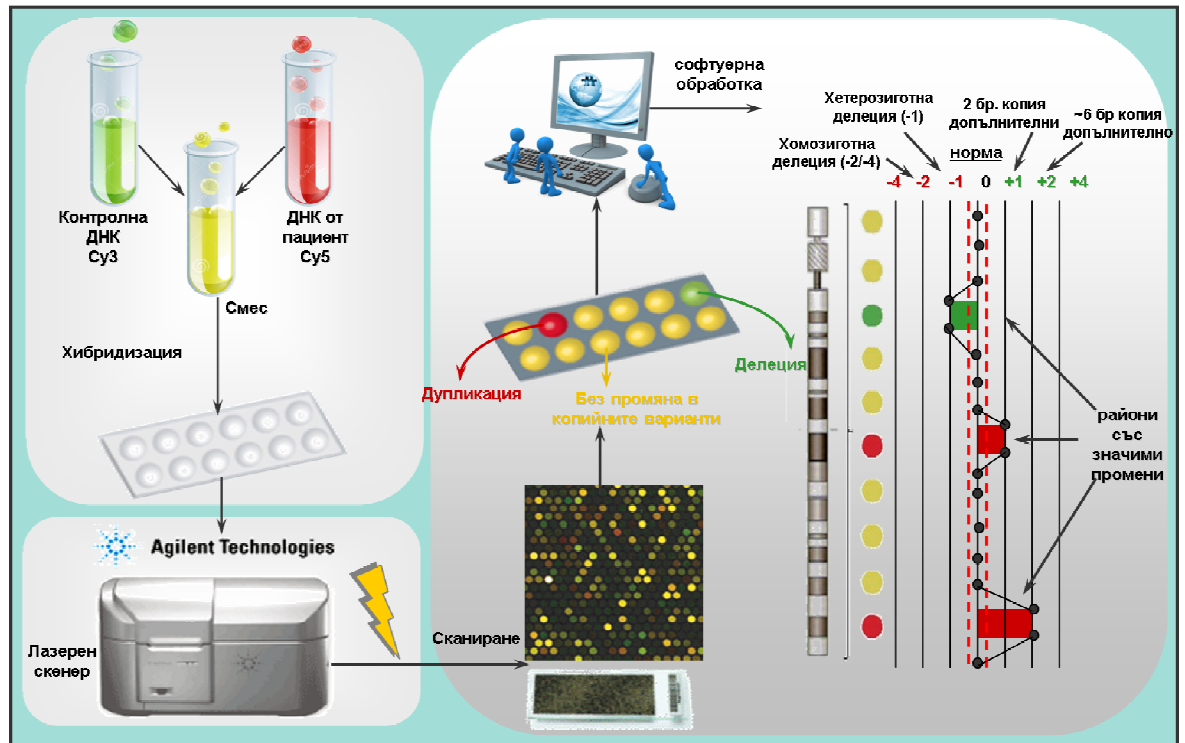
Използвана апаратура:

- Микрочипов скенер G2565CA (Agilent Technology)
- Хибридизационна камера с въртящ ротоп (Agilent Technology)
- Магнитна бъркалка (x1 or x3) (Thermo Scientific)
- Магнитна бъркалка с възможност за нагряване
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Ледогенератор модел B20A (Fiochetti)
- Устройство за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- Таймер
- Десикаторна кутия

Принцип:

Сравнителната геномна хибридизация беше извършена с консумативи, реактиви, апарати (хибридизационна камера и скенер) и по протокол на производителя Agilent (<http://www.agilent.com/>). Използвани бяха олигонуклеотидни микрочипове, формат 4x180K (Agilent, Санта Клара, САЩ), с гъстота 180 880 секвенции, покриващи целия геном с резолюция 13 Kb (килобази). Human Genome CGH микрочиповете имат четири отделни полета

за хибридизация, даващи възможност за едновременен анализ на четири проби върху един чип. При настоящата работа срещу всяка туморна ДНК е хибридизирана нормална ДНК от индивид от същия пол. Контролната (референтна) проба е ДНК от здрави индивиди от европейски произход и пол съответстващ на този на съответния пациент, осигурена от производителя Agilent. Всеки чип има уникален бар код в долната част на стъклото (Фиг.3.6)



Фигура 3.6. Схематично представяне на метода сравнителна геномна хибридизация

С помощта на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация пациентите бяха изследвани за наличие на големи геномни реорганизации - дупликации, делеции или инверсии. Този метод се основава на конкурентна хибридизация на алтернативно белязани с различни флуорохроми туморна и нормална ДНК, със синтетично синтезирани 60-мерни олигонуклеотидни ДНК секвенции комплементарни на кодиращи и не-кодиращи секвенции от генома. С помощта на сканираща система се документират и анализират получените данни за интензитета на светене на двата различни флуорохрома – Cy3 за пациента/туморна проба и Cy5 за референтната проба. Проследяването на разликите в интензитета и вида на оцветяването за всеки отделен участък от хромозомата позволява установяването на промени в генетичния материал на туморните клетки по отношение на нормалните, в определени участъци от генома на болните.

Етапи:

- ДНК изолиране (виж т.3.3.2)
- Подготовка на ДНК пробите
- Белязане на ДНК пробите с флуорохромни багрила
- Пречистване и комбиниране на белязаните ДНК проби
- Хибридизационна реакция
- Промиване на микрочиповете
- Сканиране на микрочиповете
- Софтуерен анализ на данните

Процедура:

- Подготовка на ДНК пробите

1. Записва се A260/A280 и съотношенията A260/A230. Пробите с високо качество на геномната ДНК имат съотношение:

- A260/A280 от 1.8 до 2.0, което показва отсъствие на замърсявания с белтъци,
- A260/A230 да е >1.8, което показва отсъствие на замърсявания със захари и други онечистващи съединения

2. Приготвяне на разтвор от висококачествена геномна ДНК (обща концентрация в разтвора 500ng/ μ L) и свободна от нуклеази вода с общ обем от 26 μ L.

• Флуоресцентно белязване на ДНК

1. Центрофугиране на 6 000×g за 1 minute - за събиране на съдържимото от капака и стените в дъното на епруветките

2. Прибавяне на 5 μ L Random Primer към всяка от реакционните епруветки, съдържащи избраното количество геномна ДНК и свободни от нуклеази вода с общ обем 26 μ L и достигане на обем 31 μ L. Оптималната програма на PCR апарата необходима за протичането на реакцията е както е посочено в **Табл.3.29** – подготовка за белязване на ДНК.

3. Центрофугиране на 6 000×g за 1 мин. - за събиране на съдържимото от капака и стените в дъното на епруветките.

4. За 4x180K микрочип на лед се приготвя се един Cy3 и един Cy5 микс за белязване, в съотношение както следва в **Табл.3.28**.

5. Прибавяне на 19 μ L от Cy3 или Cy5 микса за белязване към съответната геномна ДНК (достигане на общ обем 50 μ L. Внимателно смесване.

6. Инкубация на пробите. Оптималната програма на PCR апарата необходима за протичането на реакцията е както е посочено в **Табл.3.29** - белязване на ДНК.

Таблица 3.29.

Програма	Стъпка	Температура°С	Време
Подготовка за белязване на ДНК	1	95	10 мин
	2	4	изчакване
	3	на лед	5 мин
* Белязване на ДНК	1	37	2 часа
	2	65	10 мин
	3	4	изчакване

* Реакционната смес може да се съхранява на -20°С на тъмно до 1 месец

• Пречистване на белязаните ДНК проби (MinElute PCR Purification Kit)

Този кит е създаден да пречисти двойно-верижна ДНК фрагментите от PCR реакционната смес водещо до по-висока финална концентриране на ДНК в определен обем. С помощта на кита MinElute намножените ДНК фрагменти, с дължина варираща от 70 bp до 4 kb, се пречистват от праймери, нуклеотиди, полимераза и соли налични в PCR реакционната смес.

1. Прибавяне на 5 обема РВ към 1 обем PCR реакция -250 μ L от Буфер РВ към 50 μ L PCR.

2. Прехвърляне на съдържимото върху MinElute колоните и центрофугиране на 13 000 rpm за 1 мин.

3. Течността от колекторната епруветка се изхвърля. Колонката се връща обратно в микроцентрифужна епруветка.

4. Прибавяне на 750 μ L Буфер РЕ върху MinElute колонката и центрофугиране на 13 000 rpm за 1 мин.

5. Течността от колекторната епруветка се изхвърля и колонката се връща обратно в микроцентрифужна епруветка. Центрофугирана на колонката допълнително 1 мин. на максимална скорост.

6. Прехвърляне на MinElute колонката в чиста 1.5 ml микроцентрифужна епруветка.

7. За елуиране на ДНК, прибавяне на 10.5 μ L Буфер ЕВ (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) или вода в центъра на мембраната на колонката, инкубиране за 1 мин, и следващо центрофугиране на 13 000 rpm за 1 мин.

8. Повторение на последната стъпка.

9. Количествен и качествен анализ на флуоресцентно белязаните продукти чрез NanoDrop ND 2000. Използване на 1.5µl от всяка от получени пречистени флуоресцентно белязани геномни ДНК. Измерване на абсорбцията при дължини на вълните **A260nm** (за ДНК), **A550nm** (за цианин 3 - Cy3), и **A650nm** (за цианин 5 – Cy5).

10. Определяне на:

- добив на флуоресцентно белязана ДНК;
- степента на белязване;
- специфична активност (СА) $СА = \text{pmol флуоресцентно багрило} / \mu\text{g геномна ДНК}$

Таблица 3.30. Очакван добив и СА след флуоресцентното белязване и пречистяване на ДНК

Изходно количество геномна ДНК (µg)	Добив (µl)	СА на Cy3 белязаните проби (pmol/ µg)	СА на Cy5 белязаните проби (pmol/ µg)
0.2 – 0.5	2.5 – 3	15 - 25	15 – 20
0.5	5 – 7	25 - 40	20 – 35
3.0	7 - 10	35 - 55	25 - 40

11. Смесване остатъка от количеството (19.5µl) на Cy3 белязаните ДНК-и на пациентите с остатъка от количеството (19.5µl) на Cy5 белязаните контролно ДНК-и получаване на смес с обем 39µl. Белязаните ДНК-и могат да се съхраняват на тъмно и на -20°C до един месец.

• **Подготовка на белязаните геномни ДНК-и за хибридизация**

1. Приготвяне на хибридизационния микс в 1.5 ml епруветка както следва в **Табл.3.28**.
2. Прибавяне на 71 µl от хибридизационния микс към всяка от епруветките съдържащи по 39 µl смес от Cy3 белязана ДНК на пациент и Cy5 белязаната контролна ДНК
3. Смесване на пробите чрез пипетиране. Бързо центрофугиране за събиране на съдържимото в дъното на епруветките.
4. Поставяне на хибридизационните смеси в PCR апарат с нагласена програма, както следва:

Таблица 3.31.

Стъпка	Температура°C	Време (мин)
1	95	точно 3
2	37	30

5. Центрофугиране на 14 000×g за 1 мин. за събиране на съдържимото в дъното на епруветките. Така пробите са готови за процеса на хибридизация

• **Хибридизационна реакция**

Всеки микрочип е принтиран върху страната на стъклото притежаващо надписа „Agilent”. Тази страна се нарича „активна”. Страната от стъклото с изписан бар код върху него е „неактивната” страна на микрочипа.

1. Поставяне на нов SureHyb покривно стъкло върху едната част на металната хибридизационна камерка. Гумените уплътнения и надписа „Agilent” на SureHyb покривното стъкло да са нагоре и достъпни;
2. Накапване на 100 µl от хибридизационната реакция последователно върху всяко от полетата на SureHyb покривно стъкло;
3. Поставяне на Agilent SurePrint G3 Човешки CGH 4x180K чип с надписа „Agilent” гледащ надолу към надписа „Agilent” на SureHyb покривно стъкло (с „активната” страна надолу)
4. Поставяне върху получилия се „сандвич” на втората част (капак със стяга) от металната хибридизационна камерка. Затягане силно на двете части на металната хибридизационна камерка.
5. Вертикално ротиране на сглобения „сандвич” за осигуряване на достъп на течността до цялото поле и премахване неподвижните балончета, ако има такива.
6. Хибридизация на сглобения „сандвич” в хибридизационния инкубатор с въртящ ротор за 24 часа на 65°C температура и въртене 20 rpm.

• *Промиване*

Таблица 3.32.

Съд №	Стъпка	Буфер	Температура°C	Време (мин)
1	разделяне	1	СТ	-
2	1-во промиване	1	СТ	5
3	2-ро промиване	2	37°C	1
4	изсушаване	ацетонитрил	СТ	0.30

1. Измиване няколкократно на всяка стъклена кювета (съд за промиване), бъркалка, пинсета или друг атрибут използван при промиването с 18мΩ дейонизирана H₂O.
2. Подготвяне на съд за промиване № 1 и 2 с Миещ буфер 1 на стайна температура (СТ).
3. Премахване на камерката от хибридикационния инкубатор.
4. Поставяне на металната хибридикационна камерка на равна повърхност и отварянето ѝ.
5. Преместване на сандвича чип-покривно стъкло от камерката в съд за промиване № 1
6. Отстраняване на покривното стъкло от чипа с помощта на пинцета.
7. Поставяне на чипа в съд за трансфер на чипове, имащ гнезда за миене на до 10 чипа. Поставяне на съда за трансфер на чипове в съд за промиване 2, намиращ се на магнитна бъркалка със средна скорост на разбъркване и изолиран от светлина. Продължителност на миенето 5 мин.
8. Преместване на съда за трансфер на чипове от съд за промиване 2 в съд за промиване 3, съдържащ Миещ буфер 2, предварително стоял една нощ на 37°C. Съдът за промиване се намира на магнитна бъркалка с подгряваща функция, средна скорост на бъркане, и изолиран от светлина. Продължителност на миенето 1 мин.
9. Преместване на съда за трансфер на чипове от съд за промиване 2 в съд за промиване 3, съдържащ ацетонитрил за 30 сек. Премахване на съда за трансфер на чипове от течността и поставяне на чипа с надписа „Agilent” към вътрешността на специализирания държач на чипове, който се поставя в скенера.
10. Незабавно сканиране на чипа – сигналите се редуцират под влияние на светлина и озон

• *Условия на сканиране*

Таблица 3.33.

Характеристика	Условие
Сканиран район	61 x 21.6 mm
Резолуция	3 µm
Сканиране на лазерни канали	Червен и Зелен
PMT на зелено багрило	100%
PMT на червено багрило	100%
XDR	Без XDR

• *Анализ*

При обработка на данните се генерират Фигура за всяка тествана ДНК, като абсцисата показва хромозомна позиция, на хибридициралите белязани клонове, а ординатата показва логаритмичното съотношение $\log_2$ между интензитетите на флуоресценция на Cy5 белязаните към Cy3 белязаните клонове, съобразно позицията им в микрочипа. $\log_2$ - стойности на флуоресцентното съотношение между +0.3 и -0.3 отразяват нормален брой копия.

3.5. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Статистическият анализ на данните бе осъществен посредством готов статистически програмен пакет SPSS v17.0 (Windows). За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. За сравнение на разпределението на непрекъснати величини между две групи болни беше приложен непараметричният тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney U тест), а при повече от две групи за сравнение беше прилаган анализа на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis). Общата преживяемост (ОП) беше изчислена от датата на поставяне на диагнозата до датата на

настъпване на смъртта. Продължителността на ОП беше анализирана посредством метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log-rank теста. За ниво на статистическа значимост бе приета стойност на $p < 0.05$.

3.5.1. СТАТИСТИЧЕСКА ПРОВЕРКА НА ХИПОТЕЗАТА

3.5.1.1. НУЛЕВА ХИПОТЕЗА (Н₀)

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни. Приема се, че според нея не съществува статистически значима разлика между сравняваните групи. Получените експериментални резултати се обясняват с действието на случайни фактори. Алтернативната (или още експериментална) хипотеза (Н₁) е противоположна на нулевата хипотеза. Не се уточнява какъв е типът на зависимостта – т.е. дали присъствието на даден алел/генотип повишава или понижава риска за развитие на заболяването.

Първоначално трябва да се определи нивото на значимост – α (т.нар. Significance Level), което представлява вероятността (риска) да отхвърлим Н₀ хипотезата, дори ако тя е вярна. Най-често използваното ниво на значимост е $\alpha = 0.05$ или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли, когато всъщност е вярна. След това се изчислява и вероятността (P) за получаване на наблюдаваните данни (или на данни с още по-голяма разлика между двете групи) при положение, че нулевата хипотеза е вярна и двете групи всъщност не се различават.

- При $P > \alpha$ Н₀ не се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи не съществува доказуема (в случая) статистически значима разлика.

- При $P < \alpha$ Н₀ се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи съществува статистически значима разлика.

Нулевата хипотеза може да бъде проверена с различни статистически методи - χ^2 , Ман-Уитни U тест, анализа на Крускал-Уолис и др.

Избор на тест за проверка на хипотезата

- 1) според вида на разглежданата променлива - непараметрични тестове при слаби скали (при категорийни/качествени или ординални стойности на разглежданата променлива) и параметрични тестове при силни скали (при интервални или количествени променливи);
- 2) според вида на разпределението на стойностите на променливата - параметричните методи имат изисквания към параметрите на разпределението (например изискват нормално/гаусово/разпределение), докато при непараметричните част от параметрите нямат значение (или се толерира определено отклонение в стойностите им);
- 3) според наличието на зависимост между извадките, от които се получават сравняваните параметри, т.е. дали стойностите на променливата получени от едната група (извадка) се влияят от тези на другата. Извадките са независими, ако се сравняват стойностите на признака X в две групи, които нямат връзка помежду си и не споделят външни условия (коварианти), които биха повлияли на признака X в определена посока. Пример: Две групи пациенти без роднински връзки помежду си. При наличие на роднински връзки резултатите от сравнението се изкривяват в полза на нулевата хипотеза (тъй като роднините най-често имат сходни стойности на изследваните променливи). Ако са налице фактори на средата, които влияят на променливата (коварианти), влиянието им може да бъде неутрализирано чрез групиране на стойностите на променливата според стойността на коварианта.
- 4) според броя на сравняваните параметри (с колко извадки се работи) - два или повече.

3.5.1.2. МЕТОД χ^2

Методът χ^2 се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни, произлизащи от някой естествен закон или с предварително приета хипотеза. Статистическият критерий χ^2 за всяка конкретна проверка има една емпирична (χ^2_{EM}) и една теоретична (χ^2_T) стойност. Въз основа на съотношението между тях се приема или отхвърля Н₀. Сравнението се извършва между разпределения в матричен вид по колони и редове изследвани индивиди или обекти, според принадлежността им към една от разглежданите групи и наличието или отсъствието на разглежданите фактори/състояния.

Определяне на теоретичната стойност на критерия χ^2 (χ^2_T)

Теоретичната стойност се определя чрез готови таблици (или с компютърни програми), като се има предвид нивото на значимост (α) и броя на степените на свобода (degrees of freedom, df). Стойностите на χ^2 зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били възприети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по формулата:

$df = (n-1)$, където n е броят на сравняваните класове. При разглеждане на матрица с определен брой редове и колони броят на степените на свобода се изчислява по следната формула:

$$df = (r-1)(c-1), \text{ където:}$$

r – брой на редовете в таблицата (най-често $r = 2$);

c – брой на колоните в таблицата (най-често $c = 2$).

След това е необходимо да се изчисли теоретично очакваният брой на индивидите във всяка отделна клетка (E , от англ. expected). Това става с помощта на формулата:

$$E_{\text{cell}} = \frac{R \times C}{N}$$

E_{cell} – теоретично очакван брой на индивидите в дадена клетка;
 R – общ брой на индивидите в реда, в които се намира клетката;
 C – общ брой на индивидите в колоната, в която се намира клетката;
 N – общ брой на изследваните индивиди.

Изчисляване на емпиричната стойност на χ^2

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

, където n : брой сравнявани класове (клетки в матрицата)
 O_i : опитни (наблюдавани) стойности на клас i
 E_i : очаквани стойности на клас i

Изваждането на 0.5 от абсолютната разлика между наблюдавания и очаквания брой обекти се нарича корекция на Йейтс (Yates) и се прилага, когато наблюдаваният брой обекти в някой от класовете (клетките) е по-малък от 10.

При приемане верността на нулевата хипотеза по метода χ^2 , съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на χ^2 и стойностите на вероятността P , при различни степени на свобода и нива на значимост. Когато емпиричната стойност на χ^2 е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост (α) и степени на свобода (df), първоначалната нулева хипотеза се отхвърля като невярна.

Решението за приемане или отхвърляне на H_0 може да се вземе и въз основа съотношението между теоретичното предварително възприето ниво на значимост ($\alpha_T = 0.05$) и оцененото (по емпиричните данни) ниво на значимост $\alpha_{\text{ем}}$. Всъщност $\alpha_{\text{ем}}$ е вероятността за появяването на $\chi^2_{\text{ем}}$ и може да се означае с p .

При $\chi^2_{\text{ем}} > \chi^2_T$ (или респ. $p < \alpha_T$). H_0 се отхвърля в полза на H_1 . Приема се, че между наличието на определен алел/генотип и развитието на РГ съществува зависимост (асоциация).

При $\chi^2_{\text{ем}} < \chi^2_T$ (или респ. $p > \alpha_T$). H_0 не може да се отхвърли. Но това все още не означава, че тя е вярната хипотеза. В този случай интерпретацията е двузначна: или действително H_0 е вярна и поради това не се отхвърля или H_1 е вярната хипотеза, но това не може да се потвърди с конкретното проучване (например поради недостатъчния брой на наблюдаваните случаи).

Методът χ^2 се прилага, когато са спазени следните условия:

- обемът на извадката надвишава 50 индивида;
- експериментално установеният брой на индивидите във всяка клетка е не по-малък от 5.

от 5.

3.5.1.3. ТЕСТ НА ФИШЕР (FISHER'S TEST)

Тестът на Фишер принадлежи към групата на непараметричните статистически методи и се прилага при анализ на категорийни данни (които имат точно определен обикновено малък брой стойности). Тестът на Фишер е изключително подходящ в случаите, когато използваната извадка е с малък размер, т.е. когато е възможно очакваната честота да е под 10 при една степен на свобода. Нарича се още точен, тъй като дава възможност значимостта на

отклонението от нулевата хипотеза да се изчисли точно, а не на базата на приближения спрямо теоретична извадка, както е при метода χ^2 . При използване на точния тест на Фишер може да се установи статистически значима разлика между две категоријни променливи, когато анализираниите обекти се класифицират по два различни показателя.

Когато ограниченията за приложението на метода χ^2 не могат да бъдат удовлетворени, вместо него може да се използва критерият на Фишер. Критерият се изчислява по следната формула:

$$P = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{N! a! b! c! d!}$$

P – емпирична стойност на критерия на Фишер;
 a, b, c, d – експериментално установен брой на индивидите в клетките на таблицата;
 N – общ брой на изследваните индивиди.

При $P < \alpha$ H_0 се отхвърля в полза на H_1 , а при $P > \alpha$ H_0 не може да бъде отхвърлена.

3.5.2. ТЕСТОВЕ ЗА ПРОМЕНЛИВИ С МНОЖЕСТВО ИЗМЕРВАНИЯ

3.5.2.1. ТЕСТ НА МАН-УИТНИ (MANN-WHITNEY)

U-тестът на Ман-Уитни (който понякога се отбелязва и като W-тест на Ман-Уитни) има същата цел и познавателно значение, както независимия t-тест (теста на Стюдент) за независими извадки, но постигането на тази цел се извършва на базата на други статистически съображения. Първата основна характеристика на U-теста е, че неговото провеждане не предявява изисквания към вида на разпределението на изследваната променлива. Влагайки известни несъществени за практиката елементи на неточност, може да се каже, че U-тестът на Ман-Уитни използва медианата вместо средното като цел и средство за извършване на сравнението. Медианата Me представлява другата следваща по важност мярка за централна тенденция на числови променливи след средното μ . Отклоненията във формата на разпределение на дадена метрична променлива се получават най-вече като следствие от малкия обем на извадката, например по-малък от 30. Затова използването на непараметрични тестове се препоръчва именно в случаи на извадки с малки обеми. Втората важна характеристика на U-теста се състои в това, че обработката на резултатите от извадките не се извършва директно върху отчетените стойности на променливата, а върху техните поредни номера – рангове. Подреждането става като най-малката стойност получава ранг 1, следващата по големината получава ранг 2 и т.н., докато се изчерпят наблюденията.

Нека за променливата X разполагаме с извадка с обем m , а за променливата Y разполагаме с извадка с обем n . Като обединим двете извадки получаваме една обединена извадка с обем $m+n$, за която пресмятаме поредния номер на всяко наблюдение. Ако с W_x означим сумата от ранговете на стойностите от извадката за променливата X , то нулевата хипотезата гласи, че двете извадки произхождат от еднакво разпределени непрекъснати променливи, т.е. няма статистически значима разлика между W_x и W_y .

3.5.2.2. АНАЛИЗ НА КРУСКАЛ-УОЛИС (KRUSKAL-WALLIS H)

Анализът на Крускал-Уолис е непараметричен тест, използван за сравнение на повече от две независими извадки при ординални, рангови или количествени променливи с различно от нормалното разпределение. Той се използва за тестване на нулевата хипотеза, че всички групи имат еднакви функции на разпределение, срещу алтернативната хипотеза, че най-малко две от пробите се различават по отношение на медианата на разпределението си.

Нулевата хипотеза тук се състои в предположение за равенството на популационните медиани за отделните групи $H_0: Me_1 = Me_2 = \dots = Me_j$, която се проверява срещу алтернативата, че някои от тези медиани са различни. Отхвърлянето или приемането на H_0 се интерпретира по същия начин както при еднофакторния дисперсионен анализ. За изчисляване на емпиричната стойност на критерия стойностите се подреждат в обща рангова редица, като на еднакви първични стойности се присъждат еднакви средни рангови номера. Изчислява се сумата на ранговете за всяка от групите и същите се повдигат на квадрат (R_j^2). Емпиричната стойност на критерия ($H_{\text{емп}}$) се изчислява по формулата:

$$H_{\text{emp}} = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^J \frac{W_j^2}{n_j} - 3(J+1) \quad , \text{ където } W_j \text{ е сумата от ранговете на наблюденията за група с номер } j.$$

Ако хипотезата H_0 е валидна, то променливата H_{emp} се подчинява приблизително на $\chi^2(J-1)$ разпределение. При зададено ниво на значимост α , нулевата хипотеза се отхвърля когато $H_{\text{emp}} \geq \chi^2_{1-\alpha}(J-1)$ и се приема в противен случай.

3.5.3. КОРЕЛАЦИОННИ АНАЛИЗИ

Корелационният анализ е метод за обработка на статистически данни, използван за изучаване на зависимостта (корелацията) между променливи. При анализа се сравняват коефициентите на корелация между една или повече двойки променливи, за да се установят статистически взаимозависимости между тях. Когато върху дадено явление влияят много фактори, а се изследва само един от тях, зависимостта е непълна. Силата (степената) на корелационните зависимости се измерва с помощта на коефициенти на корелация. Стойността им се движи в границите от -1 до +1. В зависимост от измерителната скала, в която са изразени променливите, се ползват различни коефициенти на корелация.

3.5.3.1. КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ НА ПИЪРСЪН (PEARSON)

Най-широко използваният индекс за линейна зависимост е коефициентът на корелация на Пиърсън, индекс отразяващ степента, в която стойностите две променливи са линейно свързани (и потенциално зависими) една от друга. Прилага се, когато и двете променливи са количествени, а зависимостта им е близка до линейната по форма. Изчислява се по следната формула:

$$r = \frac{\sum((x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))}{[(n-1)s_x s_y]} \quad , \text{ където } X \text{ и } Y \text{ са променливите, } X_i \text{ е } i\text{-тата стойност на } X, \text{ } \bar{x} \text{ е средната стойност на } X, n \text{ е броя на измерванията, и } s_x \text{ е стандартното отклонение на стойностите на променливата } X.$$

Стандартният символ, с който се бележи коефициентът на корелация е r . Коефициентът може да заема стойности от -1 до +1. Когато $r = 0$ няма линейна връзка между променливите, т.е. няма никаква корелация. Когато $r = 1$ или $r = -1$ има пълна линейна корелация между стойностите на двете променливи. Това означава, че диаграмата на стойностите в тези случаи ще бъде права линия с положителен (или съответно отрицателен) наклон от 45 градуса. Знакът пред r показва посоката на зависимостта между двете променливи. Когато r е с положителен знак има права зависимост между двете променливи: при нарастване на x , нараства и y . Когато знакът е отрицателен, има обратна зависимост - с нарастване на x , y намалява. На единица изменение на едната променлива стойностите на другата се променят средно със стойността на коефициента. Интерпретацията на r не може да бъде еднаква за резултати от рода на 0.3 и 0.7. Корелационната скала е ординална, а не интервална. Има два начина за тълкуване на коефициента. Единият използва директно получената стойност:

- $0 < |r| < 0.3$ – слаба корелация
- $0.3 \leq |r| < 0.5$ – умерена корелация
- $0.5 \leq |r| < 0.7$ – значителна корелация
- $0.7 \leq |r| < 0.9$ – висока корелация
- $0.9 \leq |r| \leq 1.0$ - много висока корелация

Вторият начин за тълкуване е чрез така нареченият коефициент на детерминация, r^2 . Стойността му се получава при повдигане на втора степен на коефициента r и отразява качеството на предиктивния модел, който бихме могли да построим върху данните. При линейната регресия този коефициент (отбелязван с R^2) отразява каква част от варирането в данните се отразява от модела.

3.5.3.2. СПИРМАН (SPEARMANN) КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ

Коефициентът на рангова корелация на Спирман е подвид на коефициента на Пиърсън, но използвайки рангови данни или ординарни данни преобразувани в рангови. Използва се когато има нужда от непараметричен метод за определяне на корелацията (и следователно коефициентът на Пиърсън не може да бъде използван). Първоначалните данни се подреждат

по големина и се заменят с ранговете си и разликите между ранговете при всяко от наблюденията на двете променливи се пресмята. Изчислява се по следната формула:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Коефициентът на Спирман се означава с гръцката буква ρ („ро“, от там и наименованието „Spearman's rho“) или r_s .

Този метод се използва когато не е възможно получаването на действителни стойности на променливите, но е известен техният ред. Освен това този коефициент може да бъде добър показател, че съществува връзка между две променливи, когато връзката е нелинейна, за разлика от коефициента на Пирсън. Прилагането му е по-подходящо и когато допускането, че двете променливи имат нормално разпределение на данните, не се потвърди.

3.5.4. АНАЛИЗ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА

Данните за една популация често се обединяват под формата на жизненни таблици Life Tables с цел оценка на преживяемостта/смъртността на индивидите и оценка на риска. Жизнените таблици изследват разпределението на събития, свързани с определен период от време, зависещи от стойностите на независимата променлива. Често не могат да се наблюдават всички събития (начални или крайни) в даден период и такива данни се наричат цензурирани. Поради тази причина се използват жизненни таблици, а не обикновена множествена регресия. Основната идея на жизнените таблици е да подразделят периода на изследване на по-малки времеви периоди. За всеки по-малък интервал всички индивиди, които се наблюдават в този и потенциално в други интервали се използват за изчисление на вероятността на крайното събитие (напр. смърт), присъща за този интервал. Вероятностите за всеки един интервал се използват за оценка на общата вероятност на събитието в различни времеви отрязъци.

3.5.4.1. КАПЛАН-МАЙЕР (KAPLAN-MAYER) КРИВИ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Непараметричният оценител на функцията за преживяемост, методът на Kaplan-Meier, е широко използван за оценка и графичното изображение на вероятностите за преживяемост като функция на времето. Този метод може да се използва, за да се получи дескриптивна статистика на един параметър (времето) за такъв тип данни, включително средното време на преживяемост, и за сравнение на данните за преживяемост при две или повече групи от индивиди. За тестване цялостните разлики между кривите на преживяемост на две или повече групи от обекти (например мъже срещу жени) съществуват няколко теста, един от най-често използваните от които е log-rank тестът.

3.5.4.2. LOG-RANK ТЕСТ

Използва се за сравняване на две или повече групи данни, като функция от времето на преживяемост. Тества нулевата хипотеза, която приема, че групите са от една и съща популация (имат еднакво време на преживяемост). Log-rank тестът сравнява броя наблюдавани с броя очаквани събития във всяка група. Статистическите данни за log-rank теста се изчисляват по следната формулата:

$$\chi^2_{LR} = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

където O_1 и O_2 са суми от броя наблюдавани (observed) събития за целия период съответно за групи 1 и 2, а E_1 и E_2 са суми от броя очаквани (expected) събития за целия период съответно за групи 1 и 2.

Статистическите данни за значимост на изследването се съотнасят спрямо стойността χ^2_{N-1} , където N е броят на групите, които се сравняват, и спрямо стойността на избраното ниво на статистическа значимост. Ако статистическите данни показват по-високи стойности от критичната стойност за χ^2_{N-1} , тогава нулевата хипотеза, че групите нямат разлика помежду си, трябва да бъде отхвърлена.

3.5.4.3. КОКС-РЕГРЕСИОНЕН АНАЛИЗ (Cox Proportional Hazard Model)

Регресията на Кокс се използва за моделиране на събития в даден период от време, базирано на стойностите на дадени ковариращи независими променливи, т.е. изследва се

връзката между преживяемостта на индивидите и няколко фактора (независими помежду си) и така може да се предвиди рискът от смърт. Методът има следните характеристики:

1. Работи с различен брой независими променливи (covariates). Те могат да са дискретни или непрекъснати величини.
2. Третира непрекъснатите величини като такива.
3. Дава оценка на големината на разликата между групите, т.е. е еквивалент на анализите на съвместна дисперсия (ANCOVA) за данни за преживяемост.

Методът принадлежи към групата на полу-параметричните методи. Регресията на Кокс е предиктивен модел и се базира на множествената линейна регресия, в която времето на преживяемост е зависимата променлива (y). Ефектът на независимите променливи се дава от коефициента β в уравнението на множествената регресия и така се оценява степента на риск от смърт при влиянието на тези независими променливи. Регресията на Кокс разширява уравнението за риск при статистическите жизненни таблици по следния начин: пропорционалният риск за време t е вероятността за дадено събитие във времето t , при дадена преживяемост до времето t и за специфична стойност на независимата (прогнозираща) променлива x . Допускането, което се прави, е че ефектът на независимите променливи зависи от стойностите на тези променливи, но не зависи от времето. За да се провери това допускане се правят криви на преживяемост. Ако те се пресичат това означава, че не изпълняват условието за независимост от времето. Друг начин за проверка е чрез изчисляване на относителния риск, който при дадена стойност на x не трябва да се променя с времето. Пропорционалният риск за точно определено време t за специфична стойност на x е:

$$h(t/x) = C(t)f(x),$$
 където C е коефициент зависещ от времето, а f е функция на x . Коефициентът C дава информация за това колко бързо кривата върви надолу (т.е. за нейния slope или наклон – отговаря на b в другите регресии).

3.5.4.4. КОЕФИЦИЕНТ НА РИСК (HAZARD RATIO, HR)

Hazard ratio (HR) е съотношението на риска от наблюдаване на определено събитие в разглежданите групи. Той се използва за сравнение на риска от дадено събитие в две групи проби. HR описва пропорционалните рискове и е независима от времето величина.

В анализите на преживяемост HR се изчислява въз основа на степента на риск (hazard rate) отговарящ на условията, описани от две нива на обяснителна (независима) променлива, които дефинират двете сравнявани групи. HR се различава от относителния риск по това, че последния е кумулативен за цялото изследване, при зададена крайна стойност, докато HR представлява моментния риск през конкретен период от времето на изследването. HR в по-малка степен се влияе от избора на крайните точки и може да посочи рискове, които се случват преди крайната точка на изследването. За получаване на HR и неговите доверителни интервали (confidence interval, CI) са използвани регресионни модели. Моментната степен на риск (hazard rate) се изчислява по следната формула:

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\text{observed events in interval}[t, t + \Delta t] / N(t)}{\Delta t},$$
 където $N(t)$ е броя на рисковете в началото на времевия интервал, а рискът е вероятността пациента да изпита събитието в периода между t и $t + \Delta t$.

HR представлява ефектът на тези степени на риск в сравняваните групи и разликите между групите. Освен директното отношение на степента на риск към базовото ниво на риск (когато всички ковариращи параметри са със стойност 0) се разглежда и друга форма на представяне, в която логаритъм от HR се приема за функция на базовата степен на риск и редицата от разглеждани коварианти и съответстващите им тежести (β):

$$\log h(t) = f(h_0(t), \alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k).$$

Числовата стойност на HR често се приема като равнозначна на коефициент на вероятността за възникване на смърт. Например група с $HR=2$ се интерпретира като такава имаща два пъти по-висок шанс от летален изход в сравнение с контролната група. В Кокс-модела това може да се покаже със следната функция от преживяемостта: $S_1(t)=S_0(t)^r$, където r е коефициентът на риск HR. Следователно с $HR=2$ и $S_0=0.2$ (20% преживели в периода до момента t при нулево ниво на разглежданите фактори), то $S_1=0.04$ (очаква се 4% преживяемост

в периода до t при конкретните стойности на факторите). Съответните вероятности за възникване на смърт са съответно 0.8 и 0.96. Трябва да е ясно, че коефициентът на риск е относителна мярка за ефекта и не казва нищо относно абсолютния риск.

3.5.5. ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ ОТ aCGH

За всеки от изследваните през този етап пациенти бе извършен анализ на данните за промяна на интензитета на aCGH сигнала спрямо сигнала за контролната ДНК. Като реални аберации бяха отчетени само тези, при които отклонението на интензитета на поне 5 съседни сонди достига статистическа значимост (граница на статистическа значимост $p \leq 5.0E^{-6}$). С помощта на информацията в обществените бази данни бяха идентифицирани гените във всеки от засегнатите локуси. Подробен списък на всички използвани информационни ресурси може да се види в **Табл.3.34**.

Таблица 3.34. Списък на обществените бази данни използвани в хода на анализа на данните от aCGH

База данни	Информация за	Електронен адрес
NCBI	структура и функция на гени и белтъци; експресионни данни; фенотипна изява на мутации в различни гени; научна литература в областта на биологичните и медицински науки	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL-EBI Ensembl GeneCard	структура и функция на гени и белтъци; експресионни данни	http://www.ebi.ac.uk/ http://www.ensembl.org http://www.genecards.org
UniProt	структура и функция на белтъци	http://www.uniprot.org/
DGTV	геномни варианти	http://projects.tcag.ca/variation/
Genetic Association Database	асоциативните генетични проучвания свързани с комплексни болести при хората	http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi
DECIPHER	хромозомни аберации и свързаните фенотипи при човек	http://decipher.sanger.ac.uk/

Статистически значими разлики в интензитета на хибридизационния сигнал между проби и контроли бяха установени за сравнително голям брой кодиращи секвенции. Поради тази причина данните бяха подложени последователно на няколко различни анализа (агрегационен анализ (STAT и GISTIC), клъстериране и сравняване по групи) водещи до разделянето на пациентите в смислени групи и идентифициране на аберантните събития довели до разликата между тях и тяхната патогенеза.

3.5.5.1. КЛЪСТЕРИРАНЕ

Клъстерният анализ е може би най-широко използвания статистически инструмент за анализ на микрочипови данни. Поради размера на получените данни, предоставени от микрочиповите експерименти, информацията трябва да бъде обобщена по начин, който е достъпен за тълкуване. Техниките за клъстериране са от голяма помощ в тази задача, тъй като те намаляват размера на огромното количество данни, чрез събиране на гени (или проби) в по-малък брой групи. В много случаи клъстерният анализ се разглежда само като удобен начин за визуализиране на огромното количество данни.

3.5.5.1.1. ЙЕРАРХИЧНО КЛЪСТЕРИРАНЕ

Йерархичното клъстериране е метод, познат на повечето биолози с прилагането му при създаването на филогенетични дървета. Принципът на йерархичните алгоритми е изграждането на клъстерите в резултат на многократно присъединяване на двата "най-близки" гени или групи от гени (или други разглеждани обекти). Този подход се използва с цел да се

сведе до минимум променливостта в рамките на групата. Връзката между гените се представя графично като дърво (дендрограма), чиито дължини на клоните отразяват степента на сходство между гените. Тези взаимоотношения са полезни в способността им да представляват различни степени на сходство и по-далечни отношения между групи от тясно свързани гени, а също така изискват да се направят сравнително малък брой предположения за характера на данните. Изчислените дърветата могат да бъдат използвани за подредба на гените в таблица с данни, така че гените или групи от гени с подобни модели на експресия са разположени близо един до друг. Предимството на йерархичния метод, както е отбелязано и от Eisen (1988)⁽⁴¹¹⁾, е, че естественият начин за възприемане и анализиране на голямо количество от данни е първо да се открият големите характеристики и разлики, а след това да се насочи вниманието върху по-малките детайли. С помощта на този метод се дава възможност за един и същи вид интуитивен подход в целия анализ на геномни данни. Въпреки че този подход е един от основните, който няма присъща специфичност към конкретния метод, използван при усвояването на геномните данни, той се е доказал в практиката като изключително полезен⁽⁴¹¹⁻⁴¹³⁾.

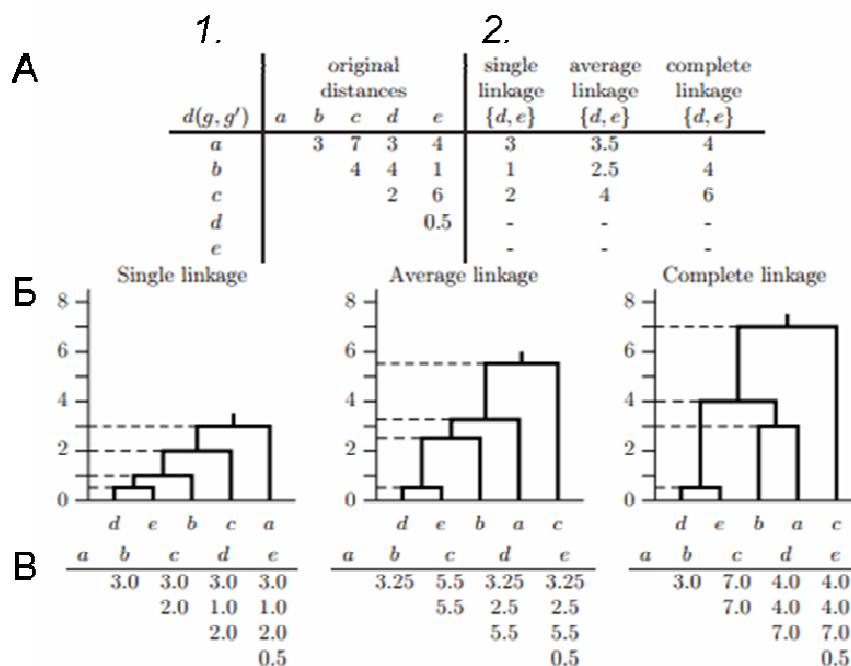
Йерархичните алгоритми винаги дават едно конкретно дърво, дори ако то не отразява истинската структура на реалната популация, от която произлизат данните. Макар дендрограмите да се считат за прости инструменти за визуализация, трябва да се подчертае, че това е много специално представяне на данните, което може да бъде напълно неуместно. Един от основните недостатъци на тези "алгоритмични" подходи е, че поради липса на точни и ясни статистически модели, е трудно да се оцени колко коректно са представени данни. Статистиците отбелязват, че йерархична клъстеризация страда от липса на устойчивост, липса на уникалност и инверсионни проблеми, които усложняват интерпретация на йерархията. Освен това детерминистката природа на йерархичното групиране може да доведе до локално решение в групиране на резултатите, което обаче да не отразява най-добрата възможна подредба^(412, 413).

При йерархичното групиране се използват три варианта на изчисляване на разстоянията между обектите или групите – Complete, Single и Average linkage (**Фиг.3.7**).

1) Групирането, базирано на пълно сходство (complete linkage) представлява клъстериране, при което на всяка стъпка разстоянията между групите се определят от техните най-далечни членове. При този вид йерархично групиране използваните критерии не са локални, а цялата структура на групирането може да повлияе клъстерирането. Това води до дефиниране на компактни клъстери с малки диаметри (разстояние между членовете) в големи, разнородни групи, като и увеличена чувствителност към големи различия в стойностите.

2) Групирането, базирано на единично сходство (single linkage) представлява клъстериране, при което на всяка стъпка разстоянията между групите се определят от техните най-близки членове. При това групиране сходството на двете групи е сходството на техните най-подобни членове. Критериите за сливане са локални. Обръща се внимание единствено на зоната, където двата клъстера са най-близки един до друг. Други, по-отдалечени части на клъстера и цялостната структура на клъстера не се взимат под внимание.

3) Групирането, базирано на усреднено сходство (average linkage) представлява клъстериране, при което на всяка стъпка разстоянията между групите се определят от усреднените разстояния между всеки два техни члена. То представлява компромис между чувствителността на complete linkage клъстерирането на показатели с големи различия в стойностите и тенденцията на single linkage клъстериране да образува дълги клонове в дендрограмите, което не съответстват на идеята за целта на групирането (т.е. окрупняване и компактно представяне на данните).



Фигура 3.7. Пример, показващ разликата между трите вида йерархично групиране; А.1. Оригиналната матрица на сходство - двата най- близки елемента са d и e: $d(d, e) = 0.5$; 2. Сравнение на разстоянията между {d, e} и другите елементи за трите алгоритъма; Б. Дендрограми представящи трите йерархични алгоритъма; В. Разстоянията между участниците в дървовидните структури (Bouroche and Saporta, 1998)

3.5.5.2. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ

Средната общата честота на аберациите свързани с промяна в броя копия в целия геном варира между различни видове ракови заболявания. Поради това, че копийните аберации, засягащи различните геномни региони в отделните пациенти, имат относителна статистическа значимост, която зависи от честотата на наблюдаваните промени в целия геном в изследваната група, ние обединихме данните за всички проби на пациенти с рак на мозъка и нормализирахме честотите на вариациите в броя копия до средна стойност, която се отнася за наблюдаваните промени в целия набор от данни (методът е подробно описан в ⁽⁴¹⁴⁾).

При изследване на аберациите водещи до промяна в броя копия в голям набор от данни най-често задаваните въпроси са: 1) Какви са най-честите изменения; и 2) Тези изменения статистически значими ли са? Софтуерната програма Nexus версия 7.0. специално разработена за анализ на данни получени от сравнителна геномна хибридизация притежава два различни инструмента, STAC и GISTIC, които дават отговори точно на тези въпроси, като всеки прави това по свой уникален начин.

3.5.5.2.1. STAC (Significance Testing for Aberrant Copy number)

STAC е метод за определяне на значимите промени в броя на ДНК копията при изследване на множество проби в един експеримент. Алгоритъмът определя тези аберации, които се срещат при най-много проби и които не биха възникнали случайно. За да бъдат намерени тези аберации, се разбърква реда на получените отклоненията във всяко рамо на всяка хромозома и отново се оценява вероятността даденото събитие да се случи на което и да е място при конкретната честота, според зададената стойност определяща % на агрегационна граница. Тогава се взима предвид и поставената гранична стойност за р- стойността и се получава крайно идентифициране на значимите региони с аберации. Всички открити значими региони са описани в секция „Significant” на глава **Резултати**.

3.5.5.2.2. GISTIC

Модулът на софтуерната програма Nexus v.7.0, използващ GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets In Cancer) алгоритъма, е инструмент проектиран специално за анализ на данни получени от онкологични проучвания. С негова помощ могат да се идентифицират региони от генома, които са показали статистически значима честота на броя на копията (амплификация или делеция) в цялата група от изследвани пациенти над фоновите аберации⁽¹⁷⁵⁾. Всяка от аберациите се оценява от алгоритъма като се изчислява G-стойност, която е получена въз основа на амплитудата на промяна в броя на копията (log-ratio интензитета) и честотата на възникване на аберацията във всяка проба. За всяка от областите показали значимост се изчислява G-стойността поотделно, както за загубите, така и за амплификациите. Откритите така области във всяка проба в последствие се подреждат в случаен ред, като по този начин се получава симулиране на данни с произволни аберации. Статистически значимите данни получени от случайното разпределение на аберациите се сравнява с тези наблюдавани досега, с цел идентифициране на резултати, които са реално значими. При тестването паралелно на много на брой проби се налага извършването на FDR корекция (контролираща степента на фалшиво открити значими райони), която изчислява Q-стойност показваща граница на значимост.

В рамките на всяка статистически значим геномен район областта на пика, който е частта от изменения район с най-висока амплитуда и честота на промяната, бива идентифицирана и се отчитат регионите с максимална G и минимална Q-стойност. Това са регионите съдържащи с най-голяма вероятност засегнати гени важни за патогенезата на заболяването. В допълнение, се определя и областта „широк пик“ ("wide peak") като се използва алгоритъм с „изключване на всеки един поотделно“ (leave-one-out), за да се отчетат грешки в границите на една и съща проба. Определените "wide peak" граници се считат за по-сигурни при идентифицирането на най-вероятните „драйверни“ гени в региона. Всеки определен като значим геномен район се тества също за това дали е резултат от голямо събитие (надвишаващо дължината на половината хромозомно рамо), фокално събитие, или и двете. Модулът идентифицира пробите, които показват всяка важна амплификация или делеция, и посочва гени намерени във всеки "wide peak" регион.

4. РЕЗУЛТАТИ

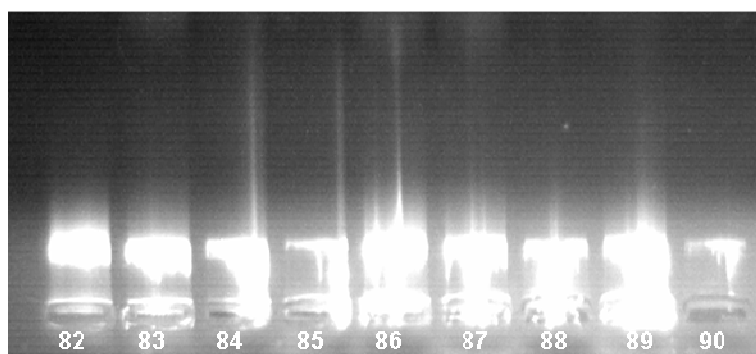
4.1. ГЛИОМНА БИОБАНКА

Една от основните задачи в началото на това проучване беше да се съберат проби от глиални тумори, които да бъдат обединени в биобанка с възможности за бъдещи колаборативни изследвания. Създадената глиална биобанка в ЦММ може да бъде разделена на следните биобанки, съдържащи съответните биологични проби:

- Тъканна биобанка, състояща се от туморна тъкан – съдържаща 133 броя проби;
- ДНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 212 броя проби;
- бисулфитно-модифицирана ДНК биобанка от болни с глиални тумори - съдържаща 212 броя проби
- РНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 70 броя проби;
- κДНК биобанка от болни с глиални тумори – съдържаща 70 броя проби.

4.1.1. ГЛИОМНА ДНК БАНКА

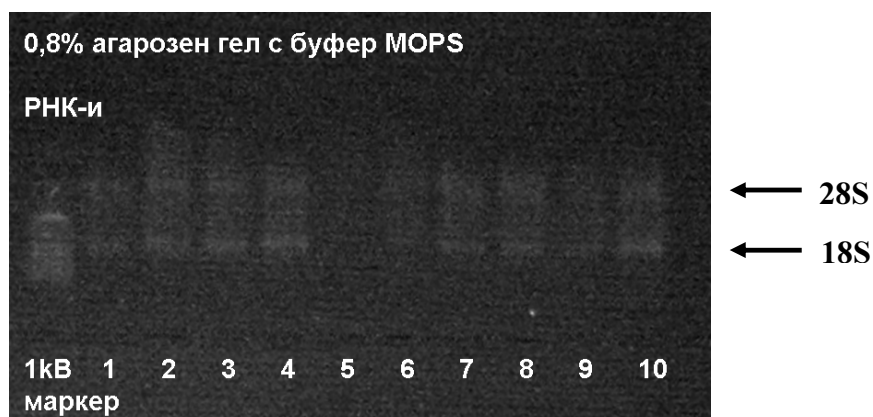
В рамките на дисертационния труд ДНК беше изолирана от 212 туморни тъкани на 199 пациента с глиални тумори с помощта на кит за ДНК екстракция от тъкан с колонки (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen). При 11 пациента беше изолирана ДНК от туморна тъкан, отстранена при две, съответно три - при един пациент, последователни хирургични резекции на тумора с цел определяне промени в мутационния статус при развитието на глиомата. Всички ДНК-и бяха количествено и качествено определени, съответно чрез спектрофотометричен анализ на Nanodrop и агарозна гел електрофореза при използване на 0.8% агарозен гел и 1xTBE (трисборатен буфер) – *Фиг.4.1.*



Фигура 4.1. Агарозна електрофореза (0.8%) на геномна ДНК

4.1.2. ГЛИОМНА РНК БАНКА

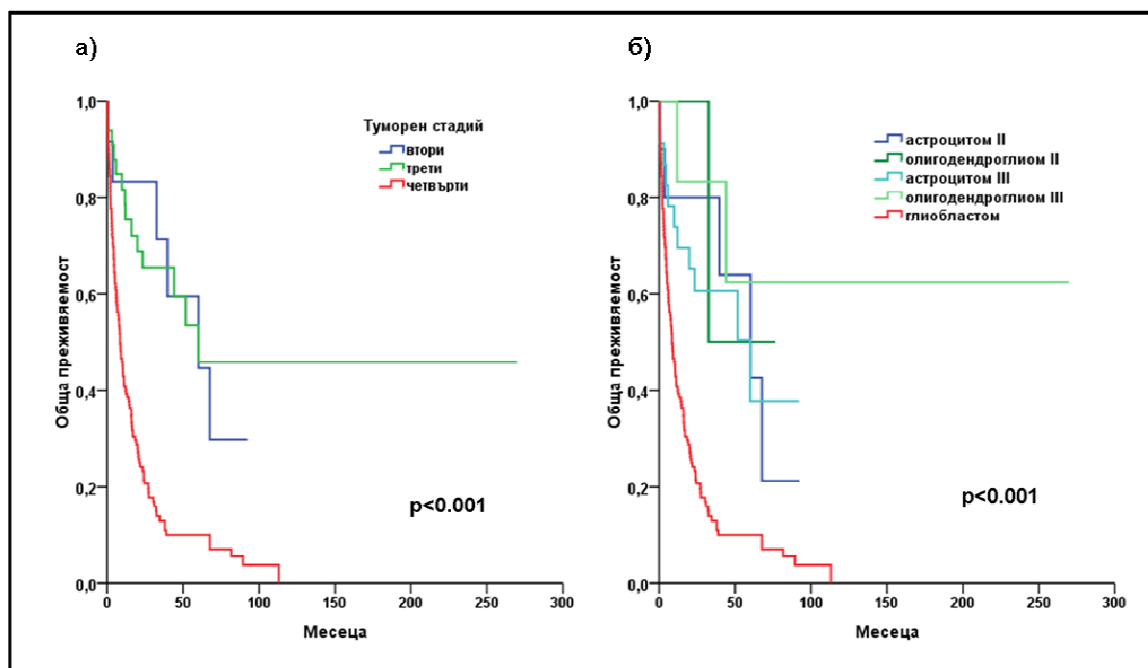
РНК беше изолирана от 59 туморни тъкани на пациенти с глиални тумори с помощта на кит за РНК екстракция от тъкан с колонки (RNA Mini Kit, Qiagen). Всички РНК-и бяха количествено и качествено определени, съответно чрез спектрофотометричен анализ на Nanodrop и агарозна гел електрофореза при използване на 0.8% денатуриращ агарозен гел и 1xMOPS буфер – *Фиг.4.2.*



Фигура 4.2. Визуализация на 18S и 28S рибозомни РНК-и в денатурираща агарозна гел електрофореза

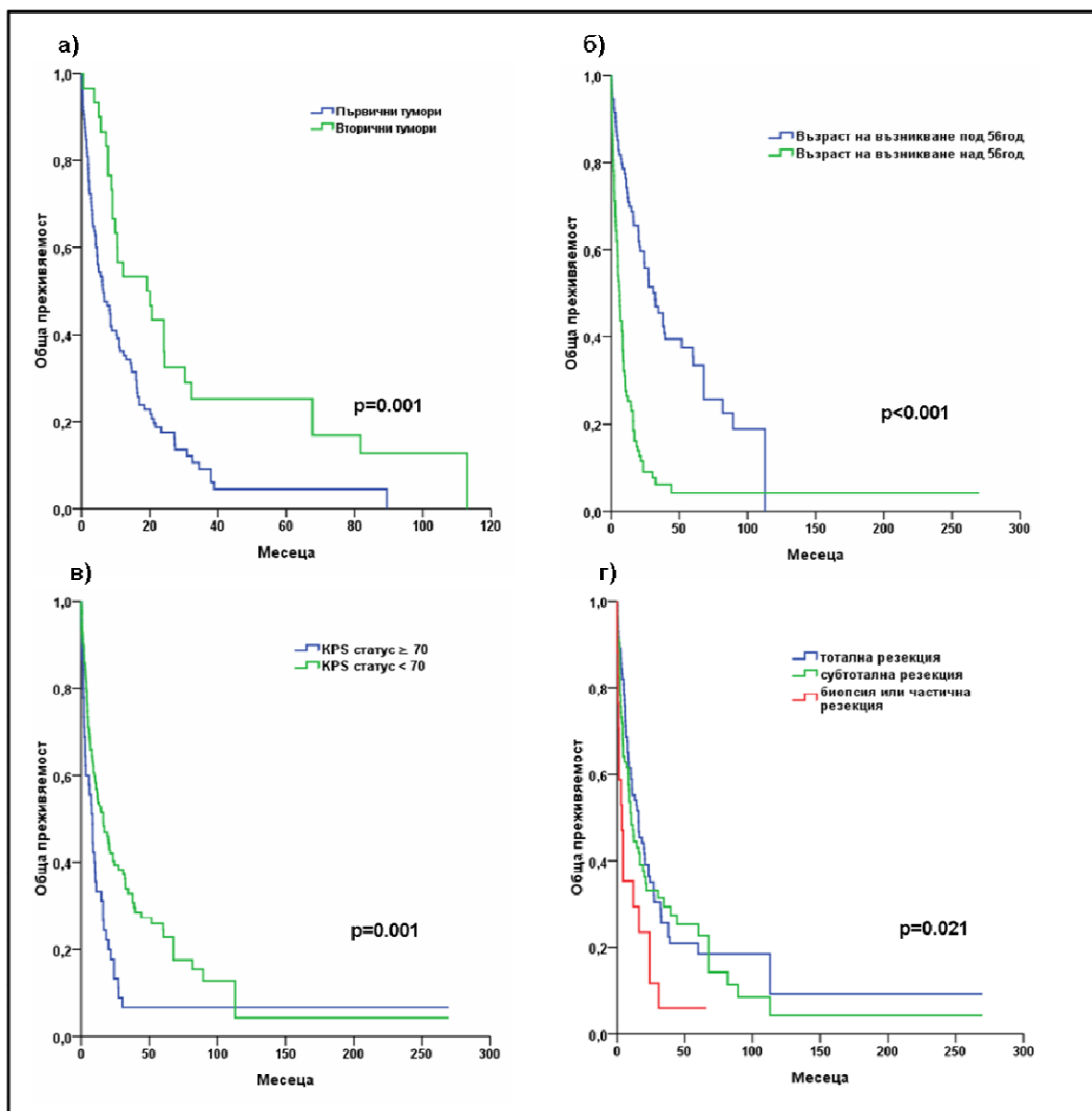
4.2. ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

Подбраната група от пациенти включва такива с разнородни характеристики, част от които оказват влияние върху преживяемостта. Затова първо бяха анализирани клиничните характеристики на пациентите чрез статистическа обработка на резултатите с помощта на статистическа програма SPSS v.17.0 и Kaplan-Meier анализ за преживяемост. На **Фиг.4.3 а)** е показана връзката между преживяемостта и туморния стадий, като туморите с четвърти стадий на развитие, показват по-лоша преживяемост от туморите с втори и трети ($p < 0.001$). При анализа по тип тумор пациентите диагностицирани с глиобластом показаха значимо по-лоша прогноза, в сравнение с пациентите с астроцитом III, които пък показват по-лоша преживяемост от тези с астроцитом II стадий (**Фиг.4.3 б**). При пациентите диагностицирани с олигодендроглиом не се наблюдава значителна разлика между преживяемостта на II и III стадий най-вероятно поради малкия брой пациенти включени в изследването с такава диагноза (4 и 10 пациента съответно).



Фигура 4.3. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от: **а)** туморен стадий; **б)** хистологична диагноза

Аналогичен анализ беше извършен и за други клинични характеристики като възникване на тумора, KPS статус, вид операция и възраст на възникване. На **Фиг.4.4 а)** е показана връзката на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ($p=0.001$). Тъй като средната възраст на всички пациенти беше 56 год, разделихме пациентите на две групи – с възникване на болестта под 56 год. и над 56 год. възраст. Пациентите с болест възникнала преди 56 год. възраст показват по-добра преживяемост (**Фиг.4.4.б**). Освен това наличието на KPS статус над 70 ($p=0.01$) (**Фиг.4.4 в**) и тоталната резекция на тумора са добри показатели за преживяемостта ($p=0.021$). На **Фиг.4.4 г)** се вижда, че биопсията и частичната резекция имат по-лоша прогностична стойност от субтоталната и тоталната оперативна интервенция.



Фигура 4.4. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от: **а)** вида на тумора (първичен/ вторичен глиобластом); **б)** възраст; **в)** KPS; **г)** степен на резекция. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост

4.3. СЕКВЕНЦИОНЕН АНАЛИЗ - IDH1, IDH2 И TP53

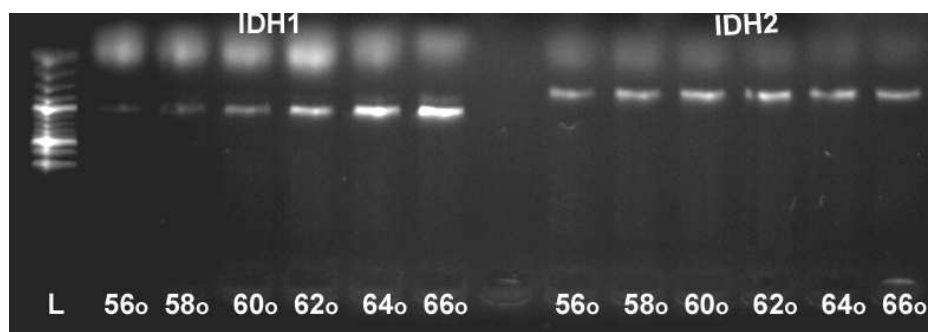
4.3.1. СИСТЕМЕН ХОД НА АНАЛИЗА

Анализът на мутационния статус на всеки тумор включваше следните стъпки:

- 1) PCR амплификация на екзон 4 на гените *IDH1* и *IDH2*;
- 2) PCR амплификация на кодиращите екзони на *TP53* гена;
- 3) оценка на качеството на получения продукт чрез агарозна гел електрофореза;
- 4) пречистване на продукта с ExoSap (USB);
- 5) секвенционна реакция с BigDye Terminator 3.1 kit (Applied Biosystems);
- 6) разделяне на продуктите от секвенционната реакция на ABI 3130xl (Applied Biosystems).
- 7) анализ на мутационния статус на гените и връзката им с преживяемостта.

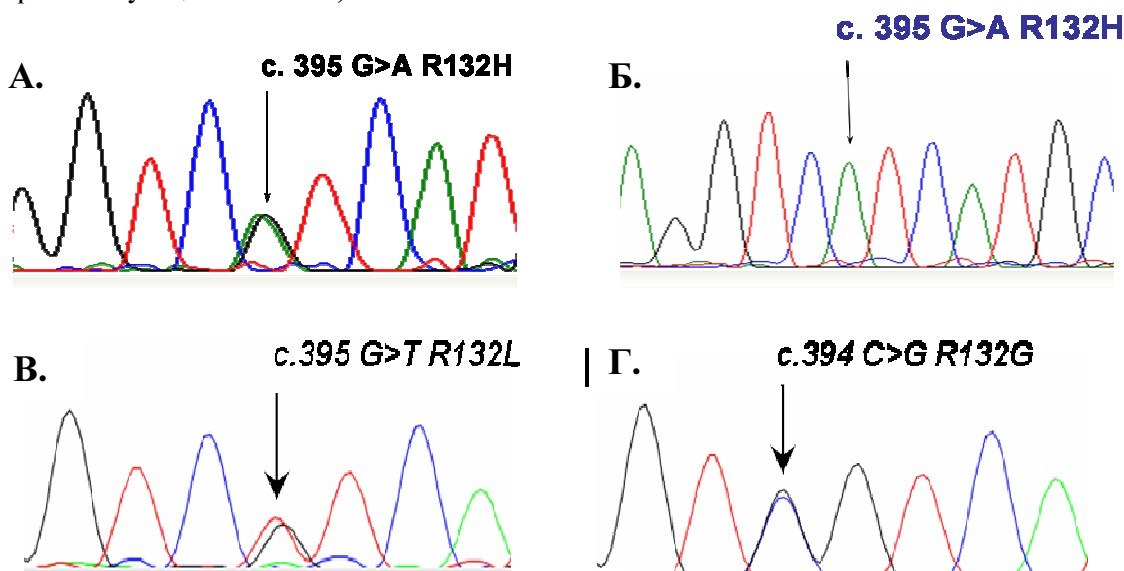
4.3.2. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНИТЕ *IDH1* И *IDH2*

Първоначално беше проведена оптимизация на условията за анализ чрез вариране концентрациите на $MgCl_2$, dNTPs, праймери и температурата на анилинг – за PCR реакцията; и концентрацията на праймери и Big Dye – за секвенционната реакция. На **Фиг.4.5** е представен резултатът от оптимизацията на PCR реакцията за гените *IDH1* и *IDH2*.



Фигура 4.5. Оптимизация на температурата на анилинг за гените *IDH1* и *IDH2* - градиентен PCR ($T_{an} = 56-66^\circ C$); L – ladder (100bp молекулен маркер)

Двеста и дванадесет тумора от 199 пациента бяха изследвани за мутации в *IDH1* и *IDH2* гените. В изследваната група от 212 проби мутация засягаща *IDH1* гена се наблюдава при 40 (18.9%) тумора от 35 пациента (17.6%). Най-честата мутация установена в кодон 132 - с.395G>A, която води до замяна на Arg с His (R132H), беше установена при 33 пациента (94% от откритите мутации в *IDH1*) – **Фиг.4.6 А.**

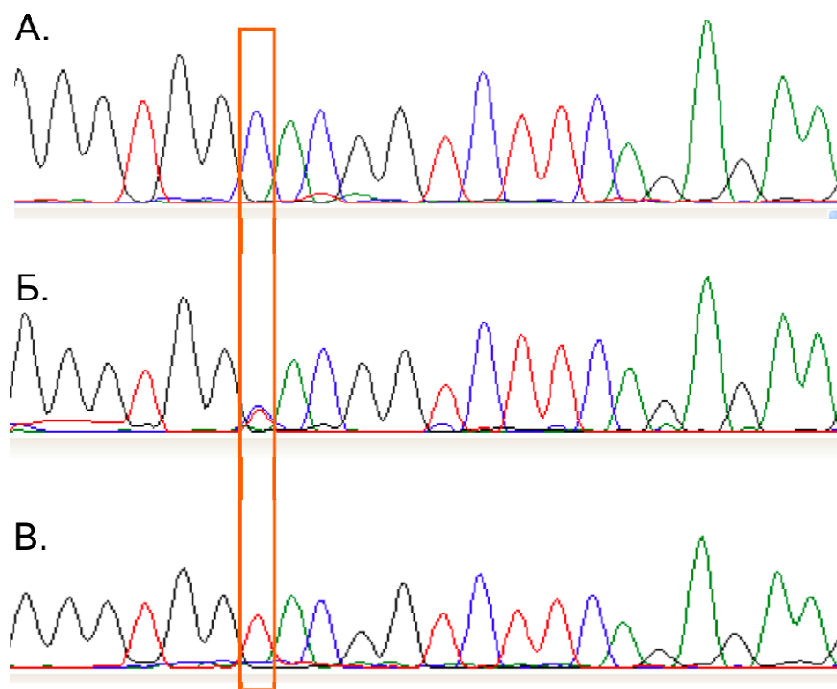


Фигура 4.6. Мутация в кодон 132 на *IDH1* гена: **А.** хетерозиготна с.395G>A мутация; **Б.** хомозиготна с.395G>A мутация; **В.** с.395G>T; **Г.** с.394C>G

Интересно е да се отбележи, че и в трите тумора, отстранени при 3 последователни хирургични резекции на един пациент (тумори 16, 41 и 52), беше открита една и съща замяна.

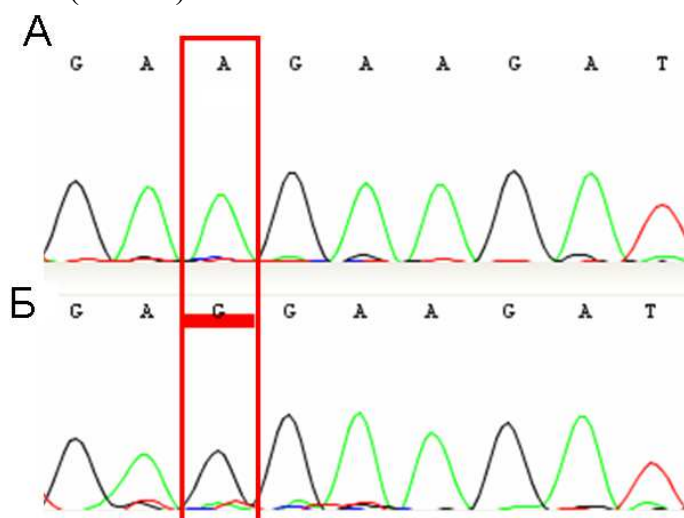
При 1 от изследваните тумори откритата мутация засяга гореспоменатия кодон, но води до замяна на аминокиселината Arg с Leu -с.395G>T (<0.5%) (**Фиг.4.6 В**). Открита е и още една мутация засягаща същия кодон, но съседния нуклеотид, водеща до замяната на Arg с Gly (**Фиг.4.6 Г**). При един от пациентите (№ 62) мутацията в кодон 132 беше в хомозиготно състояние – **Фиг.4.6 Б**. Вероятно причината за това е загубата на втория алел, за което говори и намерения в *IDH1* полиморфизъм в хомозиготно състояние.

В екзон 4 на *IDH1* беше установен и един полиморфизъм - с.315C>T G105G (rs11554137) – **Фиг.4.7**. Замяната на С с Т в позиция 315 беше детектирана при 19 тумора, в три от случаите – в хомозиготно състояние.



Фигура 4.7. Синонимна замяна в *IDH1* - с.315C>T G105G: **А.** Генотип CC; **Б.** CT; **В.** TT

При изследваните 212 тумора беше открита само една мутация в *IDH2* гена засягаща кодон 129 – с.386A>G, която води до замяна на Lys с Arg (K129R). Мутацията бе наблюдавана в хомозиготна състояние (**Фиг.4.8**).

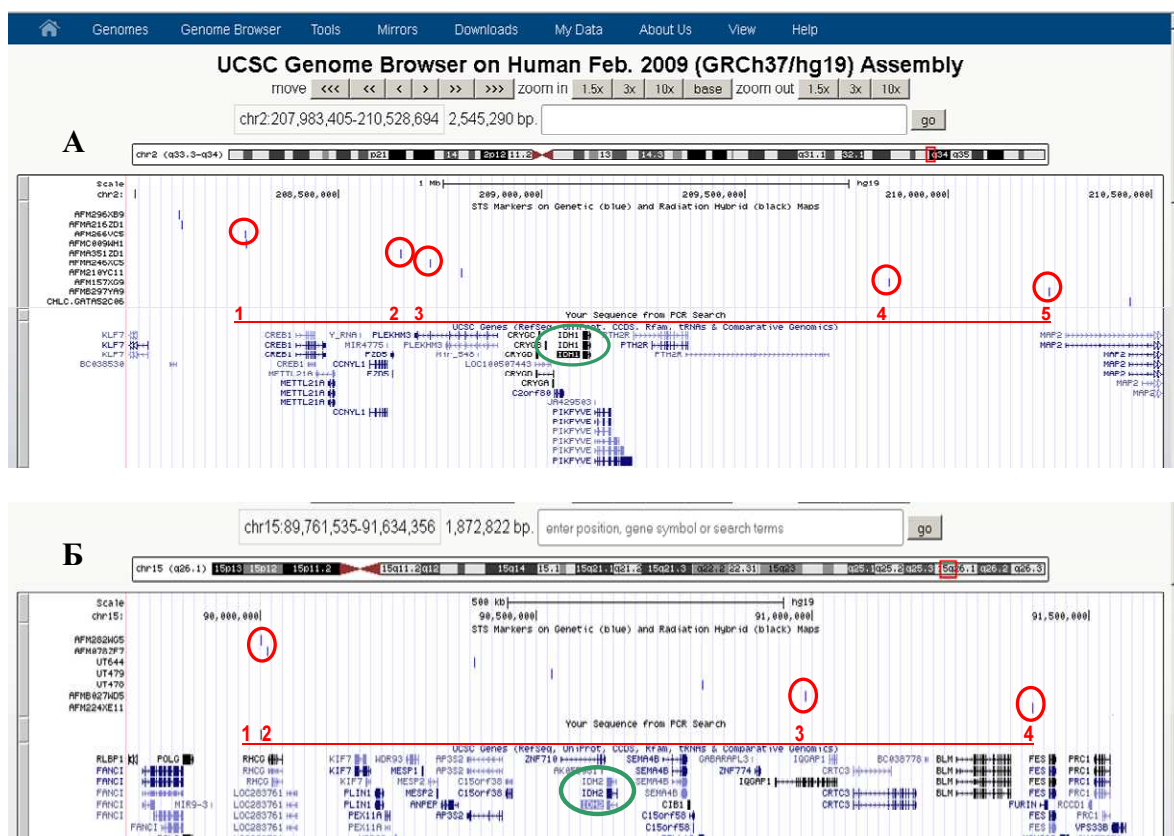


Фигура 4.8. Хомозиготна мутация в кодон 129 на *IDH2* гена: **А.** див тип; **Б.** с.386A>G K129R

Три алгоритъма бяха използвани, за да се предскаже влиянието на тази замяна върху активността на протеина. Тя е класифицирана като "с ниска вероятност да е патологична" със стойност 3.46 изчислена от предиктивната програма SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), като "доброкачествена" със стойност 0.270 определена използвайки PolyPhen-2 програмата (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и като "не много надеждна" с помощта на SNPs & GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>).

4.3.2.1. LOH

Мутацията в *IDH1* при един от пациентите беше наблюдавана в хомозиготно състояние. Хомозиготна мутация в *IDH1* (R132G) досега е била установена при един случай на левкемия (407) и само при едно пациент с мозъчни тумори (155). Откриването на хомозиготна мутация и в гена *IDH2* при пациент № 112 доведе до необходимостта за потвърждаването им. За целта бяха подбрани високо специфични и информативни микросателитни маркери, намиращи се от двете страни на изследваните райони (**Фиг.4.9**) Микросателитният анализ включва изследване на няколко микросателитни маркера чрез PCR и автоматичен фрагментен анализ.



Фигура 4.9. Разположение на избраните микросателитни маркери около изследваните райони: **А** за ген *IDH1*; **Б** за ген *IDH2*

При подбора на микросателитните праймери беше съобразено тяхното белязване с флуоресцентни багрила. Това са багрила, които при облъчване със светлина излъчват светлина с определена дължина на вълната. Белязането на праймерите беше подбрано така, че в една PCR реакция да е възможно амплифицирането на 3 или 4 фрагмента, както и последващото им едновременно електрофоретично разделяне. За *IDH1* маркерите бяха анализирани в две реакции- в едната се амплифицират 2 маркера, а в другата 3 маркера. За разлика от тях четирите маркерите за *IDH2* бяха оптимизирани да се анализират в рамките само на 1 реакция.

За всеки микросателитен маркер ДНК от туморната тъкан на един пациент се сравнява с ДНК от нормалната тъкан на същия пациент. Например за гена *IDH2* четирите маркера се амплифицират в една реакция за туморната ДНК и в друга за нормалната за всеки пациент.

Първоначално беше проведена оптимизация на условията за PCR анализ чрез вариране концентрациите на $MgCl_2$, dNTPs, праймери и температурата на анилинг. В глава **Материали и Методи – Табл.3.12** са посочени секвенциите на използваните праймери и установените оптимални температури на анилинг за съответните ДНК фрагменти.

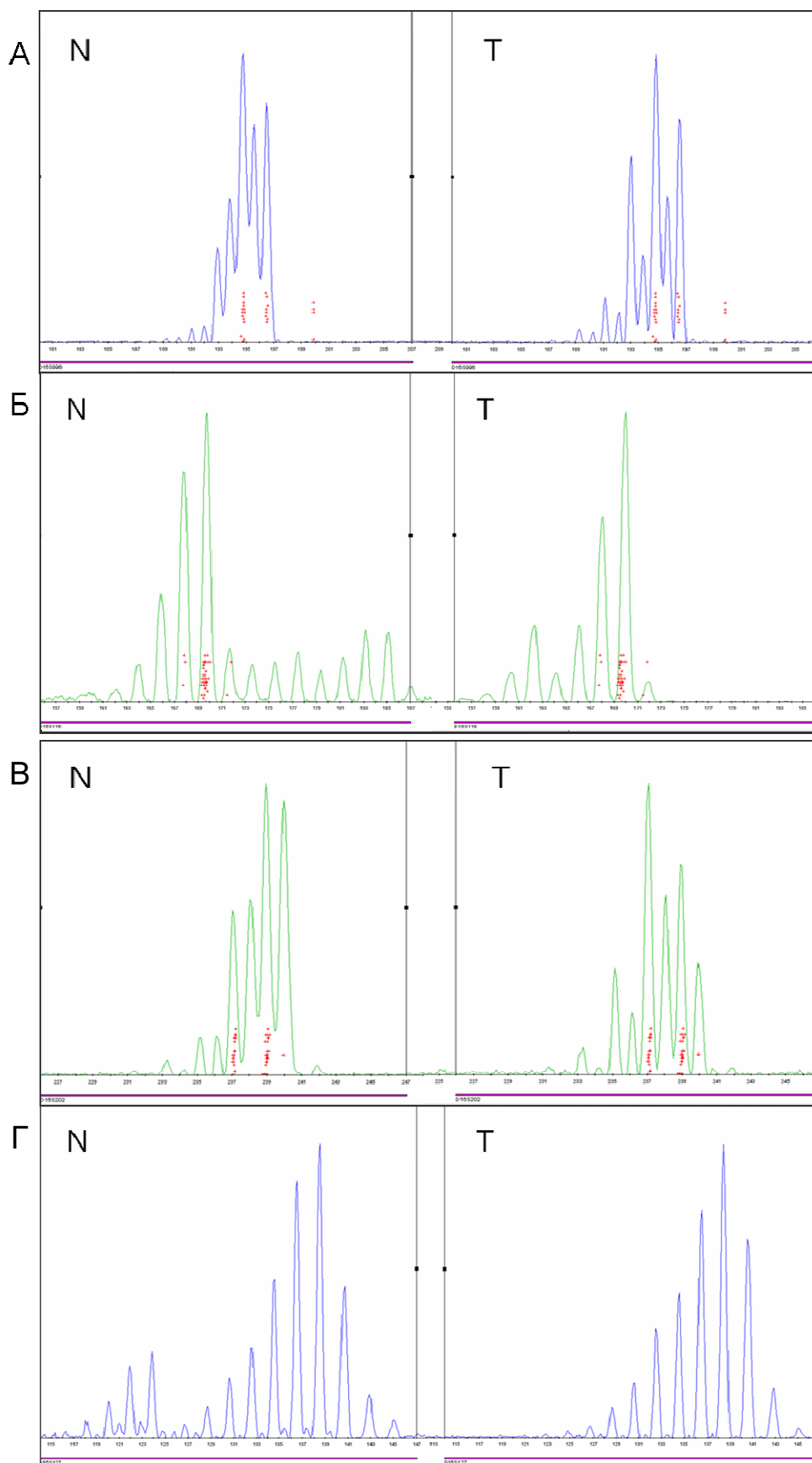
Поради невъзможността да се осигури нормална ДНК от пациент № 62 (липса на нормална тъкан в оперативно отделената тъкан и невъзможност за взимане на венозна кръв за ДНК) анализ на микросателитните маркери, обграждащи локуса на *IDH1* не беше осъществен.

От пациент № 112 с помощта на лазерна микродисекция беше отделена нормална тъкан, от която беше изолирана нормална ДНК по споменатия в глава Материали и методи начин. Изследваните маркери, локализирани на дългото рамо на петнадесета хромозома - 15q26.1. съдържат динуклеотидна последователност от -(CA)- повтори. Характеризират се с висока степен на хетерогенност, което ги определя като високо информативни маркери при изследване на микросателитна нестабилност. В настоящото изследване след сравняване на нормална и туморна тъкан на изследвания пациент, микросателитна нестабилност беше установена в D15S116, D15S202 и D15S127. Маркера D15S116 показва амплификация на 2 алела с дължина съответно 170 н.дв и 184 н.дв. в нормалната тъкан, за разлика от туморната при която се наблюдава наличието само на алел с дължина 170 н.дв. липсва. Подобно на него микросателитния маркер D15S127 в нормалната тъкан се характеризира с два алела (124 и 238 н.дв.), а в туморната- само с един – 238 н.дв. Следователно се наблюдава загуба на втория алел. За разлика от тях D15S202 има два алела с еднаква дължина на маркера от 239 н.дв. В туморната проба се наблюдава нов алел, който е с дължина 237 н.дв., т.е. е с 2 н.дв. по-къс от по-лекия алел. На **Фиг.4.10 А** са показани електрофореграмите на микросателитния маркер D15S996 визуализиращ наличието на 2 алела в нормалната и туморната ДНК. В нормалната и туморната тъкан присъстват и двата алели с дължини съответно 135 и 137 н.дв. В туморната проба се наблюдава нов алел, който е с дължина 128 н.дв, т.е. е с 10 н.дв. по-къс от по-лекия алел. На **Фиг.4.10 Б, В и Г**, са показани електрофореграмите на останалите микросателитните маркери показващи загуба на хетерозиготността.

Получените резултати потвърдиха първоначалното ни предположение за загуба на втория алел, като три от общо четирите изследвани микросателита показаха загуба на хетерозиготност (LOH). В **Табл.4.2** са показани обобщено резултатите получени от анализа на микросателитните маркери. Ясно се вижда, че загубата на хетерозиготността се наблюдава в един от маркерите намиращи се преди локуса на *IDH2* гена и в двата изследвани маркера разположени след него. Следователно началото на загубата на част от хромозома 15 започва някъде между D15S996 и D15S116, но за определяне на точното място, както и за определяне края на загубата, е необходимо извършването на допълнителни изследвания.

Таблица 4.2. Резултати, получени от анализа на 4 микросателита на хромозома 15

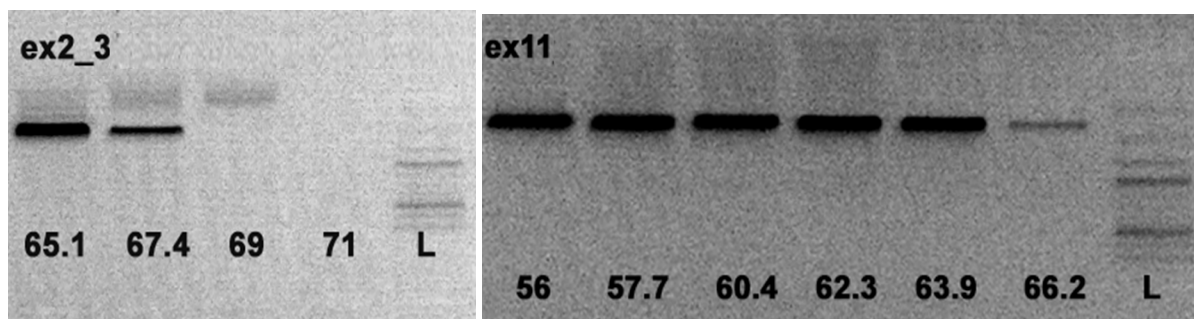
Пациент №	D15S996 1	D15S116 2	<i>IDH2</i>	D15S202 3	D15S127 4
112	MCC	LOH		LOH	LOH



Фигура 4.10. Електрофореграми на 2 от микросателитните маркери при пациент № 112: **А.** MCC на D15S996; **Б.** LOH на ДНК маркер D15S116; **В.** LOH на D15S202; **Г.** LOH на ДНК маркер D15S127

4.3.3. СКРИНИНГ ЗА МУТАЦИИ В ГЕНА *TP53*

Осемдесет процента от анапластичните астроцитомии и глиобластомите с мутации в гените *IDH1* или *IDH2* носят мутации и в *TP53*⁽¹⁴⁰⁾. Генетичните увреждания в *TP53* засягат предимно средната част на белтъка или ДНК-свързващия домен, кодирана от екзони 5-8. Въпреки това изследвани бяха и останалите шест кодиращи екзона (2, 3, 4, 9, 10 и 11).



Фигура 4.11. Оптимизация на температурата на анилинг за гена *TP53*, екзон 2,3 и екзон 11 - градиентен PCR (T_{an} = 65-71°C и 56-66°C); L – ladder (100bp молекулен маркер)

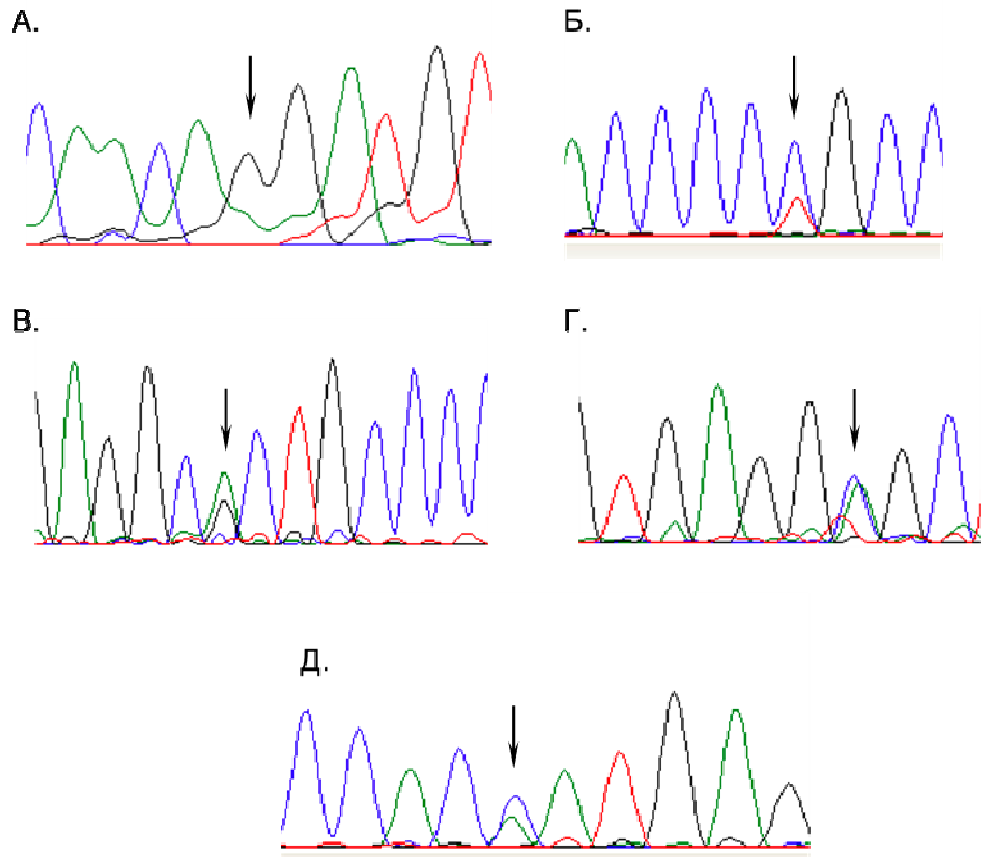
Двеста и дванадесет тумора от 199 пациента бяха изследвани за мутации в екзони от 2^{ри} до 11^{ти} на *TP53* гена. Проведена беше оптимизация на условията чрез вариране концентрациите на $MgCl_2$, dNTPs, праймери и температурата на анилинг – за PCR реакцията; и концентрацията на праймери и Big Dye – за секвенционната реакция. На **Фиг.4.11** е представен резултатът от оптимизацията на PCR реакцията за екзоните 2, 3 и 11 на гена *TP53*.

В изследваната група от 212 тумора бяха намерени 30 мутации при 52 тумора (47 пациента) (23%). Мутационният анализ на останалите шест екзона доведе до идентифицирането на 15 различни мутации наблюдавани при общо 143 пациента (67%). Общият брой на детектираните аберации във всички екзони на гена е 45, като най-голям е броят им в екзон 8 - 11/45 (24.4%), следван от екзон 5 - 20% и т.н. Разнообразието от аберации в този ген включва: точкови мутации, в кодиращата и не кодиращата част на гена, делеции на 3 нуклеотида и SNP. Мутациите, водещи до промяна в кодираната аминокиселина (missense) представляват най-голяма част от точковите мутации. Мутациите, водещи до замяна на кодираната аминокиселина със Stop кодон (nonsense) са 8 на брой, засягащи единствено 10-ти екзон на гена. Броят на регистрираните делеции е 2. Мутациите в интронните последователности на гена представляват шест на брой точкови мутации, чийто ефект върху активността и функциите на протеина p53 е неясна (**Табл.4.3**).

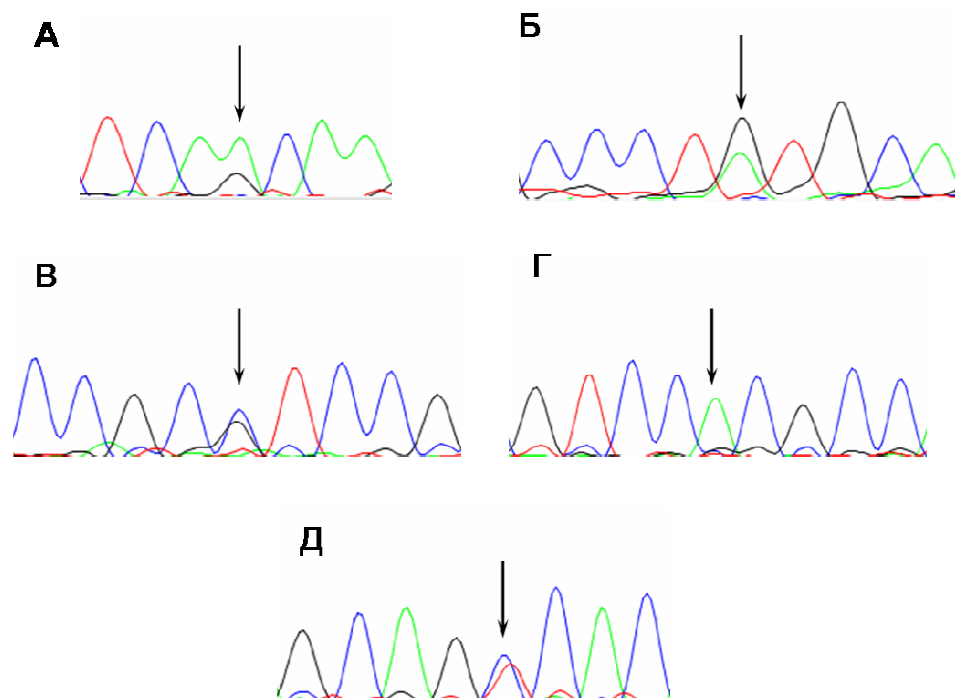
Таблица 4.3. Открити варианти в гена *TP53*

Точкови мутации						Други	
Брой	nonsense	Missense		интронни	синонимни	SNP	делеции
		патогенни	неутрални			(патогенни)	
		35	9			18 (9)	
	2			6	3		2

В екзон 5 на *TP53* гена бяха намерени общо 9 мутации - c.395A>G, K132R (**Фиг.4.12A**); c.455C>T, P152L (**Фиг.4.12 Б**); c.524G>A, R175H (**Фиг.4.12 В**); c.523C>A R175S (**Фиг.4.12 Г**) и c.535C>A H179N (**Фиг.4.12 Д**); c.392A>G R132H (**Фиг.4.13 А**); c.427G>A V143M (**Фиг.4.13 Б**); c.469G>C V157L (**Фиг.4.13 В**); c.473G>A R158H (**Фиг.4.13 Г**); c.496T>C S166T (**Фиг.4.13 Д**).



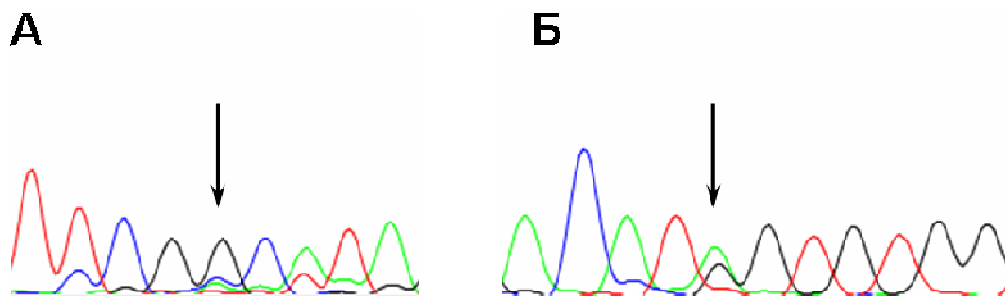
Фигура 4.12. Мутации в екзон 5 на *TP53* гена: **А.** с.395A>G; **Б.** с.455C>T; **В.** с.524G>A; **Г.** с.523C>A; **Д.** с.535C>A



Фигура 4.13. Мутации в екзон 5 на *TP53* гена: **А.** с.392A>G; **Б.** с.427G>A; **В.** с.469G>C; **Г.** с.473G>A; **Д.** с.496T>C

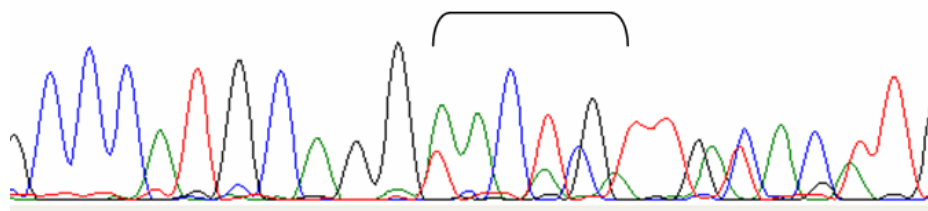
Генетични изменения в екзон 6 бяха установени при 3 тумора. В този район беше намерена мутация с.639A>G, наблюдавана при два тумора – в хомозиготно и хетерозиготно

състояние (**Фиг.4.14 А**). При пациент 178 беше открита с.643A>G мутация в хетерозиготно състояние (**Фиг.4.14 Б**).

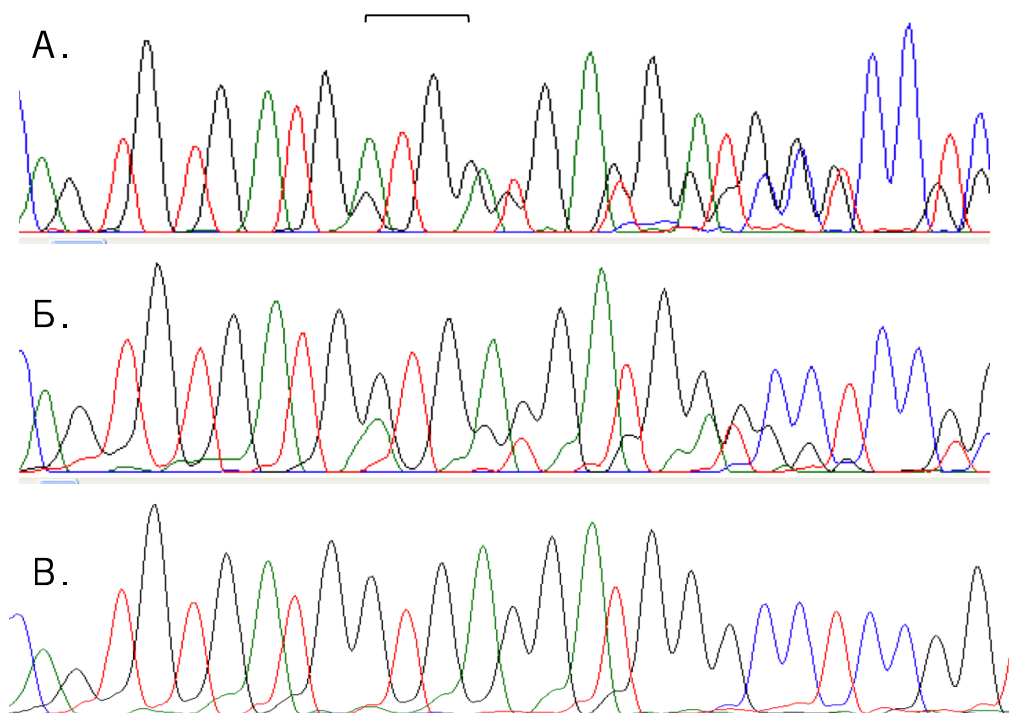


Фигура 4.14. Единични базови замени в екзон 6 на *TP53* гена: **А.** с.639A>G; **Б.** с.643A>G

Генетични изменения в екзон 7 бяха установени при 10 тумора. В този район бяха намерени 2 делеции - del716_21 при тумор 33 (**Фиг.4.15**) и del 759_61 при тумор № 16 и № 52 (**Фиг.4.16**). Последната беше открита при 2 от туморите на един пациент (тумори № 16 и № 52), но не и при третия тумор (№ 41), отстранен при последната операция (**Фиг.4.16 В**).

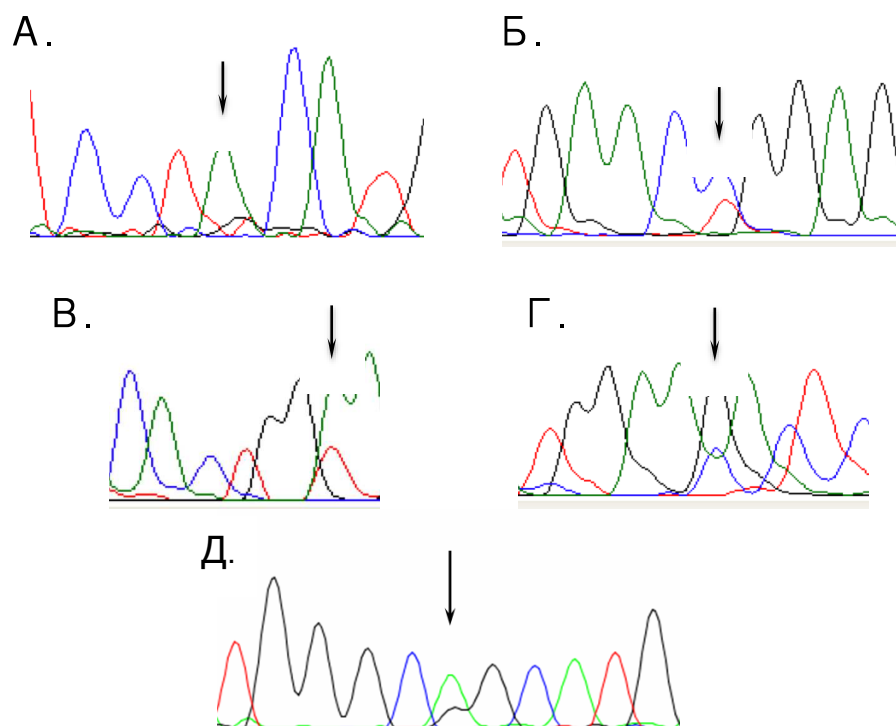


Фигура 4.15. Делеция на 6 бази (del716_21) при тумор № 33.



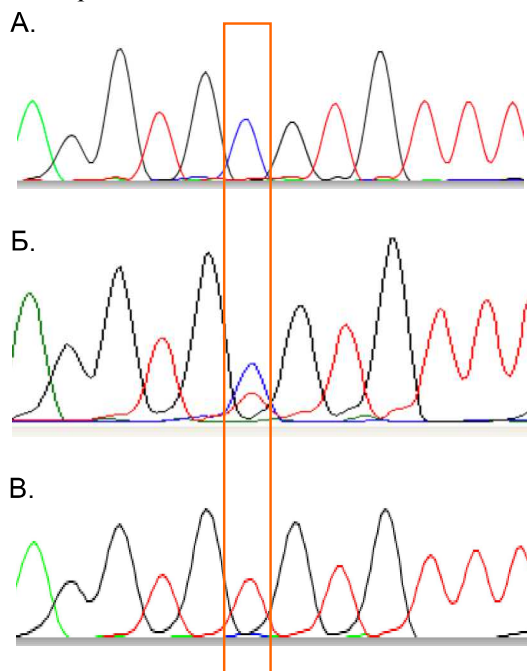
Фигура 4.16. Делеция на 3 бази (del759_61) при тумори на един и същи пациент: **А.** Тумор № 16; **Б.** Тумор № 52; **В.** Тумор № 41 – липсва мутация.

Останалите 5 мутации, открити в екзон 7 на *TP53* гена са показани на **Фиг.4.14** - с.725G>A, p.C242Y (**Фиг.4.16 А**); с.742C>T, p.R248W (**Фиг.4.16 Б**); с.773A>T, p.E258V (**Фиг.4.14 В**); с.775G>C, p.D259H (**Фиг.4.14 Г**) и с.734G>A, p.G245D

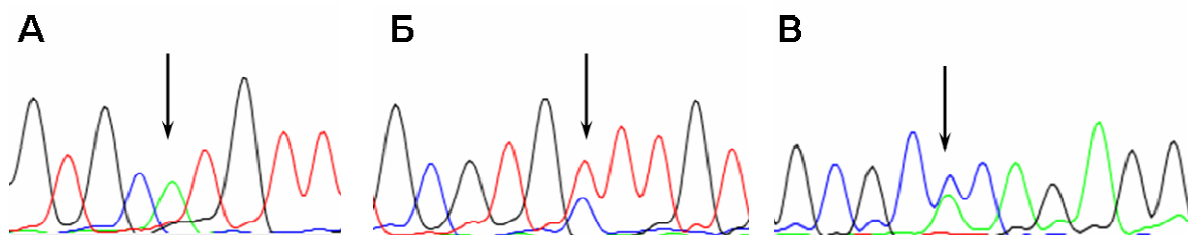


Фигура 4.17. Единични базови замени в екзон 7 на *TP53* гена: **А.** с.725G>A, **Б.** с.742C>T, **В.** с.773A>T, **Г.** с.775G>C; **Д.** с.734G>A

Най-честият обект на мутация в изследваната група тумори в ДНК-свързващия домен на белтъка беше екзон 8 – 16 мутации при 28 тумора; а най-честата мутация - с.817C>T, p.R273C – установена при 11 тумора, при 6 от които – в хомозиготно състояние. На **Фиг.4.19** са показани останалите три мутации - с.818G>A, p.R273H в хомозиготно състояние и две в хетерозиготно - с.821T>C, p.V274A и с. 850A>C, p.T284P.



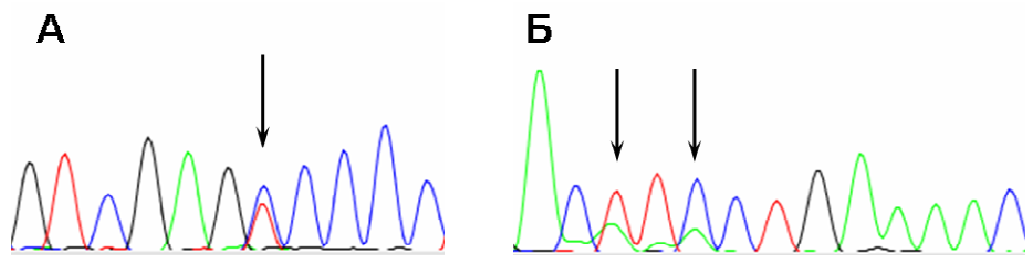
Фигура 4.18. Най-честата мутация в ДНК-свързващата област на *TP53* гена - с.817C>T: **А.** нормална проба; **Б.** хетерозиготна замяна C>T; **В.** хомозиготна мутация C>T



Фигура 4.19. Мутации в екзон 8 на TP53 гена: **A.** с.818G>A; **Б.** с.821T>C; **В.** с. 850 A>C

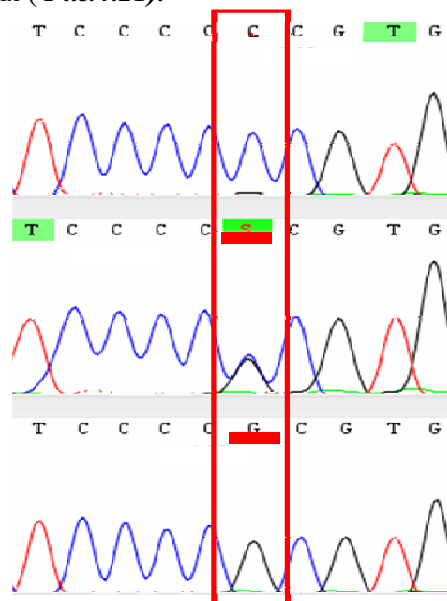
Всички пациенти в изследваната група бяха изследвани и за наличие на мутации в екзони 2, 3, 4, 9, 10 и 11. Бяха намерени 15 различни мутации в общо 143 пациента (67%). Освен генетични изменения, водещи до промяна на аминокиселина (missense мутации) или замяна със стоп-кодон (nonsense мутации), беше установена и 1 делеция в екзон 4. Докато в екзон 2, 3, 4, 9 и 10 бяха намерени множество мутации, в екзон 11 такива липсваха.

Генетично изменение в екзон 2 беше установено само при 1 тумор. В този район беше намерена хетерозиготна мутация с.34 C>T водеща до аминокиселинна замяна на пролин със серин в кодон 12 (p.P12S) наблюдаван при пациент № 60 (**Фиг.4.20 А**). При един пациент беше установена замяна на две близки бази - с.77T>A и с.79C>A, в екзон 3 (**Фиг.4.20 Б**).



Фигура 4.20. Мутации в екзони 2 и 3 на TP53 гена: **A.** с.34C>T; **Б.** с.77T>A и с.79C>A

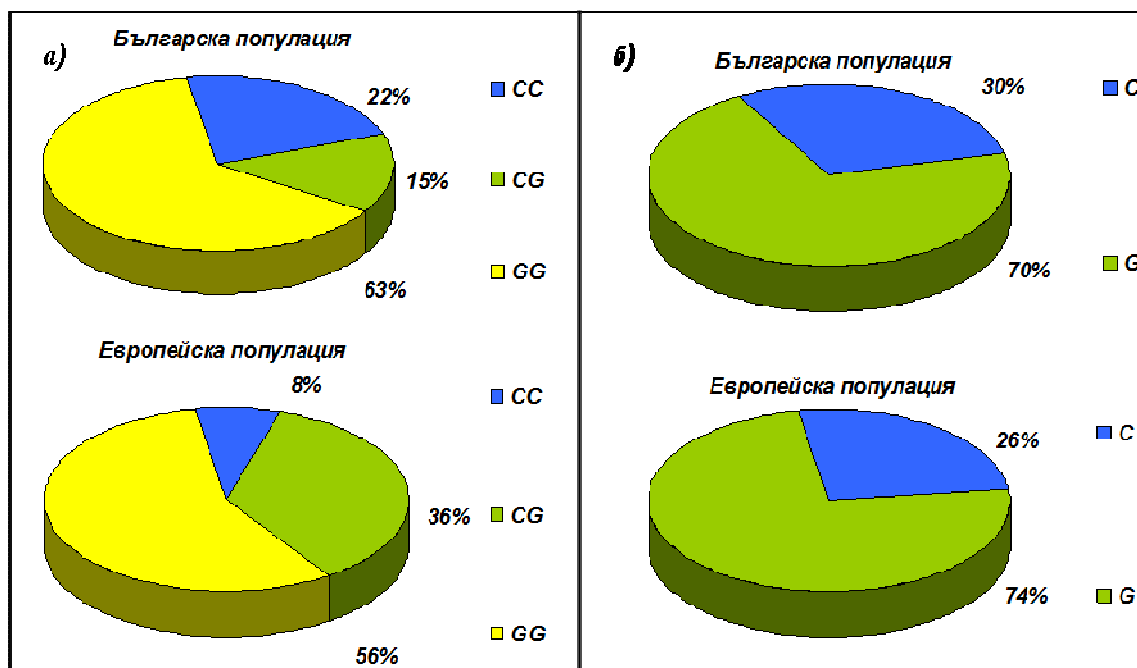
Най-честият обект на генетични изменения в екзон 4 в изследваната група се оказва missense еднонуклеотидна замяна (SNP) - rs1042522 в позиция с.215C>G R72P, с неясна значимост за раковите заболявания (**Фиг.4.21**).



Фигура 4.21. Най-честата мутация в TP53 гена: **A.** нормална проба; **Б.** хетерозиготна замяна C>G; **В.** хомозиготна мутация C>G

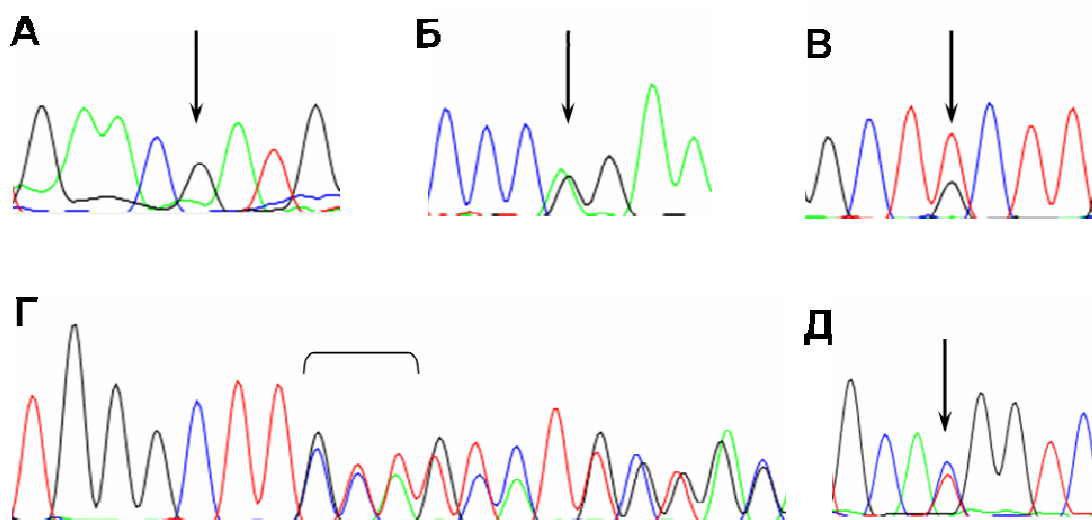
Сто тридесет и седем пациента са хомозиготни по отношение на изследвания SNP спрямо антисенс веригата на гена, 39 от които имат генотип CC, а 111 пациента с GG генотип.

Останалите 26 пациента са хетерозиготни с генотип **CG**. Процентното съотношение на трите генотипа в изследваната група пациенти е съответно: 63% за **GG** генотип, 15% за **GC** генотип и 22% за **CC** генотип (**Фиг.4.22**).



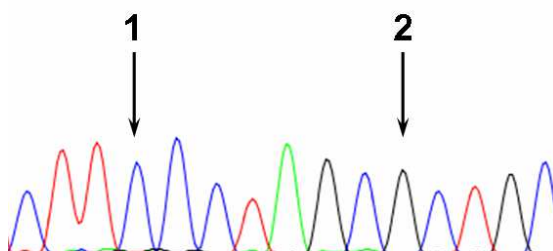
Фигура 4.22. Процентно съотношение на: **а)** различните генотипове в европейската и българската популация; **б)** различните аели в двете популации по отношение на rs1042522

При 5 от пациентите освен наличие на rs1042522 (с.215C>G, p.R72P) беше установена и друга аберация в екзон 4 (с.299A>G, p.Q100R или с.151G>A, p.E51K или с.374C>T, p.T125M или с.338T>G F113S). При един от пациентите са открити 2 мутационни събития освен наличието на rs1042522 (с.155A>G, p.Q52R и с.374C>T, p.T125M) – **Фиг.4.23**. При един от пациентите беше открита и единствената делеция намерена в този екзон, засягаща последователност от три нуклеотида – **Фиг.4.23 Г**



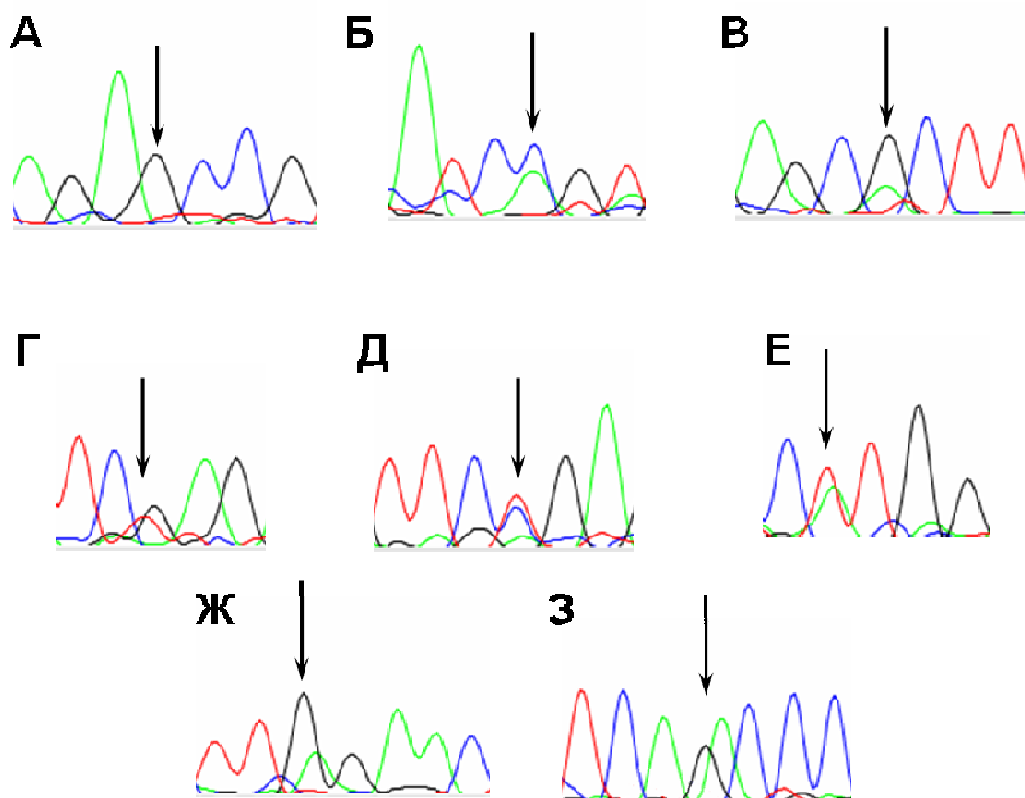
Фигура 4.23. Мутации в екзони 4 на TP53 гена: **А.** с.155A>G; **Б.** с.299A>G; **В.** с.338T>G F113S; **Г.** с.339_341delCTT; **Д.** с.374C>T T125M

В екзон 9 на *TP53* гена беше открита само една мутация (*c.921A>G* – **Фиг.4.24 "2."**) и то само при един пациент - № 80. В същия пациент бяха открити и два полиморфизма единия, от които е показан на **Фиг.4.24 "1"**.



Фигура 4.24. Аберации в екзон 9 на *TP53* в хомозиготно състояние: 1. *c.920-6T>C*; 2. *c.921A>G*.

В екзон 10 на *TP53* гена бяха намерени 8 мутации, които досега не са били докладвани - *c.995T>G* (**Фиг.4.25 А**); *c.997C>A* (**Фиг.4.25 Б**); *c.1010G>A* (**Фиг.4.25 В**); *c.1015G>T* (**Фиг.4.25 Г**); *c.1024C>T* (**Фиг.4.25 Д**); *c.1042T>A* (**Фиг.4.25 Е**); *c.1044T>A* (**Фиг.4.25 Ж**); *c.1090G>A* (**Фиг.4.25 З**);



Фигура 4.25. Мутации в екзон 10 на *TP53* гена: **А.** *c.995T>G*; **Б.** *c.997C>A*; **В.** *c.1010G>A*; **Г.** *c.1015G>T*; **Д.** *c.1024C>T*; **Е.** *c.1042T>A*; **Ж.** *c.1044T>A*; **З.** *c.1090G>A*

За допълнителен анализ на получените точкови мутации беше използвана Excel-базираната програма: MUT-TP53 П_2.01, съдържаща информация от базата данни UMD. Анализиранияте резултати от програмата са показани в обобщен вид в **Табл.4.4**. MUT-TP53 П_2.01 генерира информация относно функционалността на мутантния белтък, като процент остатъчна активност от активността на нормалния протеин. В допълнение дава информация относно честотата на дадената мутация, спрямо регистрираните мутации в UMD базата данни.

Таблица 4.4. Точкови мутации / SNP в гена TP53 и техният ефект на белтъчно ниво

Мутация/SNP	Мутационен ефект	SIFT клас	SNP - rs №/ Клинична значимост	Честота	Активност на белтъка
c.34C>T; p.P12S	missense	неутрална	-	Не описвана досега	Силно намалена
c.74+38C>G	NA	интронна	rs1642785 / Не патогенна	-	Силно намалена
c.77T>A; p.L26H	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Без значителна загуба на активност
c.79C>A, p.P27H	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Без значителна загуба на активност
c.151G>A; p.E51K	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Без значителна загуба на активност
c.155A>G; p.Q52R				Не описвана досега	Без значителна загуба на активност
c.215C>G; p.R72P	missense	патогенна	rs1042522 Неясна значимост	---	---
c.299A>G; p.Q100R	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Силно намалена
c.338T>G; p.F113S	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.374C>T; p.T125M	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.392A>G; p.N131S	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.395A>G; p.K132R	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
c.427G>A; p.V143M	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
c.455C>T; p.P152L	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
c.469G>C; p.V157L	missense	неутрална	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.473G>A; p.R158H	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
c.496T>C; p.S166T	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Силно намалена
c.523C>A; p.R175S	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.524G>A; p.R175H	missense	патогенна	rs28934578/ Патогенна	"Hot spot" мутация	Силно намалена
c.535C>A; p.H179N	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
c.639A>G; p.R213R	silent	NA	rs1800372 /Не патогенна	---	---
c.643A>G; p.S215G	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
c.672+31A>G	intronic	NA	rs34949160/ NA	-	Силно намалена
c.672+48g>a	intronic	NA	rs17884607 /NA	-	-
*del 716_21	deletion	NA	-	-	-
c.725 G>A; p.C242Y	missense	патогенна	rs121912655/ Патогенна	Честа мутация	Силно намалена
c.734G>A; p.G245D	missense	патогенна	rs121912656/ Патогенна	Честа мутация	Силно намалена
c.742C>T; p.R248W	missense	патогенна	rs121912651 /Патогенна	"Hot spot" мутация	Силно намалена
*del 759_61	deletion		-	-	Силно намалена
c.773A>T; p.E258V	missense	патогенна	-	Рядка мутация	Силно намалена
c.775G>C; p.D259H	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Силно намалена
c.799C>T; p.R267W	missense	патогенна	rs55832599/ Вероятно патогенна	Честа мутация	Силно намалена
c.806G>T; p.S269I	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Силно намалена
c.817C>T; p.R273C	missense	патогенна	rs121913343/ ---	"Hot spot"	Силно намалена

			/Патогенна	мутация	
<i>c.818G>A; p.R273H</i>	missense	патогенна	rs28934576/ Патогенна	"Hot spot" мутация	Силно намалена
<i>c.820G>C; p.V274L</i>	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Силно намалена
<i>c.821T>C; p.V274A</i>	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
<i>c.838A>G; p.R280G</i>	missense	патогенна	-	Честа мутация	Силно намалена
<i>c.841G>C; p.D281H</i>	missense	патогенна	-	"Hot spot" мутация	Силно намалена
<i>c.844C>T; p.R282W</i>	missense	патогенна	rs28934574/ Патогенна	Честа мутация	Силно намалена
<i>c.847C>T; p.R283C</i>	missense	патогенна	rs149633775/ Неясна значимост	Не е честа мутация	Силно намалена
<i>c.850A>C; p.T284P</i>	missense	патогенна	-	Рядка мутация	Силно намалена
<i>c.853G>A; p.E285K</i>	missense	патогенна	rs112431538/ NA	Честа мутация	Силно намалена
<i>c.857A>T; p.E286V</i>	missense	патогенна	-	Не е честа мутация	Силно намалена
<i>c.921+27g>a</i>	intronic	NA	-	-	Силно намалена
<i>c.921A>G; p.A307A</i>	silent	NA	-	-	-
<i>c.921A>G; p.A307A</i>	silent	NA	-	Рядка мутация	Без промяна на аминокиселината. Може да засегне сплайсинга, транслацията и стабилността на РНК.
<i>c.995T>G; p.I332S</i>	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Силно намалена
<i>c.997C>A; p.R333S</i>	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Силно намалена
<i>c.1010G>A; p.R337H</i>	missense	патогенна	rs121912664/ Вероятно патогенна	Рядка мутация	Стабилността е силно зависима от pH на средата
<i>c.1015G>T; p.E339*</i>	nonsense	NA	-	Не е честа мутация	Силно намалена
<i>c.1024C>T; p.R342*</i>	nonsense	NA	-	Честа мутация	Силно намалена
<i>c.1042T>A; p.L348M</i>	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Силно намалена
<i>c.1044G>A; p.L348L</i>	missense	патогенна	-	Не описвана досега	Без промяна на аминокиселината. Може да засегне сплайсинга, транслацията и стабилността на РНК.
<i>c.1090 G>A; p.A364T</i>	missense	неутрална	-	Рядка мутация	Частична активност
<i>c.1100+30A>T</i>	NA	интронна	rs17880847/ NA	-	-
<i>*1101+28C>A</i>	NA	интронна	-	-	-

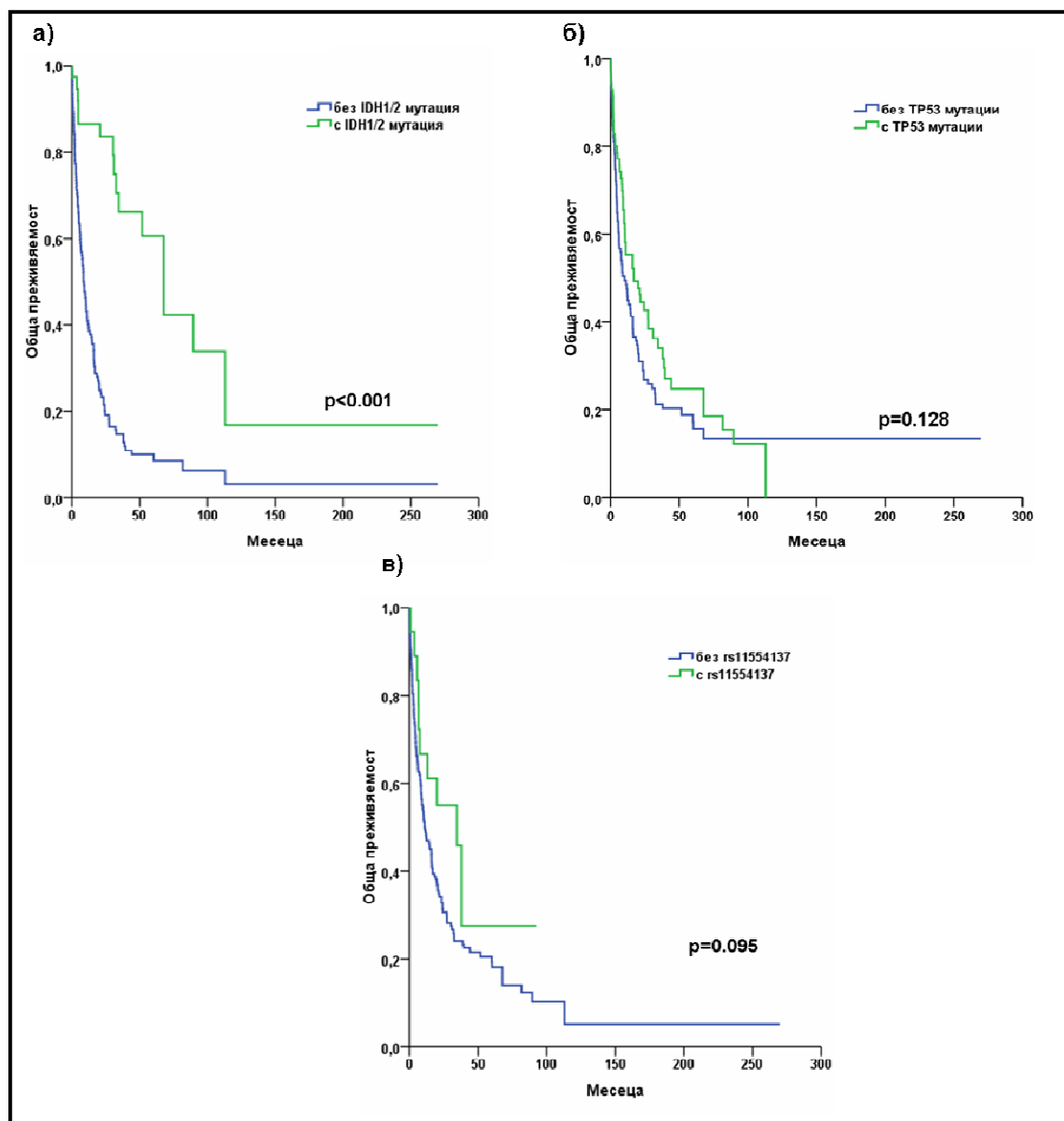
„Силно намалена” – активност на мутантния белтък под 20% в сравнение с нормалния

4.3.4. ОЦЕНКА НА ПРОГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ В *IDH1*, *IDH2* И *TP53*

Генотипът на всички изследвани тумори е посочен в *Приложение I, Табл. I.1* и *I.2*. Асоциациите на намерените генетични изменения с клиничните особености на пациентите бяха изследвани чрез статистическа обработка на резултатите с помощта на статистическа програма SPSS v.17.0 и Kaplan-Meier анализ за преживяемост. Връзката с преживяемостта на полиморфизма *c.315C>T*, *p.G105G* (rs11554137) в гена *IDH1* е била изследвана при пациенти с амиелоидна левкемия и тироиден карцином. Въпреки, че rs11554137 не е показал статистическа значима връзка с прогнозата на пациентите с тироиден карцином ⁽⁴¹⁵⁾, при пациентите с левкемия е асоцииран с по-лоша прогноза и по-висока иРНК експресия на *IDH1*

⁽⁴¹⁶⁾. За тази генетична промяна се предполага, че води до промяна на ензима IDH1 чрез промяната на РНК стабилността, сплайсинга и правилното нагъването на белтъчната структура.

По литературни данни мутациите в *IDH1* и *IDH2* корелират с по-дълга преживяемост при глиома и са характерни за по-млади пациенти ⁽¹⁴⁰⁾. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на двете групи (с и без мутация; $p < 0.001$) - **Фиг.4.26 а)** *IDH1/IDH2* мутации бяха наблюдавани по-често при глиоми II и III степен, но поради малкия брой тумори II и III степен тази характеристика не показва статистическа значимост ($p = 0.2$). Генетичните изменения в *IDH1/IDH2* бяха по-чести при вторичните глиоми (26.7%) отколкото при първичните (8%).

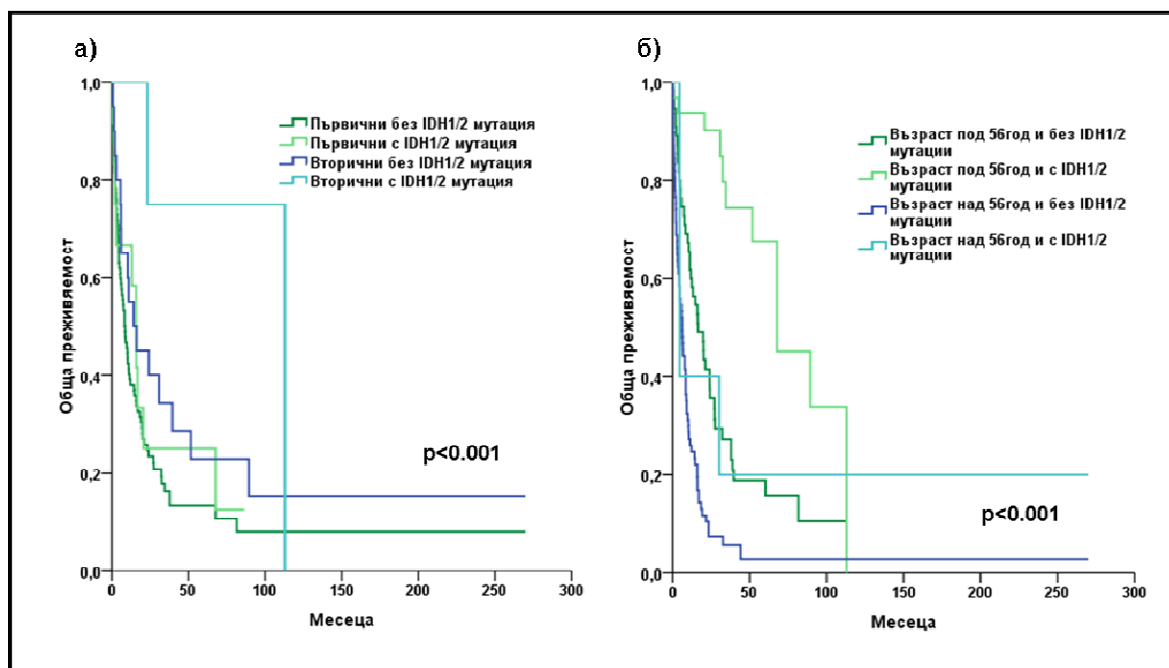


Фигура 4.26. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на: а) мутация в *IDH1/IDH2*; б) мутация в *TP53*; в) полиморфизъм *rs11554137* в *IDH1* гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост

Статистически анализ беше извършен, независимо от откритите мутации и за намерения полиморфизъм *rs11554137* в *IDH1* гена. Не беше открита статистическа значима връзка между наличието му и преживяемостта ($p = 0.095$; **Фиг.4.26 в**). Същите изчисления бяха направени и за *TP53* гена – **Фиг.4.26 б**) Мутациите в *TP53* гена не показаха статистически значима корелация с никой от клинични показатели, нито с преживяемостта ($p = 0.21$).

Тъй като генетичните изменения в *IDH1* се асоциират по-често с вторичните глиоми (60-90%) отколкото с първичните⁽⁴¹⁷⁾, и съответно по литературни данни при вторичните тумори с наличие на *IDH1* или *IDH2* мутации се наблюдава връзка с прогнозата ние направихме статистически анализ, като разделихме пациентите според мутационния им статус и според възникването на тумора. На **Фиг.4.26 а)** се наблюдава, че пациентите с вторични тумори и наличие на *IDH1/IDH2* мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ($p<0.001$). Въпреки, че първичните тумори са с по-лоша преживяемост от вторичните, при тези с *IDH1/IDH2* мутации се наблюдава по-добра прогноза от тези без мутация.

На **Фиг.4.27 б)** се наблюдава статистическа значима разлика в преживяемостта на пациентите в зависимост от възрастта и мутационния статус на *IDH1/IDH2* – тези с мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ($p<0.001$). Въпреки, че пациентите с възраст на възникване на заболяването над 56 год. са с по-лоша преживяемост, при тези с *IDH1/IDH2* мутации се наблюдава по-добра преживяемост в сравнение с тези без мутация.



Фигура 4.27. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от наличието на *IDH1/IDH2* мутации и: **а)** вида ГБМ тумор; **б)** възрастта на възникване на тумора

Сох-регресионният анализ беше използван с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Всички фактори, показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Сох регресионен анализ, използващ long-rank теста. С негова помощ фактори като наличието на *IDH1/IDH2* мутация ($p<0.001$), възрастта на заболяемост под 56 год. ($p<0.001$), KPS статус над 70 ($p=0.001$) и вид глиобластоми – първични или вторични ($p=0.002$) показаха по-добра прогностична стойност. За разлика от тях вида оперативна резекция ($p=0.173$), наличието на открития полиморфизъм в *IDH1* гена ($p=0.100$) и наличието на мутация в *TP53* гена ($p=0.132$) не показаха статистическа значима връзка с прогнозата – **Табл.4.5**.

Факторите показали значима връзка с преживяемостта бяха подложени на Мултивариационен Сох-регресионен анализ. С негова помощ бяха отграничени тези фактори, имащи независима прогностична стойност при изследваните пациенти. Мултивариационният регресионен анализ показва, че единствено възрастта и наличието на *IDH1/IDH2* мутации имат статистическа значимост като независими прогностични фактори. Докато възрастта е предиктор за лоша преживяемост ($HR=1.045$, т.е. увеличаването с една година е съпроводено с влошаване на прогнозата на пациентите с 4.5 %), то наличието на *IDH1/IDH2* мутации е фактор асоцииран с по-дългата преживяемост ($HR=0.201$).

Таблица 4.5. Унивариационен и мултивариационен Сох регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Сох регресионен анализ			Мултивариационен Сох регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	1.048	1.029-1.067	<0.001	1.045	1.026-1.065	<0.001
Вторични vs. първични ГБМ	0.483	0.306–0.761	0.002	0.628	0.383-1.272	0.065
Вид операция (тотална vs. др)	0.794	0.571-1.106	0.173	*	*	*
KPS (за 10 единици)	0.984	0.979 - 0.993	0.001	1.005	0.993-1.017	0.431
IDH1/IDH2 (мутирал vs. немутирал)	0.227	0.134 – 0.387	<0.001	0.201	0.137–0.565	<0.001
SNP rs11554137 (с vs. без)	0.596	0.322- 1.104	0.100	*	*	*
TP53 (мутирал vs. нормален)	0.770	0.548- 1.196	0.132	*	*	*

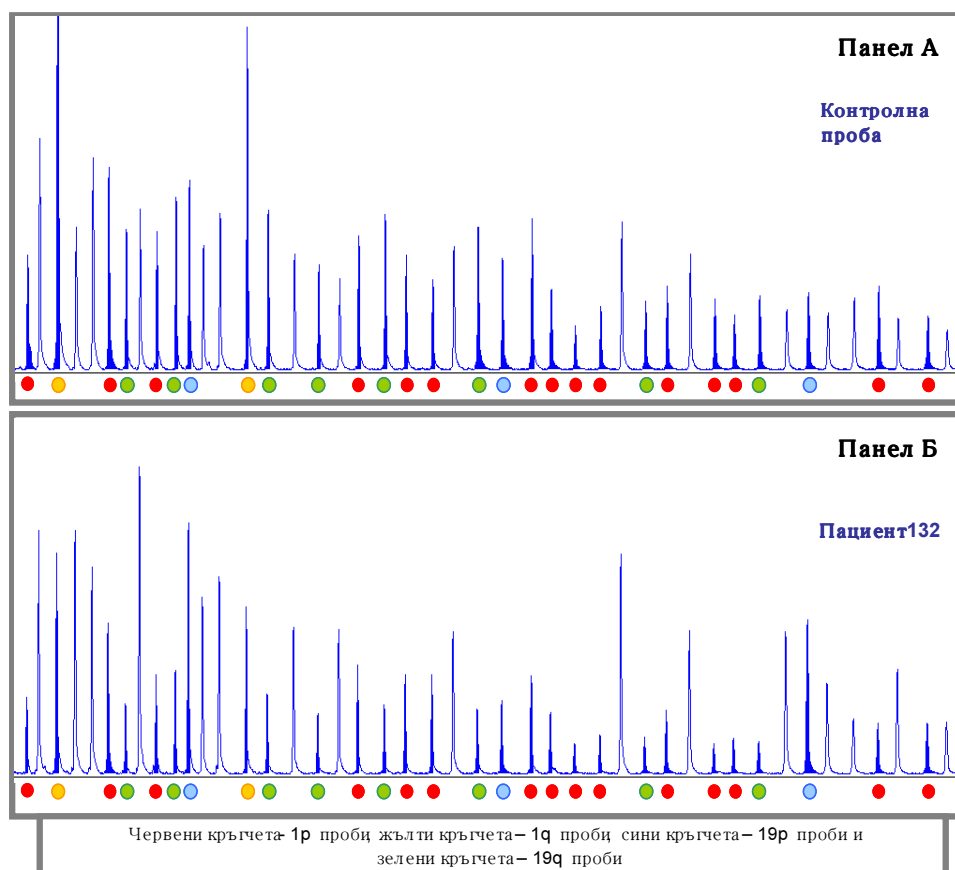
* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

4.4. АНАЛИЗ ЗА НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q

4.4.1. СИСТЕМЕН ХОД НА АНАЛИЗА

При количествения анализ на резултатите, получени чрез MLPA метода за определяне наличието на делеции на участъци или целите хромозомни рамена 1p и 19q беше извършено сравнение между височината и площта на пиковите на всяка таргетно-специфична сонда, представляващи отделните гени, с тези на съседните референтни сонди в рамките на изследваната туморна проба. Освен това, за изследването на всяка проба е необходимо наличието на външна контролна проба, която да е успоредно заложена с изследваната проба. Тя бива подложена на същите условия на MLPA и електрофоретично разделяне. Методът налага използване на външна контрола, тъй като получените пикове се сравняват по площ и височина с тези на изследваната туморна проба и служат като референтни стойности. Така достоверността на получените резултати се подсигурава два пъти. Външната контрола трябва да съдържа ДНК от здрав пробанд и да е изолирана от същия биологичен материал, от който е изолирана и пробата (кръв, свежа тъкан или парафиново блокче). За настоящето проучване беше използвана ДНК, изолирана от здрава тъкан на пациенти с мозъчни тумори или венозна кръв от същия пациент. При невъзможност за достъп до такива материали изследването се провежда като се сравнява ДНК, изолирана от кръв на здрав индивид, без история на ракови образувания.

За въвеждането на използвания от нас SALSA MPLA KIT P088-B1/B2 oligodendroglioma 1p-19p кит бяха извършени редица оптимизации. Първоначално беше оптимизирано началното количество ДНК матрица. Извършен беше експеримент с варираща концентрация на ДНК от 20 до 200 ng/реакция и беше избрана концентрация от 50 ng като резултат, показващ най-ясни визуални показатели. Други условия на метода, които претърпяха оптимизация бяха температурата и времето на първоначалната денатурация. Първоначалната денатурация е важен процес, от който зависи пълното разделяне на двете ДНК вериги и дали последващата хибридизация ще се извърши пълноценно. Като оптимални условия ние установихме температура - 98°C и време 20 мин. В следващи експерименти бяха оптимизирани условията на капилярната електрофореза: количеството на нанесения PCR продукт (1–4 µl), време и волтаж при инжектиране на пробата, а също време и волтаж на разделяне. Като оптимални бяха избрани следните параметри: време на инжектиране 15 сек, волтаж на инжектиране – 1.6 kV, време на разделяне - 2000s, волтаж на разделяне 1.6 kV. На **Фиг.4.28** е показана MLPA проба, разделена на капилярна електрофореза при оптимални условия на анализа.



Фигура 4.28. Капилярни електрофореграми на контролна проба (панел А) и изследваната проба (панел Б.) анализирани с помощта на SALSA MLPA probemix P088- B1/B2 Oligodendroglioma 1p-19q при оптимални условия.

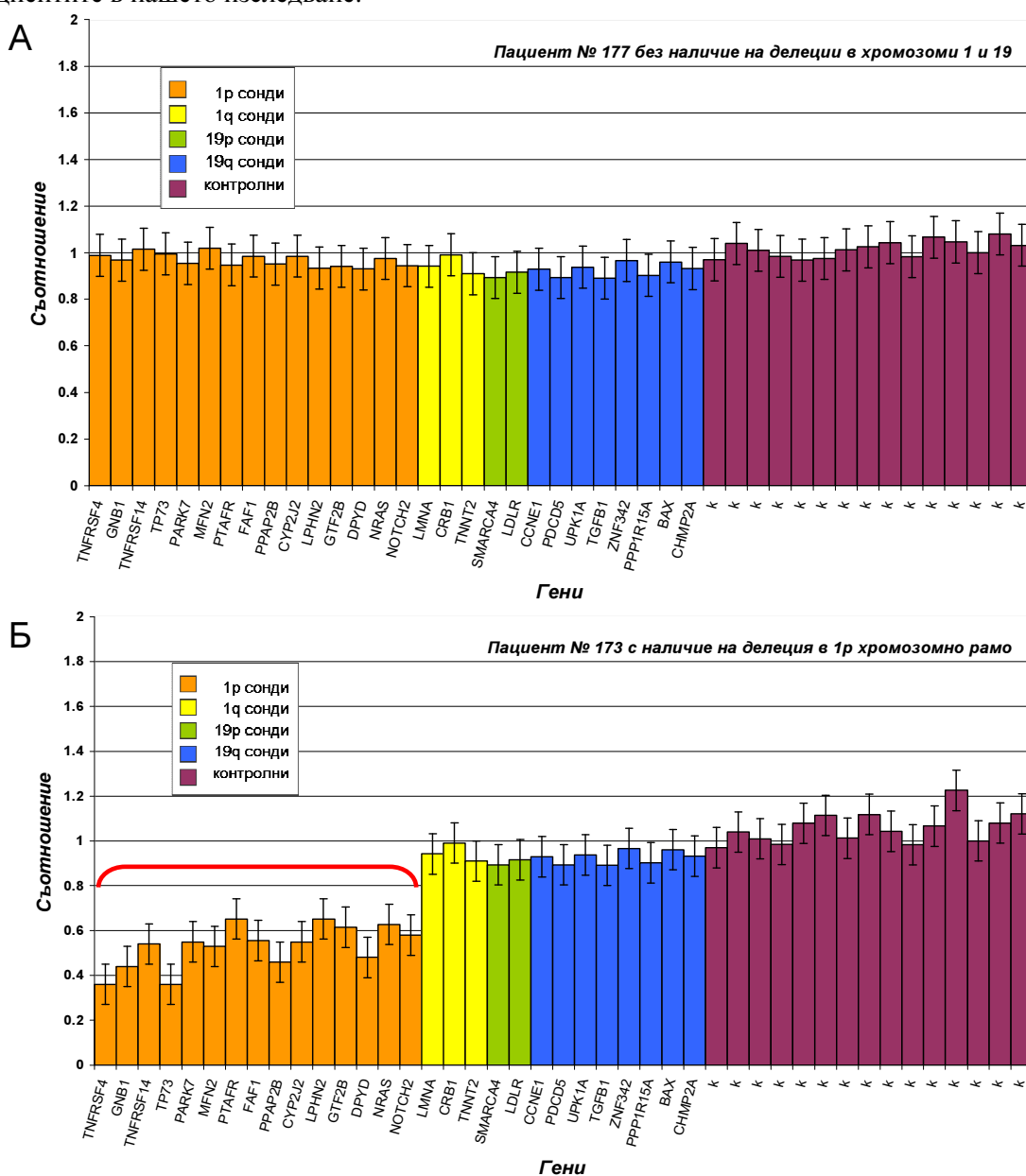
След разделяне на пробите и контролите на капилярна електрофореза получаваме файл с електрофореграми. Количественият анализ извършваме с помощта на софтуер **Coffalyser V.8.0**, специално разработен от фирмата, производител на MLPA китове (**MRC Holland**).

4.2.2. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИ, ПОЛУЧЕНИ ОТ MLPA МЕТОДА ЗА ДЕЛЕЦИИ В 1p И 19q ХРОМОЗОМНИ РАМЕНА

По литературни данни едновременно наличие на делеции в хромозоми 1p и 19q показва връзка с по-добър отговор към лечение и благоприятен изход, не само при олигодендроглиоми, а и при астроцитомии. Според McLendon et al. ⁽⁴¹⁸⁾, туморите с делеция на целите хромозомни рамена 1p и 19q се характеризират с по-добра прогноза от тези с частична загуба или без загуба на хромозомен материал. От изследваните 212 тумора при 3 пациента амплификация на фрагментите за прицелните райони не беше осъществена поради естеството на изходния материал, а именно ДНК, изолирана от парафиново блокче. При шест от пробите, анализа не беше извършен поради липсата на достатъчно количество ДНК матрица. В изследваната група от 203 тумора (191 пациента) с глиоми съществува група от 11 пациента, при които има повече от един изследван материал. При трима от тях, туморите са отделени в резултат на провеждането на две различни хирургични резекции, а при един – от три. За останалите осем пациента разликата в туморния материал се дължи на различната форма на съхранение на тъканта, т.е. свеж и съхранен под формата на парафиново блокче материал. Анализът за делеционните събития в изследваните райони показва, че метода е достатъчно специфичен, за да бъде използван за анализ на ДНК изолирана от парафиново архивиран материал. Не бяха наблюдавани разлики в получените резултати при сравнение на материалите съхранени под различна форма. Поради тази причина в анализа на данните само един от двата материала беше включен за осемте двойки туморни материала.

Туморите на пациентите претърпели повече от една операция бяха анализирани като самостоятелни проби. При пациента с три операции бяха анализирани материали само от две от тях поради изчерпване на ДНК матрицата от първата операция. Само един от пациентите показва разлика в делеционните събития на туморите от различните операции. Тумор № 108 е от първата операция и в него се наблюдава частична делеция на 1p, включваща гените PARK7, MFN2, PTAFR, FAF1. Материал № 211 е тумор от същия пациент, но от четвърта операция. В този тумор вече се наблюдава делеция на цялото 1p хромозомно рамо, като се открива и ново събитие – делеция на гените ZNF342 (или ZNF296), PPP1R15A, BAX и CHMP2A в късото рамо на 19^{-та} хромозома.

В изследваната група от пациенти бяха открити делеционни събития в част и/или целите изследвани райони на хромозомните рамена 1p, 1q, 19p и 19q при общо 80 тумора от 78 пациента (39.4%). В табличен вид (*Приложение II, Табл. II.1.*) са представени резултатите при пациентите в нашето изследване.



Фигура 4.29. Графично представяне на резултати от MLPA анализ: **А.** пациент № 177 без наличие на делеции в хромозоми 1 и 19; **Б.** пациент № 173 с наличие на 1p делеция

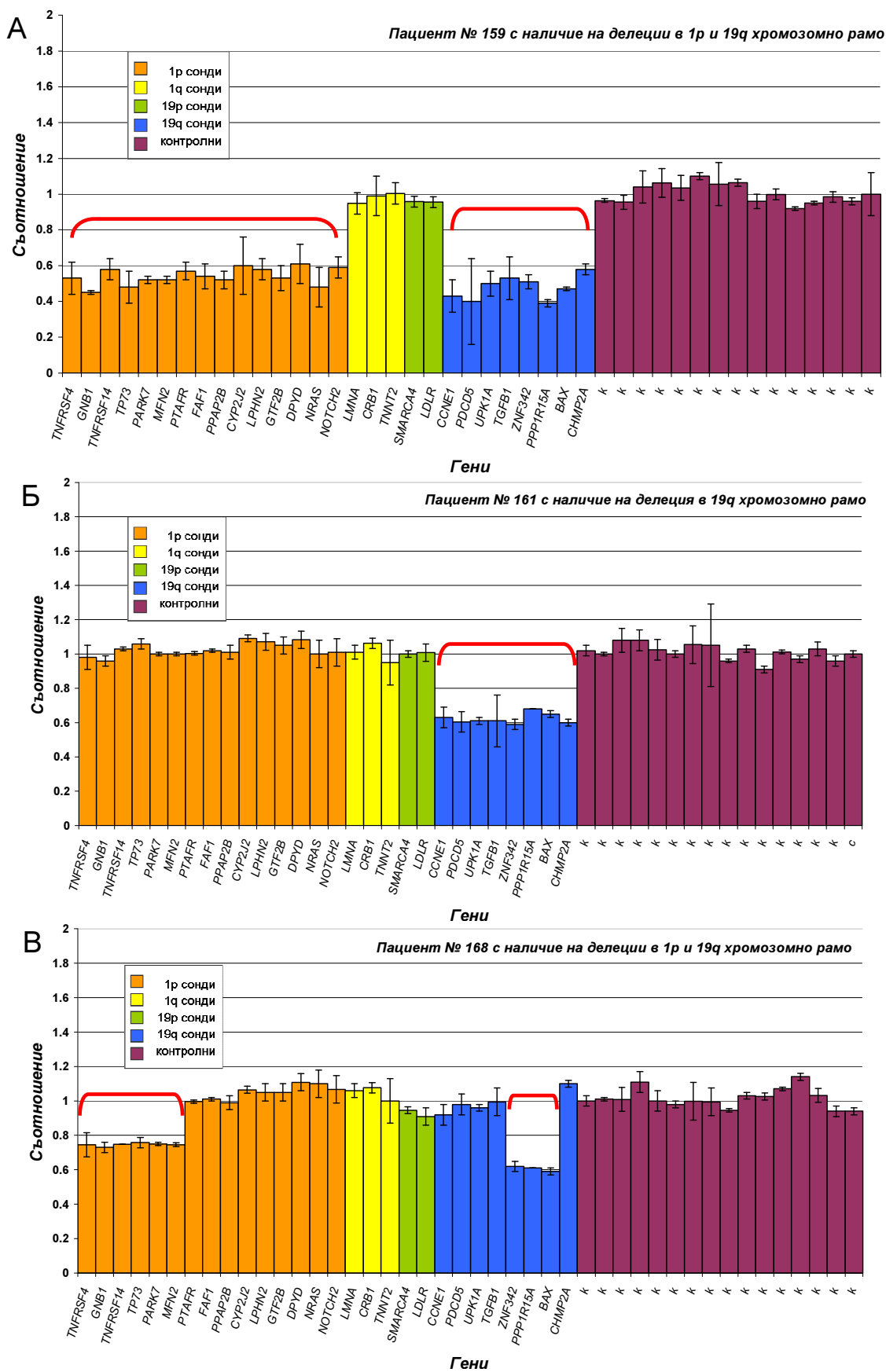
Делеции, обхващащи цялото късо (p) рамо на хромозома 1 бяха открити в 13 пациента от 67^{-те} пациента с поне един делетирал ген в 1p (19.1%). На **Фиг.4.29 А** графично са показани пациенти, в единия от които не е открита делеция в изследваните райони, а другият е със

загуба на целия изследван 1p регион. Следващите по-честота в групата се откриват делеции засягащи гените *PARK7-PTAFR*, *FAF1*, *NRAS* и *NOTCH2*, съответно при 7, 5, 5 и 6 пациента. Дванадесет от пациентите притежават 2 делеции в 1p хромозомния район, а при един се наблюдават 1 по-обширна и 3 делеции засягащи само един от гените. В **Табл.4.6** са показани всички делеционни събития (1p, 1q, 19p и 19q), големината и броя пациенти, при които са открити.

Таблица 4.6. Характеристика на откритите делеционни събития в хромозоми 1 и 19

Хр	Хр. рамо	Делеция		Район Mb	бр. пациенти
		начало	край		
1	p	TNFRSF4	<i>GNB1</i>	0.68	1
			<i>PARK7</i>	6.90	2
			<i>MFN2</i>	10.93	3
			<i>PTAFR</i>	27.36	4
			<i>NRAS</i>	114.11	2
			<i>NOTCH2</i>	119.47	13
		<i>GNB1</i>	-	0.11	1
			<i>TP73</i>	1.95	1
		TNFRSF14	<i>TP73</i>	1.18	2
			<i>MFN2</i>	95.86	1
			<i>PTAFR</i>	26.02	1
			<i>NRAS</i>	112.77	1
			-	0.02	4
		<i>PARK7</i>	<i>MFN2</i>	4.05	1
			<i>PTAFR</i>	20.48	7
			<i>FAF1</i>	43.40	3
		<i>MFN2</i>	-	0.03	2
			<i>DPYD</i>	86.35	1
		<i>PTAFR</i>	<i>FAF1</i>	22.95	2
			<i>NOTCH2</i>	92.14	2
		<i>FAF1</i>	-	0.52	5
			<i>GTF2B</i>	38.45	1
		<i>PPAP2B</i>	-	0.08	1
			<i>CYP2J2</i>	3.43	1
		<i>CYP2J2</i>	-	0.03	3
			<i>GTF2B</i>	29.00	1
		<i>LPHN2</i>	-	0.19	2
			<i>GTF2B</i>	7.09	1
		<i>DPYD</i>	-	0.84	1
			<i>NOTCH2</i>	23.07	1
		<i>NRAS</i>	-	0.01	6
		<i>NOTCH2</i>	-	0.16	5
19	q	<i>LMNA</i>	-	0.25	2
			<i>TNNT2</i>	45.26	10
		<i>CRB1</i>	-	0.21	2
			<i>TNNT2</i>	4.11	5
		<i>TNNT2</i>	-	0.02	4
	p	<i>SMARCA4</i>	<i>LDLR</i>	0.17	17
		<i>CCNE1</i>	-	0.01	7
			<i>UPK1A</i>	5.87	1
			<i>TGF-β1</i>	11.56	1
			<i>PPP1R15A</i>	19.08	2
			<i>CHMP2A</i>	28.76	23
		<i>PDCD5</i>	<i>TGF-β1</i>	8.79	1
		<i>UPK1A</i>	-	0.01	1
			<i>CHMP2A</i>	22.91	1
		<i>TGF-β1</i>	<i>CHMP2A</i>	17.23	1
		<i>ZNF342</i>	-	0.00	3
			<i>BAX</i>	3.89	3
		<i>PPP1R15A</i>	<i>CHMP2A</i>	13.49	1
			<i>CHMP2A</i>	9.69	2
		<i>CHMP2A</i>	-	0.00	1

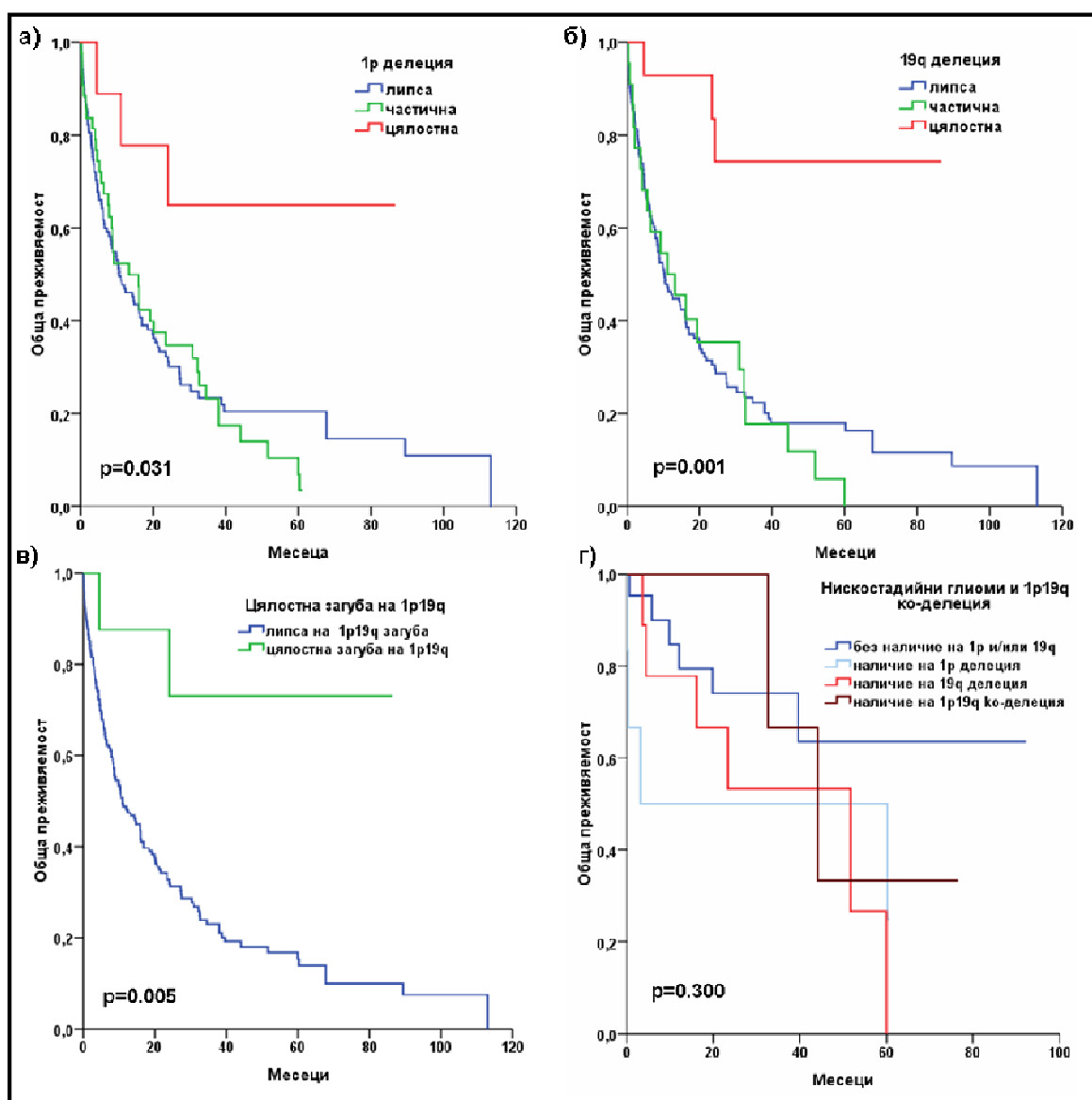
В изследваната група пациенти 24 показаха наличие на делеционни събития в хромозомно рамо 1q. Десет от пациентите (41.6%) имаха делеция на всичките 3 амплифицирани района в 1q, кодиращи гените *LMNA*, *CRB1*, *TNNT2*, и в 6 (25%), делеции засягащи *CRB1* и *TNNT2* гените. Единична делеция в гените *LMNA*, *CRB1* или *TNNT2* беше наблюдавана съответно в 2 (8.3%), 2 (8.3%) и 4 (16.6%) от пациентите.



Фигура 4.30. Графично представяне на резултати от MLPA анализ: **А.** пациент №159 с наличие на 1p/19q делеции; **Б.** пациент №161 с наличие на делеции в хромозомно рамо 19q; **В.** пациент №168 с наличие частични 1p и 19q делеции

При провеждане на анализа, наличието на делеции засягащи изследваните в 19p и двата гена (*SMARCA4* и *LDLR*) беше открито в 17 пациента (**Фиг.4.30 Б**). За разлика от това, в 19q хромозомно рамо, бяха открити делеции, засягащи 24.9% (48) от пациентите при четири, от които има по две различни събития. Установени бяха 23 пациента с цялостна загуба на 19q. Това е и най-честата делеция в изследваната група, засягаща кодиращ ДНК участък. Четиридесет и двама от пациентите притежават цялостна или частична делеция на изследваните райони в 1p и 19q едновременно (**Фиг.4.30 А и В**), 12 от тях се характеризират със загуба на целите 1p и 19q хромозомни района, а 2 пациенти показват делеция на хромозомите 1 и 19.

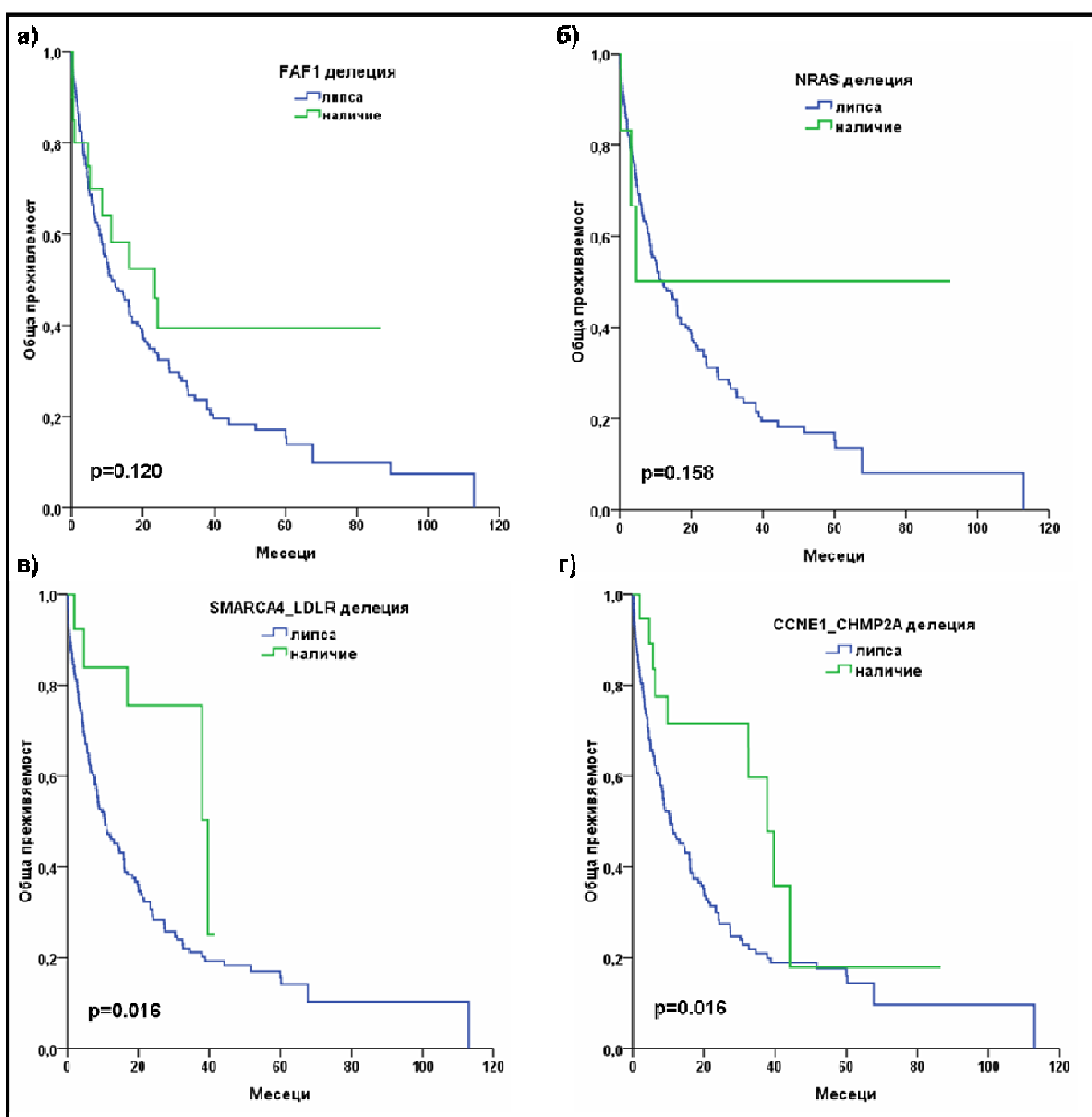
При пациентите с ОД над 80% (5 от 6-те пациента с ОДП и 7 от 9-те с ОДП) показват наличие на 1p делеция, докато при останалите групи процентът, които заемат пациентите с този тип делеция са съответно 11%, 47% и 27% за пациентите с астроцитом II, III стадий и ГБМ. При пациентите с диагноза олигоастроцитомата беше отбелязано наличие на 1p делеционно събитие с честота 66%, най-вероятно поради малкия брой на изследвани пациенти с тази диагноза (3 броя II и 4 - III стадий). Аналогично е положението с наличието на 1p/19q коделеция, което се наблюдава в най-голям процент при пациентите с хистологична диагноза ОД (78%), докато при ААП е 30% и ГБМ е едва 15%.



Фигура 4.31. Преживяемост на пациенти с глиални тумори в зависимост от наличието на делеционния им статус: а) 1p делеция ; б) 19q делеция; в) 1p19q делеция; г) НСГ и 1p19q делеция

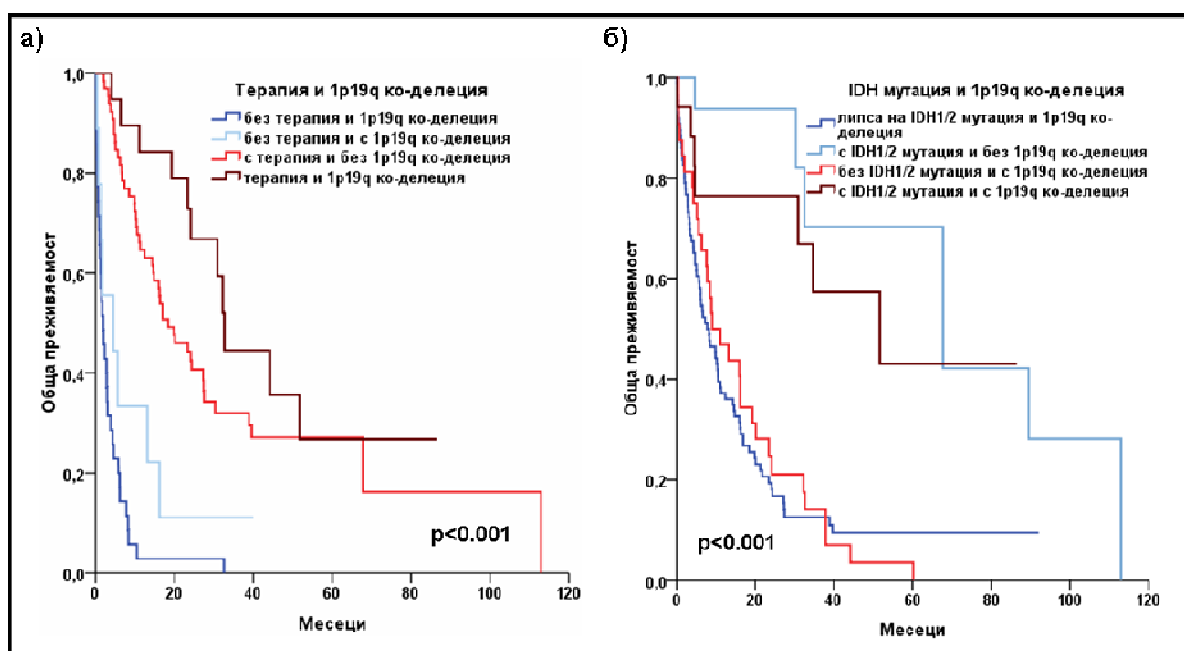
С помощта на Kaplan-Meier анализ на преживяемостта беше установено, че наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ($p=0.031$; **Фиг.4.31 а**) и късо рамо на хромозома 19 ($p=0.001$, **Фиг.4.31 б**) показва по-добра прогностична стойност, за разлика от наличието на частична загуба или липсата на такава. Анализът на двете събития заедно, независимо дали е частична или цялостна загубата не доведе до очаквания резултат. Анализът на данните за едновременно наличие на пълна 1p и 19q загуби показва значима връзка с преживяемостта в цялата изследвана група ($p=0.005$; **Фиг.4.31 в**), но не и в групата на ниско-стадийните глиомы ($p=0.300$; **Фиг.4.31 г**)

Анализът на най-често откриваните генни загуби с данните за преживяемост са показани на **Фиг.4.32**. Голяма част от делециите в 1p хромозомно рамо засягат гените *FAF1* и *NRAS*. Наличието на делеции в тези гени не показаха асоциация с по-лоша преживяемост (съответно $p=0.120$ и 0.158 ; **Фиг.4.32 а**) и **б**), докато по-големи събития, като тези в 19p включващо *SMARCA4-LDLR* или в 19q-*CCNE1-CHMP2A* показаха статистическа значимост с по-дълга преживяемост ($p=0.016$; **Фиг.4.32 в**) и **г**).



Фигура 4.32. Преживяемост на пациенти с глиални тумори в зависимост от наличието на най-честите делеционни събития: а) *FAF1*; б) *NRAS*; в) от *SMARCA4* до *LDLR*; г) от *CCNE1* до *CHMP2A*

Пациентите, при които се наблюдава прилагане на терапия, независимо дали е лъче-, химиотерапия или комбинация от двете, и наличието на 1p19q едновременно загуба, показват значително по-висока преживяемост в сравнение с тези, при които няма коделеционното събитие ($p < 0.001$). За разлика от кооперативния ефект между терапевтичния подход и 1p19q коделецията, при сравняването на *IDH1/IDH2* мутациите с хромозомните загуби не се наблюдава акумулативния ефект на два положителни прогностични фактора. Пациентите с наличие на *IDH1/IDH2* мутации показват по-висока преживяемост, независимо от присъствието на коделецията ($p < 0.001$).



Фигура 4.33. Преживяемост на пациенти с глиални тумори в зависимост от наличието на 1p/19q делеционния им статус и: а) наличието на терапия; б) *IDH1/IDH2* мутационния статус

Таблица 4.7. Унивариационен и мултивариационен Сох-регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Сох регресионен анализ			Мултивариационен Сох регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	1.065	1.049 - 1.081	<0.001	1.047	1.030 - 1.065	<0.001
Диагноза (ОД vs другите)	0.225	0.072 - 0.709	0.011	0.204	0.060 - 0.691	0.011
Вид операция (тотална vs. др)	0.826	0.584 - 1.116	0.277	*	*	*
KPS (за 10 единици)	0.422	0.295 - 0.603	<0.001	1.006	0.993 - 1.019	0.362
Терапия (наличие vs липса)	0.168	0.114 - 0.248	<0.001	0.187	0.115 - 0.302	<0.001
1p делеция (цялостна vs другите)	0.246	0.078 - 0.774	0.017	0.588	0.097 - 3.569	0.564
19q делеция (цялостна vs другите)	0.157	0.050 - 0.495	0.002	4.390	0.724 - 26.623	0.108
1p19q делеция (цялостна vs другите)	0.173	0.043 - 0.701	0.014	0.924	0.404 - 2.111	0.851
<i>IDH1/IDH2</i> (мутирал vs. нормален)	0.227	0.134 - 0.387	<0.001	0.291	0.140 - 0.608	<0.001
<i>SMARCA4_LDLR</i> (делетиран vs не)	0.350	0.143 - 0.857	0.022	0.442	0.140 - 1.459	0.184
<i>CCNE1_CHMP2A</i> (делетиран vs не)	0.445	0.225 - 0.877	0.19	1.053	0.422 - 2.422	0.912

* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

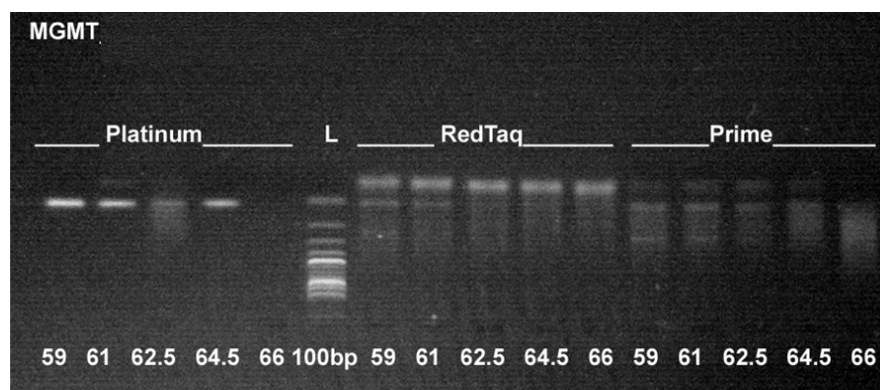
Сох-регресионният анализ беше използван с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Всички фактори показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Сох

регресионен анализ използващ long-rank теста. След извършване на мултивариационния регресионен анализ, с независима прогностична стойност се откриха възрастта ($p < 0.001$; HR 1.047), диагнозата ($p = 0.011$; HR 0.204), терапията ($p < 0.001$; HR 0.187), и наличието на *IDH1/IDH2* мутации ($p = 0.001$; HR 0.291).

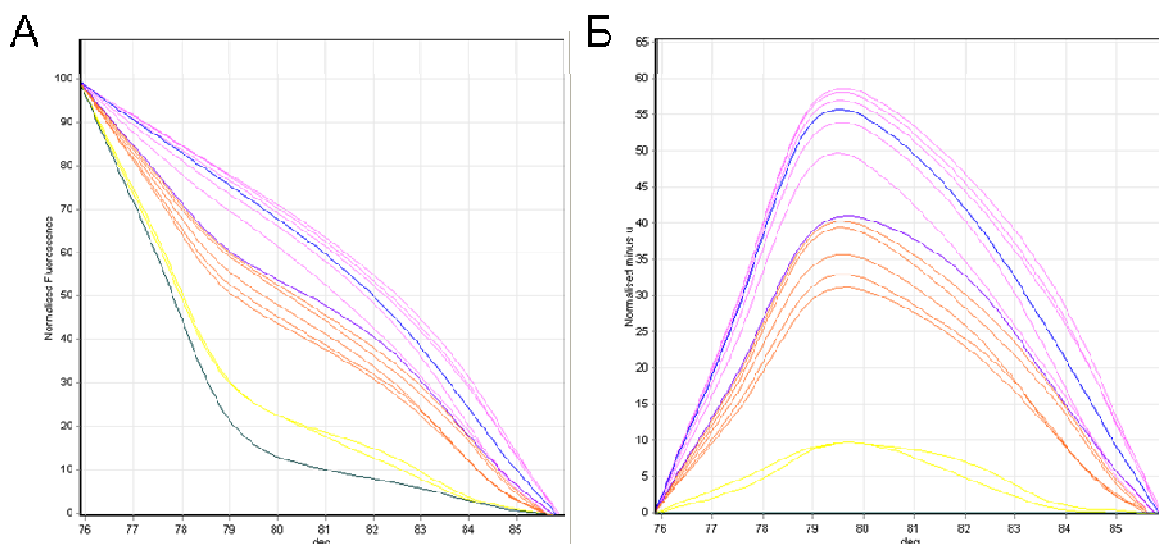
4.5. АНАЛИЗ НА *MGMT* ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ

4.5.1. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ТОПЕНЕ С ВИСОКА РЕЗОЛЮЦИЯ НА ДНК (HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS, HRMA)

Хиперметиране в промоторната област на *MGMT* гена беше изследвано с помощта на метил-специфичен анализ чрез топене на ДНК с висока резолюция (MS-HRM). Оптимизацията на температурата на хибридизация беше извършена чрез амплификация при температури около теоретично изчислената стойност за съответните праймери – **Фиг.4.34**. Използвани бяха и няколко вида полимераза (Platinum, RedTaq и Prime Taq), за да се определи най-подходящата за този анализ.



Фигура 4.34. Оптимизация на температурата на анилинг за HRM - градиентен PCR ($T_{an} = 59-66^{\circ}\text{C}$); L – ladder (100bp молекулен маркер)



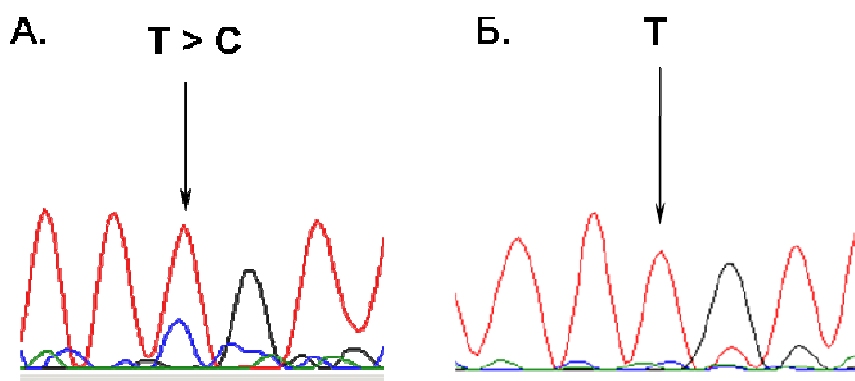
Фигура 4.35. Нормализирани HRM данни. Три групи са видими във всеки панел. Жълтите криви представляват неметилираните проби, в оранжево са частично метилираните проби и в светло лилаво – напълно метилираните проби. Зелените, лилавите и сините криви представляват съответно неметилираните, частично метилирани и напълно метилирани контролни ДНКи

ДНК-и, изолирани от 212 глиални тумори, бяха използвани за анализ на промоторното хиперметиране в *MGMT* чрез метода MS-HRM. Извършена беше оптимизация на условията на амплификация и стъпката на топене на получения продукт, като успоредно бяха ползвани и контролни ДНК на фирмата Qiagen -неметирана, 50% метирана (смес от равни количества неметирана и метирана ДНК) и 100% метирана ДНК (**Фиг.4.35**).

Промоторно хиперметиране на *MGMT* беше наблюдавано при 116 от общо 212 изследвани тумора (53.5%), като 100% метиране бе наблюдавано при 35 (30% от всички метиларни тумори). Резултатите получени при анализа на MS-HRM са представени в Приложение №III.

4.5.2. ПОТВЪРЖДАВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИ ЧРЕЗ БИСУЛФИТНО СЕКВЕНИРАНЕ

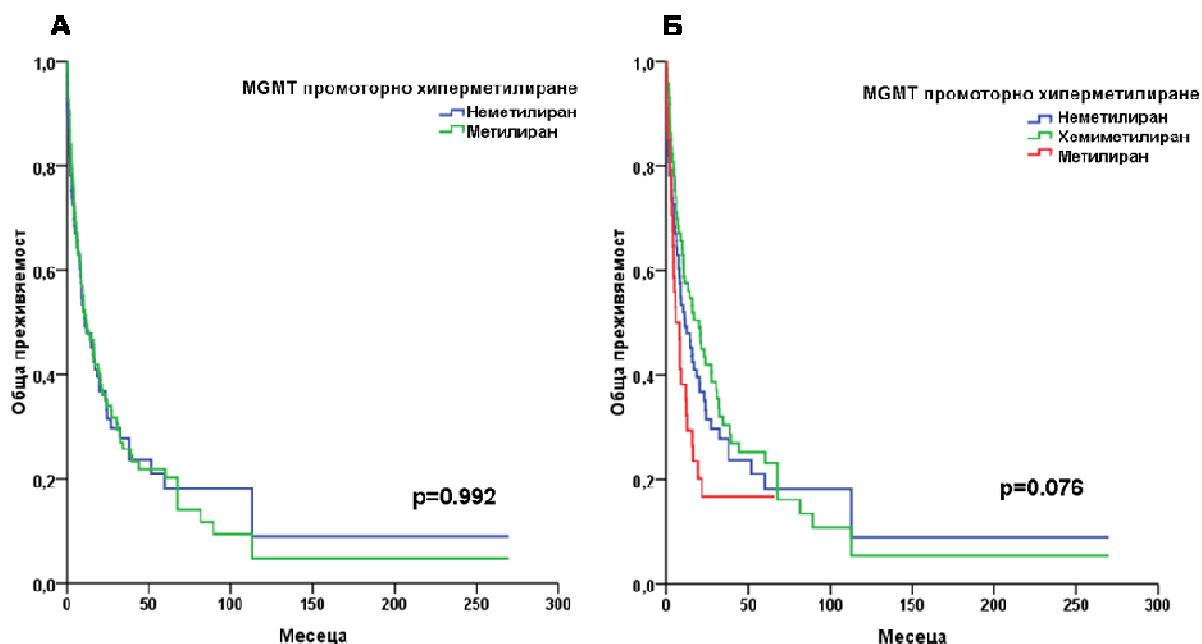
Поради високия процент на метиране установено в *MGMT* гена, беше проведено бисулфитно секвениране с цел потвърждаване на резултатите от MS-HRM. В последвалия анализ участваха 20 пациента – 10, при които е установено метиране и 10 с неметиран промотор на гена. По този начин може се докаже, че използваната за изследването ДНК е изцяло бисулфитно превърната и праймерите са били свързани специфично с промоторен регион на ДНК. След проведения PCR беше извършено бисулфитно секвениране. Получените резултатите от секвенирането доказаха, че е имало специфично свързване на праймерите с метираната ДНК, следователно резултатите от анализа бяха потвърдени - **Фиг.4.36**.



Фигура 4.36. Бисулфитно секвениране на промоторен участък на *MGMT* гена: **А.** частично метиран *MGMT*; **Б.** неметиран *MGMT*

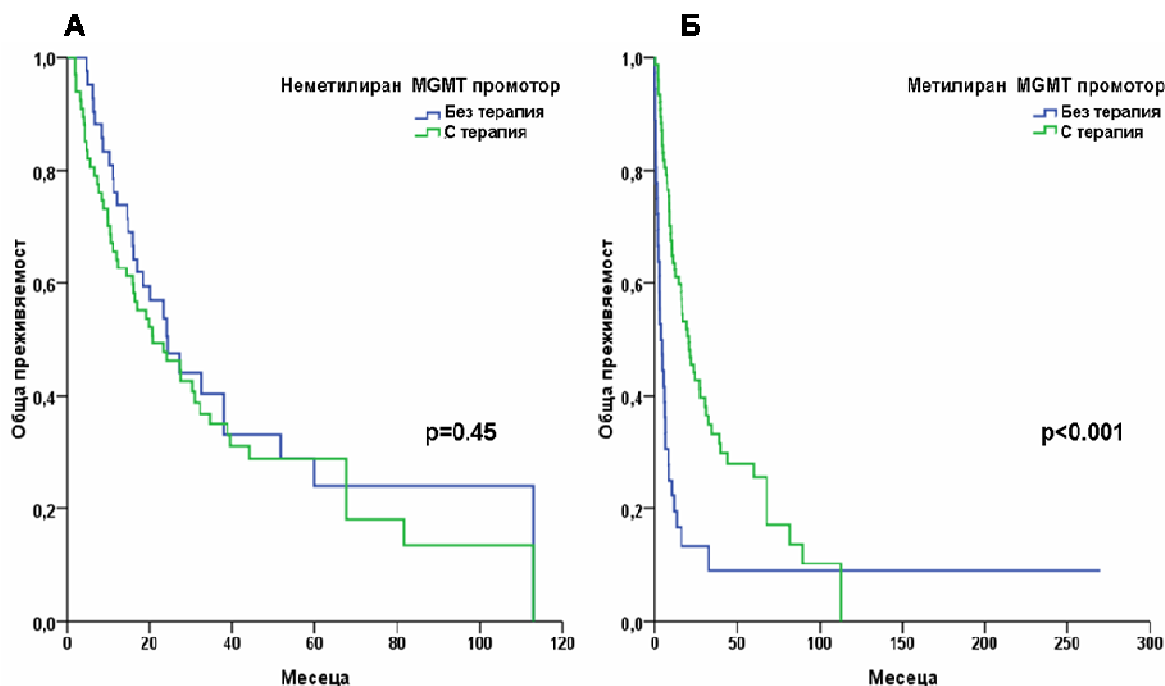
4.5.3. АНАЛИЗ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТ И *MGMT* ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ

Беше извършена статистическа обработка на данните с помощта на SPSS софтуер и Kaplan-Meier анализ на преживяемостта – **Фиг.4.37**. Промоторното хиперметиране на *MGMT* гена в изследваната група тумори не показва статистически значима корелация с преживяемостта ($p=0.992$) – **Фиг.4.37 А**, въпреки че при разделянето в три групи беше установена тенденция за по-лоша преживяемост при пациентите с напълно метиран промотор ($p=0.076$) – **Фиг.4.37 Б**. Регресионният анализ на промоторното метиране в *MGMT* също не показва значими стойности ($HR=1.02$).



Фигура 4.37. Преживяемост на пациенти с глиални тумори в зависимост от промоторно хиперметиране в MGMT гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост: **А.** наличие на метилиране (зелена крива) или липса (синя крива) **Б.** наличие на пълно метилиране (червена крива), хемиметилиране (зелена крива) или липса на метилиране (синя крива)

Тъй като при изследването на промоторно хиперметиране на MGMT проведено при първите 30 пациента беше установена асоциация с преживяемостта при пациенти, третирани с химио- и лъчетерапия, беше проведен и анализ, при които пациентите с неметилиран и метилиран MGMT бяха изследвани за връзка с проведена или не терапия.



Фигура 4.38. Преживяемост на пациенти с глиални тумори, подложени на лечение с лъче- и/или химиотерапия, в зависимост от липсата (А панел) или наличието (Б панел) на промоторно хиперметиране в MGMT гена. На абсцисата е показана преживяемостта в месеци, а на ординатата – общата преживяемост

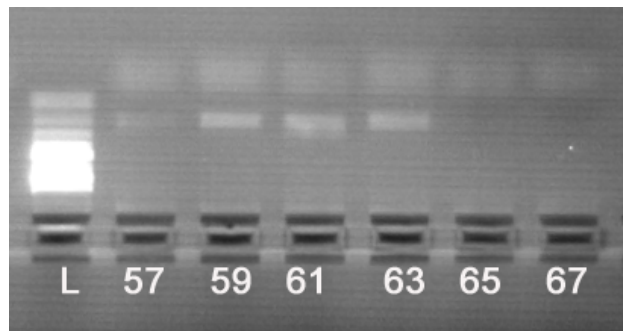
При пациентите с неметилиран промотор не беше достигната статистическа значимост ($p=0.45$) – **Фиг.4.38 А**, докато при туморите с метилиран промотор на гена се наблюдава значително по-добра преживяемост при прилагане на терапия, без значение дали е лъче- или химиотерапия ($p<0.001$)– **Фиг.4.38 Б**. Въпреки, че по литературни данни при туморите с хиперметилиран *MGMT* се срещат по-често мутации в гена *IDH1* ⁽⁴¹⁹⁾ в нашето проучване само 24 тумора с метилиран *MGMT* носят мутация в *IDH1* от общо 116 тумора (20%) срещу 17 от 94 тумора (18.08%) без метилиране в *MGMT*. Не беше установена статистически значима корелация между наличието на *IDH1* мутация и метилирането на *MGMT*.

4.6. АНАЛИЗ НА МИКРОСАТЕЛИТНА НЕСТАБИЛНОСТ

Микросателитният анализ включва изследване на няколко микросателитни маркера чрез PCR и автоматичен фрагментен анализ. За всеки микросателитен маркер ДНК от туморната тъкан на един пациент се сравнява с ДНК от нормалната тъкан на същия пациент. При една част от пациентите беше изолирана ДНК от венозна кръв. При друга част от пациентите ДНК беше изолирана от нормална тъкан, която беше отдиференцирана от туморната с помощта на системата за лазерна микродисекция Carl Zeiss (Germany), след поставяне на хистологична оценка от опитен патолог.

За провеждането на този анализ беше подбрана група от 17 пациента, на които е изяснен метилационния статус на промотора на *MGMT*, има данни за провеждането на терапия и има изолирана ДНК от туморна и нормална тъкан. В групата са включени двама пациенти с диагноза астроцитом II стадий, четирима с астроцитом III стадий, един с олигоастроцитом II стадий, един с олигодендроглиома III стадий и девет с глиобластом. Седем от избраните тумори са показали *MGMT* промоторно хиперметилиране (41%).

За изследване на микросателитната нестабилност бяха подбрани следните 5 маркера - BAT26, D5S346, D18S35, D2S123 и FGA, както и бяха проведените експерименти по оптимизиране на условията за PCR и електрофоретичното разделяне чрез автоматичен секвенатор ABI 3130xl (Applied Biosystems)– **Фиг.4.39**.



Фигура 4.39. Оптимизиране условията за PCR на ДНК маркера FGA –градиентен PCR ($T_{an} = 57-67^{\circ}\text{C}$); L – ladder (100bp молекулен маркер)

За всеки маркер беше проведена PCR реакция за нормалната и туморната ДНК. Промяната в дължината на микросателита се означава като микросателитна нестабилност. При анализа освен микросателитна нестабилност може да се отчете и загуба на хетерозиготност (ЛОН) като загубата на алел може да бъде установена чрез изчисляване на съотношенията между височините на пиковите на съответните алели при нормалните и туморни проби, при повтори, които са хетерозиготни в нормалната проба. Получените резултати са представени в **Табл.4.8**.

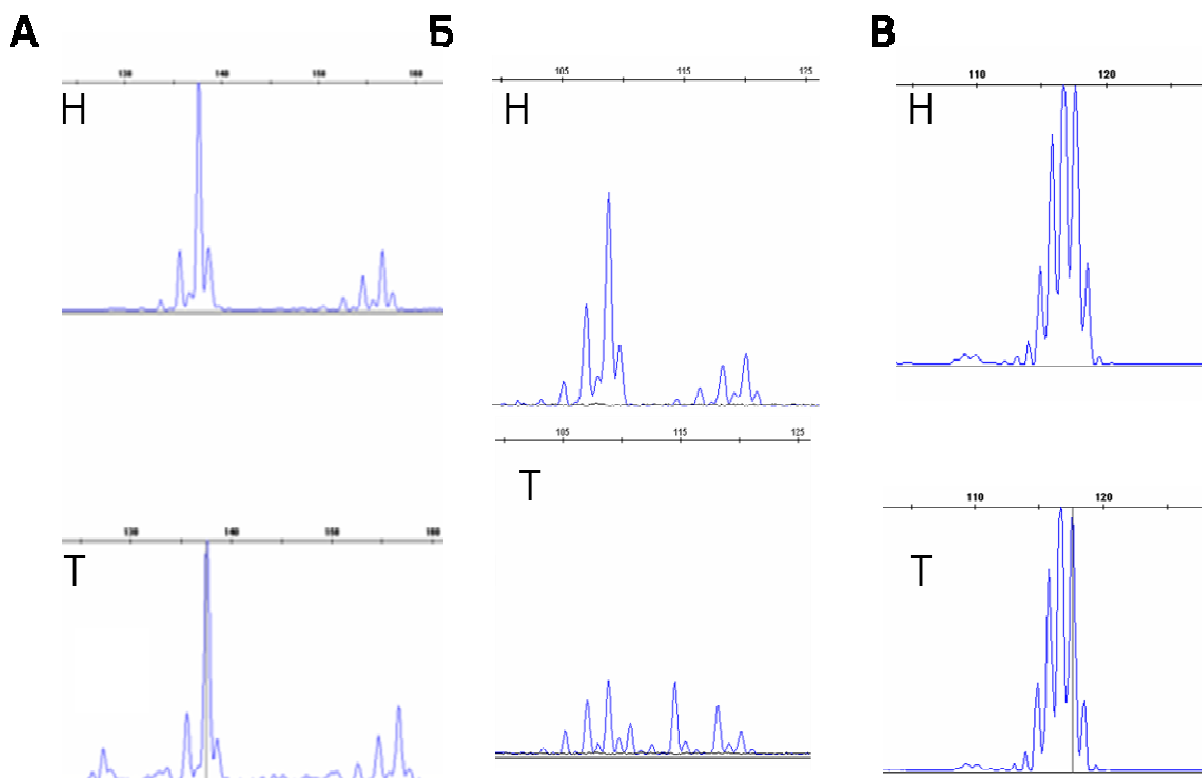
Таблица 4.8. Резултати, получени от анализа на 5 микросателита при глиоми

Пациент №	D2S123	D5S436	D18S35	Bat26	FGA	MSI/MSS
39	MSS	MSS	MSS	MSS	LOH/MSI	MSI-L/LOH
43	MSS	LOH/MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L/LOH
96	MSS	MSS	MSI	MSS	MSS	MSI-L
112	MSS	LOH/MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L/LOH
135	MSS	MSI	MSS	MSS	MSS	MSI-L
136	MSS	MSS	LOH	MSS	MSS	LOH
146	MSI	MSS	MSS	MSS	MSI	MSI-L
148	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
149	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
159	MSS	MSS	LOH	MSS	MSI	MSI-L
161	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
169	MSI	MSS	MSS	MSS	MSS	MSI-L
172	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
178	MSS	MSS	LOH	MSS	MSS	LOH
207	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
209	MSI	MSI	MSS	MSS	LOH/MSI	MSI-H/LOH
212	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS

Изследваният маркер D18S35 е локализиран на дългото рамо на осемнадесета хромозома - 18q21.1-18q21.31. Съдържа динуклеотидна последователност от -(CA)- повтора. Характеризира се с висока степен на хетерогенност, което го определя като високоинформативен маркер при изследване на микросателитна нестабилност.

В настоящото изследване след сравняване на нормална и туморна тъкан на съответните пациенти, микросателитна нестабилност в D18S35 беше установена при 1 от тях. Загуба на хетерозиготност беше наблюдавана в 3 от туморите (17.6%). На **Фиг.4.40 А** е показан случай на МСН. В нормалната и туморната тъкан присъстват два различни алела с дължини съответно 138 и 156 н.дв. В туморната проба се наблюдава нов алел, който е с дължина 128 н.дв., т.е. е с 10 н.дв. по-къс от по-лекия алел.

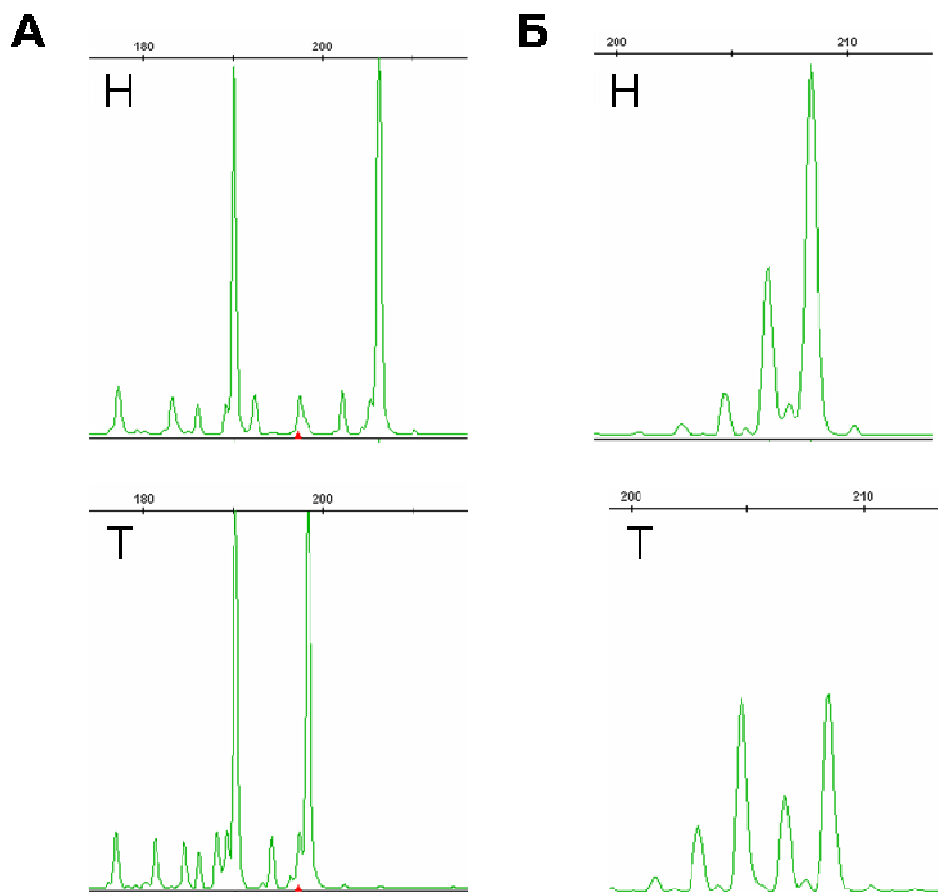
Изследваният маркер D5S346 е локализиран на дългото рамо на пета хромозома 5q21-5q22 в района на APC гена. Съдържа динуклеотидна последователност -(CA)_n- повтор. Характеризира се с висока степен на хетерогенност при отделните индивиди. Маркерът D5S346 е високоинформативен при изследване на микросателитна нестабилност. Проведената полимеразна верижна реакция върху изследваната група доведе до получаване на продукти с дължина от 100 до 130 н.дв. Сравняването на амплифицираните продукти на ДНК, изолирана от нормална тъкан с ДНК, изолирана от туморна тъкан на съответните пациенти, доведе до доказването на 2 случая на МСН и 2 на загуба на хетерозиготност в този маркер. Резултатите на пациент №112 са показани на **Фиг.4.40 Б**. При него както в туморната тъкан, така и в нормалната тъкан се наблюдават два алела с дължина от 112 и 118 н.дв, но в туморната тъкан по-дългия алел е по-слабо амплифициран. Резултатът може да се тълкува като загуба на хетерозиготност (LOH). Освен това се наблюдава и наличието на нов алел, което е доказателство и за МСН.



Фигура 4.40. Електрофореграми на микросателитните маркери (Н-Нормална тъкан, Т-Туморна тъкан): **А.** МСН на маркер D18S35 при пациент №136; **Б.** МСН и LOH на маркер D5S346 при пациент №112; **В.** МСН на BAT26 при пациент №135

Изследваният маркер BAT26 е локализиран на късото рамо на втора хромозома (2p16-2p16), в района на пети интрон на *MSH2* гена. Продуктът на този маркер е моонуклеотид - съдържа поли-А секвенция, за разлика от останалите използвани маркери от настоящото изследване. Изключително рядко се срещат индивиди, хетерозиготни по BAT26. При проведените изследвания не беше установена микросателитна нестабилност. От друга страна този маркер е неинформативен, за да се направят заключения относно наличието на загуба на хетерозиготност поради наличието му в хомозиготно състояние в здравата тъкан т.е редуцията на единия от алелите ще бъде замаскиран от другия със същата дължина. На **Фиг.4.40 В** са показани алели с еднаква дължина на ДНК, изолирана от нормална и туморна тъкан на един пациент. По този ДНК маркер той се определя като микросателитно стабилен.

Маркерът FGA е локализиран на дългото рамо на четвърта хромозома (4q28). Представлява тетрануклеотиден повтор, който показва също висока степен на хетерогенност. В изследваната група бяха установени алели с дължина от 164 до 224 н.дв. След сравняване на амплифицираните продукти на ДНК, изолирана от нормална тъкан с ДНК, изолирана от туморна тъкан на съответните пациенти, МСН за този маркер беше наблюдаван при четири пациента, а при един от тях се наблюдава и LOH. При пациент №207 в нормалната тъкан се наблюдават два алела с дължини 190 и 206 н.дв. В туморната тъкан се наблюдава поява на нов алел с дължина 198 н.дв, т.е. е с 8 н.дв. по-къс от дългия алел, който тук вече не се наблюдава.



Фигура 4.41. Електрофореграми на микросателитни маркери: **А.** МСН и LOH на FGA при пациент №209; **Б.** МСН на ДНК маркер D2S123 при пациент №209

Маркерът D2S123 е локализиран на късото рамо на втора хромозома - 2p22, във втори интрон на *MSH2* гена. Този маркер съдържа нуклеотидна последователност $-(AC)_n$. Установено е, че той показва високо ниво на микросателитна нестабилност. Тези характеристики го класифицират като високо информативен и предпочитан маркер при изследване на микросателитна нестабилност.

В изследваната група бяха намерени алели с дължини в границите 194 до 224 н.дв. След сравняване на амплифицираните продукти на ДНК, изолирана от нормална тъкан или кръвни клетки, с ДНК, изолирана от туморна тъкан на съответните пациенти, микросателитна нестабилност беше открита при трима пациента, но не беше наблюдавана LOH. На **Фиг.4.41 Б** са показани резултатите от фрагментния анализ на пациент № 207. В нормалната тъкан се наблюдават два алела с дължини 208 н.дв. Новият алел е с дължина 204 н.дв, т.е. е с 4 н.дв. по-къс от 208 н.дв. алела.

При статистическа обработка с помощта на SPSS и Kaplan-Meier анализ на преживяемостта наличието на микросателитната нестабилност в изследваната група тумори не показва статистически значима корелация с преживяемостта ($p=0.452$). Липсата на ефективна MMR прави тумора резистентен към алкилиращи агенти дори при отсъствие на активен MGMT. При 7 от изследваните пациенти се наблюдава промоторно хиперметиране на *MGMT*, при три от тях се наблюдава и МСН. Изследвана беше връзката между наличието на промоторно хиперметиране на *MGMT* гена, МСН и преживяемостта, но отново не беше достигната статистическа значима разлика между групите ($p=0.782$). Тъй като наличието на МСН има връзка с резистентността към химиотерапевтиците, по-конкретно към темозоломид, корелационен анализ бе извършен за наличието на химиотерапия, МСН и преживяемост, но отново не беше достигната статистическа значимост ($p=0.7$).

4.7. АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ

Освен прогностични фактори на ниво ДНК, са установени и голям брой такива на ниво генна експресия, т.е. РНК. До сега проучванията са показали, че профилиране въз основа на експресията на гени, които участват в процесите на туморна хипоксия (*HIF1α*, *HIF2α*, *HIF3α*, *CAIX* и т.н.), ангиогенеза (*VEGFA*, *KDR*, *FLT1*, *TGF-β2*, *EGFR* и т.н.), метастазиране (например ре-иницииране на невронални стволови клетки – *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *MMP9* и т.н.) и др. спомагащи глиоматогенезата⁽¹⁷³⁾, корелира по-добре с прогнозата, отколкото хистологията, и дори може да се използва за по-прецизно предсказване прогнозата за пациентите^(284, 285).

Таблица 4.9. Клинични показатели на избраната група от пациенти

Характеристика		Брой (n)
Пол	Мъже	31
	Жени	28
Възраст (средна), години		22-80 (53)
Вид на операцията	Тотална резекция	33
	Субтотална резекция	23
	Частична резекция	3
Тип тумор	Астроцитом	56
	Олигоастроцитом	1
	Олигодендроглиом	2
Локализация на тумора	Лява	26
	Дясна	32
	Билатерална	1
Степен на тумора	IV (вторични)	45 (10)
	III	11
	II	3
KPS (средно)		50-90 (80)
Преживяемост (средна), месеци		0.17-269.73 (23.5)

Подбрана беше група от 59 пациента, при която беше изследвана прогностична стойност на избраните маркери. Клиничните характеристики на пациентите/туморите са посочени в Табл.4.9.

Проведе се генно-експресионен анализ на 14 гена (*CAIX*, *EGFR*, *FLT-1*, *HIF1α*, *HIF2α*, *HIF3α*, *KDR*, *MMP9*, *SOX2*, *SOX6*, *SOX8*, *SOX9*, *TGF-β2* и *VEGFA*) при група от туморни тъкани (59 мозъчни тумора) в сравнение с контролна група от периферна нетуморна мозъчна тъкан (14 тъканни проби от пациенти с мозъчен тумор). За всеки ген в серията бяха заложили и по три негативни контроли, при които вместо кДНК се налива RNase-free вода.

Въз основа на публикувано изследване за подбор на ендегенна контрола при генно-експресионен анализ на иРНК-и изолирани от мозъчни тъкани като най-подходящи са избрани следните пет гена - *TBP*, *IPO8*, *RPL13A*, *GAPDH* и *SDHA*. Те показват амплификация с минимална вариация между отделните проби, независимо дали са от нормална или туморна тъкан, както и независимо от вида и стадия на тумора⁽⁴²⁰⁾. Като най-подходящ бе посочен гена *TBP* (белтък свързващ ТАТА последователността в ДНК веригата); затова и един от изследваните гени в нашето проучване бе той. Вторият ген използван в нашето изследване като вътрешна контрола е *GAPDH* (кодиращ ензима глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа), тъй като е най-често използван като ендегенна контрола в този вид анализи при мозъчни тумори и е един от петте най-инвариантни гени в мозъчните тъкани. Както подсказва името, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа катализира превръщането на глицералдехид-3-фосфат в D-глицерат 1,3-бифосфат. Това е шестия етап от гликолитичното разграждане на глюкоза, един от най-важните пътища за доставка на енергия и въглеродни атоми, който се извършва в цитозола на еукариотни клетки.

С цел подбор на ендегенна контрола беше сравнена вариабилността на получените Ст стойностите за двата гена, както при групата от нормални тъкани, така и в групата от изследваните тумори. За гена *TBP* в групата от контроли (нормални тъкани) Ст стойностите варират максимално с 6.35 единици ($Ст=26.33\div 32.68$), а в групата от проби (туморни тъкани) - с 6.28 единици ($Ст=22.95\div 29.24$). За гена *GAPDH* в групата от контроли (нормални тъкани) Ст стойностите варират максимално с 7.1 единици ($Ст=19.07\div 26.18$), а в групата от проби (туморни тъкани) - с 7.42 единици ($Ст=16.65\div 24.07$). Въз основа на получените данни беше избран гена *TBP* като по-подходящ, показващ по-малко отклонения в нивата на експресия вътре и между сравняваните групи.

4.7.1. *HIF1a*, *HIF2a* и *HIF3a* (Приложение IV ; Фиг. IV.1. ; А, Б и В)

При анализа на резултатите бяха получени следните данни:

HIF1a - Намалена експресия беше наблюдавана само при един (1.7%) тумор и то с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха повишена експресия на изследвания ген, а при 22 (37.3%) тумора тя беше нормална. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както нормална, така и увеличена експресия на изследвания ген. В множеството от изследваните проби (27 бр, 60%) се наблюдава повишена, при 18 нормална експресия.

Асоциациите на намерените експресионни изменения с клиничните особености на пациентите бяха изследвани чрез статистическа обработка на резултатите с помощта на статистическа програма SPSS v.17.0 и Kaplan-Meier анализ за преживяемост. По литературни данни повишените експресионни нива корелират с по-лошата преживяемост при глиома. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи (с понижена, с повишена и нормална експресия; $p=0.032$ - **Фиг.4.42 а**). Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е значително по-ниска от тази с нормална (14 мес. за групата с увеличена експресия към 38 мес). Извършен беше и анализ за обща преживяемост при туморите освен само според нивата на експресия и в комбинация с други клинични характеристики, като туморен стадий, възраст на възникване на заболяването и KPS статус.

HIF2a - Намалена експресия на *HIF2a* беше наблюдавана при 11 пациента (18.6%) двама, от които със смесен тип астроцитом и двама с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 12 (20.4%) тумора тя беше повишена. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които в множеството от изследваните проби (30 бр, 66.7%) се наблюдава нормална експресия. При 8 тумора се наблюдава увеличена, а при 7 намалена експресия.

Статистически значими разлики в преживяемостта бяха установени при трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ($p=0.01$)- **Фиг.4.42 б**). Средната преживяемост на групата с увеличена е по-ниска от тази с нормална експресия (13 мес. за групата с увеличена експресия към 16 мес. с нормална). Интересно е, че групата с понижена експресия показва значително по-добра преживяемост от останалите две групи (58 мес.) Извършен беше и анализ за обща преживяемост при туморите в комбинация с други клинични характеристики, като туморен стадий, възраст на възникване на заболяването и KPS статус.

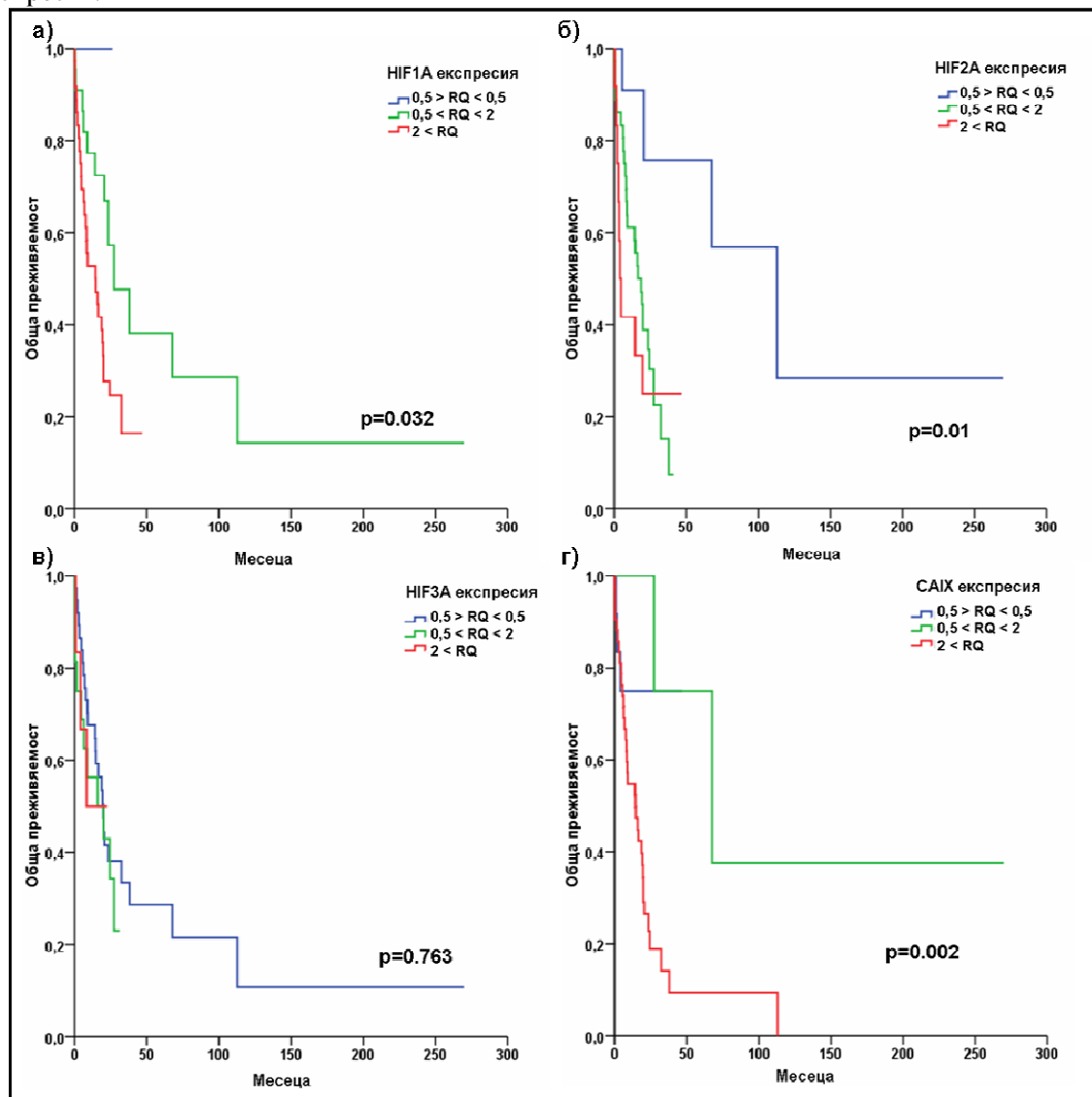
HIF3a - Намалена експресия беше наблюдавана при повечето от пациентите - 37 (62.7%). При 16 (27.1%) от пациентите беше установена нормална експресия на изследвания ген, а при 6 (10.2%) тумора – повишена. От 45 глиобластоми, в 29 (64%) се наблюдава нормална експресия. При 12 наблюдаваме понижена, а при пет повишена експресия. Интересно е, че 83% от случаите с увеличена *HIF3a* експресия са с поставена клинична диагноза глиобластом. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана ($p=0.763$) - **Фиг.4.42 в**).

4.7.2. *CAIX* (Приложение IV ; Фигура IV.1 ; Г)

В изследваната група тумори с нормална експресия са 5 (2.3%) тумора, с понижена – 12 (8.5%) тумора и с повишена – 42 (71.2%) тумора. При около 35% от туморите с повишена

експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при две проби нивата надвишават 200 пъти.

Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В повечето от изследваните проби (39 бр, 86.7%) се наблюдава повишена експресия, при 2 нормална експресия и при 4 намалена експресия.



Фигура 4.42. Преживяемост на пациенти с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: а) *HIF1a*; б) *HIF2a*; в) *HIF3a*; г) *CAIX*

Получените данни за нивата на експресия на *CAIX* гена при изследваните тумори бяха анализирани за връзка с данните за обща преживяемост. В литературата наличието на свръхекспресия на гена *CAIX* се свързва с по-лоша прогноза и в нашето изследване беше наблюдавана същата тенденция. Групата с повишена експресия показва по-малка обща преживяемост (17 мес) в сравнение с другите две групи - 20 мес. за групата с понижена и 34.32 мес. за групата с нормална експресия ($p=0.002$; Фиг.4.42 г).

Сох-регресионният анализ беше използван с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Всички фактори показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Сох-регресионен анализ. Фактори като възрастта на заболяемост под 56 год. ($p<0.001$), KPS статус над 70 ($p=0.022$), стадий на тумора ($p=0.004$) и наличието на понижена *HIF2a* експресия ($p=0.010$) показаха по-добра прогностична стойност, докато наличието на увеличена експресия в гените *HIF1a* ($p=0.013$) и *CAIX* ($p=0.001$) показаха значимост като негативни прогностични

фактори. За разлика от тях наличието на увеличена експресия в *HIF3a* ($p=0.935$) не показва статистическа значима връзка с прогнозата – **Табл.4.10**.

Факторите показали значима връзка с преживяемостта бяха подложени на мултивариационен Сох регресионен анализ. С негова помощ бяха отграничени тези фактори, имащи независима прогностична стойност при изследваните пациенти. Мултивариационният регресионен анализ показва, че единствено възрастта има статистическа значимост като независим прогностичен фактор, и то като предиктор за лоша преживяемост ($HR=1.043$). Никой от експресионните фактори в тази група не показва значимост като индивидуален добър или лош прогностичен фактор.

Таблица 4.10. Моновариационен и мултивариационен Сох регресионен анализ на корелациите между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Сох регресионен анализ			Мултивариационен Сох регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	1.058	1.030-1.087	<0.001	1.043	1.011-1.076	0.008
KPS (за 10 единици)	0.973	0.951-0.996	0.022	0.987	0.954-1.020	0.425
Диагноза (ГБМ vs др.)	5.666	1.738-18.473	0.004	4.579	0.804-26.086	0.087
<i>HIF1a</i> (увеличена vs. др)	2.512	1.212-5.207	0.013	2.149	0.921-5.016	0.077
<i>HIF2a</i> (увеличена vs. др)	0.154	0.037-0.644	0.010	0.276	0.050-1.531	0.141
<i>HIF3a</i> (увеличена vs. др)	0.952	0.290-3.121	0.935	*	*	*
<i>CAIX</i> (увеличена vs. др)	4.749	1.841-12.249	0.001	1.741	0.426-7.117	0.440

Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR–hazard ratio; CI–интервал на достоверност; p–стойност(2-tailed)

4.7.3. *KDR*, *FLT1* и *VEGFA* (Приложение IV ;Фиг. IV.2; Ж, 3 и И)

При анализа на резултатите бяха получени следните данни:

VEGF-A - С намалена експресия бяха наблюдавани 5 (8.5%) тумора и при това само един с диагноза глиобластом. Четиридесет и трима (72.8%) от пациентите показаха повишена експресия на изследвания ген, а при 11 (18.6%) тумора тя беше нормална. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които беше наблюдавана предимно увеличена експресия на изследвания ген (40 тумора, 89%). При 5 тумора беше установена нормална експресия и само при един - намалена. По литературни данни повишените експресионни нива корелират с по-лошата преживяемост при глиома. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи (с понижена, с повишена и нормална експресия; $p<0.001$)- **Фиг.4.43 в**) Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е значително по-ниска от тази с нормална експресия (14.33 мес. за групата с увеличена експресия към 25.43 мес). Средната обща преживяемост на групата с нормални нива на гена е 20.92 мес.

KDR - Намалена експресия на гена беше наблюдавана при 15 пациента (25.4%) двама, от които с диагноза астроцитом II. Двадесет и осем (46.5%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 16 (27.1%) тумора - повишена. При повечето глиобластоми (21 тумора, 47%) беше наблюдавана нормална експресия. При 9 тумора експресията беше намалена, а при 15 - повишена. Статистически значими разлики в преживяемостта бяха наблюдавани при трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ($p=0.028$)- **Фиг.4.43 а**). Статистически значими разлики в преживяемостта бяха наблюдавани при трите групи -с понижена, с повишена и нормална експресия ($p=0.028$). Групата с повишена експресия показва по-малка средна обща преживяемост (11.55 мес) в сравнение с групата с понижени нива на изследвания ген – 19.22 мес. Подобно на групата с понижени нива на експресия, групата с нормална експресия показва сравнително сходна обща преживяемост (19.13 мес.).

FLT-1 - С намалена експресия бяха наблюдавани 14 от пациентите (23.7%). При 39 (66.1%) от пациентите експресията на изследвания ген беше нормална, а при 6 (10.2%) тумора - повишена. Групата на глиобластомите от 45 тумора включваше 31 тумора (69%) с нормална експресия. При 6 тумора беше наблюдавана увеличена, а при 10 - намалена експресия. Статистически значими разлики бяха наблюдавани в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ($p=0.042$) - **Фиг.4.43 б**). Групата с повишена

експресия показва по-ниска обща преживяемост (10.48 мес) в сравнение с групата с понижени експресионни нива на изследвания ген – 19.83 мес. Подобно на групата с увеличена нива на експресия, тази с нормална експресия показва сравнително ниска обща преживяемост (16.43 мес.).

4.7.4. *MMP9* (Приложение IV ; Фиг. IV.2 ; Й)

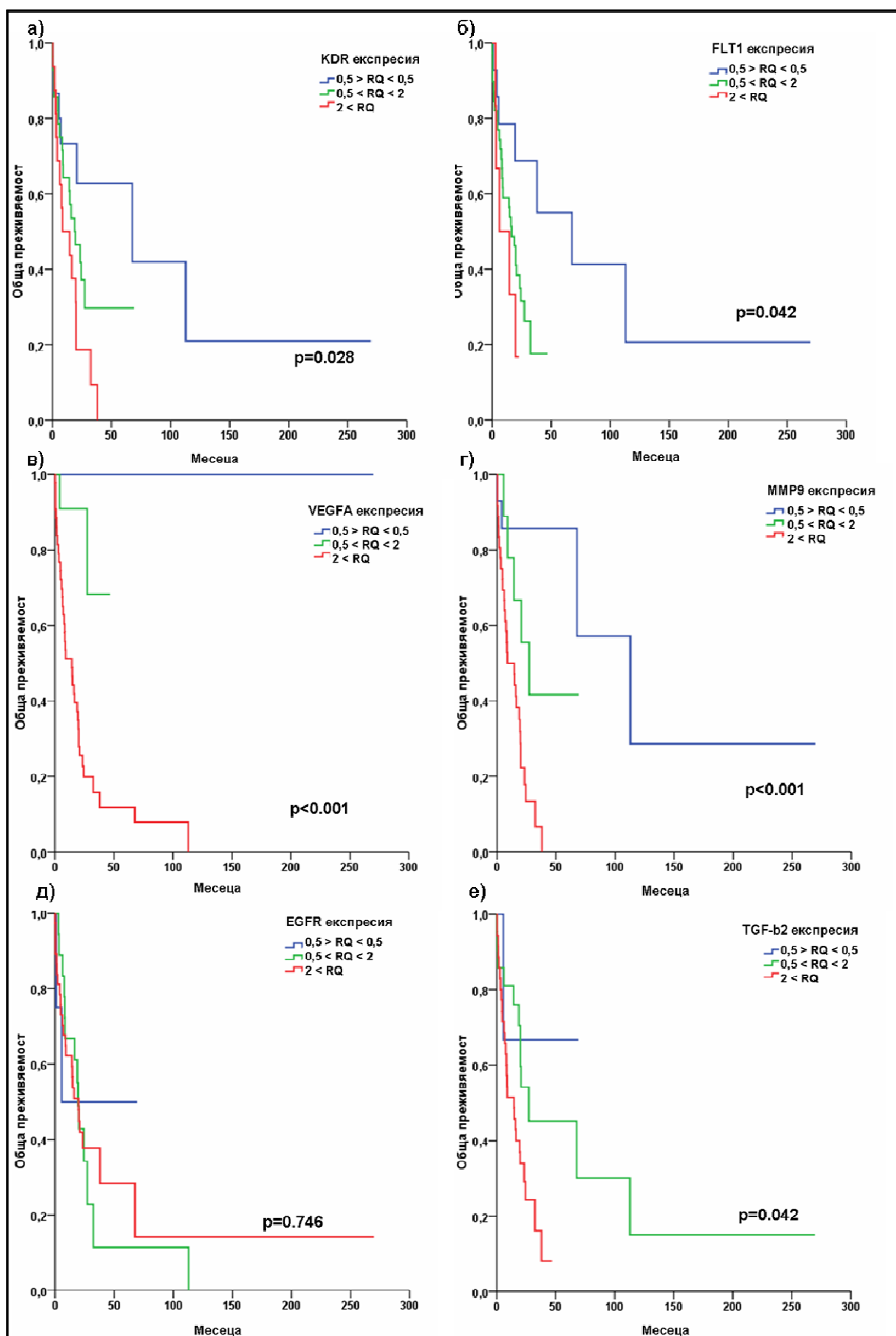
При анализа на генната експресия на *MMP9* бяха установени следните групи - с нормална експресия са 9 (15.2%) тумора, с понижена – 14 (23.7%) тумора и с повишена – 36 (61%) тумора. При около 13 (29%) от туморите с повишена експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при четири проби нивата надвишават 200 пъти. При глиобластомите беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В множеството от изследваните проби (33 бр, 73%) беше наблюдавана повишена експресия, при 5 - нормална експресия и при седем - намалена експресия. Получените данни за нивата на експресия на *MMP9* гена при изследваните тумори бяха анализирани за връзка с данните за обща преживяемост. Беше установена връзка между наличието на свръхекспресия на гена *MMP9* и лошата прогноза. Групата с повишена експресия показва значително по-малка обща преживяемост (12 мес) в сравнение с другите две групи – 48.7 мес. за групата с понижена и 22.9 мес. за групата с нормална експресия (Фиг. 4.43 г); $p < 0.001$).

4.7.5. *EGFR* (Приложение IV ; Фиг. IV.1; Д)

В нашата група с понижена експресия са 4 (6.8%) тумора, с нормална – 18 (30.5%) тумора и с повишена – 37 (62.7%) тумора. При около 10% от туморите с повишена експресия в изследвания ген се наблюдава увеличаване над 50 пъти на експресионните нива, а при две проби нивата надвишават 100 пъти. Групата на глиобластомите от 45 тумора включва 27 проби (60%) с повишена експресия, 16 с нормална и трима – с намалена експресия. Значими разлики в преживяемостта не бяха установени ($p=0.746$; Фиг. 4.43 д). Групата с повишена експресия показва сходна обща преживяемост (23 мес) с групата с нормална експресия - 22 мес. Въпреки това беше наблюдавана значима разлика в общата преживяемост при сравнение на пациентите с повишени нива на *EGFR*, разделени според началото на развитие на заболяването на ранно - под 56 години и късно – над 56 години (както следва 21 спрямо 7 месеца, $p=0.005$). При групата с нормални нива на експресия такава значима връзка не беше открита ($p=0.09$)

4.7.6. *TGF-β2* (Приложение IV ; Фиг. IV.1 ; Е)

При изследването на *TGF-β2* понижена експресия беше установена при 3 (5%) тумора, нормална – при 21 (35.6%) тумора и повишена – при 35 (59.3 %) тумора. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които се наблюдава както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. При тридесет и две от изследваните проби (71%) се наблюдава повишена експресия, при 9 нормална и при 2 - намалена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, беше наблюдавана ($p=0.042$) - Фиг. 4.43 е). Групата с нормална експресия показва най-дълга обща преживяемост (86 мес) в сравнение с тези с повишена (17 мес) и с понижена експресия (20 мес). Извършен беше и анализ за обща преживяемост при туморите освен само според нивата на експресия и в комбинация с други клинични характеристики, като туморния стадий, възрастта на възникване на заболяването и KPS статуса. С помощта на Cox регресионен анализ, използващ long-rank теста, фактори като възрастта на заболяемост под 56 год. ($p < 0.001$), KPS статус над 70 ($p=0.022$), стадий на тумора ($p=0.004$) и наличието на понижена *FLT-1* експресия ($p=0.029$) показаха по – добра прогностична стойност, докато наличието на увеличена експресия в гените *VEGF-A* ($p=0.001$), *MMP9* ($p < 0.001$) и *TGF-β2* ($p=0.016$) показаха значимост като негативни прогностични фактори. За разлика от тях наличието на увеличена експресия в гените *KDR* ($p=0.060$) и *EGFR* ($p=0.948$) не показва статистическа значима връзка с прогнозата – Табл. 4.11. Мултивариационният регресионен анализ показва, че освен възрастта, и наличието на увеличена *VEGF-A* експресия има статистическа значимост като независим прогностичен фактор. Освен възрастта като предиктор за лоша преживяемост ($HR=1.039$), наличието на увеличена *VEGF-A* генна експресия е фактор, асоцииран с по-къса преживяемост ($HR=7.934$).



Фигура 4.43. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: а) KDR; б) FLT-1; в) VEGF-A; г) MMP 9; д) EGFR; е) TGF-β2

Таблица 4.11. Моновариационен и мултивариационен Сох регресионен анализ на корелациите между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Сох регресионен анализ			Мултивариационен Сох регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	1.058	1.030-1.087	<0.001	1.039	1.003-1.066	0.032
KPS (за 10 единици)	0.973	0.951-0.996	0.022	0.981	0.952-1.011	0.215
Диагноза (ГБМ vs др)	5.666	1.738-18.473	0.004	1.361	0.289-6.403	0.697
VEGFA (увеличена vs. др)	11.544	2.77-48.000	0.001	7.934	1.210-52.044	0.031
KDR (увеличена vs. др)	0.428	0.176-1.038	0.060	*	*	*
FLT-1 (увеличена vs. др)	0.343	0.131-0.898	0.029	0.469	0.143-1.541	0.212
MMP9 (увеличена vs. др)	5.473	2.354-12.727	<0.001	1.230	0.420-3.596	0.706
EGFR (увеличена vs. др)	1.021	0.542-1.926	0.948	*	*	*
TGF- β 2 (увеличена vs. др)	2.387	1.174-4.852	0.016	0.653	0.254-1.678	0.376

*Показателят не е включен в мултивариационния анализ; HR—hazard ratio; CI—интервал на достоверност; p—стойност(2-tailed)

Таблица 4.12. Спирман корелационен анализ на експресионните нива на CAIX, EGFR, FLT1, HIF1 α , HIF2 α , KDR, MMP9, TGF- β 2 и VEGFA гените и клинично-патологичните параметри.

		Въз- раст	Диагно- за	Резек- ция	IDH1	KPS	CAIX	FLT1	HIF1 α	HIF2 α	KDR	MMP9	TGF- β 2	VEGFA
Пол	rho	0.216	0.066	0.045	-0.104	-0.452 [§]	0.096	-0.025	0.320 [*]	0.190	0.096	0.137	0.164	0.177
	p	0.100	0.621	0.734	0.459	0.000	0.471	0.851	0.014	0.149	0.471	0.309	0.213	0.179
Въз- раст	rho	0.348 [*]	0.136	-0.507 [§]	-0.419 [§]	0.337 [*]	0.219	0.231	0.162	0.154	0.390 [*]	0.088	0.407 [§]	
	p	0.007	0.303	0.000	0.001	0.009	0.096	0.078	0.219	0.245	0.003	0.507	0.001	
Диаг- ноза	rho			-0.210	-0.509 [§]	-0.233	0.540 [§]	0.156	0.047	0.041	0.264 [*]	0.551 [§]	0.249	0.478 [§]
	p			0.110	0.000	0.076	0.000	0.237	0.725	0.758	0.043	0.000	0.057	0.000
Резек- ция	rho				0.318 [*]	-0.139	-0.141	0.010	0.131	-0.216	-0.194	-0.179	-0.066	-0.158
	p				0.020	0.294	0.286	0.940	0.321	0.101	0.140	0.182	0.619	0.231
IDH1	rho					0.237	-0.457 [§]	-0.328 [*]	-0.345 [*]	-0.428 [§]	-0.445 [§]	-0.639 [§]	-0.563 [§]	-0.602 [§]
	p					0.088	0.001	0.017	0.011	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
KPS	rho						-0.102	-0.101	-0.219	-0.181	-0.099	-0.150	-0.175	-0.144
	p						0.441	0.449	0.096	0.171	0.456	0.266	0.186	0.276
CAIX	rho							0.256 [*]	0.260 [*]	0.281 [*]	0.291 [*]	0.540 [§]	0.268 [*]	0.817 [§]
	p							0.050	0.047	0.031	0.026	0.000	0.040	0.000
FLT1	rho								0.476 [§]	0.613 [§]	0.681 [§]	0.439 [§]	0.465 [§]	0.355 [*]
	p								0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006
HIF1 α	rho									0.584 [§]	0.584 [§]	0.339 [*]	0.584 [§]	0.404 [*]
	p									0.000	0.000	0.010	0.000	0.002
HIF2 α	rho										0.701 [§]	0.281 [*]	0.532 [§]	0.471 [§]
	p										0.000	0.034	0.000	0.000
KDR	rho											0.522 [§]	0.526 [§]	0.401 [*]
	p											0.000	0.000	0.002
MMP9	rho												0.368 [*]	0.612 [§]
	p												0.005	0.000
TGF- β 2	rho													0.430 [§]
	p													0.001

[§]p<0.001 (2-tailed); *p<0.05 (2-tailed).

Изследваните промени в експресионните нива на споменатите по-горе гени един с друг, както и с различните клиничко-хистологични характеристики бяха показани чрез Спирман корелационния анализ – **Табл. 4.12**. Всички анализирани гени показаха положителна корелация един с друг, както и негативна корелация с наличието на *IDH1* мутация. *CAIX*, *MMP9* и *VEGFA* показаха силна положителна асоциация с по-напредналата възраст на заболяемост и наличието на диагноза ГБМ. Докато *HIF1a* показва положителна корелация с мъжкия пол на пациентите, повишените *KDR* експресионни нива се асоциираха с наличието на диагноза ГБМ. Освен това беше показана положителна връзка между наличието на *EGFR* експресия и възрастта на заболяемост ($\rho=0.268$; $p=0.040$), вида резекция ($\rho=0.290$; $p=0.026$) и наличието на 1p19q коделеционни събития ($\rho=0.343$; $p=0.030$) (не представени в **Табл. 4.12** данни). Единствената корелация, която беше наблюдавана с участието на *HIF3a* беше с *CAIX* ($\rho=-0.264$, $p=0.044$) (не представени в **Табл. 4.12** данни).

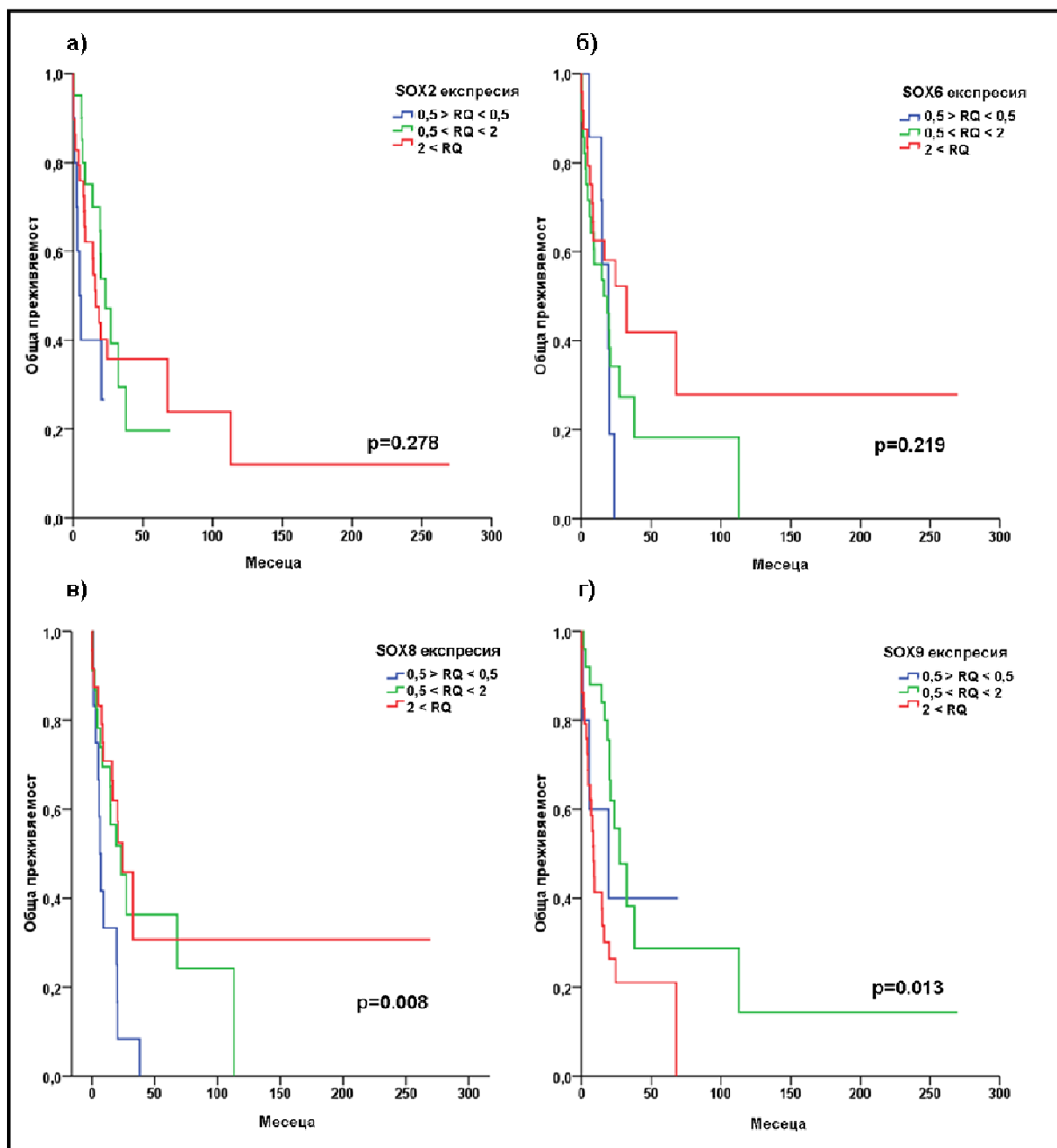
4.7.7. Sox (SRY-type HMG box) суперсемејство (Приложение IV, Табл. IV.1 ; К, Л, М и Н)

- **SOX2** - Анализът на Sox2 експресията показва намалена експресия при 10 от пациентите – 16.9%. При 20 (33.9%) от пациентите беше наблюдавана нормална експресия на гена, а при 29 (49.5%) тумора - повишена. Групата на глиобластомите включва 45 тумора, при които беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В групата от изследваните проби при 21 пациенти беше установено повишение в генната експресия, при 15 наблюдавахме нормална, а при 9 - понижена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана ($p=0.278$)- **Фиг. 4.44 а**).

- **SOX6** - С намалена експресия бяха наблюдавани 7 (11.9%) от пациентите. Двадесет и осем (47.5%) тумора показаха нормална експресия на изследвания ген, а 24 (40.7%) тумора - повишена. (**Приложение Б, Табл. II.2**). При 23 глиобластоми не беше наблюдавана промяна в генната експресия, при 7 наблюдавахме понижена, а при 15 - увеличена експресия. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана ($p=0.219$)- **Фиг. 4.44 б**).

- **SOX8** - Намалена експресия на *SOX8* беше наблюдавана при 11 пациента (18.6%) двама, от които със смесен тип астроцитом и двама с диагноза анапластичен астроцитом III. Тридесет и шест (61%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 12 (20.4%) тумора тя беше повишена. В групата на глиобластомите беше наблюдавана както намалена, така и увеличена експресия на изследвания ген. В 18 проби не беше установена промяна в генната експресия, при 11 наблюдавахме понижена, а при 16 - увеличена експресия. По литературни данни повишените експресионни нива корелират с по-лошата преживяемост при глиома. Статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи според експресията, беше наблюдавана и в нашето проучване ($p=0.008$)- **Фиг. 4.44 в**). Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е по-дълга от тази с нормална експресия (28.4 мес. за групата с увеличена експресия към 11.2 мес.)

- **SOX9** - С намалена експресия на *SOX9* бяха наблюдавани 5 пациента (8.5 %) един, от които с диагноза анапластичен астроцитом III. Двадесет и пет (42.4%) от пациентите показаха нормална експресия на изследвания ген, а при 29 (49.1%) тумора беше повишена. При 20 от 45-те глиобластоми беше наблюдавана нормална експресия. При 21 тумора експресията беше увеличена, а при 4 - намалена. Статистическият анализ на резултатите показва значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия ($p=0.013$)- **Фиг. 4.44 г**). Средната преживяемост на групата с увеличена експресия е по-ниска от тази с нормална експресия (13.4 мес. за групата с увеличена експресия към 35 мес. с нормална). Интересно е, че групата с понижена експресия показва също по-добра преживяемост от групата с повишена експресия (24 мес.).



Фигура 4.44. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от експресията на гените: а) SOX2; б) SOX6; в) SOX8; г) SOX9

Извършен беше корелационен анализ за изследване на взаимовръзките между SOX гените и клинично-патологичните характеристики. В **Табл.4.13** са показани всички значими корелации, като всички SOX гени показаха силна връзка помежду си, а SOX6 и SOX8 силна положителна корелация с наличието на IDH1 мутация (съответно $\rho=0.504$ и 0.443 ; $p<0.001$ за двете). Негативна корелация с диагнозата ГБМ показва SOX6 ($\rho=-0.261$; $p=0.046$), докато експресионните нива на SOX9 показаха положителна връзка с извършването на тотална резекция и възрастта (както следва $\rho=0.296$; $p=0.023$ и $\rho=0.261$; $p=0.045$).

Таблица 4.13. Спирман корелационен анализ на *SOX* генните експресионни нива и клиничко-патологичните параметри

		Спирман корелация	
		rho	p
Възраст	KPS	-.419**	.001
	IDH1	-.413**	.001
	Диагноза ГБМ vs другите	.320**	.014
IDH1 статус	Резекция тотална vs другите	.338**	.006
	Диагноза ГБМ vs другите	-.533**	<.001
KPS ст-ност	Пол (Мъже vs Жени)	-.452**	<.001
SOX2	SOX6	.350**	.007
	SOX8	.432**	.001
	SOX9	.356**	.006
SOX6	SOX8	.513**	<.001
	SOX9	.300*	.021
	IDH1	.504**	<.001
	Диагноза ГБМ vs другите	-.261*	.046
SOX8	SOX9	.208	.114
	IDH1	.443**	<.001
SOX9	Резекция тотална vs другите	.296*	.023
	Възраст	.261*	.045
	IDH1	-.048	.720

**p<0.01 (2-tailed); *p<0.05 (2-tailed)

Освен това данните бяха анализирани според *IDH1* мутационния статус в комбинация с промените в експресионните нива на *SOX* гените. Резултатите показват, че намалената експресия на *SOX2* не корелира значимо със статуса на *IDH1* ($p=0.985$) (Табл.4.13). В групата на пациентите, които притежават мутации в *IDH1* се наблюдава леко увеличаване на преживяемостта, в сравнение с тези с нормален *IDH1* (Табл.4.14.).

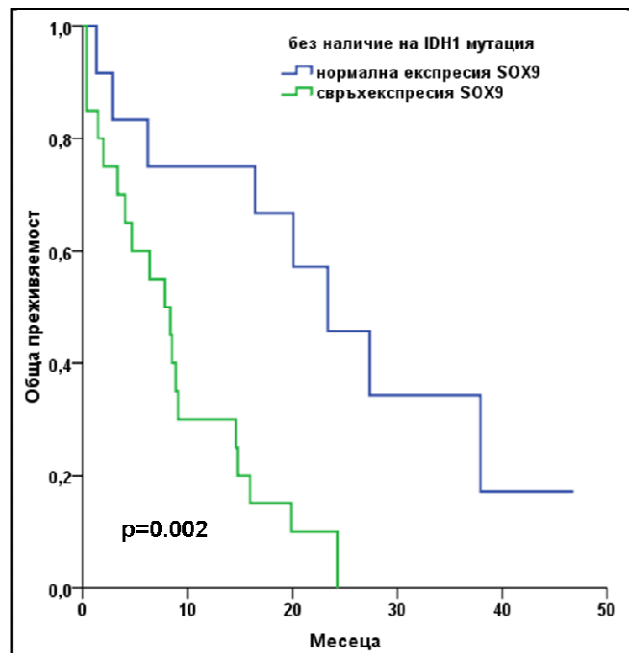
Таблица 4.14. Обща преживяемост на изследваните пациенти групирани според *IDH1* статуса и *iPHK* експресионните нива на *SOX* гените

IDH1 статус	Експресионен статус	Гени							
		SOX2		SOX6		SOX8		SOX9	
		ОП месеца	p	ОП месеца	p	ОП месеца	p	ОП месеца	p
Нормален	Понижен	3.30		16.42		5.9		3.23 [‡]	
	Нормална	20.07	0.157	8.98	0.859	14.60	0.523	20.97	.002
	Увеличен	8.42		8.07		8.87		8.07	
Мутирал	Понижен	12.73 [‡]		-		-		47.03 [‡]	
	Нормална	28.48	0.228	26.27	0.162	46.98	0.122	24.27	0.314
	Увеличен	25.05		24.67		21.88		23.52	

[‡] изключен от статистическия анализ поради малкия брой пациенти в групата; ОП – обща преживяемост (медиална); p- p стойност (2-tailed)

Пациентите с понижена *SOX2* експресия в двете групи - с и без *IDH1* мутации, бяха много малко на брой и недостатъчни за провеждане на анализ за преживяемост. По същия начин, не бяха открити значителни корелации с ОП, когато *IDH1* статус и *SOX6*/*SOX8* експресията бяха изследвани заедно. Въпреки, че не беше установена корелация между наличието на *IDH1* мутация и *SOX9* експресията (Спирман корелационен анализ), бяха наблюдавани интересни резултати, когато пациентите са разделени в зависимост от техния *IDH1* статус. Пациенти с мутирал ген показаха сходна ОП и в двете групи - със свръхекспресиран и нормално експресиран *SOX9* ген. Въпреки това, пациентите с див тип

IDH1 и нормални нива на *SOX9* показваха значително по-продължителна преживяемост (20.97 месеца) (**Фиг.4.45.**) в сравнение с тези характеризиращи се с увеличена експресия (8.07 месеца, $p=0.002$). Пациентите, които показват по-ниски нива от нормалните на *SOX9* бяха малко на брой и в двете групи - с и без *IDH1* мутация; поради тази причина бяха изключени от статистическата обработка.



Фигура 4.45. Преживяемост на пациентите с глиални тумори, при които не е открита мутация в *IDH1* гена в зависимост от експресията на *SOX9* гените

С помощта на Cox регресионен анализ беше установено, че наличието на понижена *SOX8* експресия ($p=0.005$) показва по-добра прогностична стойност, докато наличието на увеличена експресия в гена *SOX9* ($p=0.009$) показва значимост като негативен прогностичен фактор. За разлика от тях наличието на увеличена експресия в гена *SOX2* ($p=0.911$) и *SOX6* ($p=0.199$) не показваха статистическа значима връзка с прогнозата - **Табл.4.15.**

Таблица 4.15. Моновариационен Cox регресионен анализ за между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

Характеристика	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	1.058	1.030-1.087	<.001
Пол (жени vs. мъже)	0.884	0.575 - 1.361	.576
Вторични vs. първични ГБМ	0.421	0.179 – 0.987	.05
Резекция (тотална vs др.)	0.957	0.499 - 1.836	.896
Диагноза (ГБМ vs др.)	5.666	1.738-18.473	.004
KPS (на 10 единици)	0.973	0.951-0.996	.022
<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	0.108	0.032 – 0.358	<.001
<i>SOX2</i> (свръхекспресиран vs др.)	1.037	0.547 – 1.965	.911
<i>SOX6</i> (свръхекспресиран vs др.)	0.644	0.329 – 1.261	.199
<i>SOX8</i> (понижена експресия vs др.)	2.717	1.356 – 5.444	.005
<i>SOX9</i> (свръхекспресиран vs др.)	2.375	1.244-4.533	.009

HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност (2-tailed)

За извършването на по-прецизен и информативен мултирегресионен анализ, и поради наличието на силни корелационни връзки между *SOX8* и *IDH1* мутационния статус беше извършено изграждането на 3 независими модела (**Табл.4.16** -А, Б и В модели). Модел А включва всички клинични и генетични параметри без промените на *SOX8* експресионните нива. В този модел освен възрастта, наличието на *IDH1* и *SOX9* експресията се откриха като

независими прогностични фактори. В модел Б вместо експресионните нива на *SOX9*, бяха изследвани тези на гена *SOX8*, но не беше наблюдавана независимата значимост на промените в нивата му. Модел В показва анализа при изследване едновременно на *SOX8* и *SOX9* експресионните нива, като се наблюдава редуциране на независимите прогностични значимости на параметри като възраст и наличие на *IDH1* мутация, за разлика на маркерите *SOX8* и *SOX9*, които заедно показват силна независима прогностична роля. Наличието на увеличена *SOX9* генна експресия е фактор асоцииран с по-лоша преживяемост (HR=4.686; p=0.002) докато понижена експресия на гена *SOX8* е фактор асоцииран с по-дългата преживяемост (HR=3.042; p=0.020).

Таблица 4.16. Мултивариационен Cox регресионен анализ (А, Б и В модели) за между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

Модел	Характеристика	HR	95% CI	P
А	Възраст (за година)	1.035	1.004 - 1.067	.029
	Диагноза (ГБМ vs др.)	2.413	0.312 - 5.568	.707
	KPS (за 10 единици)	0.983	0.955 - 1.013	.110
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	0.161	0.038 - 0.681	.013
	<i>SOX9</i> (свърхекспресиран vs др.)	3.058	1.339 - 6.984	.008
Б	Възраст (за година)	1.038	1.003 - 1.074	.034
	Диагноза (ГБМ vs др.)	0.990	0.238 - 4.124	.989
	KPS (за 10 единици)	0.970	0.939 - 1.0-1	.061
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	0.226	0.054 - 0.953	.040
	<i>SOX8</i> (понижена експресия vs др.)	1.754	0.770 - 3.994	.181
В	Възраст (за година)	1.026	0.997-1.071	.072
	Диагноза (ГБМ vs др.)	1.718	0.390 - 7.561	.474
	KPS (за 10 единици)	0.966	0.935 - 0.977	.034
	<i>SOX9</i> (свърхекспресиран vs др.)	4.686	1.729-10.544	.002
	<i>IDH1</i> (мутантен vs. нормален)	0.267	0.058 - 1.231	.090
	<i>SOX8</i> (понижена експресия vs др.)	3.042	1.194 - 7.754	.020

HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност (2-tailed);

4.8. ГЕНОМЕН АНАЛИЗ НА ГЛИАЛНИТЕ ТУМОРИ

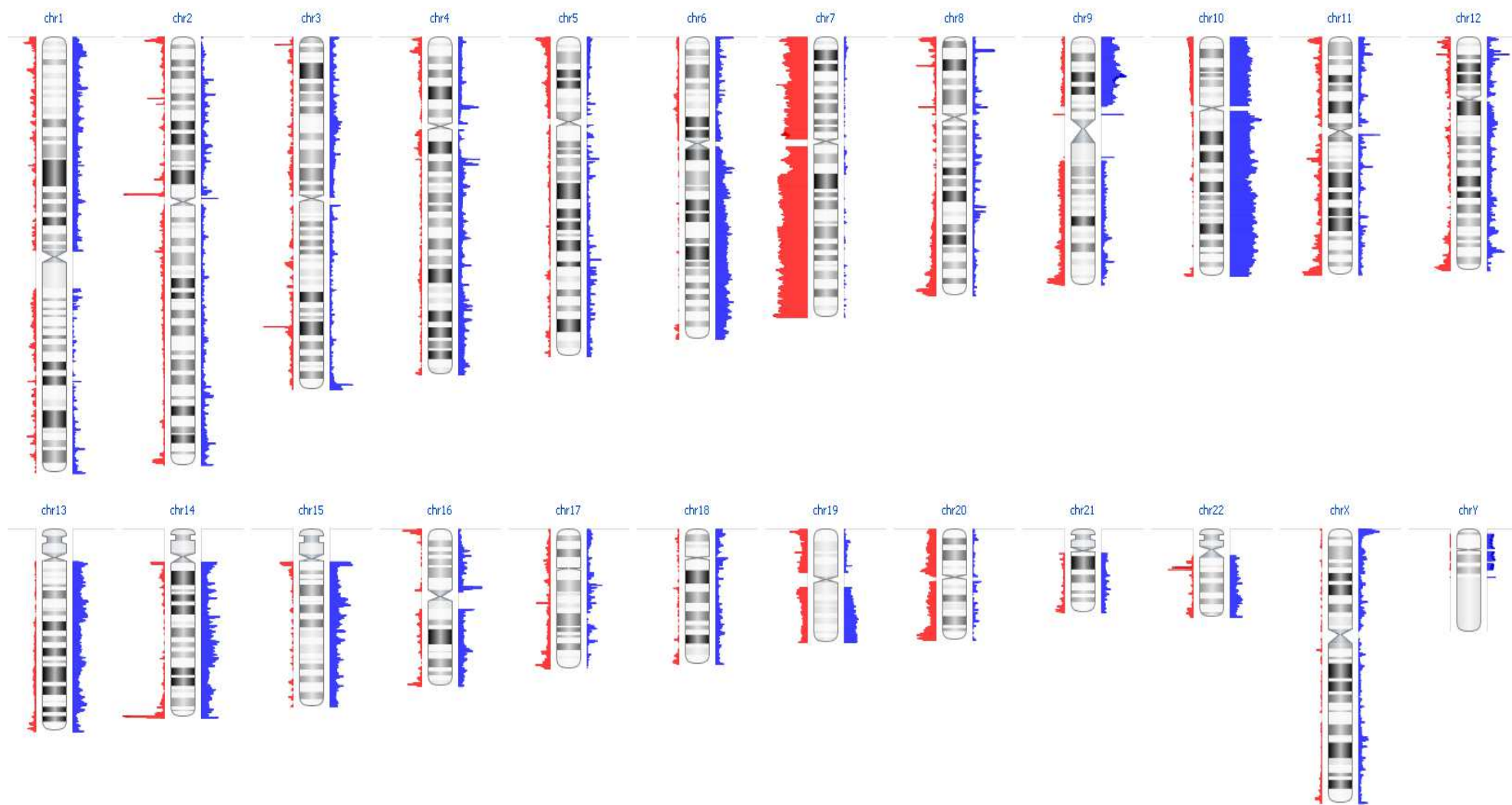
Генетичните промени като точкови мутации, промени в брой копия/аберации (CNV) на участъци от генома и структурни промени (напр. генно-фузионните събития) са отличителни характеристики на раковите заболявания. CNV възникнат като соматични промени в генома на туморните клетки чрез различни механизми и могат да бъдат наблюдавани в различна степен в почти всички видове ракови заболявания. Досега, най-често използваните методи за откриване на CNA са техниките хромозомна и микрочипова сравнителна геномна хибридизация (CGH)⁽⁴¹⁰⁾. В настоящата работа беше използвана една от най-широко разпространените микрочипови платформи – олигонуклеотидните микрочипове. С помощта на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация пациентите бяха изследвани за наличие на големи геномни реорганизации - дупликации, делеции или инверсии.

4.8.5. ПОДБОР НА ПАЦИЕНТИТЕ

Подробно описание на клиничните характеристики на всеки от изследваните пациенти в настоящето проучване може да се види в *Табл. V.1*.

4.8.6. ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ ОТ aCGH

За всеки от изследваните през този етап пациенти бе извършен анализ на данните за промяна на интензитета на aCGH сигнала спрямо сигнала за контролната ДНК. При изследването на 58 пациента бяха установени характерните за глиоми геномни изменения, а именно – увеличен брой копия на хромозома 7 и загуба на хромозома 10 – *Фиг.4.46*.



Фигура 4.46. Графично изображение на честотата на откритите при всички пациенти аберациите във всички хромозоми - с червен цвят отляво на хромозомата са отбелязани районите с амплификация, а със син цвят от дясно - районите с делеции

4.8.6.1. АНАЛИЗ НА ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q

В Табл.4.17 са показани резултатите от проведената сравнителна геномна хибридизация
Таблица 4.17.

	1-ва хромозома		19-та хромозома	
	1p аCGH	1q аCGH	19p аCGH	19q аCGH
8			p13.2	q13.11,q13.2,q13.31-q13.32. q13.32-q13.43
17	p36.13	q44		
26				
31	p36.13	q21.1,q43,q44	p13.3	q13.2,q13.42-q13.43
34				
37	p36.23	q44		
39		q43,q44		
40				
41 ¹	p35.2	q43,q44		
42		q21.1		q13.42
43				
45	p36.33,p36.32-p36.23		p13.3, p13.11	
46				
85	p36.23-p36.22,p36.11,p35.3,p35.2- p35.1,p34.3,p32.3		p13.3-p13.2, p13.13-p13.11	q12,q13.11-q13.12,q13.13- q13.2, q13.3 1-q13.41. q13.42-q13.43
86	p36.23,p36.13			
87 ⁵	p36.13	q12-q21.1		
88 ⁶				
90	p36.32-p36.31,p36.13-p36.12,p36.12- p36.11,p35.1,p34.1,p33-p32.3,p31.1			
91	p36.33-p36.21,p36.21-p32.3,p32.2- p31.3,p31.3-p31.2,p31.1-p21.3,p21.3- p21.2,p13.3-p12,p36.33- p36.13,p36.13- p34.3,p34.3-p12			q12-q13.12,q13.12- q13.31,q13.31-q13.43
92			p12	q12-q13.43
93	p36.33-p36.32,p36.31- p36.21,p36.13,p36.12- p36.11,p35.3,p35.2,p35.1,p34.3,p34.1,p33 p32.3,p22.2,p13.2	q21.2-q21.3,q22- q23.1,q23.3,q32.1,q42 .12,q42.3,q43	p13.3,p13.2, p13.11	q13.11-q13.12,q13.13-q13.2. q13.31-q13.32,q13.32- q13.33. q13.3. q13.41,q13.42,q13.43
94	p36.33,p36.23-p36.22,p36.13, p36.12, p36.11, p35.3, p34.3,p34.2, p34,p32.3,p13.2	q21.2-q21.3, q22, q32.1,q32.1,q42.3,q43	p13.3-p13.2, p13.13-p13.11, p13.12-p12	q13.12-q13.2,q13.31-q13.32, q13.32-q13.33. q13.33,q13.42
95		q44		
96				
134		q21.1, q42.2		
135	p36.13		p13.11	
136				
137			p12	q13.31-q13.32,q13.42-q13.43
139				
140				
143	p36.33-p36.13,p36.13-p35.1,p34.3-p34.1, p34.1-p33,p32.3,p32.2- p32.1,p31.3- p31.2, p31.1-p22.1,p21.2,p13.3- p13.2,p13.1-p12	q21.1		q13.11-q13.12,q13.12- q13.41, q13.41-q13.43
144				q12,q13.11-q13.2,q13.2- q13.31,q13.31-q13.32,q13.32
147		q44		
148	p32.3	q21.1,q44		
150	p36.33-p36.32,p36.23-p36.22	q32.1-q32.2,q32.2-q41, q42.11-q42.12,q42.12- q42.13,q42.3		
151				
152			p12	
153				
159	p36.33-p36.13,p36.13-p36.11,p36.11- p32.1, p31.3-p31.1,p31.1,p31.1- p21.2,p13.3-p12, p12	q44	p13.11	q12-q13.31,q13.31-q13.43

160		q23.3		
161				q12-q13.12,q13.13-q13.2. q13.2-q13.43,q13.43
162				
163	p36.33			q13.32
164		q21.1-q21.2,q44		
165		q25.3		
166		q21.1,q44		q12-q13.31,q13.31-q13.43
167	p36.33,p36.23,p36.13	q12-q21.1		q13.2
168	p36.33-p36.32,p36.31,p36.12-p36.11			q13.31-q13.41,q13.42
169			p12	
171		q22,q25.3	p13.11	q13.41-q13.43
172		q21.1	p12	
173	p36.33-p36.32,p36.31-p36.21,p36.21-p36.13,p36.13-p36.12,p36.12-p35.1,p34.3-p34.2,p34.2-p34.1,p34.1-p33,p32.3,p31.1,p22.2-p22.1,p21.3-p21.2,p13.3-p13.2			q13.12-q13.2,q13.31-q13.32, q13.32-q13.41,q13.42-q13.43
174			p12	
175				q12-q13.11,q13.11-q13.43. q13.43
176				
177 ¹²			p13.11	
178				q13.43
211 ⁹	p36.33-p36.32,p36.31-p36.22,p36.22-p36.13,p36.13-p35.3,p35.2-p35.1,p34.3-p34.2,p34.2-p33,p33-p32.3,p31.3-p31.2,p31.1,p31.1-p22.1, p22.1-p21.3, p21.3-p21.2, p13.3-p13.1			q13.31-q13.43

***със зелен** цвят са отбелязани загубите в хромозомните райони, който са били открити и с метода MLPA; ***с червен** цвят са отбелязани загубите в хромозомните райони, който не са били открити с метода MLPA; ***с черен** цвят са отбелязани загубите, за които в MLPA кита не са заложени сонди

При сравнението на изследваните райони в хромозоми 1 и 19 чрез анализа MLPA с получените резултати от метода сравнителна геномна хибридизация се получиха и разминавания в резултатите, което се дължи и на разлики в изследваните райони. Освен това за времето на провеждане на MLPA анализа фирмата производител, с цел подобряване на амплификацията на изследваните райони, въведе промени засягащи както прицелните изследвани нуклеотидни секвенции (в хромозоми 1 и 19), така и в контролните райони. Това не доведе до промени засягащи изследването на конкретните включени в кита гени. Поради тази причина половината пациенти бяха изследвани с по-стария вариант на кита (B1, lot0608), а половината с по-новия вариант (B2, lot0112). Това е и причината в тази група от 58 пациента да не бъде изчислена специфичната чувствителност и специфичност на метода MLPA, както и вероятно е причина за разминавания с aCGH резултатите.

4.8.6.2. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ

Статистически значими разлики в интензитета на хибридизационния сигнал между проби и контроли бяха установени за сравнително голям брой кодиращи секвенции. Поради тази причина данните бяха подложени последователно на няколко различни анализа (Агрегационен анализ (STAT и GISTIC). Клъстериране и сравняване по групи, описани по-долу) водещи до разделянето на пациентите в смислени групи, идентифициране на аберантните събития довели до разликата между тях и тяхната патогенеза. В изследваната група пациенти, райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации” са показани в табличен вид, маркирани в червено при намален брой в копията и в синьо при генетични загуби – делеции. Вниманието беше обърнато на тези райони, които в литературата се свързват с наличието на гени, имащи молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, независимо дали с локализация в ЦНС или другаде.

4.8.6.2.1. STAC

В резултат на извършения STAC анализ в изследваната група пациенти с глиома най-зна-

чимите участъци от генома бяха открити из целия геном, но районите с увеличен брой копия (в хромозоми 2, 7, 8, 9, 11 и 20) се различават от тези характеризиращи се със загуба на копийните варианти, засягащи хромозоми 1, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15 и 16. Промени от двата вида се наблюдават единствено в хромозома 9.

Таблица 4.18. Данни получени от агрегационния анализ на значимите райони в групата от 58 пациента от типа генетични загуби

	Хр	Локус	Район	Размер bp	Честота %	Р- ст-ст	% припокриване с описани CNV
УБК	2	2p25.3	1,689,807-1,761,908	72101	48.28	0	47.06
	7	7p22.3	979,430-1,121,564	142134	62.07	0.001	49.98
		7p15.2	26,850,884-26,902,023	51139	74.14	0	0.00
		7p11.2	55,093,384-55,236,352	142968	63.79	0	3.99
		7q32.3	131,642,107-131,849,351	207244	75.86	0.003	0.17
		8p23.3	1,036,179-1,198,148	161969	41.38	0	20.47
			1,763,847-1,868,441	104594	37.93		34.55
	9	9q34.3	136,718,619-136,820,673	102054	39.66	0	48.34
	11	11q13.2	68,793,637-68,895,136	101499	36.21	0	1.57
		11q25	134,295,939-134,452,384	156445	43.10	0	38.56
			132,917,588-132,995,228	77640	46.55		0
	20	20p11.21	23,557,479-23,645,774	88295	37.93	0	3.86
		20q13.33	58,780,790-59,004,617	223827	37.93	0	16.09
НБК	1	1p35.3	28,826,930-28,905,646	78716	36.21	<0.001	3.37
	4	4p14	39,392,125-39,522,092	129967	48.28	<0.001	15.60
		4q13.3	71,903,303-72,051,669	148366	48.28	<0.001	0
	6	6q13	74,177,397-74,239,664	62267	44.83	<0.001	2.56
		6q14.1	76,451,236-76,504,769	53533	39.66	<0.001	3.50
		6q23.2	134,497,829-134,577,722	79893	37.93	0.01	12.89
		6q23.3	137,179,401-137,235,830	56429	39.66	<0.001	0
		6q25.1	149,953,206-150,029,132	75926	43.10	<0.001	7.09
		6q25.2	155,320,072-155,536,235	216163	37.93	0.01	0.44
		6q25.3	158,816,721-158,941,159	124438	37.93	0.01	1.19
	9	9p21.3	21,801,205-21,814,934	13729	56.90	<0.001	0
	10	10p14-13	11,885,012-12,549,681	664669	53.45	0.021	15.73
		10q26.11	120,836,500-120,907,237	70737	67.24	0.012	2.28
	12	12q24.31	121,517,032-121,528,889	11857	41.38	<0.001	0
	13	13q14.11	40,204,154-40,241,196	37042	36.21	<0.001	0
			40,795,000-40,805,525	10525	37.93	<0.001	10.60
		13q14.2-3	48,701,671-49,016,241	314570	36.21	<0.001	2.94
		13q14.3	49,257,549-49,499,891	242342	36.21	<0.001	13.30
	14	14q13.2	34,684,971-34,762,461	77490	36.21	0.014	13.09
		14q21.1	38,608,616-38,705,012	96396	37.93	0.001	1.46
		14q22.2-3	54,383,297-54,407,409	24112	37.93	0.001	25.89
		14q23.2	63,379,094-63,389,691	10597	43.10	<0.001	0
			63,831,966-63,955,007	123041	37.93	0.001	4.22
		14q23.3	64,989,547-65,007,087	17540	37.93	0.001	45.60
		14q24.2	70,917,212-71,029,620	112408	37.93	0.001	0
			72,526,898-72,628,104	101206	41.38	<0.001	4.17
		14q24.3	72,951,145-73,056,023	104878	41.38	<0.001	24.76
			73,785,204-73,918,847	133643	36.21	0.014	0
	15	15q15.1	39,309,648-39,355,840	46192	43.10	<0.001	0
			39,539,070-39,565,142	26072	43.10	<0.001	0
			40,605,407-40,651,430	46023	37.93	0.001	0
		15q15.3	42,315,667-42,622,243	306576	44.83	<0.001	0.55
			42,647,869-42,681,968	34099	50.00	<0.001	8.52
		15q22.31	62,427,086-62,528,196	101110	36.21	0.009	0.26
			62,623,999-62,719,317	95318	36.21	0.009	3.55
	16	15q22.2	57,558,375-57,678,315	119940	37.93	0.001	6.66
		16q11.2	45,058,242-45,201,846	143604	37.93	<0.001	0.11

В **Табл.4.18** са показани и конкретните засегнати райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации” (маркирани в червено) и „генетична загуба – делеция” (маркирани в синьо), както и размера, честотата в изследваната група, и публикуваната в базите данни информация за наличието им в други проучвания.

От гените, разположени в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации” за потенциално отговорни за процеса на канцерогенеза в мозъка бяха селектирани *PXDN*, *ADAP1*, *SKAP2*, *EGFR*, *PLXNA4*, *ARHGEF10* и *CST3* гени. По-голям брой гени бяха наблюдавани в райони показали значими изменения от типа „генетични загуби – делеции”. Засегнатите гени, които ние свързахме с провокиране и възникване на заболяването, бяха следните 20 - *TAF12*, *UBE2K*, *DDX43*, *SENP6*, *SGK1*, *PEX7*, *LATS1*, *TIAM2*, *MTAP*, *CAMK1D*, *GCH1*, *ESR2*, *MTHFD1*, *FUT8*, *NUMB*, *SPG11*, *CSNK1G1* и *SHCBP1*.

4.8.6.2.2. GISTIC

Районите показали наличие на значимо изменение в сравнение с нормалния геном, имащи ниски стойности на Q коефициента, високи такива на G коефициента и нисък процент на припокриване с известните вариация в броя на копията (CNVs) публикувани в литературата са районите маркирани в червено от **Табл.4.19**.

Таблица 4.19. Райони, показали значими изменения в изследваната група от 58 пациента

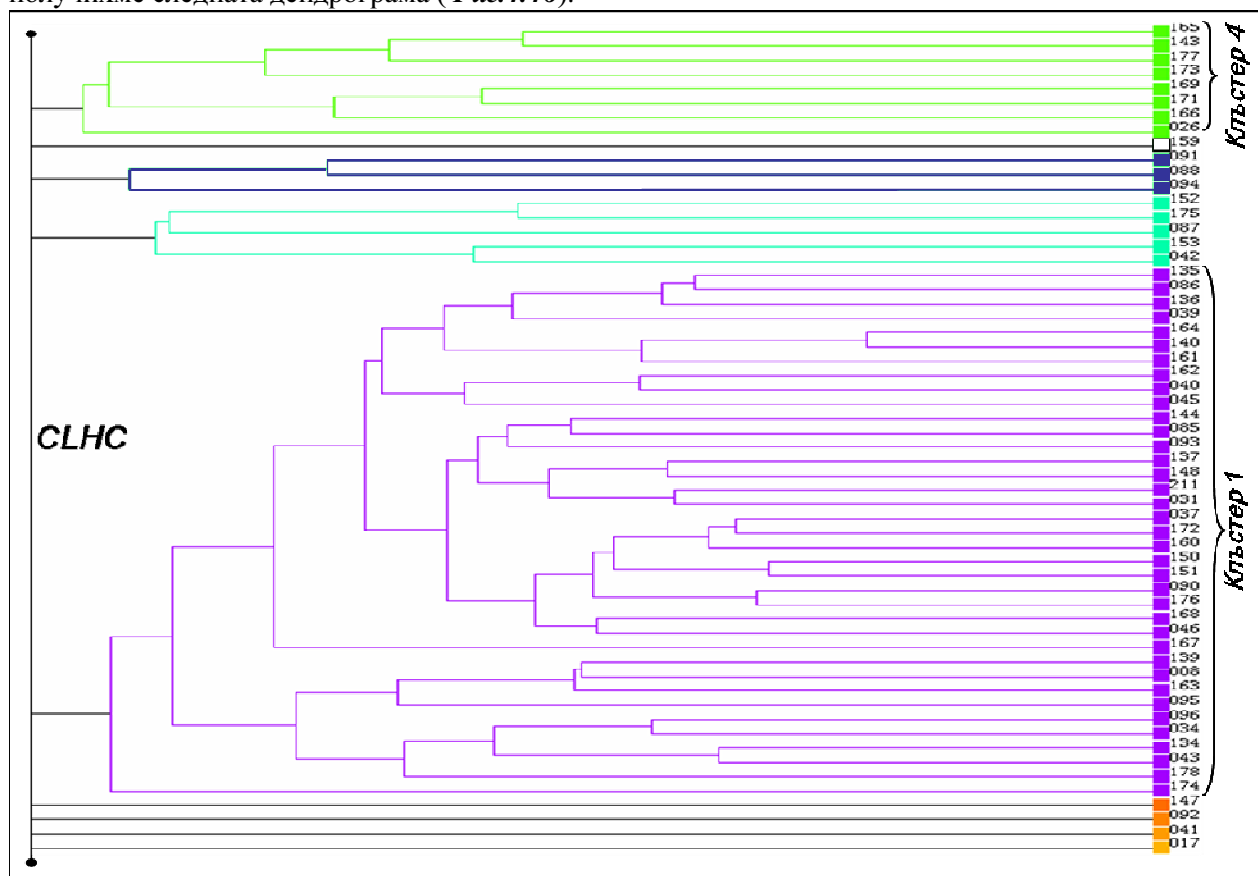
	Х.р.	Район	Q-коэф.	G-коэф.	% припокриване с крива на CNV
УБК	1	72,537,679-72,585,332	6.71E-9	35.03	100.00
	2	34,548,116-34,588,943	6.71E-9	75.95	100.00
		88,950,081-88,960,801	6.71E-9	45.06	100.00
	3	163,987,310-164,112,820	6.71E-9	128.58	100.00
		4,036,839-4,096,827	8.68E-9	26.29	100.00
	7	116,112,421-116,163,496	6.92E-9	27.49	0.00
		55,197,754-55,236,352	6.71E-9	75.23	5.04
	8	39,349,089-39,445,762	6.71E-9	94.62	100.00
	12	56,417,326-56,463,278	2.53E-7	22.16	58.30
		9,492,374-9,571,161	6.71E-9	30.52	100.00
НБК	14	105,402,495-105,598,425	3.63E-9	200.38	100.00
	22	21,381,402-21,503,059	6.71E-9	101.45	100.00
		22,672,813-22,728,622	6.71E-9	39.59	100.00
	1	194,993,565-195,078,841	6.02E-9	22.15	100.00
		246,814,209-246,863,600	9.93E-5	13.11	100.00
		72,537,679-72,585,332	5.75E-9	57.28	100.00
	3	196,863,269-196,921,025	5.94E-9	22.54	100.00
	4	68,990,434-69,405,506	5.75E-9	48.88	100.00
	6	32,596,682-32,640,289	5.75E-9	23.94	100.00
		79,025,925-79,069,295	6.06E-9	22.03	100.00
	8	39,445,762-39,487,965	5.75E-9	30.67	100.00
		7,291,268-7,807,526	1.83E-7	18.23	100.00
	9	21,952,671-21,963,222	5.75E-9	44.90	100.00
		43,626,920-44,199,460	1.28E-7	18.70	100.00
	10	19,804,993-19,890,630	3.82E-6	15.56	100.00
		46,524,789-46,804,498	5.75E-9	26.12	100.00
	11	55,126,379-55,216,250	5.75E-9	48.41	100.00
	12	9,492,374-9,597,208	5.75E-9	32.42	100.00
	14	73,065,882-73,099,317	1.65E-5	14.48	100.00
		106,298,293-106,320,862	6.69E-6	15.19	100.00
	15	19,919,008-19,960,190	3.40E-8	19.86	100.00
	16	33,044,330-33,286,122	1.92E-6	16.05	100.00
	22	22,672,813-22,728,622	1.34E-6	16.30	100.00
	X	0-104,269	3.27E-4	12.25	99.92
	Y	10,524,561-10,544,137	1.10E-4	13.03	100.00
		15,533,934-15,722,113	3.88E-5	13.83	0.00
		20,392,788-20,963,562	1.38E-5	14.64	100.00

Районите със загуба на копийните варианти (в хромозоми 2, 7, 8, 9, 11 и 20) се различават от тези характеризиращи се с увеличен брой копия, засягащи хромозоми 1, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15 и 16. Промени от двата вида се наблюдават единствено в хромозома 9. В **Табл.4.19** са показани и конкретните засегнати райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации” (маркирани в червено) и „генетична загуба – делеция” (маркирани в синьо), както и размера, честотата в изследваната група, и публикуваната в базите данни информация за наличието им в други проучвания.

От гените, разположени в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации” за потенциално отговорни за процеса на канцерогенеза в мозъка бяха селектирани следните гени: *EGFR*, *MET*, *AGAP2*, *TSPAN31*, *CDK4*, *MARCH9*, *CYP2A*, *CYP27B1*, *METTL1*, *METTL21B*, *TSFM*.

4.8.6.3. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ

Клъстерният анализ е може би най-широко използвания статистически инструмент за анализ на микрочипови данни. Поради размера на получените данни, предоставени от микрочиповите експерименти, информацията трябва да бъде обобщена по начин, който е достъпен за тълкуване. След анализ на данните и оценка на подходящия анализ за обработка на данните беше избран метода на групиране базиран на пълно сходство (Complete linkage hierarchical clustering или CLHC) При използването на този алгоритъм за анализа на данните получихме следната дендрограма (**Фиг.4.46**).



Фигура 4.46. Дендрограма получена при анализ на данните от микрочиповия анализ чрез Йерархично групиране базирано на пълно сходство (CLHC) (с лилаво - клъстер 4, със светло синьо - клъстер 2, с тъмно синьо - клъстер 3, със зелено - клъстер 4, бяло, тъмно и светло оранжево, тъмно и светло жълто – единични представители в група)

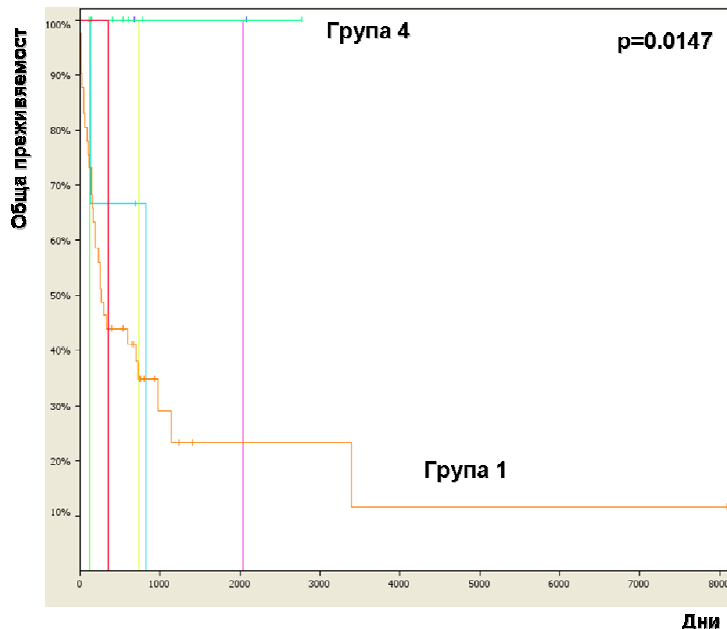
Клъстерният анализ доведе до образуването на общо 9 групи - 4 по-големи и 5 всяка от които съдържаща по един пациент в група. Клъстерна група 1 е с най-голям брой участници – 37 тумора. Преобладаващата група от пациенти (29 на брой) се характеризират с диагноза ГБМ, като само три от тях са прогресирали от по-ниско стадийна глиома. При 5 пациента е налице диагноза АА III, при 2 ААII и само при един е ОДIII. Тази група се характеризира със средна

възраст на заболяемост 60 години и ниска средна обща преживяемост (8.42 мес). Наличие на мутация в *IDH1* гена се наблюдава едва при 21% (8 пациента), три от които са с диагноза ГБМ, а само един е вторичен. Сформираната група 2 е изградена вследствие сходствата в генетичните промени измежду 5 тумора. Двама от членовете ѝ са с диагноза вторичен ГБМ, двама – с АА III стадий и един е със смесен тип глиома – олигоастроцитом. В 80% от групата възрастта на заболяемост е под 50 годишна, KPS статуса е над 70, а средната обща преживяемост е сравнително висока (19.87 мес). Клъстерна група 3 е представена от 3 пациента с малигнен глиом, два от които ААIII, а един с диагноза вторичен ГБМ. Всички имат възраст на заболяемост над 50 години, но и високи стойности на KPS (≥ 80). Групата се характеризира с по-висока средната обща преживяемост (23.07 мес), което вероятно има връзка с наличието на мутация в *IDH1* гена при пациентите с ААIII. Клъстерна група 4 се състои от 8 тумора, 3 от които с диагноза АП, двама с първична ГБМ и ААIII и един с ОДIII. Тази група се характеризира със средна възраст на заболяемост 42 години, като само 2 от пациентите имат възраст на заболяемост над 45 години. Въпреки, че средната обща преживяемост в групата не показва значително увеличение (15.92 мес), сто процента от групата има високи стойности на KPS (≥ 80) и наличие на мутация в *IDH1* гена. Причината за това се дължи на краткия период от поставянето на диагнозата до момента на събиране данните за преживяемост на тези пациенти, но се очаква групата да покаже значително по-висока преживяемост в сравнение с останалите групи поради за липсата на летално събитие за периода на проследяването им.

4.8.6.4. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПАЦИЕНТИТЕ ПО ГРУПИ

Освен извършените по-горе софтуерни анализи на данните, получени от микрочиповия анализ на всичките 58 пациента, извършихме и сравнителен анализ на пациентите разделени на групи според избрани от нас показатели, с помощта на модула „Comparison” на програмата Nexus v.7.0.

4.8.6.4.1. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД ГРУПИТЕ ПОЛУЧЕНИ ПРИ CLHC



Фигура 4.47. Преживяемост на пациентите с глиални тумори в зависимост от групирането им с CLHC

При сравняване на групите, получени при CLHC анализа беше установена статистически значима разлика в преживяемостта на клъстерна група 1 спрямо група 4 – **Фиг.4.47**. Значимите изменения наблюдавани като съществени разлики между двете клъстерни групи, бяха открити в хромозоми 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 и 19 – **Фиг.4.48** оградено в оранжево. От фигурата ясно се вижда, че най-голям процент от събитията са локализирани в хромозома 7, 8 и 10 - в клъстерната група 1 се наблюдават главно намален брой копия в хромозома 8 и 10, за разлика

от група 4, при която в хромозома 8 преобладават увеличени брой копия, а в 10-та хромозома се наблюдават сравнително малък брой аберации. Наблюдаваните значими аберации в двете групи от пациенти бяха сравнени и бяха отдиференцирани само тези, при които разликата между групите е статистическа значима и процента на припокриване с известни и описани вариации в броя копия е под 55%. В **Табл.4.20** са показани всички райони показали значима разлика между двете групи. В групата от пациенти, оформящи клъстер 1, наблюдаваните аберации довели до намаляване в броя на копията при над 70% от пациентите, засягат 9 гена и един псевдоген, като тези изменения не се наблюдават в нито един от членовете на групата, формираща клъстер 4.

Таблица 4.20. УБК/НБК наблюдавани в групата от пациенти в клъстер 1 спрямо с тези в клъстер 4

	Хр	Цитолента	Район	Размер bp	Честота в група 1 %	Честота в група 4 %	р -стой- ност	% при покриване с CNV
НБК	1	p31.3	66,296,918-66,473,773	176855	7.32	37.50	0.0470	1.43
		p21.2	99,945,484-99,973,486	28002				23.44
	3	p24.3	16,613,231-17,102,341	489110	7.32	37.50	0.0470	19.92
			23,356,669-23,573,552	216883	4.88		0.0256	3.76
		p22.1	39,309,563-39,449,100	139537	4.88		0.0256	44.86
		p21.31	46,301,889-46,503,110	201221	2.44		0.0112	12.50
			47,251,190-47,693,148	441958	7.32		0.0470	14.85
			48,331,356-48,752,528	421172	4.88		0.0256	34.40
			49,013,276-49,048,707	35431				0.00
			49,619,772-49,852,787	233015				13.76
			50,647,572-50,684,548	36976				0.00
		p21.33-p21.32	44,264,748-44,481,788	217040	2.44		0.0112	5.95
	p21.1	52,422,942-52,548,448	125506	2.44	0.0112	25.64		
	4	p14	39,392,125-39,522,092	129967	56.10	12.50	0.0488	15.60
	6	p21.31	36,346,569-36,356,297	9728	4.88	37.50	0.0256	0.00
	10	p14- p13	11,885,012-12,474,599	589587	70.73	0.00	0.0003	17.66
		q11.21	43,248,710-43,326,946	78236	63.41		0.0011	27.14
	12	q12	39,182,931-39,321,227	138296	14.63	50.00	0.0438	32.44
		q24.31	120,580,519-120,676,612	96093	39.02	0.00	0.0410	5.49
	14	q13.2	34,497,919-34,762,461	264542	41.46	0.00	0.0384	45.98
		q21.1	38,608,616-38,705,012	96396	43.90		0.0198	1.46
		q22.2-q22.3	54,383,297-54,407,409	24112	43.90		0.0198	25.89
		q22.3	54,591,250-54,660,296	69046	39.02		0.0410	0.00
		q23.1	57,699,166-58,032,027	332861	39.02		0.0410	0.45
			63,379,094-63,389,691	10597	48.78		0.0148	0.00
		q23.2	63,831,966-63,955,007	123041	41.46		0.0384	4.22
			70,917,212-71,058,612	141400	41.46		0.0384	0.00
		q24.3	72,937,703-73,056,023	118320	46.34		0.0165	25.88
73,339,254-73,616,434			277180	39.02	0.0410		0.30	
73,785,204-73,918,847			133643	39.02	0.0410		0.00	
19	q13.33	57,312,751-57,427,955	115204	14.63	50.00	0.0438	29.91	
	q13.42	60,908,078-61,103,691	195613	17.07	62.50	0.0151	49.06	
УБК	7	p22.3	979,430-1,121,564	142134	73.17	25.00	0.0150	49.98
		p22.2	2,482,648-2,566,278	83630	60.98	12.50	0.0187	49.73
		p22.1	5,678,517-5,749,435	70918	56.10		0.0488	5.80
		p21.3	11,588,856-11,780,937	192081	73.17		0.0023	0.00
		p21.1	18,506,780-18,735,048	228268	65.85		0.0146	23.27
			20,356,634-20,610,125	253491	56.10		0.0488	1.58
			20,929,302-21,815,831	886529	58.54		0.0232	27.83
		p15.3	22,470,422-22,622,803	152381	56.10		0.0488	0.00
			25,358,204-25,968,264	610060	60.98		0.0187	1.74
		p15.2	26,805,197-26,850,884	45687	68.29		0.0053	0.00
			28,007,116-28,076,744	69628	70.73		0.0035	0.00
		p14.2	36,948,696-37,118,014	169318	65.85		0.0146	21.91
		p14.1	40,510,295-40,616,804	106509	65.85		0.0146	0.00

	p13	41,281,403-41,760,388	478985	70.73		0.0035	0.79
		43,361,955-43,564,958	203003	60.98		0.0187	5.16
		45,140,110-45,581,334	441224	58.54		0.0232	45.66
	p11.2	55,065,545-55,236,352	170807	80.49		0.0005	3.34
	q11.21	62,982,831-63,016,834	34003	65.85	25.00	0.0497	0.00
	q11.22	68,698,177-68,708,823	10646	65.85	25.00	0.0497	0.00
		69,462,635-69,662,640	200005	78.05		0.0067	0.00
		70,707,372-71,210,688	503316	65.85		0.0497	42.62
	q21.11	78,790,360-80,360,296	1569936	85.37	37.50	0.0094	19.48
	q31.1	110,174,524-110,405,994	231470	85.37	50.00	0.0438	43.52
	q31.32	121,715,995-121,977,691	261696	85.37		0.0438	0.00
	q32.3	131,642,107-131,975,545	333438	90.24		0.0171	5.79
	q33	136,531,035-136,562,859	31824	85.37		0.0438	0.00
8	q21.3	91,877,707-92,004,274	126567	0.00	37.50	0.0030	0.00
	q22.1	94,041,989-94,794,793	752804		25.00	0.0238	30.71
		96,143,599-96,928,556	784957			0.0238	13.80
		97,454,340-97,641,303	186963			0.0238	2.04
		98,677,604-98,986,821	309217			0.0238	50.75
	q22.3-q23.1	105,568,064-106,739,445	1171381	2.44	37.50	0.0112	18.40
	q23.1	107,354,129-107,634,365	280236	2.44	50.00	0.0015	54.59
	q23.1-q23.2	110,291,243-110,756,807	465564	0.00	37.50	0.0030	10.23
	q24.21	129,724,082-130,852,361	1128279	4.88	37.50	0.0256	18.84
		131,129,345-131,303,047	173702			0.0256	0.90
	q24.22	133,807,801-133,837,621	29820	14.63	50.00	0.0438	0.47
	q24.3	141,965,436-142,250,663	285227	4.88	37.50	0.0256	1.23
		144,302,137-144,416,267	114130	7.32	37.50	0.0470	42.46
146,021,356-146,034,553		13197	7.32	50.00	0.0092	15.36	
10	p15.1 - p13	6,146,759-14,983,805	883704	2.44	37.50	0.0112	32.15
	p12.1- p11.23	27,679,412-28,443,939	764527	0.00	25.00	0.0238	19.71
	p11.23	28,871,557-29,195,096	323539	0.00	25.00	0.0238	0.70
		29,640,001-29,889,025	249024				50.37
		29,928,608-30,323,619	395011				21.07
	p11.23- p11.21	30,892,151-38,565,805	7673654	0.00	25.00	0.0238	19.99
q26.3	131,177,598-131,305,750	128152	4.88	37.50	0.0256	3.74	
11	q22.1	100,151,815-100,393,510	241695	0.00	37.50	0.0030	2.01
	q22.3 - q23.1	109,676,270-110,120,514	444244	0.00	25.00	0.0238	5.04
	q23.1	111,440,233-111,666,085	225852	0.00	25.00	0.0238	0.93
	q23.2	113,237,821-113,426,997	189176	0.00	25.00	0.0238	0.00
	q23.3	116,256,385-116,335,554	79169	0.00	25.00	0.0238	0.00
		117,608,146-117,647,785	39639		37.50	0.0030	0.00
		118,431,867-118,680,705	248838				1.42
		119,631,900-119,789,920	158020				2.44
	q24.1	120,859,098-121,200,535	341437	2.44	37.50	0.0112	26.67
		121,884,786-122,372,916	488130	0.00	25.00	0.0238	17.91
		122,529,701-122,738,718	209017				0.00
q24.1 - q24.2		123,378,403-123,782,671	404268	0.00	37.50	0.0030	43.86
q24.3	128,359,327-129,756,816	1397489	0.00	0.0030		32.03	
12	p12.1	21,544,261-21,588,523	44262	2.44	37.50	0.0112	0.00

син цвят – райони, намиращи се в райони с аберации от типа „генетични загуби – делеции“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от пациентите в клъстер 1 и при 0% от пациентите в клъстер 4; **червен цвят** – райони, намиращи се в райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“ показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от пациентите в клъстер 1 и при 0% от пациентите в клъстер 4; **зелен цвят** – райони, намиращи се в райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при 37% от пациентите в клъстер 4

Гените, в райони показали значими изменения и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, бяха отдиференцирани - *UPF2*, *DHTKD1* и *SAMKID* (в Табл.4.20 –маркирани в синьо). И трите гена се намират в хромозома 10, локализиращи в р.14-р.13, като засегнатия регион обхваща 589 587 б.дв. В групата от пациенти оформящи клъстер 4 наблюдаваните аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“ (Табл.4.20, маркирани в зелено) довели

до увеличаване на броя копия при около 37% от пациентите, липсващи или в единични случаи в групата формираща клъстер1 са следните гени: *NECAB1*, *ENY2*, *EBAG9*, *SYBU*, *MPZL2*, *HYOU1*, *HMBS*, *PBGD*, *H2AFX*, *HINFP*, *CBL*, *VWA5A*, *ST14*, *MGMT*, *ARHGAP32*, *BARX2*, *APLP2*, *NFRKB* и *PRDM10*. Отдиференцирани бяха и гени, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от пациентите в клъстер 1 и при под 50% от пациентите в клъстер 4 (**Табл.4.18**, маркирани в червено). Те са следните: *ADAP1*, *CYP2W1*, *GPER*, *INHBA*, *EGFR*, *MAGI2*, *GNAI1*, *SEMA3C*, *FEZF1*, *CADPS2*, *PLXNA4*, *PTN*.

4.8.2.4.2. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД *IDH1/2* МУТАЦИОННИЯ СТАТУС

В изследваната група от 58 пациента, наличието на мутация в *IDH1* гена показва статистическа значима връзка с преживяемостта ($p=4.18E^{-5}$). В резултат на това пациентите бяха разделени на четири групи, като фактори на групирането бяха наличието или липсата на *IDH1/2* мутация и ниска/ висока преживяемост. Пациентите с преживяемост по-голяма от 13 месеца са причислени към групата на дълго преживяващите, докато тези с по-малко от 13 месеца живот с ниска преживяемост.

1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В *IDH1/2* С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Сравнени бяха данните получени от микрочиповия анализ на 34 пациента, при които не беше открита мутация в *IDH1/IDH2*, като 12 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 22 пациента в групата с ниска преживяемост.

Таблица 4.21. Увеличен/намален брой копия наблюдавани в групата от пациенти без наличие на мутация в *IDH1/IDH2* и с висока обща преживяемост в сравнение с тази с ниска преживяемост

	Хр	Цитолента	Район	Размер н.дв.	Честота в група с НП %	Честота в група с ВП %	р-стойност	% припокриване с CNV
НБК	2	p23.3	24,312,539-24,401,905	89366	0.00	25.00	0.0368	0.15
	4	q12	57,551,445-57,577,568	26123	0.00	25.00	0.0368	0.00
		q13.1	65,422,655-65,623,050	200395				10.87
		q25	111,245,178-111,258,691	13513				0.00
	10	p13	16,808,232-16,821,162	12930	81.82	33.33	0.0084	0.00
		p12.1	25,339,559-25,641,368	301809				1.33
		p11.23	28,723,543-29,205,271	481728				0.60
		p11.22	32,786,533-32,823,770	37237	86.36	33.33	0.0053	0.00
		p11.21	37,866,631-38,117,466	250835	81.82	41.67	0.0256	10.98
		q11.22	49,430,142-49,627,629	197487	77.27	33.33	0.0248	1.61
		q11.23	52,695,347-52,718,104	22757	86.36	50.00	0.0403	0.00
		q21.3	69,238,850-69,965,115	726265	95.45	50.00	0.0039	1.98
		q23.31	89,692,469-89,713,463	20994		58.33	0.0136	0.00
		q23.33	97,103,111-97,523,564	420453		58.33	0.0136	0.39
	12	p13.2	10,250,299-10,366,577	116278	0.00	25.00	0.0368	0.00
		p13.1	14,425,240-14,467,509	42269				0.00
			14,577,584-14,702,477	124893				0.20
	15	q23	67,710,759-67,939,290	228531	4.55	33.33	0.0420	0.68
		q25.1	78,005,593-78,190,042	184449	13.64	50.00	0.0403	0.00
		q26.2-q26.3	95,940,562-96,648,950	708388	4.55	33.33	0.0420	10.11
	16	p13.13	10,874,317-10,887,472	13155	0.00	25.00	0.0368	0.00
		p12.3	19,711,874-19,756,622	44748	4.55	33.33	0.0420	0.00
	X	p22.33	1,508,877-1,545,484	36607	4.55	33.33	0.0420	1.11
УБК	7	p12.1	53,494,370-53,783,832	289462	86.36	50.00	0.0403	32.81
	14	q12	24,299,424-24,433,173	133749	0.00	25.00	0.0368	2.03

зелен цвят – райони, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при 25% от пациентите с ВП; син цвят – райони, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при повече от 75% от пациентите с НП

Софтуерната програма пресмята разликата в амплитудата и честотата на аберациите между двете групи и отбелязва значимите такива. Значими аберации между изследваните групи се наблюдават в хромозоми 1, 2, 4, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 22, X и Y (сините черти в секция „Significant”, **Фиг.4.49**).

След провеждане на анализ с помощта на софтуерната програма Nexus v.7.1 наблюдаваните значими аберации в двете групи от пациенти бяха сравнени и отдиференцирани само тези, при които разликата между групите е статистическа значима и процента на припокриване с известни и описани вариации в броя копия е под 55%. В **Табл.4.21** са показани всички райони показали значима разлика между двете групи. В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до намаление в броя на копията при 25% от пациентите, засягат следните 8 гени - *ITSN2*, *POLR2B*, *ELOVL6*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1*, *KLRD1* и *СИТА* (маркирани в зелено), като тези изменения не се наблюдават при нито един от пациентите с понижена обща преживяемост.

2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В IDH1/2 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Сравнени бяха данните получени от микрочиповия анализ на 24 пациента, при които беше открита мутация в *IDH1/IDH2*, като 17 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 7 пациента в групата с кратка преживяемост.

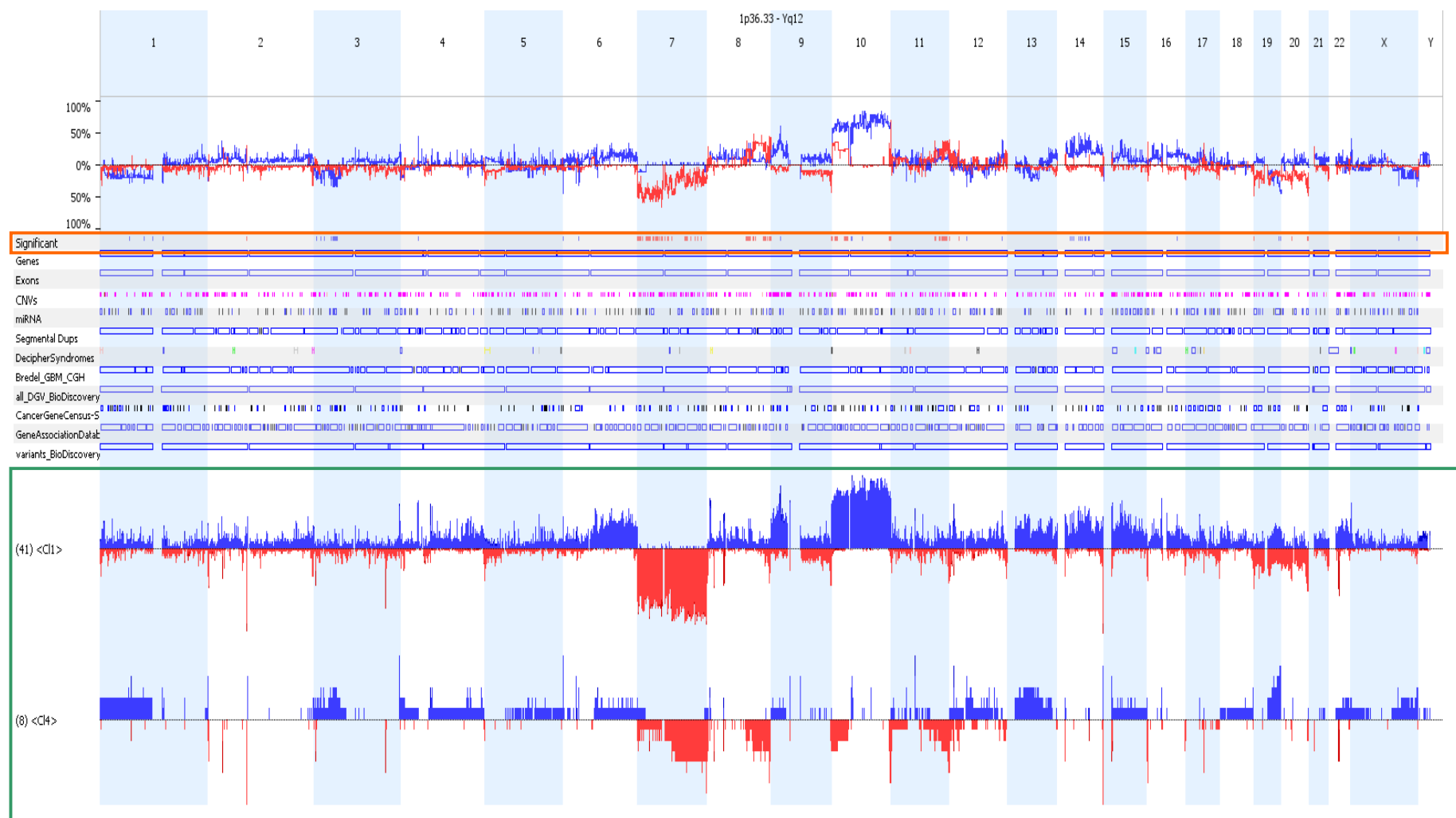
Значими аберации между изследваните групи се наблюдават в хромозоми 4, 7, 9 и 12 (сините и червените черти в секция „Significant”, **Фиг.4.50**). След провеждане на анализ наблюдаваните значими аберации в двете групи от пациенти бяха сравнени и отдиференцирани само тези, при които разликата между групите е статистическа значима и процента на припокриване с известни и описани вариации в броя копия е под 55%. В **Табл.4.22** са показани всички райони със значима разлика между двете групи. В групата с по-ниска обща преживяемост наблюдаваните аберации водещи до загуба на част от генома при 57% от групата с лоша преживяемост и при нито един или при един пациент от другата група са открити съответно гените *REP15*, *PPFIBP1* и *DNM1L* (маркирани в синьо).

От друга страна при над 75% от пациентите в групата с наличие на *IDH1/IDH2* мутации и по-лоша обща преживяемост, значимите аберации водещи до увеличаване броя на копията следователно до дупликация в следните гени - *LMTK2*, *BHLHA15*, *BAIAP2L1*, *MTPN*, *LUZP6*, *EXOC4*, *NRCAM*, *PNPLA8*, *THAP5*, *DNAJB9*, *MAGI2*, *FOXP2*, *MDFIC*, *ATXN7L1*, *NOM1*, *MNX1*, *UBE3C*, *DNAJB6*, *CNTNAP2*, *CUL1*, *EZH2*, *PDIA4*, *FGL2*, *PTPN12*, *TES*, *CAV1*, *CAV2*, *ING3*, *CPED1*, *WNT16*, *FAM3C*, *CDK14*, *ORC5*, *FSCN3*, *PAX4*, *SND1*, *CTTNBP2*, *KCND2*, *EN2*, *CPA1*, *CPA4*, *CASD1*, *SGCE*, *PEG10*, *PON3*, *PPP1R9A*, *PON1*, *PON2*, *ADAM22*, *SRI* и *STEAP4* (в **Табл.4.18** – маркирани в червено), като тези изменения се наблюдават при 17 до 30% от пациентите с повишена обща преживяемост. Тези от гореизброените делетирани гени с най-висока честота в групата с по-лоша преживяемост (85.7%) и едновременно с това и най-ниска такава в групата с по-добра (17.6%) бяха предложени като най-вероятни участници в по-бърза прогресия на заболяването и летален изход (подчертаните гени).

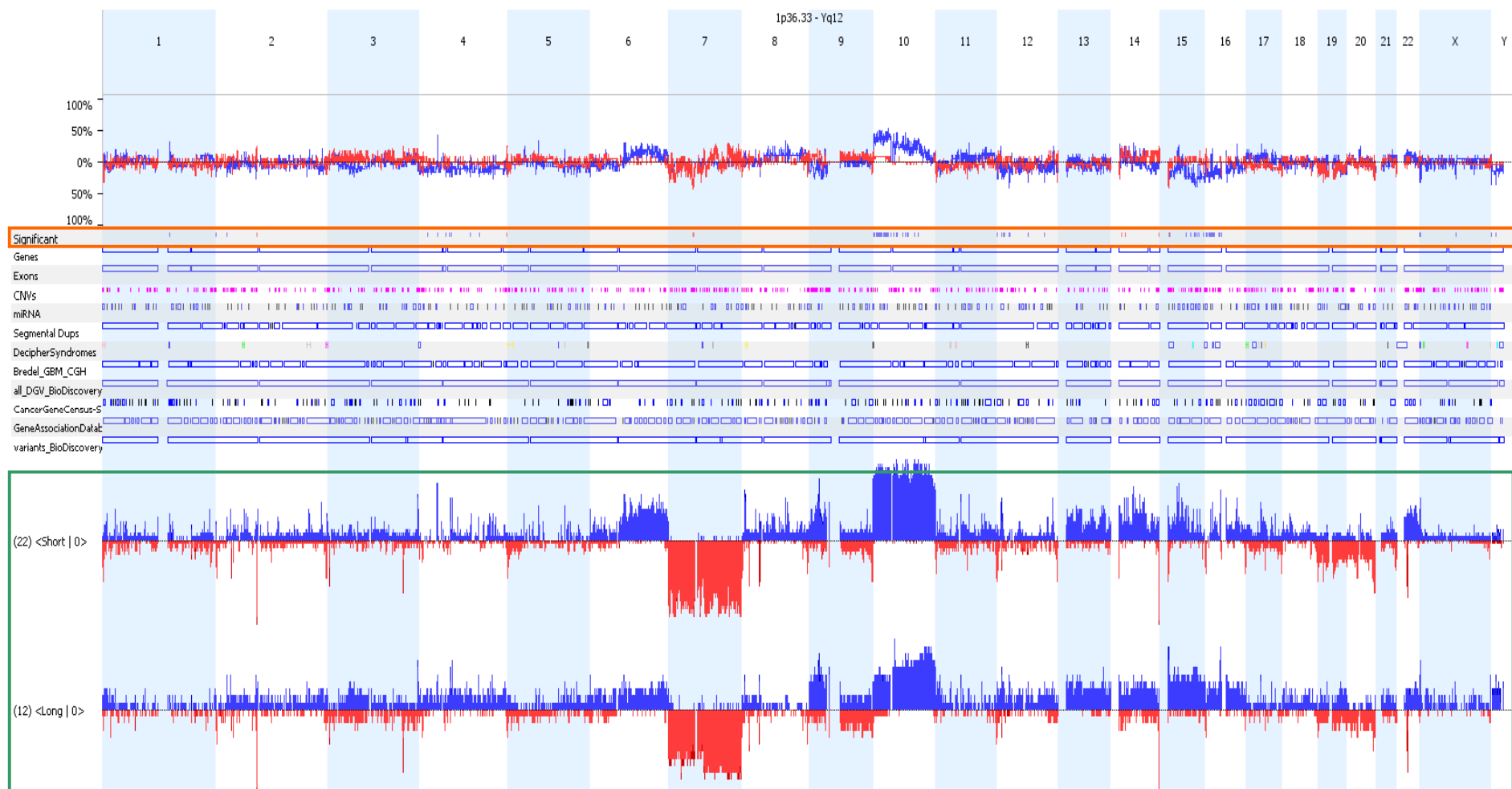
Таблица 4.22. Увеличен/намален брой копия наблюдавани в групата от пациенти с мутация в IDH1/IDH2 гените и с висока обща преживяемост в сравнение с тази с ниска преживяемост

	Хр	Цитолента	Район	Размер бр	Честота в група с ВП %	Честота в група с НП %	p-value	% припокр с CNV
НБК	12	p13.2	12,307,111-12,431,530	124419	11.76	57.14	0.0381	45.12
		p11.22	27,722,283-27,742,874	20591	0.00		0.0033	6.27
		p11.21	31,595,003-32,208,943	613940	11.76		0.0381	36.04
			32,745,219-32,774,214	28995	5.88		0.0145	0.0
		q15	67,514,239-67,561,056	46817	11.76		0.0381	2.05
УБК	7	p22.2	2,239,664-2,253,786	14122	11.76	57.14	0.0381	0.0
		q11.23	73,534,911-73,638,076	103165	11.76	71.43	0.0381	5.53
			76,644,498-77,178,148	533650	5.88		0.0027	12.36
		q21.11	77,747,593-77,789,852	42259	23.53	85.71	0.0088	0.47
		q21.12	87,604,479-87,937,511	333032	23.53		0.0088	6.15
		q21.13	90,013,373-90,370,750	357377	17.65		0.0037	17.75
		q21.3	96,500,108-96,728,511	228403	29.41		0.0233	26.28
			93,912,921-94,915,805	1002884	29.41		0.0233	42.35
			97,563,368-97,694,876	131508	29.41		0.0233	0.0
			97,773,692-97,784,535	10843	29.41		0.0233	0.0
		q22.1	103,459,176-103,700,036	240860	17.65		0.0037	2.23
		q22.2	105,037,472-105,167,797	130325	23.53		0.0088	0.59
		q31.1	107,877,306-108,130,257	252951	29.41		0.0233	0.42
		q31.1-q31.2	114,052,187-114,611,198	559011	23.53		0.0088	0.57
		q31.2	115,348,608-116,046,247	697639	23.53		0.0088	14.51
		q31.31	120,186,201-120,791,949	605748	29.41		0.0233	16.23
		q31.33-q32.1	126,865,609-127,144,689	279080	17.65		0.0037	2.55
		q32.1	127,671,727-128,195,545	523818	23.53		0.0088	43.63
		q32.2	129,713,007-129,820,040	107033	17.65		0.0037	41.19
		q31.31	117,245,186-117,536,471	291285	29.41		0.0233	3.89
			119,485,942-119,736,819	250877	23.53		0.0088	31.05
		q33	132,895,086-132,920,523	25437	29.41		0.0233	0.0
			134,787,993-134,819,865	31872	17.65		0.0037	0.0
			135,030,227-135,267,979	237752	17.65		0.0037	0.0
		q34	140,433,394-140,442,817	9423	17.65		0.0037	0.0
		q35-q36.1	147,389,944-148,350,241	960297	23.53		0.0088	10.53
		q36.1	149,636,462-150,190,704	554242	17.65		0.0037	47.35
			151,228,053-151,426,805	198752	17.65		0.0037	1.03
		q36.3	154,893,848-155,172,461	278613	23.53		0.0088	39.64
			156,291,587-156,856,646	565059	17.65		0.0037	10.49
	9	q34.3	136,718,619-136,820,673	102054	17.65	71.43	0.0207	48.34
		q34.2	135,197,394-135,551,241	353847	11.76	57.14	0.0381	23.64

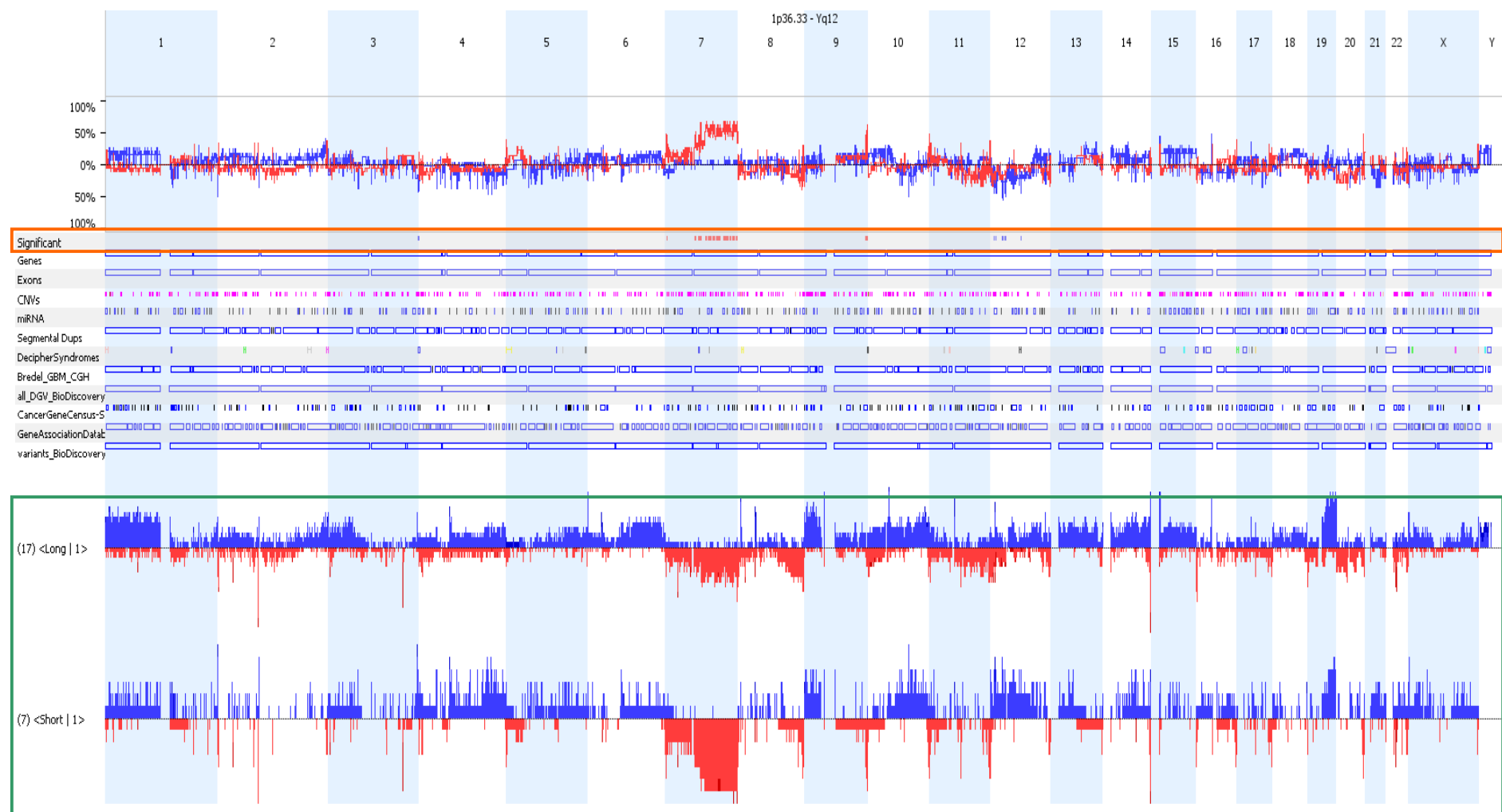
червен цвят – райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дубликации“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 75% от пациентите с НП и при 17-30% от пациентите с ВП; **син цвят** – райони с аберации от типа „генетични загуби – делеции“ показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 57% от пациентите с НП и при 0% от пациентите с ВП



Фигура 4.48. Графично изображение на честотата на откритите аберации във всички хромозоми при пациентите разделени в две групи (група 1 и група 4) според клъстерния анализ (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)



Фигура 4.49. Графично изображение на честотата на откритите аберациите във всички хромозоми при пациенти без мутация в *IDH1* характеризиращи се съответно с ниска (група «Short») и висока (група «Long») преживяемост (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)



Фигура 4.50. Графично изображение на честотата на откритите аберациите във всички хромозоми при пациенти с мутация в IDH1 характеризиращи се съответно с висока (група «Long») и ниска (група «Short») преживяемост (в оранжев правоъгълник – значими региони; в зеления правоъгълник - с червен цвят отбелязани районите с амплификация, а със син цвят - районите с делеции)

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА КЛИНИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Мозъчните тумори са неоплазии, които възникват предимно от клетки на мозъчния паренхим. Глиомите от своя страна представляват 70% от всички мозъчни тумори при хората, характеризиращи се с най-малигнения и с най-висока честота тумор, а именно ГБМ⁽⁴²¹⁾, с по-малко от 3% пет годишна преживяемост⁽⁴²²⁾. Повечето симптоми на заболяването не допринасят за разграничаването на различните видове глиоми, което прави диагностицирането на пациента само въз основа на физикалния преглед много трудно. Физическите симптоми обаче зависят от различни фактори, като например местоположението на тумора, възрастта на засегнатите лица и др. Глиомите могат да се диагностицират с помощта на методи от радиологията или хистологията, като понастоящем златният диагностичен стандарт остава хистопатологията^(421, 423). Новите молекулярно-генетични методи биха могли да бъдат използвани за разграничаването на глиомните подтипове, характеризиращи се с различна преживяемост на пациентите и осигурява механично вникване в патологията на заболяването.

Редица изследвания показват, че хистологичната диагноза на глиомите продължава да бъде статистически най-значимия прогностичен фактор показващ положителна корелация между високите стадии на тумора (въз основа на целуларността, ядрения атипизъм, митотичната активност, псевдопалисадните некрози и/или микросъдовата пролиферация) и неблагоприятната прогноза, като с увеличаване на степента съответно се понижава преживяемостта⁽⁴²⁴⁾. В проведеното от нас проучване беше установено наличието на връзка между преживяемостта и туморния стадий, като туморите с четвърти стадий на развитие, показват по-лоша преживяемост от туморите с втори и трети ($p < 0.001$). Получените данни в нашето проучване потвърждават литературните данни, че диагнозата има значима връзка с преживяемостта ($p < 0.001$). Пациентите диагностицирани с глиобластом показват значимо по-лоша прогноза, в сравнение с пациентите с астроцитомите III стадий, които пък показват по-добра преживяемост от тези с астроцитом II стадий. При пациентите диагностицирани с олигодендроглиоми не се наблюдава значителна разлика между преживяемостта на II и III стадий най-вероятно поради малкия брой пациенти с такава диагноза включени в изследването (съответно 4 и 10 пациента).

Аналогичен анализ беше извършен и за други клинични характеристики като възникване на тумора, KPS статус, вид оперативна резекция и възраст на заболяемост. Установена беше асоциация на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ($p = 0.001$). Според публикуваните данни възрастта е един от неизменните прогностични фактори за ОП, както при НСГ⁽⁴²⁵⁾, така и при ГБМ⁽⁴²⁶⁾. По литературни данни ранното възникване на заболяването се асоциира с по-добра преживяемост^(426, 427), което беше наблюдавано и при пациентите в изследваната от нас група ($p < 0.001$). Подобно на редица други изследвания, беше наблюдавана линейна функционална връзка между възраст и прогнозиране. Глиомите като цяло възникват предимно в по-зряла възраст. Според Packer и сътр средната възраст за възникване на първичните мозъчни тумори (злокачествени или не) е 57 година⁽⁴²⁸⁾. Тъй като средната възраст на всички пациенти в изследваната от нас група беше 56 години разделихме пациентите на две групи – с възникване на болестта преди и след 56 годишна възраст. Пациентите с болест възникнала преди 56 год. възраст показват по-добра преживяемост. Освен това възрастта на заболяемост се очертава като силен независим прогностичен параметър, който повлиява избора на хирургичен метод, а следователно и времето на преживяемост. С напредването на възрастта, се увеличава и риска от смърт. Освен това е установено, че прилагането на по-агресивна терапия при пациенти с напреднала възраст има по-слаба ефективност, докато при пациентите с по-ранна възраст на развитие удължава значително преживяемостта⁽⁴²⁷⁾.

В литературата съществуват различни инструменти позволявайки коректното оценяване на качеството на живот, като Karnofsky Performance Status (KPS), инструмента на ECOG и др.

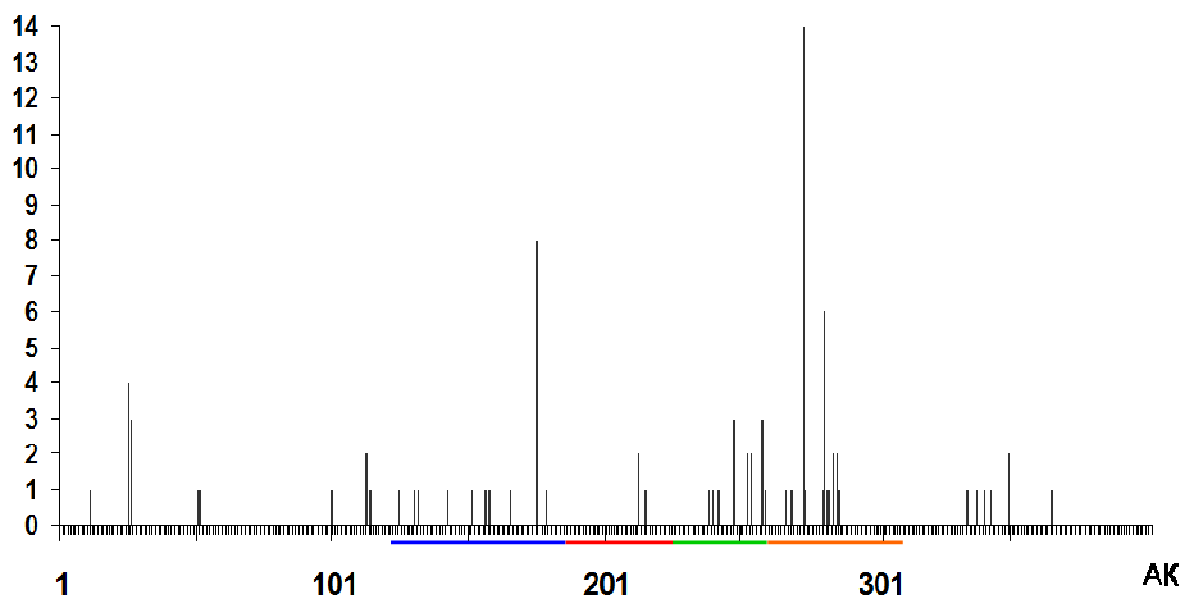
^(429, 430). KPS е най-често използваният инструмент, като редица автори са потвърдили неговата надеждност и прогностичната му стойност. Високи стойности на KPS статуса (KPS>70) се асоциират по-често с добра прогноза ^(178, 429). Основният недостатък на KPS е ниската му чувствителност при пациенти, които са в относително добро състояние (KPS>80) ⁽⁴³¹⁾. В нашето изследване наличието на KPS статус над 70 ($p=0.01$) и на тотална резекция са добри показатели на преживяемостта ($p=0.021$). Освен това се наблюдава, че биопсията или частичната резекция имат по-лоша прогностична стойност от субтоталната и тоталната оперативни интервенции. През последните няколко години, въпросът за връзката между степента на туморна резекция и влиянието ѝ върху преживяемостта е доста оспорван. Докато редица проучвания показват, че степента на резекция не оказва влияние върху общата преживяемост на пациентите, ⁽⁴³²⁻⁴³⁴⁾, други показват значима положителна корелация между обема на туморна резекция и клиничния курс ⁽⁴³⁵⁻⁴³⁷⁾. Интересно е да се отбележи, че почти всички от проучванията, при които не е установена значима корелация на ОП със степента на резекция се характеризират с малък брой изследвани пациенти. Друг недостатък на тези проучвания се базира на ограниченията от субективната оценка на степента на резекция. Такава оценка може лесно да бъде подвеждаща, тъй като макроскопичната диференциация между патологичната и нормалната тъкан е трудна, дори и за опитни неврохирурзи. В нашето изследване резекцията на преобладаващата част от пациентите е извършена след флуоресцентно белязване на туморната маса с помощта на вещество 5-АЛА. Chaichana и сътр ⁽⁴³⁸⁾ установяват, че 70% е минималната степен резекция, която се асоциира с удължаване на преживяемостта при пациенти с новодиагностициран глиобластом, както и че този фактор е от ключово значение за цялостното прогнозиране. При нарастване с 5% размера на резекция над 70%, коефициентът на риск се редуцира с 5.2% ^(438, 439). От друга страна има данни, че туморите засягащи както двете хемисфери, така и функционални сензомоторни области в мозъка са фактори действащи в противоположна посока на позитивния ефект в резултат на тоталното резекционно премахване на туморната маса, поради възникването на сериозен неврологичен дефицит. Следоперативният неврологичен дефицит се свързва с влошаване на KPS статуса, а от там и с по-ниска преживяемост. По този начин агресивният подход на тотална резекция при масивни тумори, засягащи функционално сензомоторни райони, носи висок риск от влошаване на клиничните показатели и силно понижена преживяемост ⁽⁴⁴⁰⁾.

Въпреки всички тези диагностични и прогностични характеристики, някои глиоми остават слабо изучени и разбрани поради редица фактори. Тумор класифициран като даден вид (например, пилоцитния астроцитом) може да покаже голямо разнообразие в рамките на неопластичните клетки, които го образуват, а от своя страна туморите от различните видове показват морфологични припокриващи се характеристики, което прави поставянето на окончателна диагноза трудно ⁽¹⁷⁹⁾. Освен това, глиомите до голяма степен остават нелечими и напредъкът в образните технологии, лъче-, както и химиотерапия води до слабо и недостатъчно повишение процента на преживяемост ⁽⁴²³⁾. Следователно, нови биомаркери и диагностични техники се очаква в бъдеще да подобрят клиничното лечение на заболяването, т.е. да осигурят поставянето на диагноза на по-ранен етап в развитието на тумора, както и да доведат до подобряване на преживяемостта на пациентите.

5.2. IDH1, IDH2 И TP53 В МАЛИГНЕНИТЕ ГЛИОМИ

В настоящото изследване се насочихме към изследване на генетични прогностични маркери при пациенти с глиални тумори, част от тях включващи изясняване мутационния ДНК статус на гените *IDH1*, *IDH2* и *TP53*. Мутации в гена *IDH1*, засягащи кодиращ кодон R132, бяха наблюдавани само при 18.4% от пациентите. При вторичните ГБМ по-често бяха наблюдавани мутации в *IDH1/IDH2* гените (30.7%). Тази честота е значително по-ниска в сравнение с вече публикуваната от редица други проучвания ^(140, 144, 158, 441-444), което най-вероятно се дължи на по-нисък брой ниско-стадийни глиоми (21), по-висок брой първични ГБМ (153) и по-малък брой вторични ГБМ (13), които бяха включени в изследването.

В изследваната група от 212 тумора бяха намерени аберации при 159 тумора (от 151 пациента) в гена *TP53* (75%). Общият брой на детектираните мутации във всички екзони на гена е 45, като най-голям е броят им в ДНК кодиращата последователност, включваща екзони 5 (20%), 6, 7 и 8 (24.4%). Обобщените данни за установените генетични мутации са представени схематично на **Фиг. 5.1**.



Фигура 5.1. Разпределение на мутациите в *TP53* гена. На абсцисата е посочен номера на засегнатата аминокиселина, на ординатата – броят на туморите, при които е намерена съответната мутация. Цветните линии под абсцисата показват разположението на екзони 5 до 8: в синьо е екзон 5, червено – екзон 6, зелено – екзон 7, и оранжево – екзон 8. На фигурата не са представени откритите полиморфизми

Основните причини за *TP53* инактивацията са еднонуклеотидни замени и загуба на алелите, с инактивиране на вирусни или клетъчни протеини, които играят важна роля при различните видове тумори⁽⁴⁴⁵⁾. Известно е, че генетични полиморфизми биха могли да играят роля в предразположението към развитие на рак и тяхната роля в развитието на глиомите все още се оценява. *TP53* е високо полиморфен както в кодиращите си, така и в не кодиращите си райони и някои от полиморфизмите, открити в него, се асоциират с увеличено предразположението към развитие на различни неоплазии, както и с промяна във фенотипната изява на притежавания *TP53* мутации⁽⁴⁴⁶⁾. Над 80 *TP53* полиморфизма са идентифицирани и валидирани в човешката популация (www.p53.iarc.fr). Преобладаваща част от тях (90%) са разположени в инtronите, около местата за сплайсинг, или в не кодиращите екзони. Малка част от тях са изследвани във функционални анализи или са проучвани за връзката им с риска от развитие на ракови заболявания. Така например Ara и сътр⁽⁴⁴⁷⁾ съобщават за наличието на полиморфизъм в гена p53 водещ до замяната на аминокиселината Arg (аргинин) с Pro (пролин) в кодон 72 (P72R). Dumont и сътр⁽⁴⁴⁸⁾ установяват, че алела Arg72 води до 15-кратно увеличаване на апоптотичната способност в сравнение с алела Pro72 в изследвания с клетъчни линии и индуцирани хомозиготи за изследвания p53 вариант. В изследваната от нас група този вариант, намиращ се в екзон 4, се среща с най-висока честота. Открит беше при 136 от всички изследвани тумори (64%). При анализ на данните спрямо възраст на заболяемост пациентите притежаващи SNP в хомозиготно състояние Pro/Pro показват връзка с по-ранното начало на заболяването (51.5 годишна възраст, $p=0.04$) в сравнение с генотип Arg/Pro (54 годишна възраст) и тези с генотип Arg/Arg – 59 годишна възраст. El Hallani и сътр⁽⁴⁴⁹⁾ сред 254 пациенти с ГБМ откриват връзка между наличието на алела Pro72 и по-ранна възраст на заболяемост. В 20% от пациентите генотипът Pro/Pro е асоцииран с начало на заболяването преди 45 години в сравнение с 6.5% от тези с начало след 45 годишна възраст ($p=0.002$) и 5.9% при 238 контроли ($p=0.001$)⁽⁴⁴⁹⁾. Освен това е открита асоциация между алела Pro и по-висок процент на соматични *TP53* мутации⁽⁴⁴⁹⁾. Изследваният вариант не показва наличие на никаква

зависимост с общата преживяемост на пациентите. Получените от нас резултати са в съответствие с други публикации, в които повече от 50% от първичните човешки тумори носят мутации в гена *TP53* ⁽⁴⁵⁰⁾. Функцията на *TP53* е от решаващо значение за ефективността на лечението на раковите заболявания, тъй като лъче- и химиотерапия водят до активиране на програмираната клетъчна смърт, в отговор на увреждане на ДНК. Следователно туморите носещи мутации в този ген често са трудни за лечение и тяхната прогноза е лоша. В настоящето изследване мутациите в *TP53* гена не показаха статистически значима корелация с нито един от клиничните показатели, нито с преживяемостта ($p=0.21$). Появата на *p53* мутации в глиома обикновено се свързва с възрастта. Промените в *TP53* са рядкост сред педиатрични тумори и с ниска честотата сред групата от глиоми в напреднала възраст, докато при младите пациенти честотата им е висока ⁽⁴⁵¹⁾. Нашите резултати потвърждават връзката между *TP53* мутации и възрастта на пациента. Открити са мутации на *TP53* както в НСГ (стадий II), така и във ВСГ (стадий III и IV), с честоти съответстващи на вече публикуваните - между 25 и 35% ⁽¹²¹⁾. Още повече, че не беше наблюдавана благоприятна прогноза за пациентите притежаващи аберации засягащи кодони 248 и 273 от *TP53* гена, наблюдавана в други изследвания ^(121, 452). Анализът на данните за преживяемост в групите с и без *TP53* мутации (**Табл. 5.1**) не доведе до значими разлики в отграничаването им (средна преживяемост 10.8 vs. 8.5 месеца).

Таблица 5.1. Клинични характеристики на пациентите по групи според мутационния статус на *TP53* гена

		<i>TP53</i> мутация (153)	<i>TP53</i> нормален (46)
Пол	Мъже	84	22
	Жени	69	24
Възраст (средна), години		53	58
Вид на операцията[§]	Тотална резекция	66	20
	Субтотална резекция	58	14
	Частична резекция	11	4
	Биопсия	2	0
Тип тумор	Астроцитом	141	38
	Олигоастроцитом	2	3
	Олигодендроглиом	10	4
	Пилоцитен Астроцитом	0	1
Локализация на тумора[§]	Лява	57	18
	Дясна	79	19
	Билатерална	8	1
Степен на тумора	IV (вторични)	114 (9)	32 (4)
	III	28	10
	II	11	3
	I	0	1
KPS[§] (средно)		80	80
Преживяемост (средна), месеци[§]		10.8	8.5

[§]- не пълна информация

Публикуваните до сега данни, свързани с генетичните аберации в *IDH1* при малигненни глиоми, показваха наличие на мутации в хетерозиготно състояние. Нормално цитоплазменият *IDH1* и митохондриалният *IDH2* представляват хомодимери в рамките на съответните им клетъчни компартменти ⁽¹⁴²⁾. Анализ на ефекта на хетерозиготни *IDH1* мутации в клетки получени от глиоми показва, че мутантният *IDH1* повлиява функционалната способност на ензима да редуцира α -KG до 2-HG ⁽¹⁴⁹⁾. Поради това беше предположено, че мутантният *IDH1* доминира негативно нормалната функция на дивия тип *IDH1* ⁽⁴⁵³⁾. Туморите притежаващи *IDH* мутантни белтъци, продуцирайки 2-HG, могат да предотвратят деметилирането на хистоновите белтъци, което е необходимо за диференцирането на прогениторни клетки специфични за

дадена клетъчна линия клетки. При пациенти с глиома, наличието на *IDH* мутации се свързва и с наличието на специфичен генно-експресионен профил, характеризиращ се с изявата на гени, широко експресирани в невроналните стволови клетки, корелиращи от своя страна с повишено метилиране на хистоновите белтъци⁽⁴⁵⁴⁾. Наскоро беше показано, че ГБМ характеризиращи се с CIMP фенотип се асоциират с пронеуроналната (PN) подгрупа тумори и *IDH1* мутациите са инициращи тяхното развитие^(239, 240). В настоящия дисертационен труд открихме наличие на хомозиготна мутация в кодон 132 (R132H) в един пациент с малигнен глиом (вж. Глава 4, т.4.3.2, **Фиг.4.6**). При този пациент беше предположено наличието на делеция на нормалния алел, поради хомозиготното състояние и на мутацията и на полиморфизма rs11554137 в *IDH1* гена. Наскоро *IDH1* хомозиготни аберации бяха публикувани за първи път при пациенти с глиом - при двама пациента с вторичен ГБМ⁽⁴⁵⁵⁾ и един пациент с астроцитом⁽¹⁵⁵⁾. В предходни изследвания *IDH1* мутации са наблюдавани при пациенти с левкемия⁽⁴⁰⁷⁾ и рак на тироидната жлеза⁽⁴⁵⁶⁾. Jin и сътр⁽⁴⁵⁵⁾ установяват наличие на по-ниски нива на 2-HG в клетки загубили дивия тип *IDH1* алел в сравнение с тези в хетерозиготно състояние, които могат да затруднят прилагането на 2-HG модулатори като потенциална терапевтична стратегия в туморите, имащи *IDH1* мутации⁽⁴⁵⁵⁾. В съответствие със скоростните открития, че производството на 2-HG, а не доминантно негативния ефект върху функцията на ензима е от решаващо значение, и изследвания базирани на NADP+-зависими *IDH1* мутации открити при глиоми⁽⁴⁵⁵⁾, съчетано с ролята им да блокират хистоновото деметилиране и асоциацията му с CIMP⁽⁴⁵⁴⁾, може да се предположи, че хомозиготният носител на мутацията R132H ще има по-високи нива на метилиране в сравнение с хетерозиготният носител.

Ролята на *IDH2* мутациите, като самостоятелно събитие, все още не е изяснена поради ниската им честота при глиални тумори - около 1-2%⁽¹³⁹⁾. Откриват се по-често при остра миелоидна левкемия (AML) - около 15%, където „горещите точки“ на мутации засягат кодоните 140 и 172⁽⁴⁵³⁾. В изследваната група от 212 тумора не беше открита мутация засягаща публикуваните вече и споменатите по-горе кодони, но беше открита нова непубликувана досега аберация в кодон 129 - c.386A>G, K129R. Независимо, че и двете аминокиселини - аргинин и лизин са базични (с основен характер), наблюдаваната промяна засяга част от консервативния домен в *IDH2*, а като допълнение беше установено, че вторият алел липсва. Въпреки това, проведените анализи за патогенност на новия вариант с програмите SIFT, PolyPhen и SNPs & GO показаха по-голяма вероятност промяната да не е патогенна.

Няколко предходни изследвания демонстрираха значимата роля на *IDH1* и *IDH2* мутациите за определянето на прогнозата на пациенти в изследвани групи от астроцитом и ГБМ^(146, 179, 442, 443, 457). Поради малкия брой на проби от различен туморен стадий - астроцитом II и III стадий, ОД II и III стадий, изследвахме значимостта на *IDH1* и *IDH2* мутациите в цялата група от 212 глиоми. Открита беше силна асоциация между наличието на *IDH1/IDH2* мутации и благоприятната ОП, потвърждавайки публикуваните вече литературни данни. Освен това, както очаквахме *IDH1/IDH2* мутациите бяха открити преобладаващо при по-млади пациенти с хистологично поставена диагноза различна от ГБМ. Изследваната от нас група пациенти има ниска средна (медиална) ОП – 8.68 месеца, която е по-ниска от тази при повечето изследвания^(458, 459). Това несъответствие може да се дължи на преобладаващото наличие на първични ГБМ в изследваната от нас кохорта. Ohgaki и сътр публикуват също ниска средна (медиална) преживяемост при първичните ГБМ (4.7 месеца) в сравнение при вторичните (7.8 месеца)⁽¹²¹⁾, което е в съответствие със стойностите наблюдавани от нас - средна (медиална) ОП от 6.2 и 25.8 месеца съответно за първичните и вторични ГБМ⁽¹²¹⁾.

Друга причина обясняваща по-ниската обща преживяемост в изследваната от нас група, в сравнение с преобладаващата част от глиалните проучвания, може да се дължи и на промяната в стандартите за провеждане на лъче- и химиотерапия, извършена не еднократно през периода 2005-2014 година в страната ни. Потвърждение на тази хипотеза се открива в изследването на Bleeker и сътр⁽⁴⁶⁰⁾, които публикуват данни за тумори, които са били подложени на терапия преди 2006 година и показват сходни с нашите стойности на средна (медиална) преживяемост – 8.7 месеца⁽⁴⁶⁰⁾. В допълнение в страната ни проучване, определящо честотата на мутации в гените *IDH1/IDH2* при български пациенти не е провеждано до сега и поради това няма данни, с които бихме могли да сравним получените от нашето проучване резултати.

Таблица 5.2. Клинични характеристики на пациентите по групи според мутационния статус на IDH1/IDH2 гени

		IDH1/IDH2 мутация (35)	IDH1/IDH2 нормален [§] (141)
Пол	Мъже	21	69
	Жени	14	72
Възраст* (средна), години		42	58
Вид на операцията [§]	Тотална резекция	11	64
	Субтотална резекция	21	57
	Частична резекция	4	11
	Биопсия	0	2
Тип тумор	Астроцитом	29	136
	Олигоастроцитом	2	1
	Олигодендроглиом	4	4
Локализация на тумора [§]	Лява	14	56
	Дясна	20	70
	Билатерална	1	7
Степен на тумора		IV (вторични)	13(5)
		III	15
		II	7
		I	0
KPS [§] (средно)		80	70
Преживяемост [§] (средна), месеци *		30.8	8.68

* - показатели със статистически значима разлика между двете групи ($p=1.34E^{-3}$ за възрастта; [§] - не пълна информация)

Определянето произхода на тумора, по-специално засягащ ГБМ, е широко обсъждан поставящ въпроси относно критериите за класифицирането му като първично или вторично заболяване само въз основа на хистологичните доказателства ⁽⁴²⁴⁾ или необходимостта от включването на по-субективни критерий като данни за давност на оплакванията на пациентите над 6 месеца ⁽⁴⁶¹⁾. По пример на Kleihues и Ohgaki ⁽⁴²⁴⁾ класифицирането на туморите като първични ГБМ беше извършено въз основа на данните за липса на предходно малигнено заболяване в мозъка и поради тази причина има вероятност някои от вторичните тумори да са погрешно класифицирани като първични. Независимо от това в изследваната група от български пациенти беше установена положителната връзка между наличието на IDH1/IDH2 мутации и по-добрата ОП в сравнение с туморите без IDH1/IDH2 мутации. Тъй като генетичните изменения в IDH1 се асоциират по-често с вторичните глиоми (60-90%) отколкото с първичните ⁽⁴¹⁷⁾, и съответно по литературни данни при вторичните тумори с наличие на IDH1 или IDH2 мутации се наблюдава връзка с прогнозата ние направихме статистически анализ, като разделихме пациентите според мутационния им статус и според възникването на тумора. Наблюдава се, че пациентите с вторични тумори и наличие на IDH1/IDH2 мутация са с по-добра прогноза от пациентите, при които липсва мутация ($p<0.001$). Въпреки, че първичните тумори са с по-лоша преживяемост от вторичните, при тези с IDH1/IDH2 мутации се наблюдава по-добра прогноза от тези без мутация.

Kaplan-Meier кривите на преживяемост показваха значимостта на полиморфизма в IDH1 (IDH1 105GGT; rs11554137:C>T) върху прогнозата на пациентите. Еднонуклеотидният вариант rs11554137 е локализиран в 5'-района на екзон 4 в близост до кодон 132. Изследван е при пациенти с AML и тироиден карцином. Въпреки, че rs11554137 не показва статистическа значима връзка с прогнозата на пациентите с тироиден карцином ⁽⁴¹⁵⁾, при пациентите с левкемия се асоциира с наличието на по-лоша прогноза и по-висока иРНК експресия на IDH1 ⁽⁴¹⁶⁾. Смята се, че тази генетична промяна нарушава активността на IDH1 ензима чрез промяна

засягаща иРНК стабилност, сплайсинга и правилното нагъване на белтъчната му структура⁽⁴¹⁶⁾. Независимо, че SNP rs11554137 се намира в близкото обкръжение на кодон 132 не беше открита връзка между наличието му и наличието на *IDH1* мутации. Не беше открита и асоциация между еднонуклеотидната замяна и наличието на други генетични събития, като амплификацията на EGFR, за която има непотвърдени данни⁽⁴⁶²⁾. Независимо от това Cox регресионният анализ показва, че полиморфизмът rs11554137 няма корелации с други фактори и връзка с ОП при глиалните тумори. Ролята на този SNP като предиктор за преживяемостта при пациенти с глиални тумори трябва да бъде проучено по-обстойно, не само на иРНК, но и на белтъчно ниво.

Освен това, *IDH1/IDH2* мутациите бяха детектирани преобладаващо при по-млади пациенти. В съответствие с вече публикуваните данни, ние открихме в 64% от пациентите характеризиращи се с *IDH1/IDH2* мутация, наличие и на мутации засягащи нуклеотидната последователност, кодираща ДНК-свързващия домен на гена *TP53*^(29, 158, 463). Анализът на данните за преживяемост в групите с и без *TP53* мутации (**Табл. 5.2**) не доведе до значими разлики в отграничаването им (средна преживяемост 10.8 vs. 8.5 месеца). При разделянето на туморите според мутационния статус на *IDH1* и *TP53* гените отново беше намерена значима разлика между трите групи по възраст като най-висока тя е в групата на туморите с мутации и в двата гена.

Мултивариационният регресионен анализ определи възрастта и *IDH1/IDH2* мутационния статус като независими прогностични фактори. Интересно е да се отбележи, че пациентите с диагноза ГБМ и мутирал *IDH1* имат почти същата ОП, както и пациентите с диагноза различна от ГБМ, независимо от това дали *IDH1* е мутирал или не. Според Hartmann и сътр *IDH1* мутации са по-добър предиктор на преживяемостта, в сравнение с хистопатология. Нашите данни са подобни на тези, публикувани от Hartmann и сътр⁽⁴⁶⁴⁾, като пациентите с АА III и без наличие на мутации в *IDH1* имат по-лоша преживяемост в сравнение с пациентите с ГБМ и аберации в *IDH1*. При анализ на резултатите само за пациентите с ГБМ, нашите данни показват, че *IDH1/IDH2* мутации са по-мошен прогностичен фактор, отколкото класифицирането на ГБМ като първичен или вторичен - ние наблюдавахме по-добра ОП при първичните ГБМ с мутирал *IDH1/IDH2* в сравнение с вторичните ГБМ без мутация. В допълнение, ние наблюдавахме по-добра ОП при първичните и вторични ГБМ с мутирал *IDH1* в сравнение със съответните, но с *IDH1* див тип. Така наличието на *IDH1* мутациите се оказват благоприятен фактор за прогнозата на ГБМ, независимо от техния произход. От друга страна, оценката едновременно и на двата фактора - възрастта и *IDH1/IDH2* мутационния статус, разкрива прогностична стойност на *IDH1/IDH2* само в групата на пациенти под 56 години. Това може да бъде в резултат от по-малкия брой мутации при по-възрастните пациенти.

5.3. НАЛИЧИЕ НА ГОЛЕМИ ДЕЛЕЦИИ В ХРОМОЗОМИ 1p И 19q

През 1998 г. за пръв път се появяват данни показващи асоциацията на загубата на 1p/19q с добрия терапевтичен отговор и продължителна обща преживяемост при анапластичните олигодендроглиомите⁽²¹⁷⁾. 1p/19q коделециите често засягат хромозомните рамена в тяхната цялост. Загуба на хетерозиготност (LOH) на 1p и 19q е медирана от небалансирана транслокация t(1; 19)(q10; p10), а получения 1p19q хромозомен фрагмент се губи⁽²⁰⁹⁾. Прогностичната значимост на 1p/19q коделециите при анапластичните олигодендроглиомите и олигоастроцитомите е била потвърдена в редица клинични проучвания^(125, 126). Олигодендроглиомите, които имат класически хистологични характеристики като униформени кръгли ядра с перинуклеарен ореол и характерен васкуларен модел, показват силна корелация с 1p/19q коделецията^(465, 466). Делециите в хромозомни рамене 1p и 19q са характерни за олигодендроглиалните тумори^(216, 217, 467). Коделециите в 1p и 19q се откриват в 44-80% от олигодендроглиомите и в 20-30% от олигоастроцитомите^(221, 468). В литературата комбинираната загуба на 1p и 19p показва силна статистическа значимост като предиктор на общата преживяемост при АОД тумори⁽²¹⁷⁾. Нашите резултати допълват и разширяват тези констатации. Освен, че коделецията на 1p и 19q е статистически значим предиктор за обща преживяемост при пациенти с олигодендроглиомите в сравнение с ГБМ (p=0.035), се наблюдава

наличие на значимост и при пациентите с ААП ($p=0.002$) в сравнение с групата с ГБМ. Въпреки това, демонстрирането на тази асоциация при НСГ е по-трудно ($p=0.300$), поради цялостната по-висока преживяемост на тези пациенти, както и с оглед на сравнително малкия брой анализирани случаи. При пациентите с ОД над 80% (5 от 6-те пациента с ОДП и 7 от 9-те с ОДП) показват наличие на 1p делеция, докато при останалите групи процентът, който заемат пациентите с този тип делеция са съответно 11%, 47% и 27% за пациентите с астроцитом II, III стадий и ГБМ. При пациентите с диагноза ОА беше отбелязано наличие на 1p делеционно събитие с честота 66%, най-вероятно поради малкия брой на изследвани пациенти с тази диагноза (3 броя II стадий и 4 - III). Аналогично е положението с наличието на 1p/19q коделеция, което се наблюдава в най-голям процент при пациентите с хистологична диагноза олигодендроглиома (78%), докато при ААП е 30% и ГБМ е едва 15%.

Таблица 5.3. Клинични характеристики на пациентите по групи според делеционния статус в хромозоми 1 и 19

Характеристика	брой(%)	1p(67)	19q(48)	1p19q(12)	без делеции (141)
Пол	Мъже	32	23	5	73
	Жени	35	24	7	69
Възраст* (средна), години		54	50.5	43	55.5
Вид на операцията[§]	Тотална резекция	27	16	3	66
	Субтотална резекция	23	17	4	53
	Частична резекция	4	4	1	10
	Биопсия	-	-	-	2
Тип тумор	Астроцитом	59	32	5	130
	Олигоастроцитом	4	3	2	1
	Олигодендроглиома	13	10	4	5
	Пилоцитен астроцитом	-	-	-	2
Локализация на тумора[§]	Лява	22	17	4	57
	Дясна	29	18	3	68
	Билатерална	3	2	1	6
Степен на тумора[§]	IV (вторични)	37	24	3	109
	III	17	14	7	19
	II	5	8	2	10
	I	-	-	-	2
Терапия[§]	да	32	23	6	79
	не	21	13	2	45
IDH1/IDH2 мутации[§]	да	17	18	8	19
	не	35	20	1	105
KPS[§] (средно)		80	80	80	80
Преживяемост (средна), месеци[§]		16.05	21.05	35.35	9.86

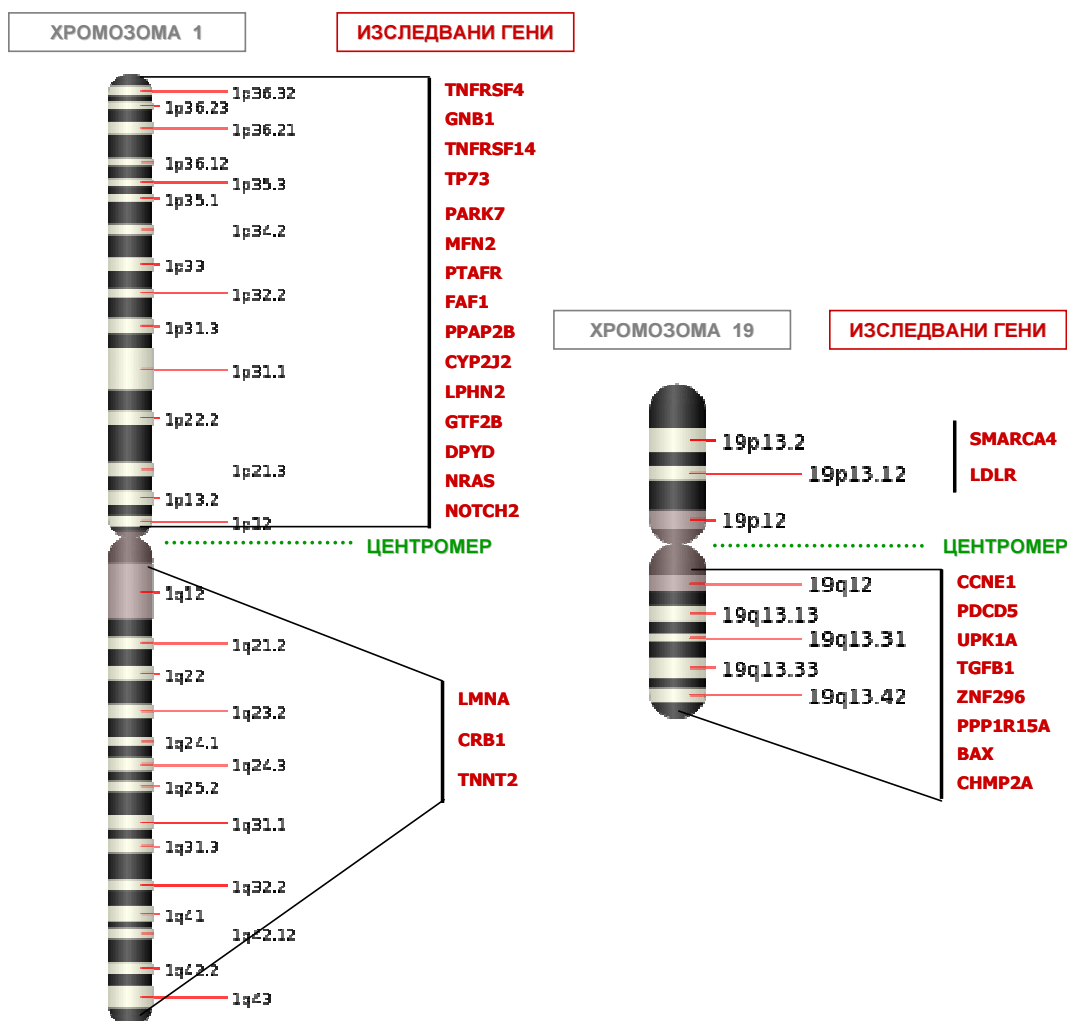
* - показатели със статистически значима разлика между двете групи ($p=1.34E^{-5}$ за възрастта; [§]- не пълна информация)

За разлика от тези, с комбинирана загуба, пациентите както с олигодендроглиома, така и с астроцитом, характеризиращи се със загуба на 1p или 19q, поотделно една от друга, показват статистическа значимост като предиктори на общата преживяемост. Установено беше, че наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ($p=0.031$) и съответно късото рамо на хромозома 19 ($p=0.001$) показват по-добра прогностична стойност, за разлика от наличието на частична загуба или липсата на такава в цялата изследвана група, включваща както олигодендроглиома така и астроцитомите. Предишни изследвания относно

олигодендроглиома предполагат, че загубата на 1p без съпътстваща загуба на 19q е необичайно събитие^(469, 470). Всъщност, настоящото изследване идентифицира само 2 олигодендроглиоми и 24 астроцитомии със загуба на 1p, но липса на промяна в 19q (11%), докато в литературата тази честота е малко по-ниска (4%) при олигодендроглиоми⁽²²¹⁾. Въпреки, че изследването на Smith и сътр⁽²²¹⁾ открива при олигодендроглиоми загуба на 19q без наличието на такава промяна в 1p с по-висока честота от наличието само на 1p (19%), предполагайки, че загубата на 19q предхожда загуба на 1p в развитието на олигодендроглиома, в нашата група от пациенти такава разлика не беше наблюдавана. От друга страна наблюдавано беше наличието на силна връзка между наличието на цялостна загуба на 1p хромозомното рамо и такава при 19q – 100 % от ОД характеризиращи се с цялостна загуба на 1p притежават такава и в 19q, докато при ОД пациентите с наличие на цялостна загуба на 19q по равно се наблюдават пациенти с частична и цялостна загуба на 1p. При астроцитомите положението е сходно, макар и да се наблюдава по-ниска честота на туморите с едновременно загуба на целите рамене на 1p19q – при 85%. Може би, загуба на 19q предразполага тези новообразувания на по-нататъшни загуби на 1p, което от своя страна придава по-слабо агресивното биологично поведение на тумора.

В съответствие с предишни доклади, честотата на комбинирана 1p и 19p загуба в този набор от астроцитни тумори е значително по-ниска - при ААIII е 30% и при ГБМ е едва 15%, въпреки че наблюдаваните от нас стойности са по-високи от публикуваните в литературата (8%)⁽²²¹⁾. Това може да се дължи на съдържанието на олигодендроглиомна компонента в ГБМ тумори, която от скоро се класифицира отделно и започна да се прилага като допълнителен маркер, обясняващ групата от ГБМ тумори, характеризиращи се с по-добра обща преживяемост в сравнение със средната наблюдавана⁽⁴⁷¹⁾. Деветнадесет от изследваните от нас първични ГБМ с коделеционен събитие, показват тенденция към по-ниска преживяемост. Това може да е следствие на рядко срещано нарушение, свързано с по-лоша прогноза или по-вероятно може просто да отразява цялостната геномна нестабилност при ВСГ. Освен това, по-високата честота на 1p19q коделеция се асоциира, както споменахме с диагнозата олигодендроглиома, докато е сравнително рядко събитие при астроцитомите IV стадий, което предполага, че тези промени не са толкова тясно свързани с астроцитните тумори, колкото с ОД.

Високата честота на 1p и 19q делециите в ниско-стадийните глиоми и по специално ОД категорично показва, че тези хромозомни райони съдържат туморсупресорни гени важни за туморогенезата на мозъчните тумори. За по-нататъшното разбиране значението на тези промени и за ефективното им прилагане в клиничната практика е необходимо извършването на важни стъпки като детайлното изследване на тези райони, последвано от клониране на заподозрените туморсупресорни гени в 1p или 19q глиомите. Редица кандидат гени в областта на 1p и 19q хромозомните рамена са изследвани в търсенето на потенциални прицелни гени на това коделеционен събитие, включително *NOTCH2*, *CDKN2C*, *RAD54*, *CITED4*, *CAMTA1*, *TP73*, *EMP3*, *PEG3* и други, но доскоро търсенето на такъв оставаше неуспешно^(421, 472-475). Наличието на 1p загубата и хипотетично намиращия се там туморсупресорен ген в глиом, показва силната връзка с увеличената химиочувствителност на АОД⁽²¹⁷⁾. Освен това, почти всички човешки малигнени заболявания, от солидни тумори до левкемии и миелопролиферативни заболявания показват участието на промените в хромозома 1, особено в теломерния край на 1p⁽⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁸⁾. Един от гените разположен в 1p кодира белтъка TP73, в последно време е спряган като хомолог на TP53, и е най-често наблюдавания делетиран район при глиомите⁽⁴⁷⁹⁾. Въпреки това мутационен анализ проведен при тумори притежаващи тази 1p делеция доведе до отхвърлянето му като потенциален туморсупресорен ген⁽⁴⁸⁰⁾. От особен интерес представляват и промените в 19q хромозомното рамо при пациентите с глиома, тъй като те са единствените известни общи и за трите основни подвида глиоми изменения⁽⁴⁶⁷⁾. Още повече, че при малигнените заболявания, с изключение на мозъчните, рядко се наблюдават делеции в 19q⁽⁴⁸¹⁾, което предполага наличието в този хромозомен район на туморсупресорен ген специфичен за глиалните тумори. Полагат се значителни усилия за идентифицирането на такъв ген, но доскоро без успех^(482, 483).



Фигура 5.2. Гени и тяхната локализация в хромозоми 1 и 19, изследвани с MLPA P088 кита на фирмата MRC-Holland

Дългогодишните предположения за наличието на туморсупресорни гени в късото рамо на хромозома 1 (1p) наскоро доведоха до откриване на мутации засягащи два кандидат гена, *CIC* (capicua генен хомолог при *Drosophila*) локализиран на 19q13.2 и *FUBP1* (far-upstream element /FUSE/ binding protein) намиращ се на 1p31.1⁽²⁰⁸⁾. Наличието им се свързва с олигодендроглиоми притежаващи 1p19q коделеционни събития. Наблюдаваните честоти на откритите мутации в гените *CIC* и *FUBP1* е съответно 50-70% и 15% в изследваните олигодендроглиоми с 1p19q коделеции. Мутационните събития в тези важни туморсупресорни гени се асоциира със самото олигодендроглиално формиране и развитието. *CIC* белтъка се свързва към регулаторни райони, като води до транскрипционно инактивиране на гени. Освен това *CIC* е негативен транскрипционен регулатор на MAPK (mitogen activated protein kinase) сигналният път, включително EGFR, Ras, Raf, и MAP киназите⁽²⁰⁸⁾. От друга страна мутациите в *FUBP1* повлияват активирането на MYC (myelocytomatosis viral oncogene homolog)⁽²⁰⁸⁾, широко познат онкоген. В контраст на вече публикуваните данни от Sahm и сътр⁽⁴⁸⁴⁾, които откриват мутации в *FUBP1* при изследваните 18 ОД и 42 ОА пациента, притежаващи мутации в *CIC* гена, Jiao и сътр⁽⁴⁸⁵⁾ не откриват такава корелация между събитията при изследване на по-голяма група от пациенти със същите хистологични диагнози. Освен това е наблюдаван и пациент, при които се наблюдава мутация в *CIC* гена, но не се характеризира с 1p19q делеционни събития⁽⁴⁸⁴⁾. Въпреки теоретичното функционално съответствие на тези гени и логичността на хипотезата те да са замесени в патогенезата на глиомите, особено на олигодендроглиомите, до момента конкретен механизъм не е идентифициран⁽⁴⁸⁶⁾. Поради това е необходимо извършване на по-обширно изследване за потвърждаване на тяхната потенциална роля и значение в раковите заболявания и особено при ОД⁽²⁰⁸⁾. В изследвания от

нас панел от гени намиращи се в районите на 1p и 19q тези два гена не бяха включени (Фиг.5.2).

Въпреки, че локализираните в 1p и 19q гени остават неидентифицирани, има данни за множество корелации асоциирани с наличието на 1p/19q загубите. Например, тумори с коделеция засягаща 1p и 19q често се характеризират с класическа глиална хистология и често имат *IDH1* и *IDH2* мутации⁽⁴⁸⁷⁾. Анапластични олигодендроглиоми с 1p/19q се отличават с проневронален генно-експресионен профил. Този профил, който отчасти се характеризира с експресията на специфични за неврони гени, е преобладаващ сред НСГ и спомага предсказването на терапевтичен отговор на глиобластом⁽⁴⁸⁸⁾. 1p/19q коделецията е мощен прогностичен и предиктивен маркер за олигодендроглиални тумори. Делециите на 1p/19q са предиктор на отговора към химиотерапия и едновременно с това се свързват с по-добрата обща преживяемост при НСГ⁽⁴⁸⁹⁾. Въпреки това, ефектът на 1p/19q коделеционните събития върху преживяемостта на пациентите може да бъде по-малък при НСГ и ролята им при определяне лечението на тази група пациенти е тема на широка дискусия^(421, 452). Загуба на 1p/19q изглежда да има прогностично значение само при пациенти лекувани с лъчетерапия или комбинирано лечение с лъчетерапия и химиотерапия. 1p/19q коделецията не е прогностичен маркер за преживяемост без прогресия при пациенти, претърпели хирургична резекция, а за такава по-скоро при пациенти с олигодендроглиални тумори, които не са претърпели терапия⁽⁴⁹⁰⁾. Пациентите, при които се наблюдава прилагане на терапия, независимо дали е лъче-, химиотерапия или комбинация от двете, и наличието на 1p19q едновременна загуба, показват значително по-висока преживяемост в сравнение с тези, при които няма коделеционното събитие ($p<0.001$). За разлика от кооперативния ефект между терапевтичния подход и 1p19q коделецията, при сравняването на *IDH1/IDH2* мутациите с хромозомните загуби не се наблюдава кумулативния ефект на двата положителни прогностични фактора. Пациентите с наличие на *IDH1/IDH2* мутации показват по-висока преживяемост, независимо от присъствието на коделецията ($p<0.001$). След извършване на мултивариационния регресионен анализ, с независима прогностична стойност се откриха възрастта ($p<0.001$; HR 1.047), диагнозата ($p=0.011$; HR 0.204), терапията ($p<0.001$; HR 0.187), и наличието на *IDH1/IDH2* мутации ($p=0.001$; HR 0.291).

Таблица 5.4. Характеристика на засегнатите гени в изследваните 1p/19q райони

Хр.	Гени	Биологична функция
1p хромозомно рамо	<i>TNFRSF4</i>	Рецептор за TNF
	<i>GNB1</i>	Сигнална трансдукция
	<i>TNFRSF14</i>	Рецептор за TNF
	<i>TP73</i>	Туморсупресорна
	<i>PARK7</i>	Антиоксидант
	<i>MFN2</i>	Поддържа митохондриалния интегритет
	<i>PTAFR</i>	Сигнална трансдукция
	<i>FAF1</i>	Посредник при апоптозата
	<i>PPAP2B</i>	Сигнална трансдукция
	<i>CYP2J2</i>	Антиоксидант; метаболизъм на лекарства
	<i>LPHN2</i>	Сигнална трансдукция; клетъчна адхезия
	<i>GTF2B</i>	Транскрипционен фактор
	<i>DPYD</i>	Пиримидинов катаболизъм
	<i>NRAS</i>	Сигнална трансдукция; онкоген
	<i>NOTCH2</i>	Междуклетъчна сигнализация
19q хромозомно рамо	<i>CCNE1</i>	Регулация на клетъчния цикъл
	<i>PDCD5</i>	Апоптоза
	<i>UPK1A</i>	Сигнална трансдукция; клетъчен растеж и развитие
	<i>TGF-β1</i>	Растежен фактор важен за процесите на пролиферация, диференциация, трансформация, апоптоза и имунитет
	<i>ZNF342</i>	Транскрипционен фактор
	<i>PPP1R15A</i>	Спиране на клетъчния цикъл
	<i>BAX</i>	Апоптоза
	<i>CHMP2A</i>	Регулация на клетъчния цикъл

5.4. *MGMT* ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ И МИКРОСАТЕЛИТНАТА НЕСТАБИЛНОСТ

Алкилиращите химиотерапевтични лекарства отдавна се използват за лечение на пациенти със злокачествени глиоми. В момента, почти всички пациенти с ГБМ се третират перорално с алкилиращия лекарствен препарат – TMZ⁽²⁴⁶⁾. Този медикамент води до закачане на метилови групи на Об позиция в молекулата на нуклеотида гуанин, което впоследствие води до клетъчна смърт⁽²⁴⁸⁾. Нормално функциониращите клетки имат унаследен механизъм, чрез който възстановяват увредената ДНК и който от своя страна имат противоположен на ефекта на TMZ действие. *MGMT* е туморсупресорен ген, имащ отношение към развитието и прогресията на рака на мозъка. *MGMT* е ензим, поправящ ДНК повредите, резултат например от алкилиращи химиотерапевтични препарати, използвани при лечението на глиоми⁽⁴⁹¹⁾. Това означава, че нормално функциониращият *MGMT* ензим води до резистентност към алкилиращи лекарства, а следователно и към TMZ. Конститутивно експресиращия се и участващ в ДНК репарацията ензим *MGMT* необратимо осъществява прехвърляне на метилова група от позицията Об на вече модифицирания гуанин върху свой цистеинов остатък, редуцирайки цитотоксичните ефекти на химиотерапията. Въпреки това, при около половината от пациентите с ГБМ се наблюдават понижени концентрации на *MGMT*, което може да направи тези тумори по-податливи на ефектите на TMZ. В настоящото проучване беше изследвано промоторно хиперметиране на *MGMT* гена при пациенти с глиални тумори. Отклонението от нормалния тип ДНК метилиране се разглежда като важно епигенетично събитие, което има връзка с развитието на човешките тумори. Метилирането на туморсупресорните гени в CpG островите, намиращи се в промоторната област, има връзка с транскрипционната му инактивация и загубата на експресия на тези гени в туморните клетки на някои човешки ракови заболявания, включително и при глиомите⁽⁴⁹¹⁾. Загубата на експресия на *MGMT* в резултат на мутация, делеция или реаранжиране на ДНК е доста рядко събитие⁽⁴⁹²⁾. Основният механизъм, чрез който се потиска транскрипцията на този ген, е метилирането на CpG - островите в промоторния регион на гена. В изследваната от нас група глиоми промоторно хиперметиране на *MGMT* беше наблюдавано при 116 от общо 212 изследвани тумора (53.5%), като 100% метилиране бе наблюдавано при 35 (30% от всички метилирани тумори). Тази честота е в съответствие с публикуваните данни в литературата - 35-93% за глиоми⁽⁴⁴⁴⁾ и 41-45% при ГБМ^(246, 491).

Въвеждането през 2005г. на TMZ като стандарт за лечението на пациенти с ГБМ, и наличието на отговор към TMZ, свързано със статута на *MGMT* промоторния район, генерира огромен интерес към анализа на този ген. По литературни данни повечето изследвания установяват наличието на по-дълга преживяемост при пациентите с метилиран *MGMT*⁽⁴⁹³⁾. В нашето проучване не беше открита такава, но съществува макар и малък брой публикации, в които такава връзка също не се открива⁽⁴⁹⁴⁻⁴⁹⁶⁾. Вероятно една от причините за липса на такава асоциация в изследваната група е ниският процент на пациенти със 100% хиперметиран *MGMT*. *MGMT* промоторното хиперметиране е свързано с отговор на лечението TMZ в ГБМ пациенти⁽²⁴⁶⁾. Това доведе до предположението, че нивото на *MGMT* експресия и статуса на промоторното му хиперметиране имат предиктивно значение при ГБМ пациентите, лекувани с TMZ^(248, 101). Няколко проучвания потвърждават предположенията за наличие на такава взаимовръзка при пациентите с ГБМ⁽²⁵³⁾ и НСГ⁽²⁵¹⁾. В литературата има данни, показващи метилационния статус на *MGMT* промоторната област като независим от приложението на TMZ валиден прогностичен маркер при по-възрастни пациенти с ГБМ⁽⁴⁹⁷⁾, което не беше потвърдено от нас. От множеството проучвания, се отличава изследването на Negi и сътр⁽²⁴⁶⁾, които са изследвали състоянието на промотор на *MGMT* при голям брой тумори от пациентите, изучавайки ефекта от прилагането едновременно на TMZ и лъчетерапия, в сравнение с прилагането само на лъчетерапия. Тези автори предполагат, че анализите определящи метилационния *MGMT* статус като допълнение към прогностичната стойност, допринасят и с предиктивната значимост като допълнителен инструмент, спомагащ в отиференцирането на ГБМ пациентите, които биха се повлияли от лечението с TMZ⁽⁴⁹⁸⁾. Въпреки това, в групата с неметиран *MGMT* също се наблюдава по-добра преживяемост при прилагането на терапия с TMZ, макар и значително по-слаба в сравнение с пациентите с

метилян *MGMT* ($p=0.06$)⁽²⁴⁶⁾. Обяснение за тази тенденция все още не е дадено и вероятно наред с други причини може да се дължи и на използвания метод за определяне на метилянето, както и на интерпретирането на резултатите при отграничаване на метилирани от неметиляни тумори^(493, 499). В изследваната от нас група, при пациентите с неметилян промотор не беше достигната статистическа значимост ($p=0.45$), докато при туморите с метилян промотор на гена се наблюдава значително по-добра преживяемост при прилагане на терапия, без значение дали е лъче- или химиотерапия ($p<0.001$). Въпреки това, наличието на благоприятния отговор към TMZ в *MGMT* неметилянните тумори, както и настоящата липса на терапевтична алтернатива, не позволява лишаването от лечение с TMZ на тази група пациенти, само въз основа на този тест, особено като се има предвид възможността за пероралното му приложение и добрата обща поносимост към лекарството. Някои автори показват *MGMT* промоторното хиперметиляне като благоприятен маркер за ОП дори при пациенти с ГБМ, които са получили само лъчетерапия, но не и химиотерапия⁽²⁵⁹⁾. По този начин, *MGMT* метилянето не може да бъде само положителен предсказващ маркер за химиотерапия, но показва като цяло положително прогностичен фенотип в ГБМ⁽⁴²¹⁾. *MGMT* метилянето значимо корелира с 1p/19q коделецията, както и с прогнозата при АОДnm⁽²⁵⁵⁾. Въпреки, че по литературни данни при туморите с хиперметилян *MGMT* се срещат по-често мутации в гена *IDH1*⁽⁴¹⁹⁾, в нашето проучване само 24 тумора с метилян *MGMT* носят мутация в *IDH1* от общо 116 тумора (20%) срещу 17 от 94 тумора (18.08%) без метиляне в *MGMT*. Не беше установена статистически значима корелация между наличието на *IDH1* мутация и метилянето на *MGMT*.

Таблица 5.5. Клинични характеристики на пациентите по групи според метилационния статус на *MGMT* гени

		<i>MGMT</i> [§] метилян (116)	<i>MGMT</i> [§] нормален (94)
Пол	Мъже	61	50
	Жени	55	44
Възраст (средна), години		52.5	54.5
Вид на операцията [§]	Тотална резекция	47	38
	Субтотална резекция	53	28
	Частична резекция	6	8
	Биопсия	2	-
Тип тумор	Астроцитом	100	83
	Олигоастроцитом	3	4
	Олигодендроглиом	9	6
	Пилоцитен астроцитом	-	1
Локализация на тумора [§]	Лява	42	31
	Дясна	62	35
Билатерална		3	6
Степен на тумора [§]	IV (вторични)	82	69
	III	10	20
	II	9	4
	I	2	-
Терапия [§]	да	67	45
	не	35	28
<i>IDH1/IDH2</i> мутации [§]	да	23	17
	не	93	77
KPS [§] (средно)		80	80
Преживяемост [§] (средна), месеци		11.92	11.27

* - показатели със статистически значима разлика между двете групи ($p=1.34E^{-5}$ за възрастта; [§] - не пълна информация)

Статусът на *MGMT* метилиране може да се променя във времето между първоначалното диагностициране и повторната поява на заболяването, и се променя по-често при тумори, които първоначално са охарактеризирани с метилиран *MGMT* ⁽²⁵⁶⁾. Данните в литературата свидетелстват за по-подходящото прилагане на прогностичната роля на *MGMT* метилирането при първични тумори, но не и при рецидиви ^(256, 493). В допълнение, отскоро метилационният статус на *MGMT* при АА (т.е. степен на СЗО III) беше подложен на анализ от невро-онкологичната група към на Германското Раково Общество и Европейската организация за изследвания и лечение на рак (EORTC) ⁽²⁵⁵⁾. И в двете проучвания, метилираният *MGMT* има прогностична стойност, но не предсказва специално отговор на лечение с алкилиращи лекарства. Наскоро промоторното хиперметилиране на *MGMT* в кохорта от ГБМ пациенти, лекувани само с лъчетерапия ⁽²⁵⁹⁾ показва връзката и с предикцията към отговор на лъчева терапия ⁽²⁵⁹⁾. Това ни навежда на мисълта, че при анапластичните глиоми и вероятно при ГБМ, прогностичната полза свързана с положителния резултат за *MGMT* метилиране може да не е само въз основа на терапевтичното повлияване с алкилиращи лекарства в резултата на *MGMT* промоторното хиперметилиране, а вместо това може да свидетелства за наличието на прогностично благоприятен молекулен фенотип ^(259, 493).

В допълнение, при ГБМ пациенти с метилиран *MGMT* промотор беше наблюдавана по-голяма склонност от развитие на рентгенографска псевдо-прогресия при лечение с TMZ, в сравнение с пациентите с неметилиран генен промотор ^(493, 500). По време на псевдопрогресия, невроизобразителният профил изглежда влошен след прилагането на TMZ, но в течение на лечението се подобрява. По този начин анализът на промоторно *MGMT* хиперметилиране показва своята приложимост в друга област, а именно като маркер показващ оценка на вероятността от появата на псевдопрогресия ⁽⁵⁰⁰⁾.

Епигенетичните промени засягащи гени, участващи в репарацията на ДНК, понижават стабилността ѝ и я правят по-податлива на различни типове повреди. Отговорът към лечението с TMZ не показва абсолютна корелация с *MGMT*, показвайки, че и други допълнителни механизми са намесени. Един от механизмите, които се смятат за свързани с наличието на резистентност към химиотерапия е загубата на MMR ⁽⁵⁰¹⁾. Об-метилгуанина, свързвайки се с тиминова база, се разпознава от MMR система последвано от премахване на тимина. Независимо от тази поправка, при липсата на нормално функциониращ *MGMT*, модифицираният Об-MeG не се поправя и срещу него отново се закача тимин. Тези празни цикли на ДНК поправка водят до активиране на гените *ATR* и *CHK1*, последвано от генериране на двойно верижни скъсвания и в крайна сметка до клетъчна смърт ⁽⁵⁰²⁾. Клетките с нарушена MMR система не разпознават и следователно не могат да поправят погрешно свързаните бази, ДНК репликацията продължава въпреки грешките, и клетъчният цикъл не се прекратява или не настъпва апоптоза. Много изследвания са проучвали ролята на MMR във връзка с наличието на отговор към TMZ и публикуваните резултати са много противоречиви. В изследване на пациенти с различни стадии на глиома, при нито един от пациентите не се наблюдава висока степен на MCH, определена като нестабилност в три от петте анализирани локуса ⁽⁵⁰³⁾. Нисък процент на MSI (8.5%) е намерен в друго проучване, изследващо по-голяма група от пациенти (129 тумора), като по-висок процент на MSI е открита при пациенти с повторна поява на ГБМ. Масабно изследване на 624 глиоми допълнително потвърди ниската честота на високата степен на MSI с честота 0.16 процента ⁽²⁸⁰⁾. В изследваната от нас група беше открит само един пациент показващ висока степен на MCH (5.8%), а при шест други беше открита MCH по един от изследваните 5 маркера, което показва честота по-висока от очакваната. Някои от изследванията с противоречиви данни може да се дължат на факта, че високите нива на MSI по подразбиране се асоциират съответно с дефекти в MMR система и по този начин се използват като маркер отчитащ индиректно наличието на MMR дефицит, независимо от наличието на публикации показващи липса на строга такава корелация между двете събития ⁽⁵⁰³⁾. Една хипотеза е, че ниските нива на MSI, наблюдавани в някои случаи може да са в резултат на дефекти в единични MMR участници, които не са тествани в дадените анализи ⁽⁵⁰⁴⁾. Тумор с ниско експресионно ниво на *MGMT* първоначално ще реагира добре на приложената му терапия с TMZ. Оцелелите след лечението туморни клетки притежават множество мутации в MMR гените, което води до тяхната придобита толерантност към по-нататъшно лечение с TMZ: ситуация, типична за ГБМ-и в клиничната практика.

Дефектите в MMR гените спомагат за злокачествената трансформация като позволяват бързото акумулиране на мутации, които инактивират гени с ключова роля в клетката. Липсата на MMR белтъци води до невъзможност за поправка на нуклеотидните замени и изменения в микросателитите, т.е. до микросателитна нестабилност. Освен данните за микросателитна нестабилност, анализът показва и честотата на LOH в тези микросателити. Тридесет и пет процента от изследваните проби показваха загуба на хетерозиготност по един от маркерите. Тя е причинена не от епигенетични изменения, а от други настъпили генетични изменения в клетката и е чест механизъм за инактивация на туморсупресорни гени⁽⁵⁰⁵⁾. Тук трябва да се отбележи, че изследваните микросателитни маркери не се намират в райони, които са най-чест обект на хромозомни загуби (напр. 3p, 19p, 17p)⁽⁴⁶⁷⁾, тъй като целта на проучването беше да се установи микросателитна нестабилност, резултат от инактивиране на MMR гени. Може да се предположи, че изследването на микросателити в хромозома 3p, например, ще доведе до установяване на по-високи нива на LOH при тези пациенти. Наличието на микросателитната нестабилност в изследваната група тумори не показва статистически значима корелация с преживяемостта ($p=0.452$). Липсата на ефективна MMR прави тумора резистентен към алкилиращи агенти дори при отсъствие на активен MGMT. При 7 от изследваните пациенти се наблюдава промоторно хиперметиране на *MGMT*, при три от тях се наблюдава и MCH. Изследвана беше връзката между наличието на промоторно хиперметиране на *MGMT* гена, MCH и преживяемостта, но отново не беше достигната статистическа значима разлика между групите ($p=0.782$). Тъй като наличието на MCH има връзка с резистентността към химиотерапевтиците, по-конкретно към темозоломид, корелационен анализ бе извършен за наличието на химиотерапия, MCH и преживяемост, но отново не беше достигната статистическа значимост ($p=0.7$).

5.5. ЕКСПРЕСИОННИ МАРКЕРИ С ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ

Въпреки идентичната хистопатология, ГБМ-ите не са хомогенна група от тумори, а притежават различни клинични и молекулярни характеристики. Първичните ГБМ-и са *de novo* тумори, които се характеризират с *EGFR* свръхекспресия и/или амплификация. За разлика от тях, вторичните ГБМ-и се развиват от по-нисък стадий глиоми, имат висока честота на *TP53* мутации, и рядко съдържат *EGFR* аномалии. Транскрипционната активация на редица гени, някои от които са *VEGF-A*, еритропоетин, *FLT-1* и други, представляват основните фактори, осъществяващи и определящи процесите на неоангиогенеза, подвластни на действието на фактори нар. HIF⁽⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸⁾.

Редица растежни фактори и техните рецептори се отличават с нарушена регулация при МГ, особено при ГБМ-ите. Например, повишена регулация на *EGFR*-медираната сигнализация присъства при около 30% от глиомите и 60% от ГБМ⁽⁵⁰⁹⁾, със свръхекспресия в ГБМ-и обикновено дължаща се на *EGFR* амплификация. *EGFR* амплификацията е отличителна генетична черта на първични ГБМ.⁽⁵¹⁰⁾ Събития като активиране на онкогени (например *EGFR*) и загубата на туморсупресорната функция на белтъци, като *TP53*, *PTEN* и др, са общи за глиомната туморогенеза и повлияват експресията на HIF чрез няколко механизма. *EGFR* генната амплификация и/или свръхекспресия се наблюдава често при множество тумори (около 40%), включително ГБМ, и се свързва с лоша прогноза⁽⁵¹¹⁾. Активирането на *EGFR*, независимо от това дали е в резултат на свързването му с лиганд, мутационния вариант *EGFRvIII* или в резултати на генна амплификация води до активиране на *PI3K/Akt/FRAP/mTOR* пътя, което от своя страна води до увеличаване на *HIF1*⁽⁵¹²⁾. В настоящето изследване открихме, *EGFR* амплификацията в 65% от първичните ГБМ⁽⁵¹³⁾, а другите хистологично диагностицирани тумори са с малко на брой пациенти, поради което не могат да се използват за статистически анализ. В едно популационно-базирано проучване, честотата на *EGFR* амплификацията на ГБМ е по-ниска (36%), а вторични глиобластоми се характеризират с *EGFR* амплификацията в по-малко от 10% от тумори⁽¹⁷⁶⁾. Намерени са *EGFR* амплификации при 4% от туморите стадий II и в 21% от стадий III астроцитомите⁽⁵¹⁴⁾. В нашата извадка, ние открихме, *EGFR* амплификацията в един ($n=4$) първичен анапластичен олигоастроцитом и в два ($n=4$) анапластични олигодендроглиоми. *EGFR* амплификацията се

среща рядко при ниско-стадийни олигодендроглиални тумори ⁽⁵¹⁵⁾. В серия от 33 ОД, Reifenberger и сътр ⁽⁵¹⁶⁾ откриват *EGFR* амплификация в един случай на анапластичен ОД ⁽⁵¹⁶⁾. Нашите резултати са в съгласие с предишни проучвания, въпреки че броят на туморите в тези подгрупи са малки. Анапластични олигодендроглиални тумори носят *EGFR* амплификация в по-висок процент. Въпреки, че проведено проспективно проучване показва, че *EGFR* амплификация се наблюдава при 18% от анапластичните олигодендроглиомы ⁽⁵¹⁷⁾.

Повече от 90% от ГБМ са първични, т.е. възникват без доказателства за предходен по-ниско стадийн астроцитом, за разлика от вторичните ГБМ, които обикновено се появяват при по-млади пациенти, отколкото първични ГБМ (средна възраст, 45 спрямо 62 години), ⁽¹²¹⁾, както беше наблюдавано и в нашата извадка от пациенти – средна възраст на заболяемост при първичните ГБМ спрямо вторични ГБМ – 60 спрямо 41 години. Освен това генетичните профили на първичните и вторични ГБМ са различни и се наблюдава в много по-голяма степен наличието на *EGFR* амплификация и свръхекспресия при първични в сравнение с вторичните ГБМ (както следва 40% спрямо 8% и >60% спрямо <10%), ^(121, 514). В изследваната от нас група, 45 от туморите бяха с диагноза ГБМ, а 60% от тях се характеризираха с повишена експресия на *EGFR*. При 65% от първичните тумори беше открита свръхекспресия (23 от 35 пациента), в съответствие с литературните данни, докато в групата с вторични тумори беше наблюдавана по-висока честота (28% при наблюдавани 10% от Ohgaki и сътр ⁽¹²¹⁾) – двама от седемте изследвани пациенти имат повишени нива. Това разминаване най-вероятно се дължи на малкия брой изследвани тумори в изследваната група.

Възрастовото разпределение на пациентите с *EGFR*-амплифициран ГБМ отразява честотата предимно на пациентите с първични ГБМ. *EGFR* амплификацията се наблюдава рядко при ГБМ, възникнали при пациенти на възраст под 35 години, и с увеличаване на възрастта, *EGFR* амплификацията/свръхекспресията става все по-често събитие ⁽¹²¹⁾. Това се потвърждава и от проведенния корелационния анализ показващ положителна връзка между наличието на *EGFR* експресия и възрастта на заболяемост ($\rho=0.268$; $p=0.040$). Средната възраст на заболяемост при ГБМ пациентите с *EGFR* повишена експресия в изследваните от нас пациенти е 59 години, което е в съответствие с вече публикуваните данни (средна възраст 62 години) ⁽¹²¹⁾. Корелационният анализ показва положителна връзка между наличието на *EGFR* експресия и вида резекция ($\rho=0.290$; $p=0.026$) както и наличието на 1p19q коделеционни събития ($\rho=0.343$; $p=0.030$).

В настоящото изследване, свръхекспресията на *EGFR* ($p=0.746$) не беше наблюдавана като прогностичен фактор в моновариационния регресионен анализ и според получените от нас резултати не е подходящ като независим фактор в групата на ГБМ. Групата с повишена експресия показва сходна обща преживяемост (23 мес) с групата с нормална експресия - 22 мес. Независимо от публикуваните данни от Jarvela и сътр ⁽⁵¹⁴⁾ за прогностичната роля на *EGFR* амплификацията като негативен маркер при АА ⁽⁵¹⁴⁾, други две проучвания докладват липсата на такава асоциация ⁽³⁵⁸⁾. Множеството изследвания, докладващи противоречивите резултати, са и причината прогностичната му роля да е все още неизяснена ⁽³⁵¹⁾. Няколко изследвания показват, че независимо от липсата на прогностична стойност на *EGFR* амплификацията и белтъчната свръхекспресия, при анализа на пациенти от различни възрасти заедно, *EGFR* амплификацията показва асоциация с по-лоша прогноза при по-млади пациенти и по-добра при тези с по-късно развитие на болестта (според изследването – след 45, 55 или 60 годишна възраст) ^(358, 361, 518). В изследваната от нас група беше наблюдавана значима разлика в общата преживяемост при сравнение на пациентите с повишени нива на *EGFR*, разделени според началото на развитие на заболяването на ранно - под 56 години и късно – над 56 години (както следва 21 спрямо 7 месеца, $p=0.005$).

В нормоксия, клетките превръщат глюкозата в пируват, който след това се включва в цикъла на трикарбоксилни киселини (ТКА) и генерират електрони, които са от съществено значение за получаването на АТФ от окислително фосфорилиране в електрон-транспортните системи. Когато концентрацията на кислород е ниска, клетките преминават към по-малко ефективната анаеробна гликолиза, в резултат на което се увеличава превръщането на глюкоза в лактат (ефектът на Пастър). Това метаболитно превключване е критичен процес за адаптиране на клетки в условия на хипоксия, и HIF контролира експресията на много гени, необходими за постигане на този нов фенотип. По-голямата част от информацията относно HIF индуцирания

отговор към хипоксия е чрез изследване на HIF1 α субединицата, но наскоро бяха също идентифицирани и други изоформи - HIF2 α и HIF3 α . И трите изоформи са структурно сходни и регулацията им напълно зависи от вътреклетъчната кислородна концентрация. HIF1 α и HIF2 α имат повече от 70% хомоложност в ДНК-свързващия и транскрипционно-активиращия им домени, а функционални изследвания показват, че HIF-2 α и HIF-3 α активират редица гени в отговор на хипоксия чрез димеризация с HIF- β субединицата и свързване към HRE на таргетните ген ^(519, 520). Малигнените тумори често имат зони на тъканна хипоксия или аноксия, където необходимостта от допълнително количество кислород в тези метаболитно активни тъкани не отговаря на доставеното в тези райони. Това води до необходимостта от задействането на множество адаптационни процеси, с цел осигуряване оцеляването на клетките в тези трудни условия на хипоксия, което може да помогне, за отграничаването на силно агресивните и малигнени клетки. Свързаните с това промени в генната експресия спомагат в поддържането на пролиферацията, pH регулацията и повишаване на васкуларизацията в тези хипоксични райони. Установени са наличие на повтарящи се цикли на изключително бързо нарастване на тумора и многократното увеличаване на съдовете, осигуряващи кръвоснабдяването му ⁽⁵²¹⁾. Така отговорът към хипоксията води до поддържане жизнеспособността на туморните тъкани и поддържа непрекъснатия им растеж. Измерване на нивата на HIF-1 α като маркер на хипоксия в туморната тъкан корелира с лоша прогноза и повишена степен на агресивно заболяване в повечето злокачествени заболявания, включително рак на гърдата, на яйчниците, на дебелото черво и рак на белия дроб ^(522, 523).

Експресията на HIF1 α , инициирана в резултат на вътретуморна хипоксия и генетични изменения, инактивиращи туморсупресорните гени или активиращи онкогени, играе критична роля в този процес ⁽⁵²⁴⁾. HIF1 α свръхекспресията и васкуларизацията са силно корелиращи процеси в мозъчните тумори ⁽⁵²⁵⁾. И при двете малигнени заболявания - рак на гърдата и мозъчни тумори се наблюдава значима връзка между HIF1 α свръхекспресията и стадия на тумора. Въпреки че ангиогенезата е напълно асоциирана с развитието на болестта, новообразуваната система от кръвоносни съдове в тумора структурно и функционално е аномална, което води допълнително до увеличаване на туморната хипоперфузия и хипоксия. Налице е парадоксална асоциация на туморната прогресия, както с ангиогенеза, така и с интратуморната хипоксия ⁽⁵²⁴⁾. При ГБМ, HIF1 α е свръхекспресиран във виталните туморни клетки в районите около некрозата ^(525, 526), което предполага, че участва в медиацията на клетъчното оцеляване.

Експресията и на двата белтъка HIF1 α и HIF2 α се открива в човешки ГБМ и то предимно в некрозираните райони на тумора ⁽⁵²⁷⁾. Изследвания на малък набор от мозъчни тумори предполагат, че HIF1 α белтъкът корелира положително с туморния стадий и васкуларизация на глиомите ⁽⁵²⁸⁾. В проведеното от нас изследване не беше открита положителна корелация между експресионните нивата на HIF1 α и HIF2 α и по-напредналият туморен стадий на изследваните глиоми, както и не беше открита никаква връзка с някои от клиничните параметри. При корелационен анализ на данните за нивата на експресия с другите изследвани гени, те показваха положителна корелация с всички от експресионните маркери, а негативна с наличието на мутации в IDH1 гена. Въз основа на публикувани данни, ролята на HIF2 α в туморогенезата и агресивността на ГБМ не е напълно ясно, но има мнения, че HIF2 α притежава туморсупресорна функция ⁽⁵²⁹⁾, и че е лош прогностичен маркер ⁽⁵³⁰⁾. Свръхекспресията на HIF2 α протеин в ГБМ на плъхове потиска растежа на тумора, въпреки засилената васкуларизация. Това отчасти се обяснява с повишената туморно-клетъчна апоптоза, като knockdown експеримент с HIF2 α в човешките ГБМ клетки с хипоксия намалява процента на апоптоза в тези клетки ⁽⁵²⁹⁾. По литературни данни повишените експресионни нива на HIF1 α и HIF2 α корелират с по-лошата преживяемост при глиома. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи (с понижена, с повишена и нормална експресия, както следва $p=0.032$ и $p=0.01$). Извършеният анализ определящ връзката на общата преживяемост при туморите, освен само според нивата на експресия и в комбинация с други клинични характеристики, като туморен стадий, възраст на възникване на заболяването и KPS статус, не показва нито един от тези два експресионни маркера като независими прогностични фактори. Повишени белтъчни нива на HIF1 α и HIF2 α са били открити в няколко туморни форми приписвайки им онкогенна функция

⁽⁵³¹⁾. Високите нива на HIF α белтъка се свързват с лоша прогноза при пациенти в редица туморни заболявания като рак на гърдата ^(532, 533), на дебелото черво ⁽⁵³⁴⁾ и простатата ⁽⁵³⁵⁾.

Друг член от семейството на HIF белтъците, HIF3 α , при загубата на транскрипционно активиращ се домен, започва да функционира като доминантно негативен регулатор на отговора към хипоксия поради невъзможността му за свързване с HIF- β ⁽⁵³⁶⁾. В нашето изследване намалена експресия беше наблюдавана при повечето от пациентите - 37 (62.7%), но статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия, не беше наблюдавана ($p=0.763$).

Подкисляването на микросредата е друго главно последствие от преминаването към анаеробна гликолиза. Хипоксия индуцирана ацидоза се дължи на увеличеното производство на млечна киселина, но и CO_2 намалената съдова дисперсия също допринася за това състояние. Съществува голямо разнообразие от протеини, свързани с регулирането на рН в клетките: Na^+/H^+ транспортер и H^+ -АТФ-азна помпа - активно отделяща два протона, монокарбоксилатните транспортери пренасят млечна киселина двупосочно, бикарбонатният транспортер увеличава клетъчната алкализация и карбонокиселинови анхидрази катализират хидратиране на въглеродния диоксид до бикарбонат и протони ⁽⁵³⁷⁾. Въпреки че получената ацидоза е предизвикана от хипоксия-индуцирани промени в клетъчното дишане, хипоксията регулира транскрипцията на гени, необходими за рН хомеостазата. Един от най-добре проучените адаптационни процеси към хипоксия-индуцираната ацидоза е повишената регулация на карбоанхидразните ензими. Карбокси анхидразата катализира превръщането на CO_2 до карбонова киселина и служи за връзка между промени в метаболизма и тези в рН. Следвайки тази логична връзка се установи, че карбокси анхидразите IX и XII са регулирани директно от активността на HIF1 ⁽⁵³⁸⁾. Тези ензими функционират като осигуряват подкисляването на извънклетъчната среда, което в единодействие с транспортерите на аниони, поддържа алкалното вътреклетъчно рН ⁽⁵³⁹⁾. Комбинацията от тези промени позволява на клетките да се адаптират и да оцелеят в една враждебна ацидирана среда. Установено е, че експресия на CAIX почти изцяло отсъства в здравия мозък ⁽⁵⁴⁰⁾. Така експресията на CAIX се открива само в туморната тъкан, докато в съседните нормални клетки на мозъка не се наблюдава. Това прави експресията на маркера тумор-специфична, което превръща тази молекула и в мишена за развитието на потенциална таргетна терапия. Докато експресията на CAIX в мозъчни тумори е била изследвана и по-рано ⁽⁵⁴¹⁾, връзката ѝ с различни клинични характеристики не е напълно изяснена. В настоящото проучване, експресията на CAIX се наблюдава при 76.3% от астроцитните тумори, което е в пълно съответствие с вече публикуваните данни ⁽⁵⁴¹⁾. Корелационните анализи с клиничните показатели показваха силна положителна корелация на увеличената експресия с възрастта, диагнозата и стадия на заболяването. В литературата има данни от ИХХ изследвания, че цитоплазмената експресия на CAIX има силна връзка с увеличаване на туморния СЗО стадий ⁽⁵⁴²⁾. Корелацията на експресионните нива на CAIX с прогноза показва значима асоциация на повишените му нива с лошата прогноза на пациентите. Групата с повишена експресия показва по-ниска обща преживяемост (17 мес) в сравнение с другите две групи -20 мес. за групата с понижена и 34.32 мес. за групата с нормална експресия ($p=0.002$). Мултивариационният регресионен анализ не показва промяната в нивата на CAIX да притежават независима прогностична стойност. Това най-вероятно се дължи на силната позитивна корелация между всички изследвани експресионни маркери, с изключение на HIF3 α , проявяващ значима негативна корелация (раздел Резултати, Табл.4.12).

В контраст на установената силна връзка на високата CAIX експресия и понижената обща преживяемост при пациентите с ГБМ, Flynn и сътр ⁽⁵⁴³⁾ при мултивариантен анализ на генната експресия, свързани с хипоксия в различни стадия глиални тумори, установяват, че GLUT-1 и VEGF, но нито HIF1 α , нито CAIX експресия са свързани с преживяемост при пациенти с ГБМ. Интересно е, че в това проучване също така, не се установява разлика в експресията на CAIX между ниско- и високо-стадийните глиомы ⁽⁵⁴³⁾. Това е в контраст с редица изследвания, показващи значително по-висока CAIX експресия при високо-стадийните глиомы и ясна връзка между CAIX експресия с по-ниската общата преживяемост ^(309, 311, 543). Flynn и сътр ⁽⁵⁴³⁾ не откриват значителна асоциация между експресията на CAIX върху общата преживяемостта на пациентите, вероятно поради това че CAIX генната експресия е силно индуцирана от

хипоксията, и може да се разглежда като ендегенен маркер оценяващ хипоксията, която е силно застъпена при силно агресивни тумори, характеризиращи се с висока пролиферативна и метаболитна активност⁽⁵⁴³⁾. Алтернативно, CAIX може да има важни функции в биологията на ГБМ. Така гена *CAIX*, състоящ се от уникален N- и C-крайни домени, се счита за химерен ген, сглобени в резултат на екзонно разместване. Извънклетъчният домен на *CAIX*, медиращ свързването на клетки, играе важна роля в клетъчното оцеляване на тумора⁽⁵⁴⁴⁾. Проведени изследвания показват развитието на вакуолна дегенерация на мозъка в по-напреднала възраст при мишки с индуцирана деактивация на гена *CAIX*, доказваща и неговата неотменна регулаторна роля в мозъка. Проведени са и опити за лечение с конкретни *CAIX* инхибитори, които показват обнадеждаващи резултати, особено поради липсата на медикаментозна токсичност⁽⁵⁴⁴⁾.

Всяка промяна във функцията или дейността на HIF, може значително да промени процеса на адаптация към хипоксия и да доведе до малигнизация. В условия на хипоксия, ангиогенезата се регулира предимно от HIF-зависимата транскрипция на VEGF, чиято експресия играе основоположна роля за ангиогенезата при малигнените глиомы. Освен това хипоксията транслационно регулира VEGF чрез увеличаване стабилността на иРНК с помощта на HuR свързващия белтък⁽⁵⁴⁵⁾. В хипоксичната област на тъканта се наблюдава създаване на VEGF сигнален градиент, който привлича съседните ендотелни клетки и моноцити чрез рецептор-лиганд взаимодействия. VEGF се характеризира с множество изоформи и с пет различни рецептора - VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (FLK-1/KDR), VEGFR-3 (FLT-4), NRP-1 (neuropilin-1), и NRP-2 (neuropilin-2), всеки от който има специфични характеристики за свързване на определени членове от VEGF белтъчното семейство. Например, VEGFA, взаимодейства с два тирозин-киназни рецептора, VEGFR 1 и 2, докато VEGFC и VEGFD взаимодействат с VEGFR-3. VEGFR-1 и VEGFR-2 са главните рецептори експресирани се от ендотелните клетки, като VEGFR-2 се е смята за главния рецептор свързан с VEGF митогенната сигнализация, осъществяващ почти всички функции, медираны от VEGF. За VEGFR-1 има противоречиви данни относно неговата конкретна функция, но се е счита че действа като регулира функцията на VEGFR-2 и подпомага разделянето на свързаните VEGF молекули с VEGFR-2. Скоростни изследвания показаха важното значение на VEGFR1 за миграцията и диференциацията на ендотелните клетки, процеси с основоположно значение при ангиогенезата⁽³²⁸⁾. Изключителните функции и значението на двата рецептора е потвърдено в миши модели, при които иницирираната загубата и на двата води до летална фенотипна изява по време на ембрионалното развитие^(328, 546). Освен това има и данни, че VEGFR-1 през ембриогенезата играе роля на ангиогенен негативен регулатор, потискайки проангиогенните сигнали⁽³²⁹⁾. Интересен експеримент е направен с мишки показващ, че лиганд-свързващият домен, заедно с трансмембранный на VEGFR-1 са достатъчно условие за появата на супресорен ефект на ангиогенезата в ранната ембриогенеза. Установено е, че докато функцията на VEGFR-1 (FLT-1) се регулира директно от HIF-1 сигнализация и HRE елементи разположени в енхансерната му област, то VEGFR-2 (KDR) се повлиява от непряка стимулация в резултат на хипоксията, и наличието на положителна обратна връзка чрез свързването му с VEGF в ендотелните клетки⁽⁵⁰⁷⁾. Освен това VEGFR-1 и -2 по време на туморната васкуларизация активират Ras/MAPK и PI3/Akt сигналната пътека, които са замесени в ГБМ туморогенезата⁽⁵⁴⁷⁾.

ГБМ е силно кръвоснабден тумор като резултата от това повишената експресия на VEGF по време на прогресия се сравнява с тази в други мозъчни тумори^(548, 549). Повишените нива на VEGF в ГБМ увеличават съдова пролиферация и влошават заболяването. Въз основа на сегашните ни данни, ние предполагаеме, че VEGF може да има двойни цели - не само туморните съдове, но и тумор стволите клетки. Множество методи на лечение са насочени към VEGF и VEGFR-ите поради значимата им роля в регулирането на процесите на ангиогенеза и ГБМ стволови клетки (ГБСК) пролиферация. В пациенти с глиомы, анти-VEGF и VEGFR2 инхибитори обикновено се използват за насочване на сигналната каскада на VEGF-VEGFR2. Все пак, въпреки някои преходни позитивни терапевтични ефекти, ефикасността на тези две стратегии са разочароваша⁽⁵⁵⁰⁻⁵⁵⁴⁾. Анти-ангиогенната терапия води до деваскуларизация, която ограничава растежа на тумора, но предимствата на инхибиторите на ангиогенезата обикновено са преходни и често се развива резистентност⁽⁵⁵⁰⁾. В допълнение,

някои анти-ангиогенни агенти повлияват развитието и растежа на тумора и метастазите⁽⁵⁵²⁾. Множество механизми могат да бъдат включени чрез индукция на хипоксия, като насърчаване пролиферацията на ГБСК може да бъде един от тези механизми^(552, 555). Има данни показващи, че хипоксията може да стимулира ГБСК пролиферация, но която не може да бъде потисната от VEGFR инхибитори. Следователно не само VEGF, но също и някои други сигнални растежни фактори допринасят за повишена ГБСК пролиферацията под хипоксично състояние. При продължително лечение с анти-ангиогенни препарати, туморите развиват прогресивно хипоксия, която вероятно е и основния фактор за насърчаване на туморната резистентност към терапията и в крайна сметка туморната прогресия.

В настоящото проучване, свръхекспресия на *VEGFA*, *FLT-1* и *KDR* беше открита, както следва при 72.8%, 10.8% и 27.1%, от изследваните тумори, като 100% от тях са малигнени глиоми, а в НСГ и такива от смесен тип не се наблюдавани при нито един. Статистически значими разлики бяха наблюдавани в преживяемостта на трите групи - с понижена, с повишена и нормална експресия за двата изследвани рецептора (както следва за *FLT-1*, $p=0.042$ и *KDR*, $p=0.028$), но при провеждането на мултирегресионен анализ, промяната в експресията на нито един от тях не показва значима независима връзка с прогнозата. От друга страна при провеждане на корелационния анализ на промените в нивата на *VEGFA* и *KDR* бяха установени значими положително асоциирани връзки с наличието на диагноза ГБМ (съответно $\rho=0.478$ и 0.265 $p<0.001$), както и показват такава и с напредването на възрастта на заболяемост (съответно $\rho=0.407$; $p=0.001$ и 0.390 ; $p=0.003$).

Експресията на VEGF се увеличава в отговор на хипоксия, и това се осъществява чрез два механизма. Първо, хипоксията предизвиква активиране транскрипцията на VEGF чрез HIF-зависими механизъм, медирано от HIF1, свързвайки се с HRE в рамките промотора на VEGF, водещ до повишаване на генната транскрипция⁽⁵⁵⁶⁾. Вторият механизъм е регулиращ нивата на VEGF иРНК чрез регулиране на стабилността ѝ. Този ефект се медира от 3'-нетранслираната област на VEGF иРНК⁽⁵⁵⁷⁾. Хипоксичната активация на VEGF се счита за основната движеща сила за развитието на нови кръвоносните съдове, както по време на ембрионалния генезис и в развитието на тумора. *In situ* хибридизация на туморната тъкан разкри VEGF иРНК локализирана в псевдопалисадните клетки около хипоксично/некротичните зони при ГБМ, което вероятно се дължи на хипоксична индукция. В действителност, инхибирането на VEGF сигнален път води до инхибиране туморния растеж и ангиогенеза.

VEGF е широко изследван и е ключов регулатор на ангиогенезата. VEGF и неговия основен рецептор VEGFR-2, са експресирани в злокачествените глиоми, водещо до паракринна активация на клетъчна пролиферация, оцеляване, активиране, инвазия, миграция и пропускливост. Експресионните нива на VEGF са положително свързани със злокачествена прогресия и съдова плътност. VEGF сигнализацията също стимулира въвличането на стволови клетки от костния мозък, които секретират проангиогенен фактори за местата на продължаващата туморна ангиогенеза. Установено е десетократно повишение в нивата му при ВСГ, в сравнение с НСГ⁽⁵⁴⁷⁾.

VEGF експресия е изследвана при мозъчни тумори, т.е. астроцитни глиоми (СЗО класове II, III) и ГБМ, като е наблюдавано значително повишение на *VEGF* експресия при ВСГ в сравнение с НСГ⁽⁵⁵⁸⁾. ИХХ изследвания откриват увеличено количество VEGF около областта на некроза и особено в псевдопалисадните клетки на ГБМ, което логически води до предположението, че хипоксията е отговорна за стимулиране на *VEGF* експресията и ангиогенезата с цел насърчаване на туморния растеж⁽⁵⁵⁹⁾. Поради изобилната неоваскуларизация при ВСГ и практически отсъствието им в клас II астроцитни тумори, за експресията на VEGF се смята, че има прогностична стойност в астроцитни глиоми. Поради тази причина в настоящото изследване връзката между експресия на *VEGF* и общата преживяемост на пациентите с глиома е изследван, като са включени тумори с различни стадий за оценка на прогностична стойност на този ангиогенен фактор. Клиничните данни и резултатите са сравними с тези на други анализирани ретроспективно изследвания⁽³⁰⁹⁾. Това беше потвърдено и в нашето проучване – наблюдавахме статистически значими разлики в преживяемостта на трите групи (с понижена, с повишена и нормална експресия; $p<0.001$), като средната преживяемост на групата с увеличена експресия е значително по-ниска от тази с нормална експресия (14.33 мес за групата с увеличена експресия към 25.43 мес). В

изследваната група беше анализирана и неговата независима прогностична стойност, като анализа включва наличието на клинични и демографски показатели като възраст, туморен стадий и наличието на други експресионни маркера, като показва независимата си негативна значимост наред с възрастта (съответно за VEGFA HR=1.039; 95% CI=1.003-1.066; p=0.032 и за възрастта HR=7.934; 95% CI=1.210-52.044; p=0.031). Изследването на възможните корелации между конкретните клетъчни и/или молекулярни събития и клиничните характеристики в човешките тумори е ценно поради възможността за субгруппирането на тумори въз основа на техния биологичен "облик", което може да предостави полезна информация по отношение на адекватна терапия, т.е. по-агресивно лечение може да се приложи при тумори с установена лоша прогноза въз основа на генетичните прогностични маркера. Освен това силната прогностична значимост на дадено клетъчно или молекулярно събитие могат да насочат вниманието към биологичното му значение в многостъпалния процес на туморогенеза.

Процесът на ангиогенеза сам по себе си също оказва значително влияние върху разпространението на туморните клетки, тъй като за туморите под действието на хипоксия е необходимо повишено кръвоснабдяване, което да поддържа растежа им. Новообразуваните кръвоносни съдове са аномално характеризиращи се с висока пропускливост, усукани, и дезорганизирани, които така и не се развиват напълно. Ангиогенната сигнална каскада се поддържа дерегулирана и активирана чрез редица фактори, непрестанно отделяни от хипоксичните туморни клетки. Тези непрекъснати сигнали за изграждането на нови кръвоносни съдове водят до нарушено равновесие между про- и анти-ангиогенните фактори. В резултат кръвоносните съдове биват постоянно под влияние на високите нива на проангиогенните фактори, като VEGF, и не получават възможност да финализират правилното си оформяне⁽³¹⁷⁾. Хипоксия индуцираната ангиогенна сигнализация не е свързана единствено с дерегулацията на VEGF, а регулира транскрипцията и на други проангиогенни гени, включително *ангиопоетин 1*, *ангиопоетин 2*, *MMP2* и *9*, *PDGF*, *TGF-β* и други⁽²⁹⁰⁾, които могат да станат потенциален обект от терапевтично значение. Всеки фактор има специфична роля в развитието на нови кръвоносни съдове и прецизната регулация на тези фактори е необходима за постигане на баланс при васкуларизацията. HIF сигнализацията играе централна роля в целия процес на ангиогенеза⁽⁵⁶⁰⁾. Трансформиращ растежен фактор В е цитокин с три различни изоформи, кодирани от три отделни гени. Всички TGF-β изоформи се секретират като неактивни протеини, свързани с латентно-асоцииран белтък⁽⁵⁶¹⁾. TGF-β се секретира от глиоми и има голямо разнообразие от туморсупресорни и туморстимулиращи ефекти⁽⁵⁶²⁾. HIF-1α стимулира TGF-β производството по клетъчно- и изоформно-специфичен начин. HIF-отговорните елементи (HRE), са идентифицирани в близост до начало на *TGF-β3* гена и е доказано, че отговарят на действието на хипоксията, както и са свързвани с HIF1α⁽⁵⁶³⁾. Изследвания показват, че повишение в експресионните нива и на трите TGF-β изоформи се наблюдават във висока степен при глиомите⁽³⁷¹⁾, а промени в TGF-β1 и TGF-β2 са по характерни за първичните ГБМ, но не и в изследваните тъкани от нормален възрастен или фетален мозък^(564, 565), което е в съответствие с получените от нас данни – 59.3% от туморите показваха увеличени *TGF-β2* нива, 71% от които бяха първични ГБМ. Повишените нива на *TGF-β2* експресията показваха силна корелация с нарастването на туморния стадий, туморите с ГБМ показваха повишение в нивата на експресия приблизително три пъти и половина в сравнение с контролните тъкани, което е сходно с литературните данни – 4 пъти⁽³⁷¹⁾, както за ново диагностицирани, така и за рецидивиращи ГБМ⁽⁵⁶⁶⁾. Независимо, че има данни показващи повишената *TGF-β2* експресия като негативен прогностичен фактор⁽³⁷⁰⁾, което и ние наблюдавахме (p=0.042), в последващите анализи не показва значимост като независим прогностичен фактор при мултирегресионния анализ. Силни положителни корелации бяха установени с промяната на другите експресионни маркери като *HIF1α*, *HIF2α*, *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2* и др. В литературата тези взаимовръзки на TGF-β1, 2 и 3, с HIF1α все още не са добре проучени при глиомите. И трите изоформи на TGF-β са открити в глиомни клетъчни култури, в цереброспиналната течност, и в мозъчно туморни биопсии. В глиоми има данни, че както TGF-β1 и TGF-β2 могат да инициират експресията на VEGF, в условия на хипоксия, взаимодействието между HIF1α и Smad белтъците, води до активиране на TGF-β сигнализация водещо от своя страна до повишена *VEGF* експресия⁽⁵⁶⁷⁾. Освен това TGF-β има и други проангиогенна активност в глиомите, включително регулацията в положителна посока на

металопротеинази, както и потискането на металопротеиназни инхибитори⁽⁵⁶⁸⁾, и секрецията на ЕСМ⁽⁵⁶⁹⁾. Инхибирането на TGF- β активността от нова малка молекула инхибитор (SB-431542) предотвратява експресията на *VEGF* и *PAI-1*, и инхибира пролиферацията на глиомни клетки *in vitro*⁽⁵⁷⁰⁾. Такава молекула инхибитор може да бъде полезна при лечение на ГБМ чрез предотвратяване на някои от тумор-иницииращи ефекти на TGF- β .

Матрикс металопротеиназите са голямо семейство от цинк-свързващ ендопептидази, които играят важна роля в деградацията на ЕСМ. Първоначално те се експресират като неактивни зимогени и се активират чрез протеолитичен изрязване, освобождавайки активната им субединица⁽³⁹⁸⁾. MMP-2, както и мембранните MMP-1, MMP-7 и MMP-9, са с увеличена регулация в резултат на хипоксията индуцирана от HIF-1 зависими пътища⁽⁵⁷¹⁾. Още повече, в глиомни клетъчни линии HIF активирането предизвиква инициирането на TGF- β 2, което допълнително променя MMP активност чрез позитивна регулация на MMP-1, -2 и -9 и потиска тъканните инхибитори на MMP експресия⁽⁵⁶⁸⁾. Получените от нас данни са в съответствие с вече публикуваните⁽³⁹⁹⁾, като увеличена експресия се наблюдава в 61 % от всички изследвани, а при ГБМ в 73% случаите. Свърхекспресията на MMP-9 е свързана с по-висок риск от рецидив при цялостна резекция и е негативен прогностичен фактор^(396, 404), което беше потвърдено и в нашата група. Групата с повишена експресия показва значително по-ниска обща преживяемост (12 мес) в сравнение с другите две групи – 48.7 мес. за групата с понижена и 22.9 мес. за групата с нормална експресия; $p < 0.001$, но въпреки това този маркер не се установи като независим такъв при анализа с останалите маркери показали значимост. Освен това експресионните му нива корелират значително с хистологично по-високия стадий на злокачественост ($\rho = 0.551$, $p < 0.001$), в съответствие с литературните данни⁽³⁹⁹⁾. MMP инхибиторите са потенциални кандидати за блокиране на глиомната миграция и инвазията⁽³⁹⁶⁾.

SOX (SR-Y-TYPE HMG BOX) СУПЕРСЕМЕЙСТВО

Значимата ролята на SOX генното семейство в канцерогенезата е била заподозряна поради участието им в регулацията на клетъчната диференциация, пролиферация и оцеляването на клетките. Нарушената регулация на SOX гените се наблюдава при различни видове ракови заболявания⁽⁵⁷²⁻⁵⁸⁸⁾. В търсене на по-ефективни прогностични маркери при пациентите с мозъчни тумори ние изследвахме иРНК експресията на 4 транскрипционни фактори, членове на SOX семейството, в туморни и нормални мозъчни тъкани. Анализът показва, че три от изследваните гени бяха свърхекспресирани при глиоми в сравнение с нормалните мозъчни тъкани на възрастни индивиди - *SOX2* (49.15%), *SOX8* (40.68%) и *SOX9* (49.15%) гени, докато *SOX6* гена често имаше иРНК нива еквивалентни на тези в нормалния мозък (47.46%). Тези резултати са в съответствие с вече публикувани данни, въпреки че *SOX6* свърхекспресия се наблюдава само в 40% от пациентите, докато Ueda и сътр⁽⁵⁸⁹⁾ съобщават за значително по-висока *SOX6* генна експресия във всички анализирани глиомни проби, предполагайки, че съществува установена ясна връзка между имуногенността на *SOX6* и степен на злокачественост в глиомите. Тази различна честота в нашето изследване може да се дължи на използването на две ендогенни контроли, по-подходящи за изследване на експресионни нива в ЦНС (*GAPDH* и *TBP*⁽⁴²⁰⁾) в сравнение с β -актин, използвана в проучването на Ueda и сътр⁽⁵⁸⁹⁾. Нашите резултати показват, че всички НСГ имат свърхекспресия на *SOX6* в сравнение с 33.3% от ГБМ. Друго проучване докладва, по-високи нива на иРНК на *SOX6* в ОД в сравнение с астроцитомите⁽³⁸⁷⁾, които не бихме могли да проверим поради малкия брой пациенти в групата на НСГ (2-ОДП, 3-АП и 1-ОАП проби). Повече от половината от пациентите с ГБМ и АА имат експресионни нива сравними с тези в нормалната мозъчна тъкан на възрастен индивид, докато другите групи показваха леко повишение на експресионните нива. Интересно е откритието, че една трета от пациентите с глиома и високи нива на *SOX6* развиват IgG антитела срещу тях, което досега не е наблюдавано при пациенти с други мозъчни заболявания или здрави хора^(381, 589). Освен това, ние открихме, че иРНК нивата на *SOX6* значително корелират с тези на *SOX8* ($\rho = 0.510$), което е наблюдавано и в TCGA проекта както в ГБМ, така и в НСГ⁽¹²⁰⁾.

Нашите резултати показват силно увеличена регулация на *SOX2* ген в нашата група пациенти, но без това да го прави независим маркер с клинично или прогностично значение. *SOX2* генната експресия е широко изследвана в поредица от проучвания сочещи, че промяна в експресията на *SOX2* може да бъде важна за туморогенезата при някои видове малигнни образувания, като рак на стомаха - понижена експресия се свързва с неблагоприятната ОП^(573, 590). От друга страна изследвания, изследващи ГБМ и медулобластоми разкриват свръхекспресията на *SOX2*, като индуцираща инвазия и миграцията на глиомните клетки, което предполага, че де-регулацията на *SOX2* допринася за туморното развитие⁽⁵⁹¹⁾ и е свързана с лоша прогноза⁽⁵⁸⁷⁾. От друга страна, *SOX2* показва, че има отношение в разграничаването и молекулярния отпечатък на проневроналната субгрупа ГБМ⁽⁵⁹²⁾, въпреки че в данните на TCGA проекта се асоциира и с характерния генен профил на класическата група⁽¹²⁰⁾. Различни механизми като генна амплификация, промоторно хипометилиране, транслационна регулация, и активиране на сигналните пътища, участват в регулацията на *SOX2* при ГБМ пациенти и агресивността на заболяване^(591, 593). Други проучвания нямат еднозначен резултат в опита си да съпоставят повишената експресия с прогноза на заболяването⁽⁵⁹⁴⁻⁵⁹⁹⁾. Тези резултати не намаляват значимостта на *SOX2* експресията в глиалните туморите, а предполагат, че нивата на *SOX2* са съпроводени от други промени, засягащи например генната експресия подпомагайки действието на *SOX2* в иницирането растежа на туморните клетки⁽⁵⁸⁷⁾.

Нашето изследване е едно от малкото, които анализират данни за преживяемост при пациенти с глиома във връзка със *SOX2*, *SOX6*, *SOX8* и *SOX9* експресия в комбиниран със състоянието на мутация *IDH1*. Въпреки че повечето от публикациите докладват наличие на маркери на стволови клетки като *SOX2* по-често при глиобластом, съвсем наскоро увеличена експресия на *SOX2* е открита при голям брой пациенти с анапластична глиома и с див тип *IDH1* ($p=0.020$), но статистическа значима връзка с прогноза не се наблюдава⁽⁶⁰⁰⁾. Нашите резултати показаха по-висока експресия на *SOX2* при ГБМ и ААIII в сравнение с нормалната мозъчна тъкан, но не е установена връзка с *IDH1* мутации. Вместо това, нивата на експресията на иРНК за *SOX6* и *SOX8* значително корелират с наличието на *IDH1* мутации. Схемата за класификация на Verhaak и сътр разграничава ВСГ в четири субгрупи (проневронална или PN, невронална, мезенхимална и класическа), но не позволява да се предсказва общата преживяемост на пациентите в тези субгрупи⁽¹²³⁾. Sun и сътр⁽⁶⁰¹⁾ разширяват предишните проучвания върху глиомната класификация, базирайки се на гени паралелно ко-експесиращи се с EGFR (EGFR модул-EM) или с PDGFRA (PDGFRA модул-PM) в глиоми, като тази схема на класифициране е силен инструмент за разграничаване при възрастните ниско- и високо-стадийните дифузни глиоми на три основни подтипа (EM, PM и EM^{ниско}PM^{ниско}) в зависимост от преживяемостта на пациентите, както и според транскриптомните и геномни характеристики⁽⁶⁰¹⁾. В EM са наблюдавани глиоми специфични за невроналните стволови клетки маркери като NES и EGFR, както и важни транскрипционни фактори - POU3F2, NFIA и *SOX9*, регулиращи астроцитния произход /астрогенезиса/. Докато в PM глиоми се наблюдава значителна експресия на гени, участващи в регулацията на олигодендрогенезиса (*PDGFRA*, *OLIG1*, *OLIG2*, *SOX6*, *SOX8* и други), проневроналната подгрупа се характеризира с висока *PDGFRA* амплификация и *IDH1* мутации. Последните от изброените беше установено, че се срещат с висок процент и при PM глиоми⁽⁶⁰¹⁾, което потвърди, наблюдаваната от нашето изследване положителна корелация между нивата на иРНК на гените *SOX6* или *SOX8* и *IDH1* мутации. Освен това е налице информация, че промените в *SOX8* и *IDH1* има тенденция да бъдат събития с едновременно присъствие както при ГБМ, така и в ниско-стадийните глиоми (НСГ), докато тези засягащи *SOX6* и *IDH1* има тенденция на съвместното присъствие само при НСГ, а при ГБМ се характеризират като взаимно изключващи се⁽¹²⁰⁾. Независимо че в изследваната от нас група пациенти преобладава броя на ГБМ тумори, в групата характеризираща се с *IDH1* мутации наблюдавахме тенденция за едновременно наличие и на по-висока *SOX6* експресия, най-вероятно поради наличието на НСГ в нашето проучване, които от своя страна са и пробите с по-висок процент на *IDH1* аберации. Iuchi и сътр съобщават подобна връзка между *SOX8* свръхекспресията и *IDH1* мутация⁽⁶⁰²⁾.

SOX8 и *SOX9* принадлежат към една и съща група протеини на SOX семейството, споделяйки сходна структура и геномна организация, а свръхекспресията на *SOX8* е наблюдавано, че допринася за трансформацията на нормалните в ракови клетки по аналогичен

начин на действието на *SOX9*. Въпреки това, в сравнение с широко изследвания *SOX9*, *SOX8* в много по-малка степен е проучван и съответно информацията за неговата роля е много оскъдна при туморите и по-специфично, в мозъчната туморогенеза. Нашето изследване показва, че *SOX8* експресията не се асоциира с никой от клиничните параметри (възраст, степента на тумора и диагноза). Друго изследване^(387, 237) наблюдава значително повишени иРНК *SOX8* нива в по-голямата част от изследваните ниско-стадийни дифузни астроцитомии и ОД тумори^(387, 237). Такава асоциация не беше открита в нашето изследване, вероятно поради малкия брой пациенти с глиоми СЗО стадий II. Въпреки това, ние изследвахме наличието му в няколко ОД СЗО III, където нивата на експресия варират в широк диапазон, както и в ГБМ, където нивата *SOX8* иРНК бяха по-ниски при около 90% от ГБМ. Ние открихме, че пациенти с ниско *SOX8* иРНК показват неблагоприятна ОП. *SOX8* експресията е обратнопропорционална на *SOX9* и *SOX10* експресията при ОД и експерименти с нокаут на *SOX8* показват засилване на функцията на другите два SOXE фактора⁽⁶⁰³⁾. Това може да е причина за наблюдаваните ниски нива на *SOX8* при пациенти с по-напреднал стадий и по-агресивни мозъчни тумори. Iuchi и сътр съобщават за значително по-високи експресионни нива на *SOX8* в олигодендроглиални тумори ($p < 0.0001$) и тумори с мутант *IDH1* протеин ($p < 0.0001$)⁽⁶⁰²⁾, докато ние открихме асоциация не само с НСГ, но също така и с цялата група от злокачествени глиоми, включително ГБМ и АА. Макар и без статистическа значимост, се наблюдава тенденция за връзка между наличието на увеличена регулация на *SOX8* и *IDH1* мутации ($p = 0.122$), докато при астроцитните тумори без *IDH1* мутации се наблюдава обратната тенденция, пациентите с високи или нормални нива на *SOX8* тумори с тенденция да показват по-добре оцеляване, отколкото тези с ниска *SOX8* експресия (5.9 месеца), въпреки че и тази разлика не е статистически значима ($p = 0.523$). Наблюдаваните резултати може да се дължат на преобладаващото количество от ГБМ пациенти в групата с див тип *IDH1*. Повече от половината от групата притежаващи *IDH1* мутации се състои от пациенти, които са били диагностицирани с глиоми различни от ГБМ, а от всички ГБМ три от случаите в тази група са се развили от по-ниско стадийни глиоми.

Въпреки че повечето от SOX гените, показват поведение на онкоген, иницирането на клетъчната пролиферация инхибира клетъчното остаряване и си колаборира с други онкогени при неопластичната трансформация⁽⁴⁷¹⁾, някои от тях може да проявяват диаметрално противоположен функционална роля в други видове туморни заболявания и могат да играят роля като туморсупресорни гени, блокирайки растежа на туморите⁽⁶⁰⁴⁾. Пример за такъв ген е *SOX9*, които е от критично значение за ембрионалното развитие и тъканна хомеостаза в няколко органи. Неговата свръхекспресия често се наблюдава при хепатоцелуларен карцином, рак на кожата, простатата, белия дроб и мозъка, действащи като онкоген, силно асоцииран с прогресията на тумора и лошата прогноза^(590, 605-607). От друга страна, в някои случаи на меланома и колоректален карцином, се проявява като туморсупресор, намалявайки туморогеността^(578, 608). Kaplan-Meier анализът на преживяемостта показва значително по-ниска обща преживяемост (13.4 месеца) на пациенти с глиома и с повишени иРНК *SOX9* нива в сравнение с тези на пациенти с понижени *SOX9* иРНК (24.7 месеца; $p = 0.013$). Тези данни подкрепят хипотезата за проонкогенното поведение на *SOX9* при пациентите с глиома. Нещо повече, съобщава се, че по-високите експресионни нива играят важна роля в глиомното развитие и прогресия⁽³⁹³⁾. От клинична гледна точка, повишената експресия на *SOX9* в глиома пациенти значително корелира с възрастта и вида на резекция, но нито с туморния СЗО стадий ($p = 0.927$), нито с KPS статуса ($p = 0.195$). В контраст с получения от нас резултат, Wang и сътр съобщават за тясна връзка между нивото на иРНК *SOX9* и клинично-патологични фактори като СЗО стадий и KPS статус, което предполага тенденцията увеличението на *SOX9* иРНК да води до прогресия в туморния стадий и да е свързано с по-нисък KPS⁽³⁹³⁾. Това несъответствие може да се дължи на малкия брой пациенти с по-нисък стадий в нашата група, която е доминирана от пациенти със стадий IV. Въпреки че не е наблюдавана значима корелация между *SOX9* експресията и *IDH1* мутационния статус на пациентите, тези без наличие на *IDH1* мутации, експресиращи нормални нива *SOX9*, имат значително удължена преживяемост в сравнение с тези с по-високи *SOX9* нива ($p = 0.002$). Досега няма известно публикувано проучване изследващо връзката на *SOX9* генната експресия във връзка с *IDH1* мутационния статус.

Анализ на възможните прогностични маркери, използващи многовариантни регресионни модели, определя възрастта, *IDH1* мутационен статус, KPS статус, *SOX9* и *SOX8* иРНК като

независими прогностични фактори за пациенти с глиоми. Няколко многовариантни регресионни модели, различаващи се с присъствието на *SOX8* и *SOX9* иРНК-и бяха тествани, което разкри интересни резултати. В модел А силно изразена експресия на *SOX9* имаше отрицателна прогностична стойност и *IDH1* мутации както се очакваше се откриха като независим прогностичен фактор. За разлика от тях, в модел В, *IDH1* мутация отново се отличиха като маркер за по-добра преживяемост ($p=0.013$), но *SOX8* експресията загуби своята прогностична стойност. Това може да се дължи на наблюдаваната значителна положителна корелация между мутационния статут на *IDH1* и *SOX8* експресия. Въпреки че наличието на *IDH1* мутация се съобщава в много проучвания като силен независим прогностичен фактор дори при група с ГБМ тумори^(156, 442), от модела С, където всички променливи са тествани заедно, ниските нива на *SOX8* иРНК експресия и високите нива на *SOX9* експресия се проявиха като значими неблагоприятни прогностични маркери (съответно $p=0.020$ и $p=0.002$), докато *IDH1* мутациите загубиха своята прогностична стойност.

Въпреки широко разпространената експресия на *SOX8* и неговата роля в неврогенезата, миши модели, дефицитни на *SOX8*, генерират нормални олигодендроцити⁽³⁸⁶⁾, вероятно поради биохимичното сходство на членовете в SOXE групата. Това е причината, поради която се предполага, че липсата на *SOX8* може да се компенсира от *SOX9* и *SOX10*, както *SOX8* може да компенсира липсата на *SOX9*⁽⁶⁰³⁾. От друга страна, *SOX* гените участват в регулацията на редица процеси на развитие^(590, 609, 610), като потенциални туморни супресори или инициатори в различни малигнени образувания. Последните проучвания в туморогенезата установяват, че *SOX* семейството транскрипционни фактори се очертава като важен регулатор на Wnt сигнално-трансдукционния път, който регулира клетъчната пролиферация и миграция, както и съдбата на клетките по време на ембрионалното развитие, действието на клетките като стволови и тъканата хомеостаза⁽⁶¹¹⁾. Каноничните функции на Wnt пътя се регулират от транскрипционния коактиватор β -катенин (CTNNB1), който често е свръхекспресиран при ВСГ^(612, 423). Високата му активност се наблюдава, че корелира значително с по-лошата прогноза при пациенти с рак на гърдата, стомаха и дебелото черво, както и да служи като полезен прогностичен маркер при астроцитомии и ГБМ⁽⁶¹³⁾. Повишеният цитозолен β -катенин повлиява взаимодействието му с промотори на различни целеви гени, като например с-Мус кодиращ транскрипционен фактор, с нарушена регулация в човешки ракови заболявания⁽⁶¹⁴⁾. Има доказателства в литературата, че MYC може да стимулира експресията на двата основни глутамат транспортери, с цел увеличаване приема на глутамат и получаване на допълнителни количества алфа-кетоглутарат (α -KG) в резултат на двустъпален процес на глутаминолиза⁽⁶¹⁵⁾. В тумори с *IDH1* мутация има намалено производство на α -KG за сметка на увеличения синтез на 2-хидроксиглутарат (2-HG), който представлява реалния онкометаболизъм. α -KG е важен кофактор за няколко α -KG-зависими диоксигенази, които променят 5-метил цитозин в 5-хидроксиметил цитозин, водещи до деметилиране и следователно до активно действаща епигенетична регулация^(616, 509, 617, 510). За *SOX9* и *SOX8* в литературата има данни, че са свързани с WNT/ β -катенин пътя и канцерогенност при различни видове рак^(618, 619).

Въпреки, че механизмите, с които се нарушава регулацията на *SOX8* при МГ остават неизяснени, въз основа на информацията, че някои *SOX* гени, като *SOX9* например, имат диаметрално противоположна функционална роля – като онкоген и туморсупресор^(590, 605-607) при различните видове рак може да се предположи, че това се отнася и за *SOX8*. Има данни, че свръхекспресия на *SOX8* иницира туморогенезата при хепатоцелуларния карцином⁽⁶¹⁹⁾. Предстои да бъде изяснен механизма на взаимодействие между ефекта на *IDH1* мутации и *SOX8*, *SOX9* експресия при раковите заболявания в детайли. В заключение, нашите данни предполагат, че свръхекспресия на *SOX9* иРНК и намалената експресия на *SOX8* иРНК са тясно свързани с неблагоприятните клинични резултати на пациенти с глиоми. Тези наблюдения са направени независимо от прогностичното значение на маркери като възраст, диагноза, KPS статус и мутации в *IDH1* ген, в подкрепа на хипотезата, че от избраните 4 *SOX* гени, както *SOX8*, така и *SOX9* са обещаващи прогностични биомаркери за пациенти с глиоми.

5.6. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ (aCGH)

Глиомите при хората над 18 годишна възраст представляват изключително смъртоносна група тумори, а геномните промени засягащи броя ДНК копия са ключови генетични събития в тяхната туморогенезата. Характерни изменения както при нововъзникналите, така и при рецидивиращите мозъчни тумори, са открити в различни райони на генома водещи до промени в броя на копията - дупликации и делеции. Докато някои от тези области съдържат известни (или кандидат) онкогени и туморосупресорни гени, в други райони гените имащи съответна биологична връзка със заболяването остават за сега неразкрити. Интересна особеност на глиалните тумори е тяхното фенотипно разнообразие. Също толкова сложни са и генотипните профили идентифицирани с помощта на съвремените молекулярно-генетичните изследвания, като aCGH. Фенотипната и генотипна хетерогенност показват, че причина за развитието на глиалните тумори не представлява единично, изолирано генетично събитие, а по-скоро е резултат от кумулативното въздействие на редица изменения с еднаква посока на действие⁽⁶²⁰⁾.

5.5.1. АГРЕГАЦИОНЕН АНАЛИЗ

В настоящия дисертационен труд с помощта на различни агрегационни анализи (STAC и GISTIC) в изследваната група от глиоми (НСГ и ВСГ) идентифицирахме най-често засегнатите и характерни за глиомите геномни изменения, а именно – загуба в хромозомни участъци 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 19q, 22q, и увеличен брой копия на хромозома 7, 14q, 19p, 19q, 20p, 20q и 22q. Събитието наречено амплификация (увеличен брой копия) отразява последиците от фокалното увеличение на ДНК съдържанието, което от своя страна обичайно се асоциира със специфично нарастване експресионните нивата на генните, разположени в засегнатите ампликони. Освен това амплификациите могат да водят до нарастване на броя копия както в част от хромозомния участък, така и да обхваща цели хромозоми⁽⁶²¹⁾. В литературата при глиомите са наблюдавани най-често амплификация на локусите 7p и 4q^(622, 623), като събитието с най-висока амплификационна честота, особено при ГБМ, е това в локус 7p12, където се намира и гена *EGFR*. Това е и най-често наблюдаваната промяна засягаща онкогени, която води до свръхекспресия на *EGFR*. *EGFR* се свръхекспресира в различни видове рак, което предполага ключовата му роля в патогенезата на тези заболявания. Амплификацията на *EGFR* е открита в 30-50% от всички ГБМ, като се появява по-често в първични ГБМ и ускорява процесите на растеж и инвазивност, като определя и резистентност на туморните клетки към лъче- и/или химиотерапия^(624, 625). В диагностичната практика все повече невропатолози изследват *EGFR* статуса на пациентите с цел по-точното идентифициране и поставяне на хистологична диагноза при неопластичните астроцитомии. Наличието на *EGFR* амплификация се счита за силно доказателство, че туморът е ГБМ, или поне, че би трябвало да бъде третиран като ГБМ, дори когато характерните за ГБМ хистологичните критерии (некроза и микроваскуларна пролиферация) не се наблюдават⁽⁶²⁴⁾.

Освен това амплификация и на други гени, кодиращи рецепторните тирозин киназа (RTK) имат ключова роля в туморогенезата на глиомите и е основен фактор за растежа на тумора чрез активиране на MAPK сигналния път. До 50% от ГБМ имат амплификация на RTK, включващи освен *EGFR*, *KIT*, *VEGFR2*, *PDGFRA* и *MET*. Високо ниво на амплификация на RTK гените изглежда сравнително по-късно събитие в туморогенеза на ГБМ, и обикновено високо амплификационно ниво показва само един от RTK⁽⁶²⁶⁾. По-голямата част от първични ГБМ притежават амплификация и/или мутация засягащи RTK, както следва: рецептора на епидермалния растежен фактор или (*EGFR* 40-50%), тромбоцитен растежен фактор рецептор α (*PDGFRA*, $\approx$ 15%), или рецептор на хепатоцитен растежен фактор (*MET*, $\approx$ 5%)⁽¹²⁰⁾. Такъв белтък, кодиран от гена разположен в засегнатия район в 7-ма хромозома е *MET* (Mesenchymal epithelial transition factor). Известен е като протоонкогенен тирозин-киназен рецептор на хепатоцитния растежен фактор. При възрастните, експресията му е ограничена до наличие в стволовите и прогениторни клетки, като е необходим за зарастване на рани и регенерация на хепатоцитите. В ембриона тези рецептори се експресират върху клетките от епителен произход, като са от съществено значение за инвазията при растежа и спомагат епително-мезенхимния

преход (ЕМТ). Активиране на този път при възрастните индивиди води до развитие на повече от 155 болести, множество от които различни видове инвазивни тумори^(627, 628). Мутациите открити в *MET* гена се свързват с по-лоша прогноза, тъй като водят до неконтролируемостта на клетъчно делене, ангиогенеза и метастазирание⁽⁶²⁹⁾.

Плексин А4 (**PLXNA4**), който служи като рецептор за клас 3 семафорини, притежава пряко участие в аксоналното насочване по време на развитието на централната и периферната нервна система. Например доказано е, че **PLXNA4** ограничава неправилното разпространение на мхести нервни влакна в СА3 региона на мишия хипокампус, насочва дървовидните разклонения на базалните дендрити във V слоя на кортикалните неврони и симпатиковите аксони, както и участва в образуването на слоевете и синапсите във външния край на ретината при мишки⁽⁶³⁰⁾. В литературата има данни, че *PLXNA4* е замесен при редица невродегенеративните заболявания. С помощта на GWAS проучване, изследващо вариантите с ниска честота при пациенти с късно начало на болестта на Алцхаймер е било установено, че гена *PLXNA4* показва най-силна асоциация⁽⁶³¹⁾. Досега *PLXNA4* не е свързан с възникването и развитието на мозъчни тумори, но има данни за връзката между увеличения брой копия и наличието на меланом⁽⁶³²⁾. Редица изследвания показват връзката на семафорините и неуропилините при туморите, като предполагаеми туморсупресорни гени или като медиатори на туморната инвазия и метастазирание⁽⁶³³⁻⁶³⁵⁾. Допълнителна асоциация между плексините и туморите се потвърждава от тяхната възможност да свързват и функционално да активират тирозин-киназни рецептори като *MET*, *RON*, *HER2* и *KDR*⁽⁶³⁶⁻⁶³⁸⁾. Тези данни водят до предположението, че плексините могат да участват в туморната инвазия и метастатичния потенциал на раковите клетки. Единични случаи анализират експресионните нива на индивидуални плексини в малигнените образувания⁽⁶³⁹⁻⁶⁴¹⁾.

В Таблица 5.6 са показани всички гени, разположени не само в районите на хромозома 7, но и извън, показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации“ (маркирани в червено) и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и участващи в процеси водещи до развитието на малигнените заболявания. Освен вече разгледаните *EGFR*, *MET*, *PLXNA4*, които са по-широко застъпени в литературата, интерес представляват и *PXDN*, *ADAP1*, *SKAP2*, *ARHGEF10*, *MARCH9*, *TSPAN31*, *TSFM*, *METT21B*, *AGAP2*, *METTL1*, *CYP2A*, *CYP27B1*, *CDK4*, *MDM4* и *CST3*.

Пероксидазите са хем-съдържащи ензими с добре запазена структура, обслужващи различни функции в растителното и животинското царство⁽⁶⁴²⁾. Те катализират окислението на различни субстрати в присъствието на H_2O_2 , като при бозайниците имат важна роля в редица физиологични процеси, включително самозащита и хормонален биосинтез. **PXDN** е уникален член на семейството пероксидази, защото неговия каталитичен домен е заобиколен от домени, характерни за протеините на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ). Те включват левцин богата последователност, богата и на C2-тип имуноглобулинови домени, локализирани в N-края на протеина, докато vWF C-тип домена е локализиран към C-терминалната част на протеина. **PXDN** е описан за първи път в *Drosophila melanogaster*⁽⁶⁴³⁾, но има недостатъчно информация за човешкия **PXDN**. Според проучванията на Horikoshi и сътр⁽⁶⁴⁴⁾ *PXDN* се експресира в почти всички човешки тъкани, но въпреки това функцията му сред бозайниците, остава все още неизяснена⁽⁶⁴⁴⁾. Съществуват хипотези, че индукцията на **PXDN** може да е свързана с промени в ROS метаболизма по време на апоптоза, но все още нямат потвърждение⁽⁶⁴⁴⁾. В изследване Li и сътр⁽⁶⁴⁵⁾ откриват завишени нива на белтъка по клетъчната повърхност на различните видове клетки изграждащи микроваскуларните съдове на първичните и метастатични глиални тумори. Експресията му се асоциира не само с ГБМ, но и с редица ракови заболявания като меланом, овариален карцином, рак на гърдата, и не се наблюдава в нормални тъкани⁽⁶⁴⁶⁾. Mitchell и сътр⁽⁶⁴⁷⁾ откриват, че гена кодира антагонист на рецептора на интерлевкин 1, докато друго изследване го идентифицира като индуцируем фактор по време на p53-зависимата апоптоза, предполагайки връзка между *PXDN* експресията и производството на свободни кислородни радикали в резултат на апоптозата⁽⁶⁴⁴⁾. Li и сътр⁽⁶⁴⁵⁾ установяват увеличени експресионните нива на белтъка по клетъчната повърхност на глиомните ендотелиални клетки на микроваскуларните съдове с до 17 пъти в сравнение с нормалните клетки. Подобни открития са установени за кръвоносните структури при болни с бъбречен карцином, което предполага

функционирането му като фактор в туморната ангиогенеза на различните малигнени образувания⁽⁶⁴⁸⁾. Поради това, че PXDN е повърхностно разположен белтък и е достъпен за фармацевтични вещества в бъдеще има вероятност да бъде използван като мишена за анти-ангиогенна прицелно лечение⁽⁶⁴⁵⁾.

Таблица 5.6. Данни получени от агрегационния анализ на значимите райони в групата от 58 пациента от типа „увеличен брой копия”

Хр	Локус	Размер б.дв.	Честота %	Р-ст-ст	% припокриване с описани CNV	Гени (GISTIC)
2	p25.3	72101	48.28	<0.001	47.06	PXDN
7	p22.3	142134	62.07	0.001	49.98	ADAP1, C7orf50, COX19
	p15.2	51139	74.14	<0.001	0.00	SKAP2
	p11.2	142968	63.79	<0.001	3.99	EGFR (EGFR, MET)
	q32.3	207244	75.86	0.003	0.17	PLXNA4
8	p23.3	161969	41.38	<0.001	20.47	ERICH1-AS1, ARHGEF10
		104594	37.93		34.55	
9	q34.3	102054	39.66	<0.001	48.34	COL5A1
11	q13.2	101499	36.21	<0.001	1.57	Няма
	q25	156445	43.10	<0.001	38.56	Няма
		77640	46.55		0	
12	q14.1	45952	8.6÷25	0.005	58.30	(MARCH9, TSPAN31, TSFM, METT21B, AGAP2, METTL1, CYP2A, CYP27B1, CDK4)
20	p11.21	88295	37.93	<0.001	3.86	CST3
	q13.33	223827	37.93	<0.001	16.09	Няма

червен цвят – гени, намиращи се в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации”, с връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система

p42IP4/центаурин-α1 (от скоро наименуван **ADAP1**) е 42 kD ГТФ-азен активиращ протеин от семейството на АДФ рибозилиращите фактори, който се свързва с лигандите фосфатидилинозитол 3,4-бифосфат, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат и инозитол (1,3,4,5)-тетрафосфат^(649, 650). Експресиращ се главно в нервната тъкан и е широко разпространен в човешкия мозък⁽⁶⁵¹⁾. Въпреки че физиологичната роля на p42IP4 още не е ясна, интересно е да се отбележи, че взаимодействието на този протеин с други белтъци води до участието му в процесите, регулиращи амилоид прекурсорния белтък (APP) и неговото разграждане.

SKAP2 е ген кодиращ Src асоцииран фосфопротеин, който се експресиращ основно в клетките на скелетния мускул, бъбреците, белия дроб, далака и периферните левкоцити. Белтъкът се характеризира с наличие на плекстрин хомоложен домен, който вероятно играе роля за свързването му към липидите в плазмената мембрана, Src хомоложен участък (SH3) в С-края и суперспирализиран (coiled-coil domain) домен в N-края, който позволява хомодимеризация на две молекули. Информацията за ролята на **SKAP2** в клетките, в които се експресиращ е ограничена. Съществуват данни, че фосфопротеина регулира клетъчната адхезия по време на развитието на клетките на имунната система и играе ролята на цитозолен адаптор при взаимодействието на интегриновите рецептори с актиновия цитоскелет. Съществува малък брой изследвания на ролята на **SKAP2** в патогенезата на различни заболявания. Установено е например, че наличието на допълнителни копия **SKAP2** се свързва с развитието на тумори на панкреаса⁽⁶⁵²⁾. Соматични точкови мутации в гена са описани при меланома⁽⁶⁵³⁾, тумори на яйчниците, дебелото черво и панкреаса, лимфома и други, макар ролята им за онкогенезата да не е изяснена⁽⁶⁵⁴⁾.

ARHGEF10 е член на семейство ARHGEF Rho-специфични, гуанин-заместващи фактори, широко разпространени при човека⁽⁶⁵⁵⁾. Те могат да активират RhoA, като повишават активността на Rho ГТФ-азите и изпълнителя на тази RhoA-Rho-киназната активност, играе важна роля в процеса на атеросклеротичния мозъчен инфаркт⁽⁶⁵⁶⁾. Rho ГТФ-азите играят основна роля в множество клетъчни процеси, които са провокирани от извънклетъчните

стимули, чрез активирането на G протеин-свързаните рецептори ⁽⁶⁵⁷⁾. ARHGEF10 има и важно участие в миелинизация на периферните нерви по време на развитието ѝ ⁽⁶⁵⁵⁾. Промени в този ген се асоциират с болести, като умствено изоставяне, шизофрения, рак на гърдата и на ендометриума и други ⁽⁶⁵⁸⁾.

Протеази и протеазни инхибитори са добри кандидати, отговорни за патофизиологични процеси, свързани с нарушена функция на ЕЦМ. Един от тези протеазни инхибитори е цистатин С (**CST3**), секретирани в различни тъкани и телесни течности, който е потенциален инхибитор на лизозомалните протеинкинази ⁽⁶⁵⁹⁾. Цистатините са протеазни инхибитори, които са специфично активни срещу лизозомните цистеинови протеази. Членовете на това суперсемейство имат най-малко един цистатинов домен, състоящ се от 100 аминокиселинен полипептид, който се нагъва в пет-верижан β -лист, частично обвиващ централната α -спирала. Трите различни видове цитостатини са тези без наличие на секреторни сигнали (цистатин А и В), тези съдържащи секреторни сигнали (цистатин С, D, M, F, S, SN, и SA) и тези, които представляващи многодоменни кининогени (плазмени протеини) ⁽⁶⁶⁰⁾. Цистатин С е силен инхибитор на няколко катепсини (например катепсин S -лизозомен ензим, присъстващия в пигментните епителни клетки на ретината) ⁽⁶⁶¹⁾. Установено е, че мутации в гена *CST3* водят до исландската форма на наследствена церебрална хеморагия с амилоидоза (HCHWA-I), което е доминантно заболяване, характеризиращо се с мозъчен кръвоизлив и ранна смърт. При това заболяване, замаяната на аминокиселината левцин с глутамин в позиция 68 води до мутантен вариант на цистатин С, който лесно образува амилоидни отлагания по стените на кортикалните артерии и води до летален изход ⁽⁶⁶²⁾. По литературни данни изменения в този ген се наблюдават и при болни с болест на Алцхаймер, редица туморни заболявания, като глиобластома, рак на гърдата, пикочния мехур, менингиом и много други.

При рецидивиращи тумори са установени амплифицирани райони, засягащи хромозома 12, с големина от 44Мб до 1.479Мб и в него са включени различни участъци предимно засягащи 12q съдържащ до 41 различни гени. На ред с другите гени като значими промени в изследваната от нас група от всички гени в локус 12q14.1 отдиференцирахме гените *CYP27B1*, *METTL1* и *TSM* при 16 пациента (27%), *CDK4* и *AGAP2* при 6 пациента с ГБМ (10%). В допълнение, амплификацията на хромозомен район 12q15 (при 12 пациента) обхваща гена *MDM2* заедно със *SLC35E3* и *CPM* гените при 5 случая (8%). Амплификация на хромозомен район 12q13–15 беше наблюдавана при значителна част от ГБМ, което е в пълно съответствие с публикуваните досега данни ⁽⁶⁶³⁾. Противоположно на наблюдаваното в локус 7p11.2, в 12q13-15 често събитие е участието на множество гени, чиято експресия засяга както увеличеното количество иРНК, така и броя ДНК копия. От всички гени разположени в този локус само *METTL1*, *CYP27B1* и *TSM* бяха наблюдавани систематично да са засегнати при туморите, показващи промени в 12q. В литературата има данни за висока честота при ГБМ на ко-амплификация на гените *CDK4* и *MDM2*, намиращи се в района 12q13-15, свързвана с предимството на клетките към канцерогенеза ⁽⁶⁶⁴⁾. В изследваната от нас група беше наблюдавана предимно амплификацията на *CDK4*, без да се наблюдава връзка с тази на *MDM2*. За разлика от тези гени, относително малко се знае за ролята на другите ко-амплифицирани и свръхекспресирани гени локализирани в 12q13-15, въпреки че са наблюдавани и при други видове тумори. От тези гени по-специално внимание обърнахме на *CYP27B1* (P450 Цитохром 25-хидроксивитамин-D3-1-алфа-хидроксилаза), който катализира превръщането на калцидиола в калцитриол, който представлява най-активния метаболит на витамин D, и участва в клетъчната пролиферация проявявайки, както антипролиферативен, така и ефект в клетъчната диференциация ⁽⁶⁶⁵⁾. Обратно, ролята на *METLL1* - ядрен белтък, който катализира образуването на N (7)-метилгуанин в позиция 46 (m7G46) на тРНК, инактивиран в отговор на агонисти на PI3-киназния път или на класическата MAP киназна каскада, и *TSM* (ген, който кодира EFTs хондрични превод коефициент на удължение) при ГБМ, заслужават допълнително изследване, до какъвто извод водят и предходни проучвания ⁽⁶⁶⁶⁾.

Таблица 5.7. Гени, намиращи се в локус на 12 хромозома, показали значими промени в изследваната група от 58 пациента и техните биологични характеристики

Ген	Молекулна функция и участие в биологични процеси	Връзка със заболяване
<i>AGAP2</i>	определя насоката на аксоналното развитие, негативна регулация на невроналния апоптотичен процес и белтъчния катаболичен процес, белтъчен транспорт, регулация на ARF ГТФ-азната активност; сигнална трансдукция, медирана от малки ГТФ-ази; свързващи ГТФ, фосфолипиди, метални йони и по специално Zn^{2+}	лимфосарком, рак на простатата, глиобластом, простатит, множествена склероза, невронитис
<i>TSPAN31</i>	положителна регулация на клетъчната пролиферация	ембрионален остеосарком, хистиоцитом, невробластома, липо-, рабдо- и лейомиосарком
<i>CDK4</i>	взаимодейства с АТФ и катализира циклин-зависимата протеин киназна; осъществява регулация и прехода G1/S по време на митотичното клетъчно делене, положителна регулация на клетъчната и фибробластна пролиферация, белтъчно фосфорилиране, регулация на генната експресия, сигнална трансдукция и лекарствения отговор	Няма публикувани
<i>MARCH9</i>	Участва в белтъчното убиквитиниране; има лигазна активност; взаимодейства селективно и нековалентно с (Zn^{2+}) йони	Няма публикувани
<i>CYP2A</i>	калцидиол 1-монооксигеназна активност; Хем (Fe)-свързваща активност	белодробен емфизем, склеродерма, чернодробни заболявания, лупус еритематозус, хепатит панкреатитис.
<i>METTL1</i>	притежаващ тРНК (гуанин-N7-)-метилтрансферазна активност, участва в РНК (гуанин-N7)-метиране, тРНК модификация	хиперкалцемиа, множествена склероза
<i>METTL21B</i>	Притежава метилтрансферазна активност. Взаимодейства с членове от семейството на heat shock белтъците 70 и 90. с шарперони от семейството на TCP-1, както и с HSPD1, STIP1 и тубулин; (вероятно някои от тези белтъци са субстрат на метилови групи)	хепатоцелуларен карцином и множествена склероза
<i>TSFM</i>	фактор, активиращ транслационната елонгация, участва в регулацията на ДНК-зависимата транскрипция и транслационно удължаване	атипичен липоматозен тумор, енцефаломиопатия, митохондриални болести

От друга страна хомозиготните мутации са чест индикатор за локализацията в тези геномни позиции на туморсупресорни гени, а идентифицирането на такива събития в туморните клетки са изключително важни събития, които с помощта на високо-резолютивната способност на метода aCGH е значително улеснено. Докато най-честото хомозиготно делеционно събитие включва *CDKN2A* (p16)^(621, 622), LOH на хромозома 10 е най-честата генетична промяна в ГБМ, и се среща при 60-80% от случаите⁽¹⁷⁶⁾. Загуба на цялата хромозома е често наблюдавано събитие, както и описаните частични делеции в три региони, което предполага, че повече от един туморсупресорни гени могат да са локализиращи в 10^{-та} хромозома⁽²⁶⁾. При първичните и вторичните ГБМ LOH 10q се наблюдава със сходна честота⁽¹⁷⁶⁾, докато LOH 10p е по-характерно за първичните ГБМ⁽⁶⁶⁷⁾. В резултат на LOH в 10q е установен един от туморсупресорните гени – *PTEN*, локализиращ в 10q23.3⁽⁶⁶⁸⁾. *PTEN* е фосфатаза, което инхибира PIP3 сигналния път и по този начин потиска активността на АКТ и mTOR, като инхибира клетъчната пролиферация. Мутации в него се наблюдават при 15-40% от ГБМ⁽⁶⁶⁹⁾, с по-висока честота при първичните ГБМ^(176, 667). В изследваната от нас група пациенти гените, в райони показали значими изменения от типа „генетични загуби – делеции“ (**Табл. 5.8** маркирани в синьо) и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, са следните 20 - *TAF12*, *UBE2K*, *DDX43*, *SENP6*, *SGK1*, *PEX7*, *LATS1*, *TIAM2*, *MTAP*, *CAMK1D*, *GCH1*, *ESR2*, *MTHFD1*, *FUT8*, *NUMB*, *SPG11*, *CSNK1G1* и *SHCBP1*.

Таблица 5.8. Данни получени от агрегационния анализ на значимите райони в групата от 58 пациента от типа генетични загуби

Хр	Локус	Размер /н.дв/	Честота %	P- ст-ст	% CNV	Гени
1	1p35.3	78716	36.21	<0.001	3.37	<i>GMEB1, TAF12</i>
4	4p14	129967	48.28	<0.001	15.60	<i>LIG, PDS5A, UBE2K</i>
	4q13.3	148366	48.28	<0.001	0	<i>GRSF1, MOB1B, MOBKL1A</i>
6	6q13	62267	44.83	<0.001	2.56	<i>DDX43, MTO1</i>
	6q14.1	53533	39.66	<0.001	3.50	<i>SENP6</i>
	6q23.2	79893	37.93	0.01	12.89	<i>SGK1</i>
	6q23.3	56429	39.66	<0.001	0	<i>PEX7</i>
	6q25.1	75926	43.10	<0.001	7.09	<i>GINM1, LATS1</i>
	6q25.2	216163	37.93	0.01	0.44	<i>TIAM2</i>
	6q25.3	124438	37.93	0.01	1.19	<i>TMEM181, TULP4</i>
9	9p21.3	13729	56.90	<0.001	0	<i>MTAP, OK/SW-cl18</i>
10	10p14-13	664669	53.45	0.021	15.73	<i>CAMK1D</i>
	10q26.11	70737	67.24	0.012	2.28	<i>SFXN4</i>
12	12q24.31	11857	41.38	<0.001	0	<i>ZCCHC8</i>
13	13q14.11	37042	36.21	<0.001	0	<i>MRPS31</i>
		10525	37.93	<0.001	10.60	<i>NAA16, NARG1L</i>
	13q14.2 -3	314570	36.21	<0.001	2.94	<i>RCBTB1</i>
	13q14.3	242342	36.21	<0.001	13.30	<i>DLEU2, KPNA3</i>
14	14q13.2	77490	36.21	0.014	13.09	<i>KIAA0391</i>
	14q21.1	96396	37.93	0.001	1.46	<i>SEC23A, TRAPPC6B</i>
	14q22.2-3	24112	37.93	0.001	25.89	<i>GCHI</i>
	14q23.2	10597	43.10	<0.001	0	<i>SYNE2</i>
		123041	37.93	0.001	4.22	<i>ESR2, MTHFD1</i>
	14q23.3	17540	37.93	0.001	45.60	<i>FUT8</i>
	14q24.2	112408	37.93	0.001	0	<i>SIPA1L1</i>
		101206	41.38	<0.001	4.17	<i>RBM25, ZFYVE1</i>
		104878	41.38	<0.001	24.76	<i>HEATR4, NUMB</i>
	14q24.3	133643	36.21	0.014	0	<i>VXS2</i>
15	15q15.1	46192	43.10	<0.001	0	<i>CHP1, EXD1</i>
		26072	43.10	<0.001	0	<i>RTF1</i>
		46023	37.93	0.001	0	<i>SNAP23</i>
	15q15.3	306576	44.83	<0.001	0.55	<i>EIF3J</i>
		34099	50.00	<0.001	8.52	<i>SPG11</i>
	15q22.31	101110	36.21	0.009	0.26	<i>CSNK1G1, TRIP4</i>
		95318	36.21	0.009	3.55	<i>ZNF609</i>
	15q22.2	119940	37.93	0.001	6.66	<i>FAM81A</i>
16	16q11.2	143604	37.93	<0.001	0.11	<i>SHCBP1</i>

син цвят – гени, намиращи се в райони показали значими изменения от типа „генетична загуба – делеция“, с връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система

Често срещано събитие е делецията на хромозомен район 9p21, систематично включващ туморсупресорния ген *CDKN2A*, в асоциация с *CDKN2B*, често и с участието на *MTAP*^(670, 671) в съответствие с нашите резултати. Интересно е да се спомене, че в литературата съществуват данни за делеции на гена *MTAP*, които се наблюдават като независимо събитие от загубата на *CDKN2A*. Това предполага, че загубата на *MTAP* може да играе важна роля в туморогенезата. Освен това хомозиготните мутации в *MTAP* оказват силно влияние на експресия на неговата иРНК, което подкрепя потенциалната му роля като туморсупресорен ген. *MTAP* е ген кодиращ ензим, който играе важна роля в метаболизма на полиамините и е важен за осъществяване на повторното използване, както на аденин, така и на метионин. Ензимът катализира обратното фосфорилиране на S-метил-5'-тиоаденозин (МТА) в аденин и 5-метилтиорибозил-1-фосфат. Участва в разграждането на МТА, който е основен продукт от полиаминовия биосинтез. Този ензим се експресира във всички нормални човешки тъкани, но липсата му се наблюдава в много ракови заболявания, включително глиома, меланома, недребноклътенчен белодробен

карцином, колоректален карцином, рак на гърдата и панкреаса⁽⁶⁶⁶⁾. Хомозиготната мутация в този ген е лош прогностичен фактор при болните с гастроинтестинално раково заболяване⁽⁶⁷²⁾. Асоциира се и с редица други заболявания, като болест на Паркинсон и не-Хочкинов лимфом.

Транскрипционният фактор TFIID е един от основните, необходими за започването на точна и регулирана транскрипция с участието на РНК полимеразата II. TFIID съдържа ТАТА-свързващ протеин (TBP) и TBP-свързани фактори (TAFIIIs). Много от TAFIIIs са участници не само в TFIID комплекса, но също така и в SAGA (SPT-ADA-GCN5-ацетилтрансфераза), PCAF (p300/CREB-свързващ протеин-асоцииран фактор), STAGA (SPT3-TAF9-GCN5-L ацетилтрансфераза) и TFTC (без TBP, TAF-съдържащ комплекс) комплексите. Молекулярната структура на TAFs е изключително еволюционно консервативна⁽⁶⁷³⁾. Специфичните хистон-подобно нагънати домени (HFDs) се изследвани и се смята, че имат изключително важна роля в структурната организация на няколко TAFs. Структурни изследвания показват, че TAF6 и TAF9 съдържа HFDs, които са подобни на коровите хистони H3 и H4 и си взаимодействат като образуват хетеротетрамер подобен на този между хистоните H3 и H4^(674, 675). От друга страна hsTAF4 и hsTAF12 си взаимодействат също чрез HFDs-подобни домени, сходни съответно на тези имащи H2A и H2B⁽⁶⁷³⁾. В TFIID, тези два тетрамера вероятно се асоциират образувайки октамерна конфигурация, улеснявайки свързването на TFIID промоторите, в хроматина⁽⁶⁷⁶⁾. **hsTAF12** медира транскрипционната активност на ATF7 чрез директно взаимодействие между двата фактора. Протеинът ATF7 е член на семейство транскрипционни фактори, които са зависими от цикличен-АМФ свързващи протеини (CREB)/активиращи транскрипционни фактори (ATF), имащи доста разностранни функции: 1) могат да взаимодействат с аденовирус E1a онкопротеин, осигурявайки част от неговата транскрипционна активност; 2) хетеродимеризират с Jun, Fos или други транскрипционни фактори, вероятно модулиращи тяхната ДНК-свързващ специфичност; 3) могат да се свържат и с промотора на стрес-индуцираната протеин киназа (JNK2)⁽⁶⁷⁷⁾.

Протеинът **SPG11** е потенциален трансмембранен протеин, който се фосфорилира при ДНК увреждане. Дефекти в този ген са причина за болестта спастична параплегия тип 11 (SPG11)⁽⁶⁷⁸⁾.

DDX43 гена (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) е полипептид известен също като HAGE, идентифициран като ген за антиген при рак на тестисите в човешки сарком-клетъчни линии⁽⁶⁷⁹⁾ и е установено, че се свръхекспресира в различни видове солидни тумори и злокачествени хематологични заболявания⁽⁶⁸⁰⁻⁶⁸²⁾. Наскоро нарушения в промоторното хипометилиране на **DDX43** бяха наблюдавани при хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) и се свързват с прекомерна експресия на неговата иРНК⁽⁶⁸³⁾.

Убиквитин-зависимата протеолитична система е основния път за селективно разграждане на протеин в еукариотните клетки. Пътят на убиквитиниране обикновено включва три класа ензими, включително убиквитин активиран ензим (E1), убиквитин - конюгиращ ензим (E2 или **UBE2K**), и убиквитин лигаза (E3)^(684, 685). Убиквитинът първо се активира от E1 чрез образуване на тиоестерни връзка между С-терминален глицин на убиквитина и цистеинов остатък на E1 и след това се прехвърля върху цистеиновия остатък на E2. E2 самостоятелно или в комбинация с E3 катализира образуването на връзка между С -терминалния глицин на убиквитин и ε-амино групата на лизиновите остатъци върху целеви протеини. Убиквитинираният протеин едва тогава се разпознава и бива разграден от 26S протеазомния комплекс⁽⁶⁸⁶⁾. Голям брой E2 ензими съществуват и функциите им включват участие в поправката на ДНК, прогресията на клетъчния цикъл, биогенеза на органели, секреция и отговор на стрес.

Системата от малки убиквитин-подобни модификатори (SUMO) е отговорна за модифицирането на голям брой клетъчни протеини. Модифицирането от идентичните SUMO-2 и -3 и от специалния членът SUMO-1 от семейството имат широк спектър от функции, включващи процеси от регулирането на субклетъчното локализиране до активирането на транскрипционни фактори, белтъчната стабилност и клетъчния отговор на стрес. Балансът между SUMO конюгирането и деконюгиране се поддържа от семейство на шест SUMO протеази (SEN1-3 и 5-7), които също са отговорни за получаването на краен зрял SUMO белтък⁽⁶⁸⁷⁾. Шестте протеази притежават различна субстратна специфичност, дължаща се не само на диференцирано предпочитание към членове на семейството SUMO, но също и на база

различната субклетъчна локализация. SENP1 и SENP2 са показали, че се локализируют в комплекса на ядрените пори и в ядрената плазма, като за кратко може да преминават и в цитоплазмата. За разлика от тях двете свързани SENP (SENP3 и SENP5) са локализирани в ядрцето, въпреки че SENP5 участва и в митохондриалната морфология. И двете SENP6 и 7 са локализирани в кариоплазмата. Установена е била и митотична функция на SENP6, който заедно със SENP7 участва в освобождаване на веригите спрегнати от SUMO-2/3^(688, 689). Клетките, при които липсва белтъка SENP6 показват метафазното хромозомно струпване и дефекти в делителното вретено⁽⁶⁹⁰⁾.

Серумната, глюкокортикоидна-индуцирана серин-треонинова киназа (SGK1) функционира в резултат на появата на стрес от околната среда. Той е силно консервативен ензим в еукариоти и има 45-55% хомология (в каталитичния домен) с Akt/протеин киназа B, цАМФ - зависима протеин киназа и протеин киназа C. Други две SGK изоформи (SGK2 и SGK3) са идентифицирани въпреки, че тяхната функция все още не е много ясна⁽⁶⁹¹⁾. На ниво на единична клетка, разнообразието от екологични стресови събития (напр. осмотичен стрес, топлинен шок, оксидативен стрес, и ултравиолетово облъчване), водещи до увеличена генна експресия, спомагат за клетъчното оцеляване, пролиферация и диференциация. На нивото на организъм, SGK играе ключова роля в регулацията на солевата концентрация и хиповолемия. При тези условия, стероидни хормони (алдостерон и глюкокортикоиди) индуцират SGK транскрипцията, което води до повишена бъбречна Na⁺ реабсорбция⁽⁶⁹²⁾.

Гена **PEX7** кодира цитозолен рецептор, специфичен за набора от пероксисомни матрични ензими насочени към органел чрез пероксисом насочващ сигнал 2 (PTS2). PEX5, PEX7 и PEX2 принадлежат към машината отговорна за импорта в пероксисомите. Ролята на PEX5 и PEX7 е добре охарактеризирана, като всеки един от тях, осигурява един от двата основни начина на пероксисомалния матричен белтъчен внос⁽⁶⁹³⁾. PEX7, представляващ втория основен път на ендцитоза и не присъстващ във всички организми, отговаря за транспорта само на няколко ензими в пероксисомите. Дефекти в този ген водят до пероксисомни нарушения в биогенезата, които се характеризират с множество дефекти във функциите на пероксисомите⁽⁶⁹⁴⁾.

Белтъкът **LATS1**, кодиран от този ген вероятно е серин/треонинова киназа, която е локализирана в митотичния апарат и в комплексите регулиращи клетъчната циклин зависима киназа 2 (CDC2) в ранните етапи на митозата. Протеинът се фосфорилира в зависимост от етапа на клетъчния цикъл – късно в профазата, което остава и по време на метафазата. N-терминалната област на протеин се свързва с CDC2 и образуват комплекс, като се наблюдава намалена H1 хистон-киназна активност, показваща ролята си на негативен регулатор на комплекса CDC2/циклин A. От друга страна, C-терминалният киназен домен свързва своя N-терминален край, което влияе като негативна регулация на образуването на комплекси чрез вътрешномолекулно свързване⁽⁶⁹⁵⁾. Биохимичните и генетични данни го определят като туморсупресорен белтък. При изследвания в миши модели се наблюдава развитие на сарком на меките тъкани, тумори на яйчиците и висока чувствителност към терапия с канцерогенни вещества⁽⁶⁹⁶⁾. Човешкият ген **LATS1** е локализиран в локус 6q24-25 и хетерозиготни мутации в него са наблюдавани при овариален⁽⁶⁹⁷⁾, цервикален⁽⁶⁹⁸⁾, и рак на гърдата⁽⁶⁹⁹⁾. В литературата има данни, че иРНК и белтъчната регулация на LATS1 е понижена при глиомите в сравнение с нормалните мозъчни тъкани. Освен това понижена **LATS1** експресия има значителна отрицателна корелация със СЗО стадия и KPS статуса ($p < 0.001$ и $p < 0.001$) при пациентите с глиома. Пациентите с понижена **LATS1** експресия показват по-кратка обща преживяемост, отколкото пациентите с по-високи нива на генна експресия. В литературата мултивариационният регресионен анализ показва, че нивото на **LATS1** експресия е независим предиктивен фактор ($p < 0.001$) за оцеляването на пациентите с глиома⁽⁶⁹⁵⁾, което предстои да бъде проучено и в изследваната от нас група. От друга страна свръхекспресията на **LATS1** не само води до G2-M клетъчен арест чрез инхибиране на CDC2 киназната активност при *in vitro* туморни клетъчни линии с локализация гърда⁽⁷⁰⁰⁾, но и значително инхибира туморогенезата *in vivo* чрез индуциране на апоптозата⁽⁷⁰¹⁾. Освен това изследвания проведени наскоро демонстрираха, че хиперметирането на **LATS1** генния промотор, води до понижаване в експресионните му нива, и е често наблюдавано събитие при редица туморни образувания, като рак на гърдата и астроцитом^(702, 703).

TIAM2 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 2) генът кодира хомолог на човешкия TIAM1 протеин, специфичен гуанин заменящ фактор, който увеличава клетъчната инвазивност в Т-клетъчната лимфома, увеличава клетъчната миграция във фибробластите и предизвиква клетъчно разпространение и това на израстъците в нервните клетки. Той също така увеличава клетъчната адхезия, инхибира инвазията в епителните клетки, участва в развитието на невроните и при човешките злокачествени заболявания. Въпреки, че ролята на TIAM1 е добре характеризирана, значителен интерес представлява дали дерегулацията на физиологичните и патологичните функции на TIAM2 също допринасят за развитието на рак при човека. Има данни, че нарушената регулация на TIAM1 има връзка с туморогенезата в злокачествени заболявания, като рак на дебелото черво. Други автори смятат, че *TIAM2* е нов тумор-асоцииран ген и индуцираната му експресия може да допринесе за фенотипа на инвазивен хепатоцелуларен карцином⁽⁵⁸³⁾.

CAMK1D е ген кодиращ член на Ca^{2+} /калмодулин-зависима протеин киназа 1 от подсемейство на серин/треонинови кинази. Белтъците от това семейство са изследвани главно в неврони и лимфоцити, и функцията им в различни клетъчни процеси. CAMK1D участва в регулацията на функцията на гранулоцитите чрез пътя на хемокин-сигналната трансдукция. CAMK1D има 77% аминокиселинна хомология с останалите CAMK1 белтъци, и е първият клониран от гранулоцити, където взема участие в хемоатрактантния отговор⁽⁷⁰⁴⁾. Въпреки, че ролята на тези белтъци в раковите заболявания до голяма степен остава неизследвана, наскоро бе открито, че участват в регулацията на клетъчната пролиферация в MCF7 туморните клетки, локализирани в гърдата⁽⁷⁰⁵⁾.

SFXN4 (sideroflexin 4) е ген, кодиращ протеин локализиран в митохондриалната мембрана. Най-вероятно участва в осъществяването на йонен транспорт. Заболявания, свързани със SFXN4 включват сидеробластна анемия, болест на Алцхаймер и рак на гърдата. Gylfe и сътр⁽⁷⁰⁶⁾ изследвайки семейства с фамилен колоректален карцином идентифицираха 11 гена показващи връзка със заболяването един, от които е *SFXN4*.

ГТФ циклохидролаза I (**GCHI**) катализира първата и скоростно-определящата реакция в тетрахидробиоптериновата (BH4) биосинтеза. BH4 е важен кофактор за редица ензими, участващи в различни биосинтетични процеси, включително тирозин хидроксилазата (TH) и NOS (азотен оксид синтазата), както и фенилаланин хидроксилазата и триптофан хидроксилазата. *In vitro* изследвания показват, че нивата на BH4 са в тясна зависимост с хидроксилиране на L-тирозин (L-DOPA) и синтез катехоламин⁽⁷⁰⁷⁾.

Естрогенът е хормон, контролиращ много клетъчни процеси, включително растежа, диференциацията и нормалното функциониране на репродуктивната система. При жените, основните цели на естрогена са яйчниците, матката, влагалището и млечните жлези. При мъжете, целеви органи са тестисите, простатата и епидидимиса. Естрогенът е отговорен за растежа и поддържането на скелета и нормалното функциониране на сърдечно-съдовата и нервната системи. Естрогенът осъществява своите биологични ефекти чрез свързването си с естрогенови рецептори - алфа (ESR1) и наскоро открития бета (ESR2). Естрогеновите рецептори са лиганд-активирани транскрипционни фактори, принадлежащи към суперсемейство ядрени рецептори. Двата рецептора притежават високо сходство в ДНК-а и лиганд-свързващите домени, но се различават по транскрипционно-активирания домен, което показва възможността да са насочени към различни видове гени⁽⁷⁰⁸⁾. Няколко изследователи докладват, че понижените експресионни нива на ESR2 или промяната в съотношението ESR1/ESR2 засягат епителните клетки при рака на яйчника, в сравнение с нормалната тъкан^(709, 710). Загуба експресията на ESR2 се наблюдава също и при рак на гърдата, на дебелото черво и простатата, както и при злокачествените заболявания, които имат някои сходни етиологични функции с рак на яйчниците⁽⁷¹¹⁾.

MTHFD1 е ген кодиращ 100 kDa никотинамид аденин дифосфат (NADP +)-зависим цитоплазмен ензим, който играе важна роля в метаболизма на фолиевата киселина. Ензимът се състои от два функционални домени - N-терминален (33 kDa), съдържащ дехидрогеназна и циклохидролазна активност, и по-големия (67 kDa) синтетазен в C-терминалния край. Активността на MTHFD1 е от съществено значение за синтеза на ДНК, като осигурява 10-формил-THF и 5,10-метил-THF необходими за *de novo* синтеза на пуринови бази и тимидилат⁽⁷¹²⁾. MTHFD1 е жизненоважен ензим, особено в бързо делящите се клетки, такива

като тези на ембриона, където пурините и пиримидините са един от основните градежни елементи на *de novo* синтеза на ДНК.

Генът **FUT8** кодира ензим, принадлежащ към семейството на фукозилтрансферазите. Продуктът на този ген катализира трансфера на фукоза от ГДФ-фукоза към първия глюко-*N*-ацетилов остатък. Този ензим е различен от други фукозилтрансферази, които катализират α -1-2, α -1-3, и α -1-4 прибавянето на фукоза. Експресията на този ген се свързва с развитието на злокачествени заболявания и техните инвазивни, и метастатични възможности.

Белтъкът, кодиран от **NUMB** гена играе важна роля в определянето на клетъчната съдба по време на клетъчното развитие. Той е мембранно-свързан, чието разграждане бива индуцирано по протеозомно-зависим начин с помощта на MDM2, и се свързва с други важни белтъци - EPS15, LNX1 и NOTCH1⁽⁷¹³⁾. Участва в процеса на неврогенеза и е необходим през целия процес на ембрионална неврогенеза да поддържа нервните стволови клетки, наричани още радиални глиални клетки (RGCs), като позволява на клетките произлезли от тях да изберат прогениторната пред невроналната клетъчна съдба. Освен това участва в изграждането на субвентрикуларната зона в неврогенезата чрез регулиране на невробластната преживяемост и целостта на епендималната стена. Също така участва в поправката на локални повреди в мозъчните вентрикуларни стени⁽⁷¹⁴⁾. Заболявания, свързани с промени в експресията на този белтък, са редица злокачествени образувания (рак на гърдата, колоректален карцином, левкемия, астроцитом и др), както и тези свързани с нарушения в нервната система – болест на Алцхаймер, периферна невропатия и т.н.

CSNK1G1 е серин - треонинова протеин киназа. Казеин киназа I (KK1) е мономер серин - треонин протеин киназа със 7 изоформи. Казеиновите кинази се характеризират с тяхното субстратно предпочитание към киселите протеини като например казеин. KK1 изоформите фосфорилират голям брой протеини и участват в Wnt и Hedgehog (Hh) сигналните пътища. KK1 алфа фосфорилира бета-катенина като част от процеса на разграждане, когато Wnt не е свързан с неговия рецептор. При свързване на Wnt към неговия рецептор, CK1 епсилон фосфорилира междуклетъчния сигнализиращ протеин, а CK1 гама директно фосфорилира LRP5/6 корецептора. Тези действия на KK1 улесняват сигналната трансдукция чрез транскрипционните фактори (TCF), които регулират транскрипцията на Wnt гени. Освен това регулират бързото предаване на синаптичния сигнал с помощта на глутамата. KK1 участва в редица клетъчни процеси, включително поправка на ДНК, клетъчно делене, ядрената локализация и мембранен транспорт.

SHCBP1 играе роля в сигналните пътища, регулиращи клетъчния растеж, пролиферация и диференциация. Смята се, че може да е компонент на нов сигнален път разположен след този на Shc. Действа като положителен регулатор на FGF сигналния път в невроналните стволови клетки⁽⁷¹⁵⁾.

5.5.3. ЙЕРАРХИЧНО ГРУПИРАНЕ

Йерархично групиране вследствие групиране базирано на пълно сходство (CLHC) доведе до разграничаването на 4 групи, 2 от които показаха значими различия в преживяемостта. Значимите изменения наблюдавани като съществени разлики между двете клъстерни групи, бяха открити в хромозоми 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 и 19. Най-голям процент от събития са локализирани в хромозома 7, 8 и 10 - в клъстерната група 1 се наблюдават главно делеционни събития в хромозома 8 и 10, за разлика от група 4, при която в хромозома 8 преобладава увеличени брой копия, а в 10-та хромозома се наблюдават сравнително малък брой аберации. В **Таблица 5.9** са показани всички гени в районите показали значима промяна между двете групи. В групата от пациенти оформящи клъстер 1 наблюдаваните аберации довели до редукция в броя на копията при над 70% от пациентите, засягат 9 гена и един псевдоген, като тези изменения не се наблюдават в нито един от членовете на групата формираща клъстер 4. Гените, в райони показали значими изменения и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата са отдиференцирани **UPF2**, **DHTKD1** и **SAMK1D** (в **Табл.5.9** –маркирани в синьо). И трите гена се намират в хромозома 10, локализирани в p14-p13, като засегнатия регион обхваща 589 587 б.дв. Високата честота на LOH в хромозома 10, и по-конкретно 10p14-15, е наблюдавано при редица

туморни заболявания, като глиоми⁽⁷¹⁶⁾, медулобластоми⁽⁷¹⁷⁾, белодробни карциноми и ендометриални⁽⁷¹⁸⁾, хепатоцелуларни⁽⁷¹⁹⁾, простатни⁽⁷²⁰⁾ и други карциноми. Тези открития предполагат наличието на туморсупресорен ген в този локус⁽⁷²¹⁾, а до момента *KLF6* е идентифициран като един от туморсупресорните гени⁽⁷²²⁾, което предполага възможността за наличието и на други с важно значение за туморогенезата. *UPF2* гена кодира протеин, който е част от мултибелтъчен комплекс, действащ след процеса на белтъчно снаждане, като участва в изнасянето на иРНК от ядрото и съблюдава за изпълнението на нейната структурна и функционална роля, като разгражда тези съдържащи появилите се преждевременно терминални кодони. Заболявания, при които са наблюдавани нарушения във функцията на този белтък са колоректален карцином и болест на Алцхаймер, но досега няма данни за връзка с възникването на мозъчни тумори.

Друг потенциален туморсупресорен ген е *DHTKD1*, който кодира един от компонентите участващ в митохондриалния 2-оксоглутарат дехидрогеназен комплекс. Въпреки, че физиологичната функция на този белтък остава до голяма степен неизвестна⁽⁷²³⁾ се смята, че комплекса е отговорен за превръщането на цялото количество 2-оксоглутарат в сукцинил-КоА и CO₂, както и за катаболизирането на няколко аминокиселини, включително лизин, L-хидроксизин и L-триптофан. Мутациите в този ген се свързват с 2-аминоадипинова, 2-оксоадипинова ацидурия и Charcot-Marie-Tooth заболявания, и по-конкретно тип 2Q^(724, 725).

Гените, в райони показали значими изменения от типа „увеличен брой копия – дупликации“ (**Табл.5.9**, маркирани в червено) и с молекулни функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, са разположени единствено в 7^{-ма} хромозома. Отдиференцирахме следните кандидат гени: *ADAP1*, *CYP2W1*, *GPER*, *INHBA*, *EGFR*, *MAGI2*, *GNAI1*, *SEMA3C*, *FEZF1*, *CADPS2*, *PLXNA4*, *PTN*, *ADAP1*, *EGFR* и *PLXNA4* са гени, посочени като замесени в патогенезата на това раково заболяване в нашата извадка от пациенти и вече описани в т.5.5.2. *CYP2W1* е един от ензимите в суперсемейството на цитохром P450, които са монооксигенази и катализират много реакции, свързани с лекарствения метаболизъм и синтеза на холестерол, стероиди и други липиди. В литературата нарушения във функцията на този ген се свързват с рак на гърдата, стомаха, и дебелото черво, рабдомиосарком, като експресията на *CYP2W1* се асоциира с по-ниска преживяемост при пациентите с колоректален карцином (КПК) стадий II и III^(726, 727). *CYP2W1* е избрана като привлекателна мишена за лечението на КПК, като използва способността му да превръща някои неактивни вещества в активни, позволявайки излявата им като цитотоксични метаболити. Тази хипотеза е потвърдена както *in vitro*, така и *in vivo* в миши модел⁽⁷²⁸⁾. В този контекст изследване механизмите, които контролират експресията на *CYP2W1* е от първостепенно значение, тъй като това може значително да увеличи броят на пациенти, които ще се възползват от такава специфична терапия, включващо първоначалната индукция на *CYP2W1* (в случаите на ниска или липсваща експресия), и впоследствие третиране с *CYP2W1* специфични медикаменти. Ключът за управлението на *CYP2W1* регулацията може да се открие чрез изучаване начина на експресия и връзката му с развитието.

ALK трансмембранный тирозин-киназен рецептор и неговите лиганди, растежните фактори PTN (плейотропин) и МК (мидкин) са широко експресирани по време на развиващата се нервна система, както и в други органи и системи. Всеки от тези гени се свързва с развитие на малигнени процеси засягащи различни клетки и органи. Като изключим неговата важна роля за развитието на рака, ALK рецепторния път се смята, че допринасят за развитието, функция и поправката на нервната система, както и за метаболитната хомеостаза, и поддържането на тъканна регенерация. ALK рецепторна активност при туморите могат да бъдат регулирани чрез амплифициране, свръхекспресия, свързване с лиганд, мутации във вътреклетъчния домен на рецептора и от активността на рецептора на тирозин фосфатаза PTPRz⁽⁷²⁹⁾. В настоящето изследване ние откриваме значима корелация с амплификацията на *PTN*, който индуцира растежа на аксоните и е митогенен за фибробласти, епителни и ендотелни клетки. Свързва ALK киназата, която предизвиква активиране на MAPK пътя, важна стъпка в анти-апоптотичната сигнализация на *PTN* и регулация на клетъчната пролиферация. В ЦНС, експресията на *PTN* е висока в невроепителните прогениторни клетки, в глиални, и невронални клетки по време на тяхното развитието, но след перинаталния период от развитието и при напълно развилия се вече мозък се характеризират с над 10 кратна редукция

до много ниски нива на експресия на *PTN* и е силно ограничена до специфична популация от невронални клетки ⁽⁷³⁰⁾. В контраст на наблюдавания и ограничен експресионен профил в нормалните тъкани на възрастните индивиди, високи експресионни нива на *PTN* са детектирани при редица туморни клетъчни линии, както и при първични тумори, като рак на гърдата ⁽⁷³¹⁾, на белия дроб ⁽⁷³²⁾, менингиом ⁽⁷³³⁾, невробластом ⁽⁷³⁴⁾ и други солидни тумора. *PTN* действа като важен митогенен, хемотаксичен и ангиогенен фактор в туморни ксенографти от меланом ⁽⁷³⁵⁾, и от карцином на гърдата ⁽⁷³⁶⁾. При панкреатични и меланомни клетъчни линии инактивирането на гена водят до редуциране на туморния растеж и метастазирането, и в допълнение до анти-ангиогенен ефект ^(737, 738). Онкогенната активност на *PTN* по време на туморния растеж е потвърдена при трансфектиране на клетъчни линии с негова кДНК ⁽⁷³⁹⁾.

INHBA кодира бета А субединицата на белтъчния хетеродимер инхибин, като присъединяване на алфа субединицата води до образуването му, което резултира в инхибиране секрецията на фоликуло-стимулиращия хормон (FSH), секретирани от хипофизата. Високите експресионни нива на *INHBA* се асоциират с по-добрия прогностичен резултат, упражняващ роля на туморсупресорен и анти-ангиогенен фактор при пациенти с невробластом ⁽⁷⁴⁰⁾. Междувременно, неговата експресия корелира с туморната агресия и лошите клинични резултати при пациенти с карцином на хранопровода ⁽⁷⁴¹⁾. Тази двупосочност на действието може да се обясни с двойната роля, която изпълнява TGF- β сигналния път, като туморсупресорен и проонкогенен фактор. TGF- β сигналният път се характеризира със сложна роля в туморните клетки, медирайки способността на клетките да участват в отрицателна или положителна насока в процесите инхибиране на растежа, пролиферацията, репликация, инвазия, метастазиране, апоптоза и ангиогенеза. Например, дефекти водещи до развитие на карциногенеза чрез инактивиране функцията на участници в TGF- β сигналния път, проявявайки туморсупресорна активност в ранните фази на туморното развитие, в по-късните етапи може да проявят онкогенна функция. Тази функционална промяна в различните етапи на туморогенезата, които изпълнява TGF- β сигналния път, вероятно се дължи и на различията в произхода на раковите клетки ⁽⁷⁴²⁾. Заболявания, с които е асоциирана високата амплификационна активност на *INHBA* са рак на гърдата и белодробен карцином.

Друг ген, който представлява интерес за нас и връзката му с глиалната туморогенеза е *GPER* (7p22). *GPER* е рецептор свързващ естрогена, което води до мобилизация на вътреклетъчния калций и синтез на фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат в ядрото. Следователно този белтък играе роля в бързите, независими от закодираните в генома сигнали, често наблюдавани след стимулиране на клетките и тъканите с естроген. Заболявания, с които се свързва промяната в експресията на този ген са рак на гърдата и овариален карцином ⁽⁷⁴³⁾, но до сега няма изследванията проучващи значимостта му в глиални тумори. Аналогичен е случая с *GNAII*, който кодира един от гуанин нуклеотид-свързващите протеини (G протеини), включени като модулатори или преобразуватели в различни трансмембранный сигнални системи. G протеините са включени в хормоналното регулиране на аденилат циклазата, като я инхибират в отговор на бета-адренергични стимули. Смята се, че имат важно значение при клетъчното делене.

Гените имащи отношение към развитието и функционирането на нервната система са *SEMA3C*, *CADPS2*, *FEZF1* и *MAGI2*. *SEMA3C* се свързва с членове на семейството белтъци-плексини и притежава функция на стимулатор аксоналния растеж, като по този начин играе роля не само за растежа, но и за насоката на неговото развитие. Аналогично *FEZF1* представлява транскрипционен репресор, който участва в аксоналната проекция и правилното диференциране на обонятелните сетивни неврони. Играе роля във формирането на ретро-каудалната ос в междинния мозък и субталамуса.

Таблица 5.9. Увеличен/намален брой копия наблюдавани в групата от пациенти в клъстер 1 в сравнение с тези в клъстер 4

	Хр	Локус	Размер б.дв.	Честота в група 1 %	Честота в група 4 %	Ген (Установена връзка със заболяване)
НБК	1	p31.3	176855	7.32	37.50	PDE4B (биполярно разстройство, шизофрения)
		p21.2	28002			FRRS1
	3	p24.3	489110	7.32	37.50	DAZL, AK309946, MIR3714
		p24.3	216883	4.88		UBE2E2
		p22.1	139537	4.88		CCR8, SLC25A38, SNORA6, RPSA, SNORA62
		p21.31	201221	2.44		CCR2, CCR5, CCRL2, LTF (Болест на Адисон, Болест на Алцхаймер, Паркинсонова болест; множествена склероза, Lofgren's синдром, атеросклероза, цервикален рак, невродегенеративни болести, меланома, саркоидо-за, ревматоиден артрит, болест на Крон, Ендометриоза, Sjogren's синдром, Wegener's грануломатозис и др.
		p21.31	441958	7.32		KIF9-ASI, AK096853, KIF9, KLHL18, PTPN23, BC067356, SCAP, ELP6, C3orf75, BC041406, CSPG5, SMARCC1
		p21.31	421172	4.88		SPINK8, FBXW12, KIAA0407, KIAA0407, PLXNB1, CCDC51, TMA7, CCDC72, ATRIP, TREX1, SHISA5, IP6K2, PFKFB4, UCN2, MIR711, COL7A1, UQCRC1, TMEM89, SLC26A6, MEGF2, MIR4793, CELSR3, NCKIPSD, P4HTM, DKFZp586D1521, WDR6, DALRD3, MIR425, MIR191, CS266631, NDUFAF3, C3orf60, IMPDH2, BC009321, QRIC1
		p21.31	35431			BSN, APEH, MST1, RNF123, AMIGO3, GMPPB, IP6K1, IHPK1, CDHR4, UNQ9392/PRO34300,CDH29, FAM212A, C3orf54, MIR5193, UBA7, TRAIIP
		p21.31	233015			MAPKAPK3
		p21.33-21.32	217040			2.44
		p21.1	125506	2.44		PHF7, SEMA3G, TNNC1, NISCH, STAB1, FELE-1, NT5DC2, SMIM4, LOC440957
	4	p14	129967	56.10	12.50	LIG, UBE2K, BC018885, PDS5A
	6	p21.31	9728	4.88	37.50	PNPLA1
	10	p14- p13	589587	70.73	0.00	C10orf47, PROSER2, AK056703, UPF2, DHTKD1, SEC61A2, CR611074, NUDT5, CDC123, CAMK1D
		q11.21	78236	63.41		ZNF487P
	12	q12	138296	14.63	50.00	CR749517, AX747898, AY236870
		q24.31	96093	39.02	0.00	MORN3, TMEM120B
	14	q13.2	264542	41.46	0.00	SRP54, FAM177A1, C14ORF10, PPP2R3C, AK128559, KIAA0391
		q21.1	96396	43.90		SEC23A, SIP1-beta, SIP1, GEMIN2, TRAPPC6B
		q22.2-q22.3	24112	43.90		GCH1 (Паркинсонова болест)
		q22.3	69046	39.02		MAPK1IP1L
		q23.1	332861	39.02		ACTR10, PSMA3, BC034618, FLJ31306, CR627086, AK055868, BC104151, BC112974, ARID4A, TOMM20L, TIMM9, KIAA0586
		q23.2	10597	48.78		SYNE2
		q23.2	123041	41.46		ESR2, TEX21P, MTHFD1 (Болест на Алцхаймер, Паркинсонова болест, атеросклероза, биполярно разстройство, тиреоидит на Хашимото, колоректален карцином, рак на ендометриума, хормонален дисбаланс, хипертония,

У Б К					пременструални симптоми, рак на простатата, на стомаха, на матката, на гърдата (естроген-прогестерон зависима), на белия дроб, шизофрения, левкемия, дефекти на нервната тръба, ревматоиден артрит)
		q24.2	141400	41.46	<i>SNORD56B, LOC145474, SIPA1L1</i>
		q24.3	118320	46.34	<i>NUMB, AK055876, C14orf169, HEATR4</i>
		q24.3	277180	39.02	<i>BC038204, PTGR2, ZADH1, ZNF410, FAM161B, COQ6, ENTPD5, CD39L4, C14orf45, CCDC176, ALDH6A1, MMSADHA</i>
		q24.3	133643	39.02	<i>VXS2, PMP69, ABCD4, VRTN, C14orf115</i>
	19	q13.33	115204	14.63	50.00 <i>ZNF616, ZNF836, PPP2R1A</i>
		q13.42	195613	17.07	62.50 <i>NLRP9, RFPL4A, NLRP11, PYPAF6, NLRP4, NLRP13</i>
	7	p22.3	142134	73.17	25.00 ADAPI , <i>COX19, CYP2W1, FP15621, MIR339, GPRI46, C7orf50, GPER</i>
		p22.2	83630	60.98	<i>NM_001099942, LFNG, MIR4648, C7orf27, BRAT1, IQCE</i>
		p22.1	70918	56.10	<i>RNF216-IT1, TRIAD3A, RNF216</i>
		p21.3	192081	73.17	<i>THSD7A</i>
		p21.1	228268	65.85	<i>HDAC9</i> (HDAC инхибитор-индуциращ спиране на клетъчния растеж)
		p15.3	253491	56.10	<i>ITGB8</i>
		p15.3	886529	58.54	<i>SP4, DNAH11</i> (дегенерация на ретината)
		p15.3	152381	56.10	<i>MGC87042, STEAP1B, AK123961, LOC100506178,</i>
		p15.2	610060	60.98	<i>AK057379, MIR148A</i>
		p15.2	45687	68.29	<i>SKAP2</i>
		p15.1	69628	70.73	<i>JAZF1</i>
		p14.2	169318	65.85	<i>ELMO1</i>
		p14.1	106509	65.85	<i>C7orf10</i>
		p14.1	478985	70.73	INHBA , <i>BC047446, BC037931, INHBA-AS1</i>
		p13	203003	60.98	<i>KIAA0322, HECW1, BC020168, LOC100506895</i>
		p13	441224	58.54	<i>RAMP3, ADCY1</i>
		p11.2	170807	80.49	EGFR , <i>U48725, U48729, CR618371, EGFR-AS1</i> (мозъчен рак – анапластичен астроцитом, мултиформен глиобластом, ракови заболявания в главата и шията, белодробен, чернодробен, рак на гърдата, стомаха, панкреаса, простатата, колоректален карцином, плоскоклетъчен карцином на шийката на матката, токсичност и отговор към лечение с gefitinib, системен лупус еритематозус, меланома, поликистозна бъбречна болест, простатен карцином, простатна хиперплазия, чувствителност към радиация)
		q11.21	34003	65.85	25.00 <i>BC042811</i>
		q11.22	10646	65.85	
		q11.22	200005	78.05	
		q11.22	503316	65.85	<i>WBSCR17, CALN1</i>
		q21.11	1569936	85.37	37.50 MAGI2 , <i>AK311103, MAGI2-AS3, GNAIL, GNAT3, CD36, SEMA3C</i> (атеросклероза, инсулинова резистентност, колоректален карцином, диабет тип 2; чернодробна болест)
		q31.1	231470	85.37	50.00 <i>IMMP2L</i>

	q31.32	261696	85.37		FEZF1 , AK057037, FEZF1-AS1, CADPS2
	q32.3	333438	90.24		PLXNA4
	q33	31824	85.37		PTN
8	q21.3	126567	0.00	37.50	NECAB1
	q22.1	752804	0.00	25.00	TRIQC, BC089453, C8orf87, LINC00535, FAM92A1
	q22.1	784957	0.00		AX747981, MIR3150B, MIR3150A, PLEKHF2, C8orf69, C8orf37, LOC100616530
	q22.1	186963	0.00		SDC2 (диабет тип 2, диабетна нефропатия, нефропатия при други заболявания)
	q22.1	309217	0.00		MTDH, LYRIC, LAPTM4B, MATN2 (Рак на стомаха и белия дроб)
	q22.3-q23.1	1171381	2.44	37.50	LRP12, DKFZp781F1053, ZFPM2
	q23.1	280236	2.44	50.00	OXR1
	q23.1-q23.2	465564	0.00	37.50	NUDCD1, ENY2 , PKHD1L1, RCAS1, EBAG9 , SYBU , GOLSYN, AX748380 (начален стадий рак на гърдата)
	q24.21	1128279	4.88	37.50	LOC728724, CR600271, CR593328, CCDC26, GSDMC
	q24.21	173702	4.88	37.50	LOC100507117, ASAP1, DDEF1
	q24.22	29820	14.63	50.00	TMEM71
	q24.3	285227	4.88	37.50	DKFZp666O0110, PTK2, DENND3 (Карцином на черния дроб)
	q24.3	114130	7.32	37.50	LY6H, GPIHBP1, ZFP41
	q24.3	13197	7.32	50.00	ZNF7
10	p15.1 - p13	8837046	2.44	37.50	RBM17, MIR3155B, MIR3155A, PFKFB3, IPFK-2, LOC399715, PRKCQ, AX748236, AY007155, PRKCQ-AS1, AK094154, LINC00707, SFMBT2, ITIH5, ITIH2, KIN, Kin17, ATP5C1, TAF3, CCDS7082, GATA3-AS1, NM_207423, BC036297, GATA3, BC031880, BC032914, SFTA1P, AY102069, LINC00710, BC033338, BC106956, BC113009, BC046381, CELF2-AS2, CELF2, CUGBP2, CDNF, NAPOR-1, AF007147, USP6NL, CR595071, ECHDC3, C10orf47, UPF2, PROSER2, AK056703, PROSER2-AS1, DHTKD1, SEC61A2, CR611074, NUDT5, CDC123, MCM10, MIR4480, CAMK1D, LOC283070, BC073155, CCDC3, MST151, OPTN, AK311458, C10orf49, UCMA, PHYH, SEPHS1, C10orf30, BEND7, PRPF18, BC002572, AK055017, FRMD4A, MIR4293, MIR1265, FAM107B, ARMETL1, HSPA14, SUV39H2
	p12.1- p11.23	764527	0.00	25.00	PTCHD3, RAB18, MKX, ARMC4, MPP7
	p11.23	323539	0.00		WAC, BAMBI, BC028422, LINC00837
	p11.23	249024	0.00		LYZL1, PTCHD3P1, LOC387647, AX747507, MIR604, SVIL
	p11.23	395011	0.00		SVIL, MIR938, BC057241
	p11.23- 11.21	7673654	0.00		LYZL2, ZNF438, BC042008, ZEB1-AS1, ZEB1, BC042457, ARHGAP12, CUL2, KIF5B, EPC1, CCDC7, C10orf68, ITGB1, NRP1, LINC00838, AX765705, GJD4, AX765719, PARD3, CREM, FZD8, MIR4683, ANKRD30A, CCNY, MTRNR2L7, ZNF33BP1, ZNF25, ZNF248, ZNF33A, ZNF37A, BC046442, LOC100129055
11	q26.3	128152	4.88	37.50	MGMT (диабет тип 2; левкемия, меланома; мозъчни тумори, ракови образувания засягащи глава и шия; рак на белия дроб, гърдата, панкреаса, стомаха, пикочния мехур, шийката на матката и на простата, ендометриален и колоректален карцином)
	q22.1	241695	0.00	37.50	ARHGAP42, MIR548G, AK057372, AK023666, TMEM133
	q22.3-q23.1	444244	0.00	25.00	AK124179, AK094117, FDX1, ARHGAP20

	q23.1	225852	0.00	25.00	<i>PIH1D2, C11orf57, TIMM8B, DDP2, SDHD, IL18, TEX12, B-diox-II, BCO2, PTS, AY364433, C11orf34, AY364431</i> (ракови образувания, засягащи глава и шия, параганглиом; феохромоцитом, рак на щитовидната жлеза, Болест на Алцхаймер, болест на Бехчет, болест на Крон, язвен колит, болест на Грейвс, Офтолмопатия на Грейвс, СПИН, IL-18 лупус еритематозуза, астма; ювенилен и ревматоиден артрит, болест на Шил, лейомиома, рак на черния дроб, рак на стомаха назоларингеален рак, овариален карцином, саркоидоза, сепсис)
	q23.2	189176	0.00	25.00	<i>USP28, HTR3B, HTR3A</i> (clozapine зависими, депресивно и биполарно афективно разстройство, шизофрения, мозъчна активност, обесивно-конпулсивно разстройство)
	q23.3	79169	0.00	25.00	<i>SIK3</i>
	q23.3	39639	0.00	37.50	<i>MPZL3, UNQ2966, MPZL2</i>
	q23.3	248838	0.00	37.50	<i>HYOU1, VPS11, HMBS, PBGD, H2AFX, DPAGT1, C2CD2L, HINFP, AJ308239, ABCG4, NLRX1, PDZD3, CCDC153, CBL</i> (инсулинова резистентност, шизофрения, не-Ходжкинов лимфом)
	q23.3	158020	2.44	37.50	<i>AK057239, LOC649133, POU2F3, OCT11, TMEM136, ARHGEF12</i>
	q24.1	341437	2.44	37.50	<i>SORL1</i> (Болест на Алцхаймер)
	q24.1	488130	0.00	25.00	<i>UBASH3B, CRTAM, C11orf63, BSX</i>
	q24.1	209017	0.00	25.00	<i>ASAM, CLMP</i>
	q24.1-q24.2	404268	0.00	37.50	<i>OR8B2, OR8B3, OR8G1, OR8G2, OR10G4, OR8G5, OR10G7-G9, VWA5A, X64983, OR8D1, OR8D2, BC018065</i>
	q24.3	1397489	0.00	37.50	<i>ST14, ARHGAP32, RICS, BARX2, APLP2, AX746800, TMEM45B, NFRKB, PRDM10, BC137307, LINC00167, CR602481, ZBTB44, AX747213</i> (карцином на шийката на матката)
12	p12.1	44262	2.44	37.50	<i>RECQL, GOLT1B, C12orf39, GYS2</i> (рак на панкреаса, диабет тип 2)

$p < 0.05$; % припокриване с CNV <50%; **червен цвят** – гени, намиращи се в райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от пациентите в клъстер 1 и при 0% от пациентите в клъстер 4; **син цвят** – гени, намиращи се в райони с аберации от типа „генетични загуби – делеции“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 70% от пациентите в клъстер 1 и при 0% от пациентите в клъстер 4; **зелен цвят** – гени, намиращи се в райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при 37% от пациентите в клъстер 4

CADPS2 е Ca^{2+} свързващ белтък, свързан с екзоцитозата на везикули пълни с невротрансмитери и неuropeптиди. Участва в регулираното освобождаване на неуротрофин от грануларните клетки водещо до регулиране на клетъчната диференциация и преживяемост по време на развитието на малкия мозък. **CADPS2** е отличен кандидат ген, свързан с аномалии засягащи развитието на нервната система, тъй като се експресира предимно в нервната система и се свързва с освобождаването на NT-3 (neurotrophin-3) и BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Установено е, че **CADPS2** е разположен в „податлив към аутизъм локус 1” върху хромозома 7q31-q33 и е един от гените, които са със значима намалена експресия в мозъка на пациенти с аутизъм⁽⁷⁴⁴⁾. **MAGI2** се смята, че е молекула със структурна роля в синаптичните връзки, като осъществява свързването на невротрансмитерните рецептори с клетъчно-адхезивните протеини. Вероятно взема участие в регулацията на активин-медирана сигнализация в нервните клетки и усилва ефекта, с който PTEN потискат активацията на *Akt1*. Valiente и сътр⁽⁷⁴⁵⁾ установяват, че С-терминалната опашка на човешкия PTEN се свързва с PDZ домена на плъщия ген *Magi2*, като това води до увеличаване на PTEN белтъчната стабилност, а взаимодействието с човешки MAST кинази, подпомага фосфорилирането на PTEN с тяхна помощ.

В групата от пациенти оформящи клъстер 4 наблюдаваните аберации от типа „увеличен брой копия – дубликации” (**Табл.5.9** маркирани в зелено) при около 37% от пациентите, липсващи в групата формираща клъстер 1, са следните гени: *NECAB1*, *ENY2*, *EBAG9*, *SYBU*, *MPZL2*, *HYOU1*, *HMBS*, *PBGD*, *H2AFX*, *HINFP*, *CBL*, *VWA5A*, *ST14*, *MGMT*, *ARHGAP32*, *BARX2*, *APLP2*, *NFRKB* и *PRDM10*. От тях гените *EBAG9*, *MPZL2*, *HMBS*, *PBGD*, *HINFP*, *ST14* и *BARX2* се асоциират с възникването на различни ракови заболявания (*EBAG9* – рак на гърдата, простатата, черния дроб, дебелото черво, белодробен, езофагеален и др; *MPZL2* – рак на белите дробове, левкемия; *HMBS* – рак на гърдата, простатата, дебелото черво, но и болест на Алцхаймер, неврити и др. болести, засягащи нервната система; *PBGD* – рак на гърдата и яйчниците; *HINFP* – рак на простатата; *ST14* – рак на гърдата, простатата, стомаха, фибросарком и др, *BARX2* - левкемия и ендометриален карцином). Гените *NECAB1*, *ARHGAP32*, *APLP2* и *PRDM10* са свързани с нормалното развитие на нервната система, нейното нормално функциониране и аберациите, които ги засягат водят до редица невронални заболявания. **H2AFX** е H2A подобен хистон, който може да замества конвенционалния H2A в нуклеозомите. Нуклеозомите пакетират и компактизират молекулата на ДНК в хроматинова структура, ограничаващи достъпа до нея, като по този начин играят централна роля в регулацията на ДНК транскрипцията, репарацията, репликацията и хромозомната стабилност. Достъпността на ДНК се регулира чрез сложен набор от пост-транслационни модификации на хистоните, наричан също хистонов код и водещи до нуклеозомно ремоделиране. От друга страна **CBL** е протоонкоген, кодиращ RING пръстеновидната E3 убиквитин лигаза. Кодираният белтък е един от ензимите необходими за насочване на субстрати за протеазомно разграждане. Белтъкът разпознава активирани тирозин-киназни рецептори, включително KIT, FLT1, KDR, FGFR1, FGFR2, PDGFRA, PDGFRB, EGFR, CSF1R и EphA8, и прекратява последващата сигнализация. Участва в сигналната трансдукция в хематопоеичните клетки. Играе важна роля и в регулирането на остеобластната диференциация и апоптоза. Генът **VWA5A** в литературата се свързва с процеса на туморогенеза, като се смята, че е туморсупресорен ген. Променената експресия на белтъка води до промяна на молекулния път, в който той участва и се смята, че може да допринесе пряко за развитието на туморогенезата. **NFRKB** е предполагаем регулаторен елемент от комплекса INO80 на хроматин ремоделиращата система, който участва в регулацията на процесите транскрипция, ДНК репликация и репарация.

5.5.4. РАЗДЕЛЯНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД IDH1/2 МУТАЦИОННИЯ СТАТУС

1. ПАЦИЕНТИ БЕЗ МУТАЦИЯ В IDH1/2 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Сравнени бяха данните получени от микрочиповия анализ на 34 пациента, при които не беше открита мутация в IDH1/IDH2, като 12 от тях бяха в групата на дълго преживяващите в сравнение с 22 пациента в групата с ниска преживяемост. В **Таблица 5.10** са показани всички гени в районите показали значима разлика между двете групи.

Таблица 5.10. Увеличен/намален брой копия наблюдавани в групата от пациенти без наличие на мутация в IDH1/IDH2 гените и с висока обща преживяемост в сравнение с тази с ниска преживяемост

	Хр	Локус	Размер б.дв.	Честота в група с НП %	Честота в група с ВП %	Ген
Н Б К	2	p23.3	89366	0.00	25.00	<i>ITSN2</i>
	4	q12	26123	0.00	25.00	<i>POLR2B</i>
		q13.1	200395	0.00	25.00	<i>LOC401134</i>
		q25	13513	0.00	25.00	<i>ELOVL6</i>
	10	q23.33	420453	95.45	58.33	<i>SORBS1, TCTN3, ALDH18A1, PleA1, LOC728558, DKFZp564D116, ENTPD1, AK091396</i>
		q23.31	20994	95.45	58.33	<i>PTEN, AK130076</i>
		q21.3	726265	95.45	50.00	<i>DNAJC12, SIRT1, PBLD, HERC4, DNA2, MYPN, ATOH7, MAWBP, RUFY2, HNRNPH3, HNRPH3, SLC25A16</i>
		q11.23	22757	86.36	50.00	<i>PRKG1</i>
		q11.22	197487	77.27	33.33	<i>ARHGAP22, WDFY4</i>
		p11.21	250835	81.82	41.67	<i>MTRNR2L7, ZNF248</i>
		p11.22	37237	86.36	33.33	<i>CCDC7</i>
		p11.23	481728	81.82	33.33	<i>WAC-AS1, WAC, BAMBI, LINC00837</i>
		p12.1	301809	81.82	33.33	<i>THNSLI, ENKUR, GPR158-AS1, GPR15</i>
		p13	12930	81.82	33.33	<i>RSU1</i>
	12	p13.1	124893	0.00	25.00	<i>PLBD1, GUCY2C</i>
		p13.1	42269	0.00	25.00	<i>ATF7IP</i>
		p13.2	116278	0.00	25.00	<i>GABARAPL1, KLRD1</i>
	15	q26.2-3	708388	4.55	33.33	<i>LOC91948, ARRDC4BC105715</i>
		q25.1	184449	13.64	50.00	<i>BCL2A1, ZFAND6</i>
		q23	228531	4.55	33.33	<i>LINC00593</i>
	16	p12.3	44748	4.55	33.33	<i>IQCK</i>
		p13.13	13155	0.00	25.00	<i>CHITA</i>
	X	p22.33	36607	4.55	33.33	<i>ASMTL, P2RY8</i>
У	7	p12.1	289462	86.36	50.00	<i>FLJ45974</i>
Б К	14	q12	133749	0.00	25.00	<i>STXBP6</i>

% припокриване с CNV<33; **зелен цвят** – гени показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при 25% от пациентите с ВП; **син цвят** – гени показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при повече от 75% от пациентите с НП

Значими аберации между изследваните групи от типа „генетични загуби – делеции“ се наблюдават в хромозоми 1, 2, 4, 10, 12, 15, 16, 22, X и Y, докато тези с „увеличен брой копия – дубликации“ засягат само две хромозоми - 7 и 14.

В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до намаляване броя на копията при 25% от пациентите, засягат следните 8 гени - *ITSN2*, *POLR2B*, *ELOVL6*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1*, *KLRD1* и *СИТА* (в **Табл.5.10** – маркирани в зелено), като тези изменения не се наблюдават при нито един от пациентите с понижена обща преживяемост. С изключение на гена *СИТА* в литературата останалите гени не са докладвани да имат пряка връзка с мозъчната туморогенеза. *СИТА* е МНС клас II трансаиваторния ген, кодиращ важен транскрипционен фактор, участващ в регулацията на генните отговорни за появата на HLA клас II МНС-специфичен антиген ⁽⁷⁴⁶⁾. Увеличената експресия на този ген се свързва освен с астроцитомата и с множество други ракови (рак на белия дроб, гърдата, простатата, овариален и колоректален карцином, и др.) ⁽⁷⁴⁷⁾ и невродегенеративни заболявания (множествена склероза, болест на Паркинсон и др.) ⁽⁷⁴⁸⁾. Освен това *СИТА* взаимодейства с редица белтъци като RFX5, MAPK1, NCOA1, и други, като участва и в тяхната активация. MAPK1 е от MAP-киназното семейство и активирането ѝ действа като интеграционна точка на множество биохимични сигнали, участват в различни клетъчни процеси като пролиферация, диференциация, транскрипционна регулация и развитие. *NCOA1* (nuclear receptor coactivator 1) е транскрипционен корегулатор, който съдържа няколко домена за взаимодействие с ядрени рецептори и изключителна важната му хистон ацетилтрансферазна активност. *NCOA1* от своя страна, ацетилира хистони, което прави разположената след тях ДНК-верига достъпна за транскрипция. Всички тези зависими от активацията на *СИТА* процеси логично водят до предположението, че делециите в *СИТА* гена биха могли да са пряко свързани с по-добрата преживяемост на пациентите притежаващи тази аберация ⁽⁷⁴⁹⁾.

За гените *POLR2B*, кодиращ субединица 2 на РНК полимерата II, отговорна за синтеза на иРНК и *ELOVL6*, кодиращ елонгаза 6 при синтез на мастни киселини, в литературата има данни, че се свързват със заболявания засягащи нервната система и канцерогенеза ^(750, 751). Освен тях гените *ITSN2*, *GUCY2C*, *ATF7IP*, *GABARAPL1* и *KLRD1* се асоциират с възникването на различни ракови заболявания.

В групата с повишена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до увеличение в броя копия при 25% от пациентите, в сравнение с нито един от групата с ниска преживяемост, се наблюдава при два гена - *STXBP6*, кодиращ синтаксин свързващ белтък 6 амизин, включен в образуването на т.нар. SNARE комплекс и екзоцитозата (асоцииран с болестта на Алцхаймер и ревматоидния артрит), както и *CEP170B*, играещ роля при организацията на микротубулите.

CEP170 се експресира широко в мозъка и кодира протеин, който е компонент на центрозомния комплекс и участва в поддържане организацията, и функцията на микротубулите. Центрозомните белтъци имат добре изучени функции в неврогенезата и се смятат, като отговорни за развитието нормалния размер на човешкия мозък. Мутации в тези белтъци предизвикват микроцефалия ⁽⁷⁵²⁾. Наскоро е доказано, че центрозомните белтъци са важни за организацията на микротубулите и центрозомния мотилитет, които имат и важна роля в образуването на аксоните ⁽⁷⁵²⁾. Наличието на загуба на копие или придобиване на допълнително копие на гореспоменатите гени, наблюдавано в групата от пациенти без наличие на *IDH1/IDH2* мутация и с по-дълга преживяемост, води до предположението, че те биха могли да са свързани с изявата на по-добрата преживяемост.

5. Обсъждане

Таблица 5.11. Гени, намиращи се в районите с НБК, показали значими промени в изследваната група от 58 пациента, и техните биологични характеристики

Ген	Молекулна функция и участие в биологични процеси	Връзка със заболяване
POLR2B	ген, кодиращ втората по-големина субединица на РНК полимераза II, синтезираща при еукариотните информационни и множество малки не-кодиращи РНК-и.	болест на Хънтингтън, макулна дегенерация и др.
ELOVL6	ген, кодиращ ензим, който катализира синтеза на наситени и мононенаситени мастни киселини.	параплегия, алкохолна зависимост и др.
ITSN2	член е на семейството белтъци, участващи в клатрин-медирана ендоцитоза. Смята се за основния регулатор при образуването на опакованите с клатрин везикули и участва в ендоцитозата, осъществявана с помощта на Т-клетъчен антигенен рецептор (TCR).	рак на панкреас и саркома на Капоши; шизофрения, болест на Алцхаймер, атопичен дерматит и др.
GABARAPL1	убиквитин-подобен модификатор, който увеличава експресията на капа - опиоидния рецептор върху клетъчната повърхност, като улеснява вътреклетъчния трафик на рецептора. Участва в образуването на автофагоцитните вакуоли.	рак на гърдата и яйчниците; спастична хемиплегия и ретитнитис пигментоза.
GUCY2C	рецептор, свързващ термостабилния ентеротоксин на E.coli (E.coli ентеротоксин значително стимулира натрупването на цикличен ГМФ в клетките на бозайници, експресиращи GC-C). Активира се и от ендогенните пептиди гуанилин и урогуанилин. ATF7IP е многофункционален ядрен протеин, който се свързва с хетерохроматина. Той може да действа като транскрипционен коактиватор или корепресор в зависимост от неговите партньори.	рак на стомаха, колона, ректума и яйчниците, езофагеален аденокарцином; шизофрения.
KLRD1	рецептор, разпознаващ МНС клас I HLA-E молекули от клетките убийци и някои цитотоксични Т-клетки, активирани от имунния отговор.	левкемия и ендометриален карцином; множествена склероза, системен лупус еритематозум, ревматоиден артрит и др.
SLC25A16	протеин необходим за натрупване на коензим А в митохондриалния матрикс.	менингиома, базално-клетъчен карцином, болест на Алцхаймер.
CEP170B	участва в организацията на микротубулите	рак на интрахепаталните жлъчни канали.

зелен цвят – гени показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при 25% от пациентите с ВП; **син цвят** – гени показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при повече от 75% от пациентите с НП

В групата с понижена обща преживяемост наблюдаваните аберации довели до загуба в броя на копията при над 75% от пациентите, засягат следните 26 гени - *SORBS1*, *TCTN3*, *ALDH18A1*, *ENTPD1*, *PTEN*, *DNAJC12*, *SIRT1*, *PBLD*, *HERC4*, *MYPN*, *ATOH7*, *HNRNP3*, *HNRPH3*, *DNA2*, *SLC25A16*, *PRKG1*, *ARHGAP22*, *WDFY4*, *MTRNR2L7*, *ZNF248*, *CCDC7*, *WAC*, *BAMBI*, *THNSL1*, *GPR158* и *RSU1* (в **Табл.5.9** – маркирани в синьо), като тези изменения се наблюдават и в групата с повишена обща преживяемост, но с много по-ниска честота. Първите 15 гена се откриват при 95.46% от пациентите (21 човека) с НП и при около 50% (6 човека) от групата с ВП. Пет от изброените по-горе гени са описани в литературата, като имащи връзка с мозъчната туморогенеза – *PTEN*, *SIRT1*, *SLC25A16*, *BAMBI* и *RSU1*. LOH на хромозома 10 е най-честата генетична промяна в ГБМ, и се среща при 60-80% от случаите⁽¹⁷⁶⁾. LOH 10q се наблюдава със сходна честота при първичните и вторичните ГБМ⁽¹⁷⁶⁾, докато LOH 10p е по-характерно за първичните ГБМ⁽⁶⁶⁷⁾. В 10q е

установен един от туморсупресорните гени - PTEN локализиран в 10q23.3⁽⁶⁶⁸⁾. PTEN е фосфатаза, която инхибира R1P3 сигнализацията, потискайки активността на AKT и mTOR, като инхибира клетъчната пролиферация. Мутации в него се наблюдават при 15-40% от ГБМ⁽⁶⁶⁹⁾, но най-често при първичните ГБМ^(176, 667). Въпреки, че някои изследвания показват липса на връзка между преживяемостта и наличието на мутации в PTEN гена при глиомите⁽⁷⁵³⁾, повишената AKT активност се асоциира с по-лоша прогноза за пациентите⁽⁷⁵⁴⁾, както и редица други проучвания откриват пряка връзка между аберациите в PTEN (мутации, делеции или метилиране) и по-лошата преживяемост^(34, 754).

Друг ген локализиран също в 10-та хромозома е *SIRT1*, кодиращ член на семейството на протеина сиртуин, хомолог на дрождевите Sir2 протеини. Членове на семейството белтъци, наречени сиртуини, се характеризират със сиртуинов домейн и са групирани в четири класа. Функциите на човешките сиртулини все още не са изяснени, но дрождевите протеини са известни с регулацията си, чрез епигенетно заглушаване и репресия върху ДНК рекомбинация. Проучванията показват, че човешките сиртуини е възможно да функционират като вътреклетъчни регулаторни протеини с моно-АДФ-рибозилтрансферазна активност. Протеинът, кодиран от този ген е включен в клас I на сиртуиновото семейство и се счита за туморсупресор поради това, че се характеризира с повишена експресия при някои тумори (глиобластома, рак на шийката на матката, на белия дроб, на панкреаса, на простатата, ретинобластома, хепатоцелуларен и колоректален карцином, левкемия, и др) и възможността му да инактивира белтъци, участващи в поправката на ДНК увреждане и туморната супресия. Увеличената експресия на този ген се свързва и с други заболявания, засягащи мозъка като множествена склероза, шизофрения, болест на Алцхаймер и други. Независимо от това последните изследвания показват, че при други видове рак нивата на *SIRT1* са намалени, като този дефицит води до генетична нестабилност и туморогенезата, докато *SIRT1* свръхекспресия при същите тумори води до редукция туморогенезата в миши модели, хетерозиготни по туморсупресорния ген *p53* или *APC*. Тези последни открития показват възможността активирането на SIRT1 както да доведе до удължаване на преживяемостта, така и до инхибиране формирането на тумор. *BAMBI* е ген кодиращ трансмембранен гликопротеин, свързан със семейство рецептори тип I на трансформиращия растежен фактор-бета (TGF-b), чиито членове играят важна роля в сигналната трансдукция в много патологични процеси и процеси на развитието. ГБМ и други туморни заболявания — меланома, колоректален, хепатоцелуларен и карцином на яйчниците; редица заболявания, засягащи на мозъка — парализия, епилепсия, макулна дегенерация и други. От друга страна *RSU1* е ген кодиращ протеин, който е включен в Ras пътя от сигналната трансдукция, инхибирането на растежа, и фактори, индуциращи растежа на нервите и процесите на диференциация, както е определено в проучвания с миши и човешки клетъчни линии. Увеличената експресия на този ген се свързва и с болестта на Алцхаймер. Наличието на едно копие по-малко на гореспоменатите гени, наблюдавано в групата от пациенти без наличие на IDH1/IDH2 мутация и с по-ниска преживяемост, това води до извода, че те биха могли да са отговорните за по-лошата преживяемост на пациентите в групата, въпреки че няма ясна представа за общите механизми, в които участват.

2. ПАЦИЕНТИ С МУТАЦИЯ В IDH1/2 С НИСКА И ВИСОКА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

В резултат на получените резултати от микрочиповия анализ на 24^{те} пациента, с мутация в IDH1/IDH2, значими разлики бяха наблюдавани между изследваните групи в хромозоми 7, 9 и 12. В Табл. 5.12 са показани всички райони, както и гените намиращи се в тях, показали значима разлика между двете групи.

5. Обсъждане

Таблица 5.12. Увеличен/намален брой копия наблюдавани в групата от пациенти с мутация в IDH1/IDH2 гените и с висока ОП в сравнение с тази с ниска

Хр	Локус	Размер б.дв.	Честота в група с		Ген	
			ВП %	НП %		
Н Б К	12	p13.2	124419	11.76	57.14	LRP6, MA0NSC1, LOH12CR1 и 2
		p11.22	20591	0.00	57.14	PPFIBP1, REP15
		p11.21	613940/ 28995	11.76/ 5.88	57.14	DENND5B, AMN1, DENND5B-AS1, BICD1, METTL20, H3F3C, KIAA1551, RNU6-78/ DNM1L
		q15	46817	11.76	57.14	MDM2 , BC065505, CPM
У Б К	7	p22.2	14122	11.76	57.14	FJH1, NUDT1
		q11.23	103165/ 533650	11.76/ 5.88	57.14/ 71.43	RBAP2/ FGL2 , CCDC146, DKFZp667B242, PION, PTPN12, BC037783, RSBNI1L-AS1, RSBNI1L
		q21.11	42259	23.53	85.71	MAGI2
		q21.12	333032	23.53	85.71	ADAM22, SRI, STEAP4
		q21.13	357377	17.65	85.71	CDK14
		q21.3	228403/13 1508/1084 3/1002884	29.41	85.71	ACN9/ LMTK2, BHLHA15, TECPR1/BAIAP2L1/ CASD1, SGCE, PON1-3, PEG10, PPP1R9A
		q22.1	240860	17.65	85.71	ORC5
		q22.2	130325	23.53	85.71	ATXN7L1
		q31.1	252951	29.41	85.71	NRCAM, PNPLA8, THAP5, DNAJB9
		q31.1-2	559011	23.53	85.71	FOX2 , MIR3666, BC040713, MDFIC , BC022431
		q31.2	697639	23.53	85.71	TES , BD495725, CAVI , AK097428, TFEC, CAV2 , EF070117, EF070119, EF070122, DQ656015
		q31.31	291285/ 250877/ 605748	29.41/ 23.53	85.71	CTTNBP2/ TSPAN12, WNT16, ING3, CPED1, C7orf58, FAM3C/ KCND2
		q31.33-32.1	279080	17.65	85.71	GCC1, ARF5, FSCN3, PAX4, SND1
		q32.1	523818	23.53	85.71	LEP, MGC27345, RBM28, PRRT4, LOC401399, CALU, FAM71F2, DQ592654, DQ596753, DQ595173, IMPDH1, DQ584676, HIG2, HILPDA, DQ579129, hCG 2039358, CR598155, METTL2B, FLJ45340, DQ577349, DQ577063, FAM71F1, BC062355
		q32.2	107033	17.65	85.71	CPA1 , CPA2, CPA4 , CPA5, AK097910
		q33	31872/237 752/25437	17.65/ 29.41	85.71	CNOT4/ SUT-1, FAM180A, MTPN, LUZP6/EXO4
		q34	9423	17.65	85.71	TMEM178B
		q35-36.1	960297	23.53	85.71	CNTNAP2 , LOC392145, C7orf33, CR624471, EZH2, PDIA4, CUL1 , RNY5
		q36.1	198752/ 554242	17.65	85.71	GALNTL5 и 11, LRRC61, RARRES2, LOC285972, C7orf29, LOC728743, RNU6-34, REPIN1, TMEM176A и B, K125599, GIMAP1-8, ZNF775, AK097158, AK022851, ABP1, BC10938
		q36.3	565059/ 278613	17.65/ 23.53	85.71	LMBR1, NOM1, DNAJB6, MNX1, UBE3C , AY927465, DIF14, LOC645249/ EN2 , CNPY1, AX747269, RBM33
9	q34.3/ q34.2	102054/ 353847	17.65/ 11.76	71.43/ 57.14	COL5A1/ MED22, SNORD24, SLC2A6, RPL7A, vWF-CACFD1, SNORD36A, B и C, SURF1, 2 и 4, C9orf7 и 96, DBH, CP, REXO4, ADAMTS13, TMEM8C, SARDH, ADAMTSL2, FAM163B, AF129264	

p<0.005, % припокриване с CNV<50; **червен цвят** – гени, намиращи се в райони с аберации от типа „увеличен брой копия – дупликации“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 75% от пациентите с НП и при 17-30% от пациентите с ВП; **син цвят** – гени, намиращи се в райони с аберации от типа „генетични загуби – делеции“, показали връзка с канцерогенезата или заболявания на нервната система при над 57% от пациентите с НП и при 0% от пациентите с ВП

В групата с по-ниска обща преживяемост наблюдаваните аберации водещи до загуба броя на копията при 57% от групата с лоша преживяемост и при нито един или при един пациент от другата група са открити съответно гените *REP15*, *PPFIBP1*, *DNM1L* и *MDM2* (в Табл. 5.12 –маркирани в синьо). Загубата на вече споменатите гени, наблюдавани в групата от пациенти с *IDH1/IDH2* мутация и с по-ниска преживяемост, може да е причината за по-лошата преживяемост на пациентите в тази група. Чести генетичните аберации, открити при единични глиални тумори включват амплификация в локуси 1q32.1 (*PIK3C2B*, *MDM4*), 4q11-q12 (*KIT*, *PDGFR4*), 7p12.1–11.2 (*EGFR*), 12q13.3–12q14.1 (*GLI1*, *CDK4*) и 12q15 (*MDM2*), и делеции в 9p21.1–24.3 (*p16INK4a/p14ARF*), 10p15.3-q26.3 (*PTEN*, и т.н.) и 13 q12.11- q34 (*SPRY2*, *RBI*). Тези вариации имат голяма вероятност да са причината за развитието на патогенезата на ГБМ (наречени отключващи туморогенезата мутации). *MDM2* инициира деградирането на P53 белтъка. Амплификацията на ***MDM2*** разположен в локус 12q15 позволява на тумора да избегне контрола върху растежа на регулираните от белтъка p53 клетки. Това събитие се наблюдава при около 10% от първичните ГБМ, а TCGA показва корелация между амплификацията на *MDM2* и по-ниската обща преживяемост⁽¹²⁰⁾. Въпреки това липса на *MDM2* амплификация е наблюдавана при пациенти с МГ⁽⁷⁵⁵⁾. Аналогично при анализа за преживяемост спрямо *IDH1/IDH2* статус на получените от нас резултати беше наблюдавана загубата на *MDM2* при пациенти с глиома, които въпреки наличието на мутации в *IDH1/IDH2* гена показаха връзка с по-лошата преживяемост. Около 80% от пациентите с мутации в *IDH1/IDH2* гена притежават мутации и в гена *TP53*, водещи до инактивирането му^(29, 158, 463). В публикуваната литературата тясната връзка между *MDM2* и *TP53* е добре изучена в миши ембрионални модели, където хомозиготна делеция в *Mdm2* води до летален изход още на ниво бластоцист, поради неправилно протичаща апоптоза, но последваща делецията на p53 напълно спасява този фенотип⁽⁷⁵⁶⁾. Поради това смятаме, че е възможно при изследваните български пациенти с глиом, притежаващи мутации в гените *IDH1/IDH2*, по-лошата преживяемост при част от тях да се дължи на делециите в *MDM2* или някой от останалите гени в сравнение с пациентите без мутации.

В литературата е налична оскъдната информация относно връзката между инактивацията на гените *REP15* и *PPFIBP1*, и процеса на туморогенеза. ***REP15*** е един от белтъците, регулатори на трансферин-рецепторното рециклиране, но няма публикувани данни за връзката му с възникването на мозъчни тумори. От друга страна белтък, кодиран от гена ***PPFIBP1***, е член на семейство LAR тирозин-фосфатаза взаимодействащи белтъци наречени липрини. Те взаимодействат с членовете на семейството на LAR трансмембранни тирозин-фосфатази, които имат връзка с аксонната ориентация и развитието на млечната жлеза. Предполага се, че липрините са поливалентни белтъци, които формират комплексни структури и действат като скелет за събиране и закрепване на LAR тирозин-фосфатазните белтъци. Има данни, че взаимодейства със S100A4, калций-свързващ протеин, свързан с туморната инвазивност и метастазиране⁽⁷⁵⁷⁾. S100A4/Mts1 белтъка е високо експресирани при индивиди с хипертензия и има данни, че води до промени в кръвоносната система^(758, 759). *In vitro* експеримент показва, че взаимодействието на този белтък с протеин киназа C води до инхибиране на фосфорилирането му. Повреди в него се асоциират със заболявания като хондросарком, възпалителен миофибробластен тумор и болест на Олиер (проявява се с множество хрущялни тумори).

DNM1L кодира един от членовете на динамин суперсемейство ГТФ-ази. Белтъкът има важни функции при деленето на митохондриите и пероксизомите по време на митозата. Той спомага разделянето на мембраната чрез олигомеризация в пръстеновидна структура, която се разполага около мястото на разделяне чрез механизма на ГТФ-зависима хидролиза. Благодарение на функцията си в деленето на митохондриите се гарантира оцеляването, чрез потискане на окислително увреждане, на поне няколко вида постмитотични неврони, включително клетките на Пуркиние. Наличието му е

задължителен фактор за нормалното развитие на мозъка, включително и това на малкия мозък. Улеснява регулираната апоптоза по време развитието на невралната тръба. Освен това участва и в регулацията на апоптозата и програмираната апоптоза по време на индивидуалното развитие. Изключително е необходим за освобождаване на нормални нива цитохром С и активиране на каспазите по време на апоптозата, както и за изпълнение на програмираните некротични процеси. Вероятно участват активно и във везикулния транспорт. От друга страна свръхекспресията на изоформа 1 и изоформа 4 води до обратния ефект при пероксизомите т.е. инхибира разделяне им ⁽⁷⁶⁰⁾. Нарушаване на функциите на този ген се свързват с тежки невронални заболявания, включително и болест на Алцхаймер, Паркинсонова болест, атаксия, болест на Хънтингтън, невропатия на Шарко-Мари-Тут, но също и с много ракови заболявания – колоректален карцином, рак на простатата и на белия дроб. Мутации в този ген се асоциират с летално автозомно-доминантно заболяване, енцефалопатия, поради дефекти засягащи митохондриалното и пероксизомално разделяне. Наличието на допълнително копие на вече споменатите гени *REP15*, *PPFIBP1* и *DNM1L*, наблюдавани в групата от пациенти с *IDH1/IDH2* мутация и с по-ниска преживяемост, може да е причината за по-лошата преживяемост на пациентите в тази групата. От друга страна при над 75% от пациентите в групата с наличие на *IDH1/IDH2* мутации и по-лоша обща преживяемост, значимите аберации водещи до наличие на допълнително копие на част от генома и следователно до дупликация на следните гени - *LMTK2*, *BHLHA15*, *BAIAP2L1*, *MTPN*, *LUZP6*, *EXOC4*, *NRCAM*, *PNPLA8*, *THAP5*, *DNAJB9*, *MAGI2*, *FOXP2*, *MDFIC*, *ATXN7L1*, *NOM1*, *MNX1*, *UBE3C*, *DNAJB6*, *CNTNAP2*, *CUL1*, *EZH2*, *PDIA4*, *FGL2*, *PTPN12*, *TES*, *CAV1*, *CAV2*, *ING3*, *CPED1*, *WNT16*, *FAM3C*, *CDK14*, *ORC5*, *FSCN3*, *PAX4*, *SND1*, *CTTNBP2*, *KCND2*, *EN2*, *CPA1*, *CPA4*, *CASD1*, *SGCE*, *PEG10*, *PON3*, *PPP1R9A*, *PON1*, *PON2*, *ADAM22*, *SRI* и *STEAP4* (в Табл.5.12 – маркирани в червено), като тези изменения се наблюдават от 17 до 30% от пациентите с повишена обща преживяемост. От гореизброените дуплицирани гени тези с най-висока честота в групата с по-лоша преживяемост (85.7%) и едновременно с това и най-ниска такава в групата с по-добра (17.6%) бяха подбрани като най-вероятни участници в по-бързата прогресия на заболяването и летален изход (подчертаните гени).

Транскрипта получен от гена *MTPN* е бицистронен кодиращ едновременно два белтъка – миотрофин и leucine zipper белтък 6. Миотрофинът е асоцииран с хипертрофия на сърдечния мускул, като участва в поддържане димеризацията на NF-κB субединиците и регулира NF-κB активността на транскрипционния фактор. Този белтък има и потенциална функция в морфогенезата на малкия мозък, и вероятно е свързан с диференциацията на невроните в малкия мозък, и по-специално на грануларните клетки. Криптираният ORF разположен в 3'-края на този транскрипт използва ново позиционирано във вътрешността място за разпознаване от рибозомата. Освен това инициацията на трансляцията не започва с AUG кодон и води до получаването на leucine zipper белтък 6, туморен антиген с големина 6.4 кДа, свързан с появата на миелопролиферативни заболявания.

Белтъците, които съдържат MIF4G (средата на eIF4G) и/или MA3 домени, като например *NOM1*, функционират като част от машината синтезираща белтъците. Тези области включват места свързващи се с белтъци от семейството EIF4A АТФ-зависимите DEAD - съдържащи домени РНК хеликази. Белтъкът *NOM1* играе роля и в насочването на PPP1CA към ядрцето. Нарушения в неговата структура се свързват с остра миелоидна левкемия и овариален аденокарцином.

MNX1 е ген кодиращ ядрен белтък, представляващ транскрипционен фактор. Мутациите в този ген водят до заболявания като синдром на Курарино (автозомно-доминантна вродена малформация) ⁽⁷⁶¹⁾. Освен това е наблюдаван в CD34+ клетки, В клетки и В - лимфоидни тъкани ⁽⁷⁶²⁾. Освен с това заболяване, изменения в гена се наблюдават и при Ходжкинов лимфом, остра миелоидна левкемия, тератом, менингоцеле, церебрален паралич, Болест на Hirschsprung и други. *MNX1* функционира в имунните

клетки и досега няма данни да участва в ГЪМ биология, но скорошни изследвания го идентифицират като транскрипционен фактор участващ в развитието както на солидни тумори, така и на хематологични малигнени заболявания ⁽⁷⁶³⁾.

UBE3C е E3 убиквитин лигаза, която приема убиквитин от E2 убиквитин-конюгиранения ензим UBE2D1 под формата на тиоестер и след това директно прехвърля убиквитина върху набелязаните субстрати. Спомага образуването на поли-убиквитинови вериги най-често засягащи аминокиселината Лизин на 29^{-та} и 48^{-ма} позиции в белтъчната молекула. Този белтък в *in vitro* експерименти може сам на себе си да бъде обект за убиквитиниране, а *in vivo* е установено, че успява да инициира собствената си деградация. Изменения в гена се асоциират и с Паркинсонова болест, синдром на Ангелман, сериозни депресивни разстройства, кокаинова зависимост, астма и рак на гърдата.

DNAJB6 генът е член от фамилията DNAJ протеини. Това семейство протеини се характеризира с аминокиселинна последователност наречена „J домен” и действа като един от двата важни молекули – шаперони, участващи в редица клетъчни процеси, като белтъчното нагъване. Те също играят роля в полиглутаминовата агрегация в специфични неврони. Действат като ендегенен молекулен придружител за невроналните протеини. Потиска агрегацията и токсичността на полиглутаминово съдържащи, склонни към агрегация белтъци. Изоформа В инхибира хънтингтоновата агрегация. Има стимулиращ ефект върху активността на АТРаза на HSP70 в дозо- и време-зависим начин и по този начин действа като придружител на HSP70. Също така намалява клетъчната токсичност и активност на каспаза-3. Има литературни данни показващи връзката му с рак на гърдата, на хипофизата, мускулна дистрофия пояс-крайник и други.

CDK14 е една от серин/треонин протеин киназите, участващи в регулацията на еукариотния клетъчния цикъл, чиято дейност се контролира от свързващите се с нея циклини. Съществуват предположения, че CDK14 има важна, независима роля за растежа на КРК тумори извън гастроинтестиналния тракт и метастазирането им. Въпреки че данните от сравнителните изследвания отчитат ролята на CDK14 в раковите заболявания са много малко, има данни за действието му като регулатор на клетъчния цикъл на Wnt-сигналния път по време на прехода между G2/M фазата чрез фосфорилиране на белтъка LRP6. Наблюдава се връзка между свръхекспресията на CDK14 и активирането на му ⁽⁷⁶⁴⁾, което предопределя химиотерапевтичната резистентност ⁽⁷⁶⁵⁾, и увеличава възможността за метастазиране при хепатоцелуларния карцином ⁽⁷⁶⁶⁾. Действа като регулатор на клетъчния цикъл и пролиферация чрез взаимодействието му с CCND3. В *in vitro* изследвания води до фосфорилиране на RB1, но този резултат не е бил потвърден в *in vivo* системи. Предполага се, че играе и важна роля по време на мейозата, диференциацията на невроните и като индиректен негативен регулатор на инсулин-чувствителния глюкозен транспорт. Свързва се с развитието на плоскоклетъчен тип карциноми, злокачествени образувания в черния дроб, аутизъм и др.

ORC5 е част от комплекса разпознаващ началото на репликацията (ORC) и се свързва със самото място (Ori място). ORC е необходим за образуването на преиницииращ комплекс, който от своя страна иницира ДНК репликацията. Свързването на белтъка с тази ДНК последователност е АТР-зависим процес. Заболявания, които се свързват с този ген са миелоидна левкемия, лейомиома, невронитис и др.

FSCN3 действа като белтък, водещ до групирането на актина. Освен това фасцина има ключова роля в туморната инвазия и метастазиране ⁽⁷⁶⁷⁾, което предполага, че развитието на фасцин-блокиращи агенти вероятно ще доведе до предотвратяване на туморното разпространение при малигнените тумори ⁽⁷⁶⁸⁾. Поради високата честота на смъртност на раково болни вследствие на метастазирането, има спешна нужда от развитие на медикаментите намаляващи този процес ⁽⁷⁶⁹⁾. Някои карциноми с различен произход, засягащи различни органи, характеризирани се с високи експресионни нива на фасцин се асоциират с увеличена инвазивност и ранна смърт ⁽⁷⁶⁷⁾. Фасцинът освен това показва връзка

и с тъканната инфилтрация с помощта на циркулиращите туморни клетки ⁽⁷⁷⁰⁾. Подобна асоциация е открита и при малигнен ГБМ ^(771, 772), който е склонен да се разпространява обширно из ЦНС. Ролята му е потвърдена чрез изследвания, в които потискане на неговата експресия намалява туморната инвазивност и/или метастатичния потенциал при КРК ⁽⁷⁷³⁾, ГБМ ⁽⁷⁷⁴⁾, стомашен карцином ⁽⁷⁷⁰⁾ и рак на гърдата ⁽⁷⁷⁵⁾. Освен това вещества от семейството на миграстатин, които са потенциални инхибитори на туморната инвазия и метастазиране ⁽⁷⁷⁶⁾, в лабораторни условия се свързват към фасцина и потискат неговата активност при участието му в комплекс с актина ⁽⁷⁷⁷⁾. Въпреки, че функцията им не е напълно изяснена, има данни за участието му в дендритно-клетъчния сарком, синдром на Денди-Уокър, аденокарциноми на панкреаса и ретината.

PAX4 играе важна роля в диференциацията и развитието на бета клетките изграждащи панкреасните островчета. Този ген е член на семейството транскрипционни фактори, които играят критична роля по време на развитието на плода и развитието на рака. Той е транскрипционен репресор, свързващ се със сходен елемент, намиращ се в глюкагоновия, инсулиновия и соматостатиновия промотор, и се конкурира с PAX6 белтъка за една и също място на свързване в промоторната област. PAX4 функционира, като потенциален туморен супресор при меланомните човешките клетки. А именно експресионните нива на *PAX4* са понижени при меланомните клетки. Още повече, че иницираната *PAX4* експресия потискат растежа на меланомни клетки, главно поради намаляване на синтеза на ДНК чрез спиране на клетъчния цикъл в G1 фазата ⁽⁷⁷⁸⁾. Заболявания, които се свързват с този ген са меланомата, миелоидната левкемия и други ⁽⁷⁷⁸⁾.

SND1 (staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1) представлява един мултифункционален белтък, чиято увеличена експресия се наблюдава при карцином на гърдата, простатата, колоректален, хепатоцелуларен, саркома на Капоши и малигнен глиом. Молекулярните изследвания разкриха връзката между разнородните дейности на SND1, участващ в регулацията, както на транскрипционно, така и на пост-транскрипционно ниво. Първоначалните изследвания определят SND1 като транскрипционен активатор, но SND1 е и компонент от RISC комплекса (RNA-induced silencing complex), който медира функционирането на РНК-ите, регулира РНК сплайсинга, поправката и стабилността, както и играе важна роля в поддържането на клетъчната жизнеспособност. Тези разнообразни функции му позволяват да модифицира/модулира сложен комплекс от молекулни мрежи, като по този начин иницира канцерогенеза. Освен това неговата ключова роля за раковото развитие и прогресия го определят като потенциална терапевтична мишена ⁽⁷⁷⁹⁾.

CPA4 гена е член на подсемейство карбоксипептидаза A/B, и се намира в клъстер с три други членове на същото семейството. Карбоксипептидазите са цинк-съдържащи екзопептидази, които катализират освобождаването на карбокси-разположената аминокиселина. Синтезират се като зимогени, които се активират чрез протеолитично разграждане. Този ген вероятно участва и в пътя на хистоновото хиперацетилиране, водейки до промяна във функцията на белтъци, отговорни за растежа и регулацията на процесите в простатните епителни клетки. Huang и сътр ⁽⁷⁸⁰⁾ докладват за наличието на връзка на *CPA4* и РНК експресията с хормон регулираните тъкани предполагайки, че оказва влияние на клетъчния растеж и диференциация. Освен това този ген в литературата е описан като даващ заявка да бъде един от кандидат-гените свързан с по-агресивното поведение както при рака на простатата ⁽⁷⁸¹⁾, така и при други солидни тумори. Докладвано е, че има връзка и при развитието на глиосарком.

6. ИЗВОДИ

В резултат на изследването на генетичните и геномни промени в българската популация, представена от изследваните 199 пациента с малигнени глиоми, могат да се направят следните изводи:

- ✓ Пациентите с ранно начало на заболяването показват значимо по-дълга преживяемост в сравнение с групата с по-късно начало ($p<0.001$).
- ✓ Наличието на KPS статус над 70 ($p=0.01$) и на тотална резекция са добри показатели за преживяемостта ($p=0.021$).
- ✓ Установена беше значима асоциация на вторичните тумори с по-добрата преживяемост ($p=0.001$).
- ✓ Честотата на мутациите в *IDH1* гена при пациенти с глиални тумори е 18.7%, която е по-ниска в сравнение с литературните данни, поради обогатената с първични тумори извадка от пациенти.
- ✓ За първи път беше открита хомозиготна мутация R132H в *IDH1*, определена като асоциирана с функционалната промяна на гена и непубликувана досега. В хомозиготно състояние беше открита нова мутация и в *IDH2* гена, засягаща кодон 129 – с.386A>G, която води до замяна на Lys с Arg.
- ✓ Пациентите с *IDH1/IDH2* мутации се характеризират с по-добра преживяемост дори и в групата с по-напреднала възраст на заболяемост ($p<0.001$).
- ✓ Мутациите в *IDH1/IDH2* бяха по-често наблюдавани при вторичните глиоми (26.7%), което определя и по-дългата им преживяемост.
- ✓ В изследваната група пациенти бяха открити 9 не описвани до сега в базите данни мутации в *TP53*.
- ✓ Наличието на делецията на цялото дълго рамо на хромозома 1 ($p=0.03$) и късо рамо на хромозома 19 ($p=0.001$) бяха установени като добър прогностичен фактор в цялата група, за разлика от наличието на частичните загуби или липсата на такива.
- ✓ Наличието едновременно на цялостни делеционни събития в 1p и 19q показва значима връзка с преживяемостта в цялата изследвана група ($p=0.005$).
- ✓ Едновременното наличие на 1p19q коделеции е добър прогностичен и предиктивен фактор при пациенти с проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ) ($p<0.001$).
- ✓ След стратифициране на групата според наличието или не на прилагана терапия (химио- и/или лъчетерапия) се наблюдава значително по-добра преживяемост ($p<0.001$) при туморите с метилиран промотор на *MGMT* и проведена терапия.
- ✓ Увеличената експресия на *VEGF-A* и *SOX9*, и намалена *SOX8* експресия са независими прогностични фактори. Повишените нива на *VEGF-A* ($HR=7.934$) и *SOX9* ($HR=3.058$) са лоши прогностични фактори, докато наличието на понижената експресия на *SOX8* ($HR=3.042$) е фактор асоцииращ се с по-ниската преживяемост.
- ✓ Идентифицирани бяха най-честите райони показали значими изменения (намален или увеличен брой копия) в изследваната група от глиални тумори.
- ✓ Отдиференцирани бяха специфичните хромозомни аберации показали асоциация с по-високата преживяемост при пациенти с нормален *IDH1/IDH2* гени.
- ✓ Открити бяха специфичните хромозомни аберации показали асоциация с по-ниската преживяемост при пациенти с мутация в *IDH1/IDH2* гени.
- ✓ Подбрани бяха кандидат гени в тези райони, според молекулните им функции, засягащи развитието, функционирането и регулацията на нервната система, както и свързани с канцерогенезата, за бъдещо проучване на потенциални биомаркери с прогностична стойност.

7. ПРИНОСИ

В резултат на изследването на генетичните и геномни промени в българската популация и направените изводи могат да се формулират следните приноси:

Научно-теоретични приноси

- ✓ В гена *IDH1* за първи път беше открита мутация в хомозиготно състояние при пациенти с глиални тумори;
- ✓ В гена *IDH2* беше открита нова мутация в хомозиготно състояние, непубликувана в литературата досега;
- ✓ Чрез сравнителна геномна хибридизация бяха установени най-честите хромозомни аберации при глиални тумори в български пациенти
- ✓ Идентифицирани бяха специфични геномни аберации при подгрупи пациенти с висока и ниска преживяемост в групите пациенти с и без *IDH1/IDH2* мутации;

7.2. Научно-приложни приноси

- ✓ За първи път в България беше определена честотата на мутации в гените *TP53*, *IDH1* и *IDH2* при български пациенти с глиални тумор и потвърдена ролята на мутации в *IDH1/IDH2* като добър прогностичен фактор, независимо от възрастта.
- ✓ Чрез анализ на експресионните нива на гените *VEGFA* и *SOX9* беше установена ролята на увеличената им експресия като независим негативен прогностичен фактор;
- ✓ Бяха изследвани експресионните нива на *SOX8* и беше установена ролята на намалената му експресия като негативен прогностичен фактор;

7.3. Приноси с потвърдителен характер

- ✓ За първи път в България беше проведен анализ за 1p19q коделеционни събития и беше потвърдена ролята им като независим предиктивен фактор при пациенти с глиоми и проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ);
- ✓ Беше изследван приноса на *MGMT* промоторното хиперметиране при български пациенти и беше потвърдена ролята му като независим предиктивен фактор при пациенти с проведена терапия (лъче- и/или химиотерапия с TMZ);

7.4. Методични приноси

- ✓ За първи път в България беше въведен метода на сравнителна геномна хибридизация за изследване на ДНК от глиални туморни тъкани;
- ✓ Въведен беше метода на лазерна микродисекция за разделяне на туморни от нормални клетки в свежи туморни тъкани;

Библиография:

1. Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008 Sep 25;59(6):932-46.
2. Brodal P. *The Central Nervous System: Structure and Function.*: Oxford Univ Pr; 2010.
3. Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci*. 1988;11:423-53.
4. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009 Apr 10;513(5):532-41.
5. Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*. 2010 Jul 30;329(5991):571-5.
6. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Aug;6(8):626-40.
7. Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2005 Oct;15(5):542-8.
8. Erlichman JS, Leiter JC. Glia modulation of the extracellular milieu as a factor in central CO₂ chemosensitivity and respiratory control. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Jun;108(6):1803-11.
9. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Dec;4(12):991-1001.
10. Yool AJ. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist*. 2007 Oct;13(5):470-85.
11. Zador Z, Bloch O, Yao X, Manley GT. Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog Brain Res*. 2007;161:185-94.
12. Gourine AV, Kasparov S. Astrocytes as brain interoceptors. *Exp Physiol*. 2011 Apr;96(4):411-6.
13. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):467-76.
14. Saito T, Shibasaki K, Kurachi M, Puentes S, Mikuni M, Ishizaki Y. Cerebral capillary endothelial cells are covered by the VEGF-expressing foot processes of astrocytes. *Neurosci Lett*. 2011 Jun 22;497(2):116-21.
15. Piet R, Vargova L, Sykova E, Poulain DA, Oliet SH. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2151-5.
16. <http://www.studyblue.com/notes/note/n/human-anatomy-and-physiology/deck/2043049>.
17. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):871-927.
18. Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006 Jan 20;494(3):415-34.
19. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):302-13.
20. Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 1993 Jan;7(1):9-18.
21. Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, et al. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol*. 1991 Sep;33(3):227-36.
22. Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, et al. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci*. 2009 Mar;12(3):259-67.
23. Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol*. 2008 Jul 22;6(7):e182.
24. Siebzehnrbuhl FA, Reynolds BA, Vescovi A, Steindler DA, Deleyrolle LP. The origins of glioma: E Pluribus Unum? *Glia*. 2011 Aug;59(8):1135-47.
25. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. 2012 Apr;121(1):4-27.

26. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109.
27. Piccirilli M, Brunetto GM, Rocchi G, Giangaspero F, Salvati M. Extra central nervous system metastases from cerebral glioblastoma multiforme in elderly patients. Clinico-pathological remarks on our series of seven cases and critical review of the literature. *Tumori.* 2008 Jan-Feb;94(1):40-51.
28. Figarella-Branger D, Bouvier C. [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer.* 2005 Apr;92(4):301-9.
29. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.
30. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1129-33.
31. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2683-710.
32. Mischel PS, Nelson SF, Cloughesy TF. Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy. *Cancer Biol Ther.* 2003 May-Jun;2(3):242-7.
33. Shai R, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Cloughesy TF, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene.* 2003 Jul 31;22(31):4918-23.
34. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73.
35. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Nov;107(45):799-807; quiz 8.
36. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008 Jul 31;359(5):492-507.
37. GLOBOCAN. 2012.
38. Dimitrova N, Vukov M, Valerianova Z. CANCER INCIDENCE IN BULGARIA 2011. 2011;22.
39. Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D, et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol.* 2010 Jan;20(1):245-54.
40. Dong SM, Pang JC, Poon WS, Hu J, To KF, Chang AR, et al. Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Aug;60(8):808-16.
41. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012 Nov;14 Suppl 5:v1-49.
42. Woodside G. Environmental, Safety, and Health Engineering: US: John Wiley & Sons.; 1997.
43. Ron E, Modan B, Boice JD, Jr., Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med.* 1988 Oct 20;319(16):1033-9.
44. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res.* 2005 Apr;163(4):424-32.
45. Werner A, Modan B, Davidoff D. Doses to brain, skull and thyroid, following x-ray therapy for Tinea capitis. *Phys Med Biol.* 1968 Apr;13(2):247-58.
46. Preston DL, Ron E, Yonehara S, Kobuke T, Fujii H, Kishikawa M, et al. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Oct 16;94(20):1555-63.
47. Sadamori N, Shibata S, Mine M, Miyazaki H, Miyake H, Kurihara M, et al. Incidence of intracranial meningiomas in Nagasaki atomic-bomb survivors. *Int J Cancer.* 1996 Jul 29;67(3):318-22.
48. Shibata S, Sadamori N, Mine M, Sekine I. Intracranial meningiomas among Nagasaki atomic bomb survivors. *Lancet.* 1994 Dec 24-31;344(8939-8940):1770.
49. Cardis E, Richardson L, Deltour I, Armstrong B, Feychting M, Johansen C, et al. The INTERPHONE study: design, epidemiological methods, and description of the study population. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(9):647-64.
50. Pettersson D, Mathiesen T, Prochazka M, Bergenheim T, Florentzson R, Harder H, et al. Long-term mobile phone use and acoustic neuroma risk. *Epidemiology.* 2014 Mar;25(2):233-41.

51. Bunin GR, Kuijten RR, Boesel CP, Buckley JD, Meadows AT. Maternal diet and risk of astrocytic glioma in children: a report from the Childrens Cancer Group (United States and Canada). *Cancer Causes Control*. 1994 Mar;5(2):177-87.
52. Lee M, Wrensch M, Miike R. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes Control*. 1997 Jan;8(1):13-24.
53. Feychting M, Forssen U, Floderus B. Occupational and residential magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors. *Epidemiology*. 1997 Jul;8(4):384-9.
54. Floderus B, Tornqvist S, Stenlund C. Incidence of selected cancers in Swedish railway workers, 1961-79. *Cancer Causes Control*. 1994 Mar;5(2):189-94.
55. Mack W, Preston-Martin S, Peters JM. Astrocytoma risk related to job exposure to electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 1991;12(1):57-66.
56. Inskip PD, Mellekjaer L, Gridley G, Olsen JH. Incidence of intracranial tumors following hospitalization for head injuries (Denmark). *Cancer Causes Control*. 1998 Jan;9(1):109-16.
57. Preston-Martin S, Pogoda JM, Schlehofer B, Blettner M, Howe GR, Ryan P, et al. An international case-control study of adult glioma and meningioma: the role of head trauma. *Int J Epidemiol*. 1998 Aug;27(4):579-86.
58. Wrensch M, Miike R, Lee M, Neuhaus J. Are prior head injuries or diagnostic X-rays associated with glioma in adults? The effects of control selection bias. *Neuroepidemiology*. 2000 Sep-Oct;19(5):234-44.
59. Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, et al. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer*. 1999 Jul 19;82(2):155-60.
60. Shirts SB, Annegers JF, Hauser WA, Kurland LT. Cancer incidence in a cohort of patients with seizure disorders. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Jul;77(1):83-7.
61. Wrensch M, Lee M, Miike R, Newman B, Barger G, Davis R, et al. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol*. 1997 Apr 1;145(7):581-93.
62. Lachance DH, Yang P, Johnson DR, Decker PA, Kollmeyer TM, McCoy LS, et al. Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. *Am J Epidemiol*. 2011 Sep 1;174(5):574-81.
63. Mandelzweig L, Novikov I, Sadetzki S. Smoking and risk of glioma: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2009 Dec;20(10):1927-38.
64. Kutsenko A, Berrington de Gonzalez A, Curtis RE, Rajaraman P. Risk of second benign brain tumors among cancer survivors in the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer Causes Control*. 2014 Jun;25(6):659-68.
65. Reulen RC, Frobisher C, Winter DL, Kelly J, Lancashire ER, Stiller CA, et al. Long-term risks of subsequent primary neoplasms among survivors of childhood cancer. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2311-9.
66. Friedman DL, Whitton J, Leisenring W, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, et al. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul 21;102(14):1083-95.
67. Maule M, Scelo G, Pastore G, Brennan P, Hemminki K, Olsen JH, et al. Second malignancies after childhood noncentral nervous system solid cancer: Results from 13 cancer registries. *Int J Cancer*. 2011 Oct 15;129(8):1940-52.
68. Pirani M, Marcheselli R, Marcheselli L, Bari A, Federico M, Sacchi S. Risk for second malignancies in non-Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1845-58.
69. Nielsen SF, Bojesen SE, Birgens HS, Nordestgaard BG. Risk of thyroid cancer, brain cancer, and non-Hodgkin lymphoma after adult leukemia: a nationwide study. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4062-9.
70. Scarbrough PM, Akushevich I, Wrensch M, Il'yasova D. Exploring the association between melanoma and glioma risks. *Ann Epidemiol*. 2014 Jun;24(6):469-74.
71. Davis FG, Dolecek TA, McCarthy BJ, Villano JL. Toward determining the lifetime occurrence of metastatic brain tumors estimated from 2007 United States cancer incidence data. *Neuro Oncol*. 2012 Sep;14(9):1171-7.

72. Taylor AJ, Little MP, Winter DL, Sugden E, Ellison DW, Stiller CA, et al. Population-based risks of CNS tumors in survivors of childhood cancer: the British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2010 Dec 20;28(36):5287-93.
73. Mauer ME, Bottomley A, Taphoorn MJ. Evaluating health-related quality of life and symptom burden in brain tumour patients: instruments for use in experimental trials and clinical practice. *Curr Opin Neurol*. 2008 Dec;21(6):745-53.
74. Melean G, Sestini R, Ammannati F, Papi L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004 Aug 15;129C(1):74-84.
75. Hemminki K, Tretli S, Sundquist J, Johannesen TB, Granstrom C. Familial risks in nervous-system tumours: a histology-specific analysis from Sweden and Norway. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):481-8.
76. Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M, Barnholtz-Sloan J, Wiklund F, Tavelin B, et al. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. *Am J Epidemiol*. 2010 Nov 15;172(10):1099-107.
77. Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer*. 2002 May 10;99(2):252-9.
78. Cicuttini FM, Hurley SF, Forbes A, Donnan GA, Salzberg M, Giles GG, et al. Association of adult glioma with medical conditions, family and reproductive history. *Int J Cancer*. 1997 Apr 10;71(2):203-7.
79. Hochberg F, Toniolo P, Cole P, Salcman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol*. 1990 Feb;8(1):55-60.
80. Ryan P, Lee MW, North B, McMichael AJ. Risk factors for tumors of the brain and meninges: results from the Adelaide Adult Brain Tumor Study. *Int J Cancer*. 1992 Apr 22;51(1):20-7.
81. Schlehofer B, Blettner M, Becker N, Martinsohn C, Wahrendorf J. Medical risk factors and the development of brain tumors. *Cancer*. 1992 May 15;69(10):2541-7.
82. Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Hepworth SJ, McKinney PA, van Tongeren M, Muir KR. History of allergies and risk of glioma in adults. *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2165-72.
83. Schwartzbaum J, Jonsson F, Ahlbom A, Preston-Martin S, Lonn S, Soderberg KC, et al. Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1;106(3):423-8.
84. Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M. History of allergies among adults with glioma and controls. *Int J Cancer*. 2002 Apr 1;98(4):609-15.
85. Chen C, Xu T, Chen J, Zhou J, Yan Y, Lu Y, et al. Allergy and risk of glioma: a meta-analysis. *Eur J Neurol*. 2011 Mar;18(3):387-95.
86. Il'yasova D, McCarthy B, Marcello J, Schildkraut JM, Moorman PG, Krishnamachari B, et al. Association between glioma and history of allergies, asthma, and eczema: a case-control study with three groups of controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Apr;18(4):1232-8.
87. McCarthy BJ, Rankin K, Il'yasova D, Erdal S, Vick N, Ali-Osman F, et al. Assessment of type of allergy and antihistamine use in the development of glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Feb;20(2):370-8.
88. Wiemels JL, Wilson D, Patil C, Patoka J, McCoy L, Rice T, et al. IgE, allergy, and risk of glioma: update from the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study in the temozolomide era. *Int J Cancer*. 2009 Aug 1;125(3):680-7.
89. Wiemels JL, Wiencke JK, Patoka J, Moghadassi M, Chew T, McMillan A, et al. Reduced immunoglobulin E and allergy among adults with glioma compared with controls. *Cancer Res*. 2004 Nov 15;64(22):8468-73.
90. Calboli FC, Cox DG, Buring JE, Gaziano JM, Ma J, Stampfer M, et al. Prediagnostic plasma IgE levels and risk of adult glioma in four prospective cohort studies. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Nov 2;103(21):1588-95.
91. Schlehofer B, Siegmund B, Linseisen J, Schuz J, Rohrmann S, Becker S, et al. Primary brain tumours and specific serum immunoglobulin E: a case-control study nested in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Allergy*. 2011 Nov;66(11):1434-41.
92. Schwartzbaum J, Ding B, Johannesen TB, Osnes LT, Karavodin L, Ahlbom A, et al. Association between prediagnostic IgE levels and risk of glioma. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug 22;104(16):1251-9.
93. Wiemels JL, Wrensch M, Sison JD, Zhou M, Bondy M, Calvocoressi L, et al. Reduced allergy and immunoglobulin E among adults with intracranial meningioma compared to controls. *Int J Cancer*. 2011 Oct 15;129(8):1932-9.

94. Curran CS, Bertics PJ. Eosinophils in glioblastoma biology. *J Neuroinflammation*. 2012;9:11.
95. Kuperman DA, Schleimer RP. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med*. 2008 Aug;8(5):384-92.
96. Schwartzbaum J, Ahlbom A, Malmer B, Lonn S, Brookes AJ, Doss H, et al. Polymorphisms associated with asthma are inversely related to glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6459-65.
97. Brenner AV, Butler MA, Wang SS, Ruder AM, Rothman N, Schulte PA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in selected cytokine genes and risk of adult glioma. *Carcinogenesis*. 2007 Dec;28(12):2543-7.
98. Schwartzbaum JA, Ahlbom A, Lonn S, Malmer B, Wigertz A, Auvinen A, et al. An international case-control study of interleukin-4Ralpha, interleukin-13, and cyclooxygenase-2 polymorphisms and glioblastoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Nov;16(11):2448-54.
99. Wiemels JL, Wiencke JK, Kelsey KT, Moghadassi M, Rice T, Urayama KY, et al. Allergy-related polymorphisms influence glioma status and serum IgE levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun;16(6):1229-35.
100. Wrensch M, Wiencke JK, Wiemels J, Miike R, Patoka J, Moghadassi M, et al. Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4531-41.
101. Tong JJ, Tao H, Hui OT, Jian C. Diabetes mellitus and risk of brain tumors: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2012 Nov;4(5):877-82.
102. Shiels MS, Cole SR, Kirk GD, Poole C. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Dec;52(5):611-22.
103. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*. 2008 Oct 1;113(7 Suppl):1953-68.
104. Niyazi M, Geisler J, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Garny S, et al. FET-PET for malignant glioma treatment planning. *Radiother Oncol*. 2011 Apr;99(1):44-8.
105. Stupp R, Tonn JC, Brada M, Pentheroudakis G. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 5:v190-3.
106. Pang BC, Wan WH, Lee CK, Khu KJ, Ng WH. The role of surgery in high-grade glioma--is surgical resection justified? A review of the current knowledge. *Ann Acad Med Singapore*. 2007 May;36(5):358-63.
107. Mikuni N, Miyamoto S. Surgical treatment for glioma: extent of resection applying functional neurosurgery. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2010;50(9):720-6.
108. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro Oncol*. 2008 Dec;10(6):1025-34.
109. Karim AB, Afra D, Cornu P, Bleehan N, Schraub S, De Witte O, et al. Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: an interim analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Feb 1;52(2):316-24.
110. Ward B, Mather S, Shepherd J, Crowther M, Hawkins L, Britton K, et al. The treatment of intraperitoneal malignant disease with monoclonal antibody guided 131I radiotherapy. *Br J Cancer*. 1988 Nov;58(5):658-62.
111. Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1985;32:115-54.
112. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991 Jan 31;349(6308):431-4.
113. Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X, et al. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther*. 2003 Apr;98(1):71-108.
114. Soussain C, Ricard D, Fike JR, Mazon JJ, Psimaras D, Delattre JY. CNS complications of radiotherapy and chemotherapy. *Lancet*. 2009 Nov 7;374(9701):1639-51.
115. Cokgor I, Friedman HS, Friedman AH. Chemotherapy for adults with malignant glioma. *Cancer Invest*. 1999;17(4):264-72.
116. Linz U. Commentary on Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial (*Lancet Oncol*. 2009;10:459-466). *Cancer*. 2010 Apr 15;116(8):1844-6.

117. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459-66.
118. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 2002 Sep;64(3):259-73.
119. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
120. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
121. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.
122. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2007 Mar;113(3):295-302.
123. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):98-110.
124. Italiano A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions! *J Clin Oncol.* 2011 Dec 10;29(35):4718; author reply -9.
125. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
126. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2715-22.
127. Siker ML, Wang M, Porter K, Nelson DF, Curran WJ, Michalski JM, et al. Age as an independent prognostic factor in patients with glioblastoma: a Radiation Therapy Oncology Group and American College of Surgeons National Cancer Data Base comparison. *J Neurooncol.* 2011 Aug;104(1):351-6.
128. Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst.* 1993 May 5;85(9):704-10.
129. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002 Oct;4(4):278-99.
130. Yamanaka R, Arao T, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Tanaka R, et al. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene.* [Validation Studies]. 2006 Sep 28;25(44):5994-6002.
131. Carlson MR, Pope WB, Horvath S, Braunstein JG, Nghiemphu P, Tso CL, et al. Relationship between survival and edema in malignant gliomas: role of vascular endothelial growth factor and neuronal pentraxin 2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007 May 1;13(9):2592-8.
132. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *Journal of neurosurgery.* [Comparative Study
Multicenter Study
Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Sep;99(3):467-73.
133. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* [Comparative Study
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1985 Sep 1;56(5):1106-11.
134. Ammirati M, Vick N, Liao YL, Ciric I, Mikhael M. Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery.* 1987 Aug;21(2):201-6.

135. Hentschel SJ, Sawaya R. Optimizing outcomes with maximal surgical resection of malignant gliomas. *Cancer Control*. 2003 Mar-Apr;10(2):109-14.
136. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
137. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med*. 2007 Apr 12;356(15):1527-35.
138. Douw L, Klein M, Fagel SS, van den Heuvel J, Taphoorn MJ, Aaronson NK, et al. Cognitive and radiological effects of radiotherapy in patients with low-grade glioma: long-term follow-up. *Lancet Neurol*. 2009 Sep;8(9):810-8.
139. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta neuropathologica*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Oct;118(4):469-74.
140. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73.
141. Kil IS, Kim SY, Lee SJ, Park JW. Small interfering RNA-mediated silencing of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase enhances the sensitivity of HeLa cells toward tumor necrosis factor- α and anticancer drugs. *Free Radic Biol Med*. 2007 Oct 15;43(8):1197-207.
142. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Apr 10;324(5924):261-5.
143. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer*. 2009 Jul 15;125(2):353-5.
144. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2008 Dec;116(6):597-602.
145. Holdhoff M, Parsons DW, Diaz LA, Jr. Mutations of IDH1 and IDH2 are not detected in brain metastases of colorectal cancer. *J Neurooncol*. 2009 Sep;94(2):297.
146. Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9157-9.
147. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat*. 2009 Jan;30(1):7-11.
148. Morris JH, Meng EC, Ferrin TE. Computational tools for the interactive exploration of proteomic and structural data. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Aug;9(8):1703-15.
149. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 Dec 10;462(7274):739-44.
150. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):339-44.
151. Takahashi Y, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Kamada H, et al. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients. *World J Surg Oncol*. 2013;11:284.
152. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci*. 2014 Apr;105(4):363-9.
153. Young RM, Simon MC. Untuning the tumor metabolic machine: HIF- α : pro- and antitumorigenic? *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1024-5.
154. Paulus W. GFAP, Ki67 and IDH1: perhaps the golden triad of glioma immunohistochemistry. *Acta Neuropathol*. 2009 Nov;118(5):603-4.
155. Gupta R, Flanagan S, Li CC, Lee M, Shivalingham B, Maleki S, et al. Expanding the spectrum of IDH1 mutations in gliomas. *Mod Pathol*. 2013 May;26(5):619-25.
156. Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, et al. IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:654727.
157. 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.

158. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Aug;11(4):341-7.
159. Almeida LO, Custodio AC, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res.* 2009;8(1):8-18.
160. Oren M, Levine AJ. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jan;80(1):56-9.
161. Nave KA, Trapp BD. Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:535-61.
162. Macleod K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Feb;10(1):81-93.
163. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene.* 2002 Oct 16;299(1-2):35-55.
164. Soussi T, Wiman KG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell.* 2007 Oct;12(4):303-12.
165. Butowski NA, Chang SM. Glial tumors: the current state of scientific knowledge. *Clin Neurosurg.* 2006;53:106-13.
166. Cui W, Wu R, Cao H, Gao J, Wang X, Ren Q. P53 gene mutation and expression of MDM2, P53, P16 protein and their relationship in human glioma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005;25(6):622-4, 35.
167. Kato H, Kato S, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T, Han SY, et al. Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3937-43.
168. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, et al. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 1;17(13):4588-99.
169. Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, et al. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res.* 2008 Jan;6(1):21-30.
170. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):369-76.
171. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 2012 Apr 15;26(8):756-84.
172. Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasieni P, Adams J, et al. Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle.* 2006 Apr;5(7):783-91.
173. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2012 May;108(1):11-27.
174. Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, et al. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6205-10.
175. Beroukhi R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 11;104(50):20007-12.
176. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):6892-9.
177. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005 Nov 10;353(19):2012-24.
178. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2596-606.
179. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Dec 1;27(34):5743-50.
180. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, et al. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res.* 2009 May;7(5):665-77.

181. Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11502-13.
182. Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, et al. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res.* 1997 Apr 1;57(7):1250-4.
183. Ng K, Kim R, Kesari S, Carter B, Chen CC. Genomic profiling of glioblastoma: convergence of fundamental biologic tenets and novel insights. *J Neurooncol.* 2012 Mar;107(1):1-12.
184. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):899-904.
185. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):905-8.
186. Holtkamp N, Ziegenhagen N, Malzer E, Hartmann C, Giese A, von Deimling A. Characterization of the amplicon on chromosomal segment 4q12 in glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2007 Jul;9(3):291-7.
187. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, et al. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One.* 2009;4(11):e7752.
188. Clarke ID, Dirks PB. A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming. *Oncogene.* 2003 Feb 6;22(5):722-33.
189. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, et al. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev.* 2010 Oct 1;24(19):2205-18.
190. Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest.* 2004 Aug;84(8):941-51.
191. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, et al. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res.* 2006 Oct;4(10):709-14.
192. Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol.* 2004 Oct;14(4):372-7.
193. Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Plant K, et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas. *Oncogene.* 2008 Mar 27;27(14):2097-108.
194. Alitalo K, Koskinen P, Makela TP, Saksela K, Sistonen L, Winqvist R. myc oncogenes: activation and amplification. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Apr 20;907(1):1-32.
195. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000 Feb 1;28(3):669-77.
196. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):220-4.
197. Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene.* 1999 Feb 4;18(5):1219-26.
198. Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Englert C. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2116-21.
199. Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene.* 2000 Mar 9;19(11):1485-90.
200. Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Bjorkholm M, Gruber A, et al. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):3826-31.
201. Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene.* 2002 Jan 21;21(4):688-97.
202. Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, Xie H, Duran GE, Bredel C, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA.* 2009 Jul 15;302(3):276-89.

203. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2008 Sep;7(9):1321-5.
204. Bredel M, Scholtens DM, Yadav AK, Alvarez AA, Renfrow JJ, Chandler JP, et al. NFKBIA deletion in glioblastomas. *N Engl J Med.* 2011 Feb 17;364(7):627-37.
205. Veeriah S, Brennan C, Meng S, Singh B, Fagin JA, Solit DB, et al. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 9;106(23):9435-40.
206. Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, Xiao Y, Mahoney J, Protopopov A, et al. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell.* 2008 Apr;13(4):355-64.
207. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Jun;59(6):539-43.
208. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science.* 2011 Sep 9;333(6048):1453-5.
209. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9852-61.
210. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, et al. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest.* 2005 Feb;85(2):165-75.
211. Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):407-15.
212. Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, Bredel C, Chandler JP, Renfrow JJ, et al. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA.* 2009 Jul 15;302(3):261-75.
213. Hermesen M, Snijders A, Guervos MA, Taenzer S, Koerner U, Baak J, et al. Centromeric chromosomal translocations show tissue-specific differences between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Oncogene.* 2005 Feb 24;24(9):1571-9.
214. Wong N, Lam WC, Lai PB, Pang E, Lau WY, Johnson PJ. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):465-71.
215. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):10060-5.
216. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1175-90.
217. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
218. Mirmanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 1;24(16):2563-9.
219. Walker C, du Plessis DG, Fildes D, Haylock B, Husband D, Jenkinson MD, et al. Correlation of molecular genetics with molecular and morphological imaging in gliomas with an oligodendroglial component. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 1;10(21):7182-91.
220. Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Feb;131(2):242-51.
221. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol.* 2000 Feb;18(3):636-45.
222. Ren X, Cui X, Lin S, Wang J, Jiang Z, Sui D, et al. Co-deletion of chromosome 1p/19q and IDH1/IDH2 mutation in glioma subsets of brain tumors in Chinese patients. *PLoS One.* 2012;7(3):e32764.
223. Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng PP, Collins VP, Figarella-Branger D, et al. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial

- 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Jun;66(6):545-51.
224. Natsume A, Kondo Y, Ito M, Motomura K, Wakabayashi T, Yoshida J. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Sci.* 2010 Jun;101(6):1331-6.
225. Jabbari K, Bernardi G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene.* 2004 May 26;333:143-9.
226. Cohen NM, Kenigsberg E, Tanay A. Primate CpG islands are maintained by heterogeneous evolutionary regimes involving minimal selection. *Cell.* 2011 May 27;145(5):773-86.
227. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009 Nov 19;462(7271):315-22.
228. Feil R, Berger F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* 2007 Apr;23(4):192-9.
229. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):163-7.
230. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):683-92.
231. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8681-6.
232. Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, Fernandez AF, et al. A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics.* 2009 May 16;4(4):255-64.
233. Martinez R, Schackert G, Esteller M. Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007 Apr;82(2):133-9.
234. Stone AR, Bobo W, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG, Vertino PM. Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am J Pathol.* 2004 Oct;165(4):1151-61.
235. Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol.* 2009 Jun;19(3):188-97.
236. Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifemberger G, et al. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Nov 1;123(9):2080-6.
237. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marcinek K, et al. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer.* 2003 Aug 10;106(1):52-9.
238. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 2001 Jan;81(1):77-82.
239. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):510-22.
240. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012 Mar 22;483(7390):479-83.
241. van den Bent MJ, Gravendeel LA, Gorlia T, Kros JM, Lapre L, Wesseling P, et al. A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15;17(22):7148-55.
242. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003 Apr;3(4):253-66.
243. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2038-45.
244. Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):3987-91.
245. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer.* 2000 Dec;36(18):2294-300.
246. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

247. Wen PY, Schiff D, Kesari S, Drappatz J, Gigas DC, Doherty L. Medical management of patients with brain tumors. *J Neurooncol.* 2006 Dec;80(3):313-32.
248. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4.
249. Giovagnoli AR, Boiardi A. Cognitive impairment and quality of life in long-term survivors of malignant brain tumors. *Ital J Neurol Sci.* 1994 Dec;15(9):481-8.
250. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5874-80.
251. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, et al. MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol.* 2006 Dec;60(6):740-3.
252. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, et al. 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.
253. Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Herman JG, Esteller M. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007 May;83(1):91-3.
254. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, Burnham J, Yates AJ, Holmes EJ, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. *J Clin Oncol.* 2006 Jul 20;24(21):3431-7.
255. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, et al. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5881-6.
256. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Bacci A, Agati R, et al. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol.* 2010 Mar;12(3):283-8.
257. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 15;10(6):1871-4.
258. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* 2008 Jan;9(1):29-38.
259. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. 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.
260. Sadones J, Michotte A, Veld P, Chaskis C, Sciort R, Menten J, et al. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer.* 2009 Jan;45(1):146-53.
261. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4933-8.
262. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):643-9.
263. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):761. 3.
264. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
265. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.

266. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):967-9.
267. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):143-4.
268. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003 Apr 1;138(7):560-70.
269. Kunkel TA. DNA replication fidelity. *J Biol Chem*. 1992 Sep 15;267(26):18251-4.
270. Martinez R, Schackert HK, Appelt H, Plaschke J, Baretton G, Schackert G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Feb;131(2):87-93.
271. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):812-6.
272. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*. 1993 Dec 15;53(24):5849-52.
273. Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet*. 1996 Nov;98(5):601-7.
274. Field JK, Kiaris H, Howard P, Vaughan ED, Spandidos DA, Jones AS. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*. 1995 May;71(5):1065-9.
275. Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet*. 1994 Feb;6(2):152-6.
276. Watanabe M, Imai H, Kato H, Shiraishi T, Ushijima T, Nagao M, et al. Microsatellite instability in latent prostate cancers. *Int J Cancer*. 1996 Oct 21;69(5):394-7.
277. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009 Jul;76(1):1-18.
278. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 15;20(4):1043-8.
279. Vladimirova V, Denkhau D, Soerensen N, Wagner S, Wolff JE, Pietsch T. Low level of microsatellite instability in paediatric malignant astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008 Oct;34(5):547-54.
280. Eckert A, Kloor M, Giersch A, Ahmadi R, Herold-Mende C, Hampl JA, et al. Microsatellite instability in pediatric and adult high-grade gliomas. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):146-50.
281. Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1994 Apr 21;330(16):1136-42.
282. Humbert O, Fiumicino S, Aquilina G, Branch P, Oda S, Zijno A, et al. Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis*. 1999 Feb;20(2):205-14.
283. Liu L, Gerson SL. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):328-31.
284. Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooij JJ, Stubbs AP, Duijm JE, et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res*. 2009 Dec 1;69(23):9065-72.
285. Shirahata M, Oba S, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, et al. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. *Cancer Sci*. 2009 Jan;100(1):165-72.
286. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Apr;33(4):207-14.
287. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*. 1989 Dec 1;49(23):6449-65.
288. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist*. 2008;13 Suppl 3:21-6.
289. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):38-47.
290. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):678-85.

291. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec;12(12):5447-54.
292. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997 Jan 1;11(1):72-82.
293. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 2001 Nov 29;414(6863):550-4.
294. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 2003 Aug 15;22(16):4082-90.
295. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 May;5(5):343-54.
296. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294-309.
297. Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, et al. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem.* 2006 Aug 11;281(32):22575-85.
298. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):14871-8.
299. Takahashi R, Kobayashi C, Kondo Y, Nakatani Y, Kudo I, Kunitomo M, et al. Subcellular localization and regulation of hypoxia-inducible factor-2alpha in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 23;317(1):84-91.
300. Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul;23(14):4959-71.
301. Heidebreder M, Frohlich F, Johren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J.* 2003 Aug;17(11):1541-3.
302. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, et al. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem.* 2007 May 11;282(19):14073-82.
303. Qing G, Simon MC. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev.* 2009 Feb;19(1):60-6.
304. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Feb;7(2):168-81.
305. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):7987-92.
306. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 2007 Mar 22;446(7134):444-8.
307. Pan Y, Oprysko PR, Asham AM, Koch CJ, Simon MC. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment. *Oncogene.* 2004 Jun 24;23(29):4975-83.
308. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010 Dec 9;29(49):6409-17.
309. Yoo H, Sohn S, Nam BH, Min HS, Jung E, Shin SH, et al. The expressions of carbonic anhydrase 9 and vascular endothelial growth factor in astrocytic tumors predict a poor prognosis. *Int J Mol Med.* 2010 Jul;26(1):3-9.
310. Haapasalo JA, Nordfors KM, Hilvo M, Rantala IJ, Soini Y, Parkkila AK, et al. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2006 Jan 15;12(2):473-7.
311. Jarvela S, Parkkila S, Bragge H, Kahkonen M, Parkkila AK, Soini Y, et al. Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors. *BMC Cancer.* 2008;8:1.
312. Shin HJ, Rho SB, Jung DC, Han IO, Oh ES, Kim JY. Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci.* 2011 Apr 1;124(Pt 7):1077-87.

313. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*. 2010 Dec 16;29(50):6509-21.
314. Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, Rot S, Kappler M, Bache M, et al. HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC Cancer*. 2010;10:605.
315. Potter CP, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):2-7.
316. Cianchi F, Vinci MC, Supuran CT, Peruzzi B, De Giuli P, Fasolis G, et al. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Sep 1;334(3):710-9.
317. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:563-84.
318. Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications: InTech; 2013.
319. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*. 1995 Aug 25;270(34):19761-6.
320. Liu LX, Lu H, Luo Y, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 8;291(4):908-14.
321. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
322. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995 Sep 15;55(18):3964-8.
323. Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y, et al. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer*. 1997 Oct 21;74(5):502-7.
324. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer*. 1998 Feb 20;79(1):34-8.
325. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 May;7(5):359-71.
326. Roskoski R, Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24;375(3):287-91.
327. Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, Jussila L, Li TF, Ristimäki A, et al. Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. *J Rheumatol*. 2002 Jan;29(1):39-45.
328. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 May;3(5):391-400.
329. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2006 Sep 30;39(5):469-78.
330. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):549-60.
331. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002 Apr;1(3):219-27.
332. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):4-25.
333. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998 Jul;28(1):68-77.
334. Hazar B, Paydas S, Zorludemir S, Sahin B, Tuncer I. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003 Dec;44(12):2089-93.
335. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):505-16.

336. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5(5):341-54.
337. Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res*. 2009 Jul;7(7):1000-12.
338. Hasselbalch B, Lassen U, Poulsen HS, Stockhausen MT. Cetuximab insufficiently inhibits glioma cell growth due to persistent EGFR downstream signaling. *Cancer Invest*. 2010 Oct;28(8):775-87.
339. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37.
340. Wei EX, Anga AA, Martin SS, Jackson JG, Nordberg ML, Herrera GA, et al. EGFR expression as an ancillary tool for diagnosing lung cancer in cytology specimens. *Mod Pathol*. 2007 Sep;20(9):905-13.
341. Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz C, Masui H, Fairshier R, Royston I, et al. Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst*. 1987 Sep;79(3):403-7.
342. Sainsbury JR, Malcolm AJ, Appleton DR, Farndon JR, Harris AL. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Pathol*. 1985 Nov;38(11):1225-8.
343. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Dec;11(4):689-708.
344. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res*. 1984 Feb;44(2):753-60.
345. Izyska-Swieszewska E, Brzeskwiniewicz M, Wozniak A, Drozynska E, Grajkowska W, Perek D, et al. EGFR, PIK3CA and PTEN gene status and their protein product expression in neuroblastic tumours. *Folia Neuropathol*. 2010;48(4):238-45.
346. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, et al. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):91-6.
347. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct;84(19):6899-903.
348. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(21):8602-6.
349. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31;272(5):2927-35.
350. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2006 Nov;6(11):876-85.
351. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med*. 2005 Oct 19;3:38.
352. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4309-13.
353. Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol*. 2009 Jun;11(3):274-80.
354. Galanis E, Carlson SK, Foster NR, Lowe V, Quevedo F, McWilliams RR, et al. Phase I trial of a pathotropic retroviral vector expressing a cytotoxic cyclin G1 construct (Rexin-G) in patients with advanced pancreatic cancer. *Mol Ther*. 2008 May;16(5):979-84.
355. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, et al. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol*. 1998 Oct;8(4):655-67.
356. Waha A, Baumann A, Wolf HK, Fimmers R, Neumann J, Kindermann D, et al. Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. *J Neurosurg*. 1996 Oct;85(4):634-41.

357. Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella-Branger D. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998 Oct;24(5):381-8.
358. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 15;93(16):1246-56.
359. Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996 Mar 1;34(4):809-15.
360. Etienne MC, Formento JL, Lebrun-Frenay C, Gioanni J, Chatel M, Paquis P, et al. Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. *Clin Cancer Res.* 1998 Oct;4(10):2383-90.
361. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):1122-8.
362. Tritschler I, Gramatzki D, Capper D, Mittelbronn M, Meyermann R, Saharinen J, et al. Modulation of TGF-beta activity by latent TGF-beta-binding protein 1 in human malignant glioma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Aug 1;125(3):530-40.
363. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* [Review]. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
364. Golestaneh N, Mishra B. TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma. *Oncogene.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2005 Aug 29;24(37):5722-30.
365. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Oct;11(10):790-811.
366. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature reviews Cancer.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2010 Jun;10(6):415-24.
367. Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocana A, Penuelas S, Arias A, et al. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer cell.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Feb;11(2):147-60.
368. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, et al. TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer cell.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Dec 14;18(6):655-68.
369. Hau P, Jachimczak P, Schlaier J, Bogdahn U. TGF-beta2 signaling in high-grade gliomas. *Curr Pharm Biotechnol.* [Review]. 2011 Dec;12(12):2150-7.
370. Kesari S, Jackson-Grusby L, Stiles CD. "Smad"eningly erratic: target gene methylation determines whether TGFbeta promotes or suppresses malignant glioma. *Developmental cell.* 2007 Mar;12(3):324-5.
371. Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *International journal of cancer Journal international du cancer.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 May 20;89(3):251-8.
372. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, et al. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Feb 7;27(7):918-30.
373. Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. Stem cells and brain cancer. *Cell death and differentiation.* [Review]. 2006 Jan;13(1):5-11.
374. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer.* [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2006;5:67.

375. Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2005 Nov;28(11):583-8.
376. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG.* [Review]. 2000 Apr;16(4):182-7.
377. Kordes U, Cheng YC, Scotting PJ. Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jun 30;157(2):209-13.
378. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126-40.
379. Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development.* 2004 Aug;131(15):3805-19.
380. Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, et al. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development.* 2008 Feb;135(3):541-57.
381. Ferletta M. The Role of Sox Transcription Factors in Brain Tumourigenesis. In: Garami MR, editor. *Molecular Targets of CNS Tumors: InTech*; 2011. p. 99-124.
382. Phi JH, Kim JH, Eun KM, Wang KC, Park KH, Choi SA, et al. Upregulation of SOX2, NOTCH1, and ID1 in supratentorial primitive neuroectodermal tumors: a distinct differentiation pattern from that of medulloblastomas. *J Neurosurg Pediatr.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jun;5(6):608-14.
383. Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *British journal of cancer.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Apr 23;96(8):1293-301.
384. Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, et al. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013 Jan;26(1):117-24.
385. Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P, Jr., Hemmings BA, et al. GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS One.* 2009;4(10):e7443.
386. Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, Werner T, Kosian T, et al. SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Developmental cell.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Nov;11(5):697-709.
387. Schlierf B, Friedrich RP, Roerig P, Felsberg J, Reifemberger G, Wegner M. Expression of SoxE and SoxD genes in human gliomas. *Neuropathology and applied neurobiology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Dec;33(6):621-30.
388. Qin YR, Tang H, Xie F, Liu H, Zhu Y, Ai J, et al. Characterization of tumor-suppressive function of SOX6 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan 1;17(1):46-55.
389. Cheng YC, Lee CJ, Badge RM, Orme AT, Scotting PJ. Sox8 gene expression identifies immature glial cells in developing cerebellum and cerebellar tumours. *Brain research Molecular brain research.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Aug 15;92(1-2):193-200.
390. Swartling FJ, Ferletta M, Kastemar M, Weiss WA, Westermarck B. Cyclic GMP-dependent protein kinase II inhibits cell proliferation, Sox9 expression and Akt phosphorylation in human glioma cell lines. *Oncogene.* 2009 Sep 3;28(35):3121-31.
391. Wang H, Leav I, Ibaragi S, Wegner M, Hu GF, Lu ML, et al. SOX9 is expressed in human fetal prostate epithelium and enhances prostate cancer invasion. *Cancer Res.* 2008 Mar 15;68(6):1625-30.
392. Wang H, McKnight NC, Zhang T, Lu ML, Balk SP, Yuan X. SOX9 is expressed in normal prostate basal cells and regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Jan 15;67(2):528-36.
393. Wang L, He S, Yuan J, Mao X, Cao Y, Zong J, et al. Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(5):3484-90.

394. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):207-14.
395. Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, Beier CP, Dettmer K, Oefner PJ, et al. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol.* 2009 Aug;11(4):368-80.
396. Du R, Petritsch C, Lu K, Liu P, Haller A, Ganss R, et al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro Oncol.* 2008 Jun;10(3):254-64.
397. Wang-Gillam A, Siegel E, Mayes DA, Hutchins LF, Zhou Y-H. Anti-Tumor effect of Doxycycline on Glioblastoma cells. *Journals of Cancer Molecules.* [Research paper]. 2007;3(5):147-53.
398. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005 May 25;1755(1):37-69.
399. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):411-24.
400. Choe G, Park JK, Jouben-Steele L, Kremen TJ, Liao LM, Vinters HV, et al. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):2894-901.
401. Di Carlo A, Mariano A, Terracciano D, Mazzarella C, Galzerano S, Cicalese M, et al. Gelatinolytic activities (matrix metalloproteinase-2 and -9) and soluble extracellular domain of Her-2/neu in pleural effusions. *Oncol Rep.* 2007 Aug;18(2):425-31.
402. Di Carlo A, Mariano A, Terracciano D, Ferro M, Montanaro V, Marsicano M, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the urine of prostate cancer patients. *Oncol Rep.* 2010 Jul;24(1):3-8.
403. Di Carlo A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the sera and in the urine of human oncocyoma and renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2012 Sep;28(3):1051-6.
404. Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, et al. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *J Clin Oncol.* 2010 May 10;28(14):2467-74.
405. Barresi V, Vitarelli E, Tuccari G, Barresi G. MMP-9 expression in meningiomas: a prognostic marker for recurrence risk? *J Neurooncol.* 2011 Apr;102(2):189-96.
406. Freire P, Vilela M, Deus H, Kim YW, Koul D, Colman H, et al. Exploratory analysis of the copy number alterations in glioblastoma multiforme. *PLoS One.* 2008;3(12):e4076.
407. Zhang Y, Wei H, Wang M, Huai L, Mi Y, Lin D, et al. Some novel features of IDH1-mutated acute myeloid leukemia revealed in Chinese patients. *Leuk Res.* 2011 Oct;35(10):1301-6.
408. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Jun 15;30(12):e57.
409. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41.
410. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
411. Eisen MB, P.T. S, P.O. B, D. B. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. 1988; 95.
412. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):2907-12.
413. Mangiameli P, Chen SK, West DW. A comparison of SOM neural network and hierarchical clustering methods. *Eur J Oper Res.* 1996;93:402~17.
414. Tan P, Steinbach M, Kumar V, editors. Introduction to data mining. Boston, MA, USA: Addison Wesley; 2005.
415. Hemerly JP, Bastos AU, Cerutti JM. Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol.* 2010 Nov;163(5):747-55.

416. Wagner K, Damm F, Gohring G, Gorlich K, Heuser M, Schafer I, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356-64.
417. Prensner JR, Chinnaiyan AM. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat Med*. Mar;17(3):291-3.
418. McLendon RE, Herndon JE, 2nd, West B, Reardon D, Wiltshire R, Rasheed BK, et al. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogliomas. *Cancer*. 2005 Oct 15;104(8):1693-9.
419. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jan 19;103(2):143-53.
420. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretschmar HA, Egensperger R, Kreth FW. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol*. 2010 Jun;12(6):570-9.
421. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):717-26.
422. Verma M, editor. *Cancer Epidemiology: Volume 2, Modifiable Factors.*: Humana Press; 2008.
423. Nikiforova MN, Hamilton RL. Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May;135(5):558-68.
424. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999 Jan;1(1):44-51.
425. Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2002 Apr 15;20(8):2076-84.
426. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol*. 2004 Jul;6(3):227-35.
427. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, Langberg CW, Lote K, Ronning P, et al. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand*. 2010 Sep;122(3):159-67.
428. Packer RJ, Schiff D, editors. *Neuro-oncology*: John Wiley & Sons Ltd; 2012.
429. Stark AM, Stepper W, Mehdorn HM. Outcome evaluation in glioblastoma patients using different ranking scores: KPS, GOS, mRS and MRC. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2010 Jan 1;19(1):39-44.
430. Buccheri G, Ferrigno D, Giordano MC. Weekly chemotherapy with cisplatin and paclitaxel in advanced NSCLC: a phase II study. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2006 Jun;65(2):75-81.
431. Mackworth N, Fobair P, Prados MD. Quality of life self-reports from 200 brain tumor patients: comparisons with Karnofsky performance scores. *J Neurooncol*. 1992 Nov;14(3):243-53.
432. Nimsy C, Ganslandt O, Buchfelder M, Fahlbusch R. Intraoperative visualization for resection of gliomas: the role of functional neuronavigation and intraoperative 1.5 T MRI. *Neurol Res*. 2006 Jul;28(5):482-7.
433. Muragaki Y, Iseki H, Maruyama T, Kawamata T, Yamane F, Nakamura R, et al. Usefulness of intraoperative magnetic resonance imaging for glioma surgery. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;98:67-75.
434. Mehdorn HM, Schwartz F, Dawirs S, Hedderich J, Dorner L, Nabavi A. High-field iMRI in glioblastoma surgery: improvement of resection radicality and survival for the patient? *Acta Neurochir Suppl*. 2011;109:103-6.
435. Oszvald A, Guresir E, Setzer M, Vatter H, Senft C, Seifert V, et al. Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age. *J Neurosurg*. 2012 Feb;116(2):357-64.
436. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008 Mar;62(3):564-76; discussion -76.
437. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsy C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol*. 2011 Dec;13(12):1339-48.
438. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2014 Jan;16(1):113-22.

439. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* 2011 Jul;115(1):3-8.
440. Eyupoglu IY, Buchfelder M, Savaskan NE. Surgical resection of malignant gliomas-role in optimizing patient outcome. *Nat Rev Neurol.* 2013 Mar;9(3):141-51.
441. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* [Review]. 2010 Sep;16(9):387-97.
442. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Sep 1;27(25):4150-4.
443. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, et al. 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.* Mar 1;16(5):1597-604.
444. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* 2011 Jan;21(1):74-87.
445. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):307-12.
446. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009 Feb;9(2):95-107.
447. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res.* 1990 Aug 25;18(16):4961.
448. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):357-65.
449. El Hallani S, Ducray F, Idbaih A, Marie Y, Boisselier B, Colin C, et al. TP53 codon 72 polymorphism is associated with age at onset of glioblastoma. *Neurology.* 2009 Jan 27;72(4):332-6.
450. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
451. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, et al. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;54(5):1324-30.
452. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta neuropathologica.* [Review]. 2010 Nov;120(5):585-92.
453. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010 Mar 16;17(3):225-34.
454. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012 Mar 22;483(7390):474-8.
455. Jin G, Reitman ZJ, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Yang J, Schmidt-Kittler O, et al. 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One.* 2011;6(2):e16812.
456. Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 12;393(3):555-9.
457. Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, et al. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide. *Neurology.* [Clinical Trial Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Nov 24;73(21):1792-5.
458. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci.* 2009 Oct;100(10):1996-8.
459. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, et al. Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol.* 2012 Jul;108(3):361-73.

460. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP⁺-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta neuropathologica*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr;119(4):487-94.
461. Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol*. 2001 Jun;53(2):129-47.
462. Wang XW, Boisselier B, Rossetto M, Marie Y, Idhah A, Mokhtari K, et al. Prognostic impact of the isocitrate dehydrogenase 1 single-nucleotide polymorphism rs11554137 in malignant gliomas. *Cancer*. 2013 Feb 15;119(4):806-13.
463. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*. [Review]. 2009 Dec;100(12):2235-41.
464. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010 Dec;120(6):707-18.
465. Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol*. 2008 Jul;18(3):360-9.
466. Scheie D, Cvanarova M, Mork S, Skullerud K, Andresen PA, Benestad I, et al. Can morphology predict 1p/19q loss in oligodendroglial tumours? *Histopathology*. 2008 Nov;53(5):578-87.
467. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res*. 1992 Aug 1;52(15):4277-9.
468. Jeuken JW, Wesseling P. MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; a novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. *J Pathol*. 2010 Dec;222(4):324-8.
469. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, et al. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995 Jan;54(1):91-5.
470. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*. 1995 Oct;11(10):412-5.
471. Wang Y, Li S, Chen L, You G, Bao Z, Yan W, et al. Glioblastoma with an oligodendroglioma component: distinct clinical behavior, genetic alterations, and outcome. *Neuro Oncol*. 2012 Apr;14(4):518-25.
472. Marko NF, Weil RJ. The molecular biology of WHO grade II gliomas. *Neurosurg Focus*. 2013 Feb;34(2):E1.
473. Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Kusak ME, Sarasa JL, et al. hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Jan 15;116(2):142-7.
474. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Lomas J, Arjona D, de Campos JM, et al. Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer*. 2001 Jul 20;85(2):204-8.
475. Alonso ME, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Aminos C, Lopez-Marin I, et al. Mutational study of the 1p located genes p18ink4c, Patched-2, RIZ1 and KIF1B in oligodendrogliomas. *Oncol Rep*. 2005 Mar;13(3):539-42.
476. Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer*. 1999 Mar;79(9-10):1468-74.
477. Utada Y, Emi M, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, et al. Allelic loss at 1p34-36 predicts poor prognosis in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Aug;6(8):3193-8.
478. Kambara T, Sharp GB, Nagasaka T, Takeda M, Sasamoto H, Nakagawa H, et al. Allelic loss of a common microsatellite marker MYCL1: a useful prognostic factor of poor outcomes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 1;10(5):1758-63.
479. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.

480. Mai M, Huang H, Reed C, Qian C, Smith JS, Alderete B, et al. Genomic organization and mutation analysis of p73 in oligodendrogliomas with chromosome 1 p-arm deletions. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3):359-63.
481. Seizinger BR, Klinger HP, Junien C, Nakamura Y, Le Beau M, Cavenee W, et al. Report of the committee on chromosome and gene loss in human neoplasia. *Cytogenet Cell Genet* 1991;58:17.
482. Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, et al. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer*. 2006 Aug 15;119(4):792-800.
483. Peters N, Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Pohl U, Portier BP, et al. The human glia maturation factor-gamma gene: genomic structure and mutation analysis in gliomas with chromosome 19q loss. *Neurogenetics*. 1999 Sep;2(3):163-6.
484. Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, et al. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2012 Jun;123(6):853-60.
485. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012 Jul;3(7):709-22.
486. Olar A, Aldape KD. Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2012 Dec;13(4):417-36.
487. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta neuropathologica*. [Review]. 2010 Nov;120(5):567-84.
488. Ducray F, Idbaih A, de Reynies A, Bieche I, Thillet J, Mokhtari K, et al. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer*. 2008;7:41.
489. Kaloshi G, Benouaich-Amiel A, Diakite F, Taillibert S, Lejeune J, Laigle-Donadey F, et al. Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome. *Neurology*. 2007 May 22;68(21):1831-6.
490. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Dec 1;13(23):6933-7.
491. 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.
492. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*. 2004 Jan 8;23(1):1-8.
493. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010 Jan;6(1):39-51.
494. Wick W, Platten M, Weller M. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro Oncol*. 2009 Feb;11(1):69-79.
495. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology*. 2009;32(1):21-9.
496. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Benevento F, Scopece L, Mazzocchi V, et al. Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *Cancer*. 2009 Aug 1;115(15):3512-8.
497. Gerstner ER, Yip S, Wang DL, Louis DN, Iafrate AJ, Batchelor TT. Mgmt methylation is a prognostic biomarker in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neurology*. 2009 Nov 3;73(18):1509-10.
498. Hau P, Stupp R, Hegi ME. MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers*. 2007;23(1-2):97-104.
499. Iafrate AJ, Louis DN. "MGMT for pt mgmt": is methylguanine-DNA methyltransferase testing ready for patient management? *J Mol Diagn*. 2008 Jul;10(4):308-10.
500. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. 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.

501. Ghosal G, Chen J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl Cancer Res.* 2013;2(3):107-29.
502. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013;754:3-29.
503. Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, et al. Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 1;14(15):4859-68.
504. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan;5(1):102-14.
505. Glavac D, Volavsek M, Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Gale N. Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Oct 1;146(1):27-32.
506. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004 Jul 23;95(2):146-53.
507. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23659-67.
508. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15809-14.
509. Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jul;6(7):1909-19.
510. McLendon RE, Turner K, Perkinson K, Rich J. Second messenger systems in human gliomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Oct;131(10):1585-90.
511. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1383-7.
512. Clarke K, Smith K, Gullick WJ, Harris AL. Mutant epidermal growth factor receptor enhances induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia and insulin-like growth factor-1 via a PI3 kinase dependent pathway. *Br J Cancer.* 2001 May 18;84(10):1322-9.
513. Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynnen O, Nupponen NN. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):224-31.
514. Jarvela S, Helin H, Haapasalo J, Jarvela T, Junttila TT, Elenius K, et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006 Aug;32(4):441-50.
515. Absaliamova OV, Korshunov AG, Loshakov VA, Kobiakov GL, Golanov AV, Urakov SV, et al. [Influence of molecular-genetic factors on prognosis in patients with oligodendroglial tumors]. *Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko.* 2009 Jan-Mar(1):17-23; discussion -4.
516. Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, Schmidt EE, Wechsler W, Collins VP. Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol.* 1996 Jul;149(1):29-35.
517. Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, Idbaih A, Brandes AA, Bromberg JE, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951. *Neuro Oncol.* 2009 Dec;11(6):737-46.
518. Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Varella-Garcia M. Glioblastomas in the older old. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 May;129(5):624-31.
519. Tian J, Wu H, Cheng H, Li F. [Effects of exposure to hypoxia on the skin temperature and glycogen content of frostbitten feet in rabbits]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 1997 May;13(2):118-20.
520. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 1998;7(3):205-13.
521. Province P, Griguer CE, Han X, B. NL, Shaykh HF. Hypoxia, Angiogenesis and Mechanisms for Invasion of Malignant Gliomas 2013.

522. Wong C, Wellman TL, Lounsbury KM. VEGF and HIF-1alpha expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2003 Dec;91(3):513-7.
523. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Feb;20(1):51-6.
524. Semenza GL. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):59-65.
525. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830-5.
526. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer.* 2000 Jun 1;88(11):2606-18.
527. Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2006 Jul;78(3):233-47.
528. Zagzag J, Morris LG, DeLacure MD. Cavernous hemangioma of the carotid sheath. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Apr;140(4):608-9.
529. Acker T, Diez-Juan A, Aragones J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, et al. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell.* 2005 Aug;8(2):131-41.
530. Li Y, Qiu X, Zhang S, Zhang Q, Wang E. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1alpha and HIF-2alpha correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2009 Feb;8(4):322-30.
531. Semenza GL. Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 Sep;301(3):C550-2.
532. Helczynska K, Larsson AM, Holmquist Mengelbier L, Bridges E, Fredlund E, Borgquist S, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha correlates to distant recurrence and poor outcome in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9212-20.
533. Yamamoto Y, Ibusuki M, Okumura Y, Kawasoe T, Kai K, Iyama K, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Aug;110(3):465-75.
534. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8554-60.
535. Nanni S, Benvenuti V, Grasselli A, Priolo C, Aiello A, Mattiussi S, et al. Endothelial NOS, estrogen receptor beta, and HIFs cooperate in the activation of a prognostic transcriptional pattern in aggressive human prostate cancer. *J Clin Invest.* 2009 May;119(5):1093-108.
536. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005 Apr;7(2):134-53.
537. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 2010 Apr;14(4):771-94.
538. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):7075-83.
539. Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul.* 2010;50(1):20-33.
540. Said HM, Hagemann C, Staab A, Stojic J, Kuhnel S, Vince GH, et al. Expression patterns of the hypoxia-related genes osteopontin, CA9, erythropoietin, VEGF and HIF-1alpha in human glioma in vitro and in vivo. *Radiother Oncol.* 2007 Jun;83(3):398-405.
541. Proescholdt MA, Mayer C, Kubitz M, Schubert T, Liao SY, Stanbridge EJ, et al. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro Oncol.* 2005 Oct;7(4):465-75.
542. Korkolopoulou P, Perdiki M, Thymara I, Boviatsis E, Agrogiannis G, Kotsiakos X, et al. Expression of hypoxia-related tissue factors in astrocytic gliomas. A multivariate survival study with emphasis upon carbonic anhydrase IX. *Hum Pathol.* 2007 Apr;38(4):629-38.

543. Flynn JR, Wang L, Gillespie DL, Stoddard GJ, Reid JK, Owens J, et al. Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. *Cancer*. 2008 Sep 1;113(5):1032-42.
544. Proescholdt MA, Merrill MJ, Stoerr EM, Lohmeier A, Pohl F, Brawanski A. Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 2012 Nov;14(11):1357-66.
545. Levy AP. Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 1998 Aug;8(6):246-50.
546. Bruns AF, Bao L, Walker JH, Ponnambalam S. VEGF-A-stimulated signalling in endothelial cells via a dual receptor tyrosine kinase system is dependent on co-ordinated trafficking and proteolysis. *Biochem Soc Trans*. 2009 Dec;37(Pt 6):1193-7.
547. Jo J, Schiff D, Purow B. Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future. *Expert Rev Neurother*. 2012 Jun;12(6):733-47.
548. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 Oct;11(8):712-8.
549. Robles Irizarry L, Hambardzumyan D, Nakano I, Gladson CL, Ahluwalia MS. Therapeutic targeting of VEGF in the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Oct;16(10):973-84.
550. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;72(7):1773-83.
551. Bikfalvi A, Moenner M, Javerzat S, North S, Hagedorn M. Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans*. 2011 Dec;39(6):1560-4.
552. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1;108(9):3749-54.
553. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol*. 2009 Nov;5(11):610-20.
554. Chamberlain MC. Antiangiogenic blockade: a new treatment for glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Oct;8(10):1449-53.
555. Heddleston JM, Wu Q, Rivera M, Minhas S, Lathia JD, Sloan AE, et al. Hypoxia-induced mixed-lineage leukemia 1 regulates glioma stem cell tumorigenic potential. *Cell Death Differ*. 2012 Mar;19(3):428-39.
556. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4604-13.
557. Onesto C, Berra E, Grepin R, Pages G. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):34217-26.
558. Oehring RD, Miletic M, Valter MM, Pietsch T, Neumann J, Fimmers R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytic gliomas--a prognostic factor? *J Neurooncol*. 1999;45(2):117-25.
559. 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.
560. Hanze J, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):774-87.
561. McMahon GA, Dignam JD, Gentry LE. Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor beta 1 and beta 1-latency-associated peptide. *Biochem J*. 1996 Jan 1;313 (Pt 1):343-51.
562. Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, Naumann U, Wagenknecht B, Garten W, et al. Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1.2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7238-43.
563. Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breyman C, Zimmermann R, Meuli M, et al. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta*. 2003 Nov;24(10):941-50.
564. Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, et al. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol*. 1989 Nov 15;143(10):3222-9.

565. Yamada N, Kato M, Yamashita H, Nister M, Miyazono K, Heldin CH, et al. Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *Int J Cancer*. 1995 Aug 9;62(4):386-92.
566. Strege RJ, Godt C, Stark AM, Hugo HH, Mehdorn HM. Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J Neurooncol*. 2004 Mar-Apr;67(1-2):29-39.
567. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38527-35.
568. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol*. 2001 Jun;53(2):177-85.
569. Rich JN, Zhang M, Datto MB, Bigner DD, Wang XF. Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):35053-8.
570. Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, Reese ED, Herbstreith MH, Laping NJ, et al. SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther*. 2004 Jun;3(6):737-45.
571. Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Oct;27(10):1187-95.
572. Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res*. 2004;105(2-4):442-7.
573. Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer*. 2008 Feb 26;98(4):824-31.
574. Sun M, Uozaki H, Hino R, Kunita A, Shinozaki A, Ushiku T, et al. SOX9 expression and its methylation status in gastric cancer. *Virchows Arch*. 2012 Mar;460(3):271-9.
575. Burgos-Ojeda D, Rueda BR, Buckanovich RJ. Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett*. 2012 Sep 1;322(1):1-7.
576. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):17969-78.
577. Acloque H, Ocana OH, Matheu A, Rizzoti K, Wise C, Lovell-Badge R, et al. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell*. 2011 Sep 13;21(3):546-58.
578. Passeron T, Valencia JC, Namiki T, Vieira WD, Passeron H, Miyamura Y, et al. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest*. 2009 Apr;119(4):954-63.
579. Zhong WD, Qin GQ, Dai QS, Han ZD, Chen SM, Ling XH, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer*. 2012;12:248.
580. Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, Lin SC, et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 2007 Nov;27(22):7802-15.
581. Chen QL, Zheng WL, Yao WJ, Nie LW, Cheng SH, Ma WL. Analysis of SOX4 gene mutation in non-small cell lung cancer tissues. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007 Oct;24(5):505-9.
582. Yin D, Jia Y, Yu Y, Brock MV, Herman JG, Han C, et al. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer. *Discov Med*. 2012 Jul;14(74):33-40.
583. Chen JS, Su IJ, Leu YW, Young KC, Sun HS. Expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2) promotes proliferation and invasion of liver cancer. *Int J Cancer*. 2012 Mar 15;130(6):1302-13.
584. Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):7663-75.
585. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet*. 2012 Oct;44(10):1111-6.

586. Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, et al. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer*. 2011 Apr 26;104(9):1410-7.
587. Cox JL, Wilder PJ, Desler M, Rizzino A. Elevating SOX2 levels deleteriously affects the growth of medulloblastoma and glioblastoma cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e44087.
588. Swartling FJ, Savov V, Persson AI, Chen J, Hackett CS, Northcott PA, et al. Distinct neural stem cell populations give rise to disparate brain tumors in response to N-MYC. *Cancer Cell*. 2012 May 15;21(5):601-13.
589. Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M. Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Feb 19;23(7):1420-7.
590. Zhu Y, Li Y, Jun Wei JW, Liu X. The role of sox genes in lung morphogenesis and cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):15767-83.
591. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PloS one*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;6(11):e26740.
592. Stoltz K, Sinyuk M, Hale JS, Wu Q, Otvos B, Walker K, et al. Development of a Sox2 reporter system modeling cellular heterogeneity in glioma. *Neuro Oncol*. 2014 Nov 21.
593. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW, et al. Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia*. 2014 Mar;16(3):193-206, e19-25.
594. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*. 2008 Jan;86(1):31-45.
595. Phi JH, Park SH, Kim SK, Paek SH, Kim JH, Lee YJ, et al. Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jan;32(1):103-12.
596. Wan F, Herold-Mende C, Campos B, Centner FS, Dictus C, Becker N, et al. Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomarkers*. 2011 Mar;16(2):136-43.
597. Xavier-Magalhaes A, Nandhabalan M, Jones C, Costa BM. Molecular prognostic factors in glioblastoma: state of the art and future challenges. *CNS Oncol*. 2013 Nov;2(6):495-510.
598. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011 May-Jun;8(3):139-47.
599. Galatro TF, Uno M, Oba-Shinjo SM, Almeida AN, Teixeira MJ, Rosemberg S, et al. Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels. *PLoS One*. 2013;8(4):e61605.
600. Shibahara I, Sonoda Y, Shoji T, Kanamori M, Saito R, Inoue T, et al. Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. *Neuro Oncol*. 2015 Jan;17(1):136-44.
601. Sun Y, Overvad K, Olsen J. Cancer risks in children with congenital malformations in the nervous and circulatory system-A population based cohort study. *Cancer Epidemiol*. 2014 Aug;38(4):393-400.
602. Iuchi T, Yokoi S, Ohira M, Kageyama H, Itami M, Hasegawa Y, et al., editors. Sox8 as a molecular marker of oligodendroglial tumors. *AACR 103rd Annual Meeting 2012*; 2012 April 15, 2012; Chicago, IL: Cancer Res.
603. Kordes U, Hagel C. Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *J Neurooncol*. 2006 Nov;80(2):151-5.
604. Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, Cordon-Cardo C, Esteller M, Belbin TJ, et al. Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):466-73.
605. Jiang SS, Fang WT, Hou YH, Huang SF, Yen BL, Chang JL, et al. Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 1;16(17):4363-73.
606. Guo X, Xiong L, Sun T, Peng R, Zou L, Zhu H, et al. Expression features of SOX9 associate with tumor progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2012;7:44.

607. Matheu A, Collado M, Wise C, Manterola L, Cekaite L, Tye AJ, et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer research*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Mar 1;72(5):1301-15.
608. Lu B, Fang Y, Xu J, Wang L, Xu F, Xu E, et al. Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008 Dec;130(6):897-904.
609. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*. 2013 Jan 3;12(1):15-30.
610. de la Rocha AM, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*. 2014;4(4):312-24.
611. Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn*. 2010 Jan;239(1):56-68.
612. Liu X, Wang L, Zhao S, Ji X, Luo Y, Ling F. beta-Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Med Oncol*. 2011 Jun;28(2):608-14.
613. Mishra S. CSNK1A1 and Gli2 as Novel Targets Identified Through an Integrative Analysis of Gene Expression Data, Protein-Protein Interaction and Pathways Networks in Glioblastoma Tumors: Can These Two Be Antagonistic Proteins? *Cancer Inform*. 2014;13:93-108.
614. Wan Z, Shi W, Shao B, Shi J, Shen A, Ma Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone inhibits beta-catenin-mediated glioma cell growth and invasion. *Mol Cell Biochem*. 2011 Mar;349(1-2):1-10.
615. Gerhäuser C. Cancer cell metabolism, epigenetics and the potential influence of dietary components – A perspective *Biomedical Research*. 2012 01/2012;Volume 23(Issue 1 (Cancer Metabolism)):SI 69-89.
616. Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5562-71.
617. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):472-9.
618. Zhao X, Zhang W, Wang L, Zhao WL. Genetic methylation and lymphoid malignancies: biomarkers of tumor progression and targeted therapy. *Biomark Res*. 2013;1(1):24.
619. Zhang S, Zhu C, Zhu L, Liu H, Liu S, Zhao N, et al. Oncogenicity of the transcription factor SOX8 in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2014 Apr;31(4):918.
620. Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD, et al. High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4088-96.
621. Cowell JK, Lo KC, Luce J, Hawthorn L. Interpreting aCGH-defined karyotypic changes in gliomas using copy number status, loss of heterozygosity and allelic ratios. *Exp Mol Pathol*. 2010 Feb;88(1):82-9.
622. Lo KC, Bailey D, Burkhardt T, Gardina P, Turpaz Y, Cowell JK. Comprehensive analysis of loss of heterozygosity events in glioblastoma using the 100K SNP mapping arrays and comparison with copy number abnormalities defined by BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Mar;47(3):221-37.
623. Rossi MR, La Duca J, Matsui S, Nowak NJ, Hawthorn L, Cowell JK. Novel amplicons on the short arm of chromosome 7 identified using high resolution array CGH contain over expressed genes in addition to EGFR in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Dec;44(4):392-404.
624. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia*. 2010 Sep;12(9):675-84.
625. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Caveness WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5724-9.
626. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2011 Dec 13;20(6):810-7.
627. Voutsina A, Tzardi M, Kalikaki A, Zafeiriou Z, Papadimitraki E, Papadakis M, et al. Combined analysis of KRAS and PIK3CA mutations, MET and PTEN expression in primary tumors and corresponding metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2013 Feb;26(2):302-13.
628. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(7):863-7.

629. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov;3(1 Suppl):S21-35.
630. Schulte EC, Stahl I, Czamara D, Ellwanger DC, Eck S, Graf E, et al. Rare variants in PLXNA4 and Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8(11):e79145.
631. Jun G, Asai H, Zeldich E, Drapeau E, Chen C, Chung J, et al. PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. *Ann Neurol*. 2014 Sep;76(3):379-92.
632. Balakrishnan A, Penachioni JY, Lamba S, Bleeker FE, Zanon C, Rodolfo M, et al. Molecular profiling of the "plexinome" in melanoma and pancreatic cancer. *Hum Mutat*. 2009 Aug;30(8):1167-74.
633. Christensen C, Ambartsumian N, Gilestro G, Thomsen B, Comoglio P, Tamagnone L, et al. Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6167-77.
634. Basile JR, Castilho RM, Williams VP, Gutkind JS. Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9017-22.
635. Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3321-9.
636. Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, et al. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;4(9):720-4.
637. Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev*. 2004 Feb 15;18(4):435-47.
638. Swiercz JM, Worzfeld T, Offermanns S. ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J Biol Chem*. 2008 Jan 25;283(4):1893-901.
639. Rieger J, Wick W, Weller M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia*. 2003 Jun;42(4):379-89.
640. Rody A, Holtrich U, Gaetje R, Gehrman M, Engels K, von Minckwitz G, et al. Poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancers predicted by loss of plexin B1. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1115-22.
641. Wong OG, Nitkunan T, Oinuma I, Zhou C, Blanc V, Brown RS, et al. Plexin-B1 mutations in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 27;104(48):19040-5.
642. O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact*. 2000 Dec 1;129(1-2):113-39.
643. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, et al. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol*. 2001 Aug 20;154(4):879-91.
644. Horikoshi N, Cong J, Kley N, Shenk T. Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the Drosophila peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 11;261(3):864-9.
645. Liu Y, Carson-Walter EB, Cooper A, Winans BN, Johnson MD, Walter KA. Vascular gene expression patterns are conserved in primary and metastatic brain tumors. *J Neurooncol*. 2010 Aug;99(1):13-24.
646. Hutchins JT, Deans RJ, Mitchell MS, Uchiyama C, Kan-Mitchell J. Novel gene sequences expressed by human melanoma cells identified by molecular subtraction. *Cancer Res*. 1991 Mar 1;51(5):1418-25.
647. Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Minev B, Edman C, Deans RJ. A novel melanoma gene (MG50) encoding the interleukin 1 receptor antagonist and six epitopes recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res*. 2000 Nov 15;60(22):6448-56.
648. Castronovo V, Waltregny D, Kischel P, Roesli C, Elia G, Rybak JN, et al. A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Nov;5(11):2083-91.
649. Kahn RA, Bruford E, Inoue H, Logsdon JM, Jr., Nie Z, Premont RT, et al. Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J Cell Biol*. 2008 Sep 22;182(6):1039-44.
650. Tong Y, Tempel W, Wang H, Yamada K, Shen L, Senisterra GA, et al. Phosphorylation-independent dual-site binding of the FHA domain of KIF13 mediates phosphoinositide transport via centaurin alpha1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20346-51.

651. Sedehizade F, Hanck T, Stricker R, Horstmayer A, Bernstein HG, Reiser G. Cellular expression and subcellular localization of the human Ins(1,3,4,5)P(4)-binding protein, p42(IP4), in human brain and in neuronal cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002 Feb 28;99(1):1-11.
652. Harada T, Chelala C, Bhakta V, Chaplin T, Caulee K, Baril P, et al. Genome-wide DNA copy number analysis in pancreatic cancer using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*. 2008 Mar 20;27(13):1951-60.
653. Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, et al. Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS One*. 2010;5(5):e10770.
654. Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. *Oncologist*. 2009 Jul;14(7):667-78.
655. Verhoeven K, De Jonghe P, Van de Putte T, Nelis E, Zwijsen A, Verpoorten N, et al. Slowed conduction and thin myelination of peripheral nerves associated with mutant rho Guanine-nucleotide exchange factor 10. *Am J Hum Genet*. 2003 Oct;73(4):926-32.
656. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Sep;25(9):1767-75.
657. Aoki T, Ueda S, Kataoka T, Satoh T. Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10. *BMC Cell Biol*. 2009;10:56.
658. Ranta S, Lehesjoki AE, de Fatima Bonaldo M, Knowles JA, Hirvasniemi A, Ross B, et al. High-resolution mapping and transcript identification at the progressive epilepsy with mental retardation locus on chromosome 8p. *Genome Res*. 1997 Sep;7(9):887-96.
659. Katunuma N, Kominami E. Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol*. 1995;251:382-97.
660. Abrahamson M. Cystatins. *Methods Enzymol*. 1994;244:685-700.
661. Rakoczy PE, Mann K, Cavaney DM, Robertson T, Papadimitreou J, Constable IJ. Detection and possible functions of a cysteine protease involved in digestion of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994 Nov;35(12):4100-8.
662. Levy E, Lopez-Otin C, Ghiso J, Geltner D, Frangione B. Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1771-8.
663. Fischer U, Keller A, Leidinger P, Deutscher S, Heisel S, Urbschat S, et al. A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol Cancer Res*. 2008 Apr;6(4):576-84.
664. Fischer U, Leidinger P, Keller A, Folarin A, Ketter R, Graf N, et al. Amplicons on chromosome 12q13-21 in glioblastoma recurrences. *Int J Cancer*. 2010 Jun 1;126(11):2594-602.
665. Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 1;11(15):5370-80.
666. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One*. 2012;7(9):e46088.
667. Karajannis MA, Zagzag D, editors. *Molecular Pathology of Nervous System Tumors: Biological Stratification and Targeted Therapies*. New York: Springer; 2015 edition (November 21, 2014); 2015.
668. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
669. Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol*. 2002 Jul;4(3):196-211.
670. Nobori T, Takabayashi K, Tran P, Orvis L, Batova A, Yu AL, et al. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):6203-8.
671. Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, Minna JD, Kuwano H, Yokota J, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene*. 2003 Jun 12;22(24):3792-8.
672. Huang HY, Li SH, Yu SC, Chou FF, Tzeng CC, Hu TH, et al. Homozygous deletion of MTAP gene as a poor prognosticator in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6963-72.

673. Gangloff YG, Werten S, Romier C, Carre L, Poch O, Moras D, et al. The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol Cell Biol*. 2000 Jan;20(1):340-51.
674. Hoffmann A, Chiang CM, Oelgeschlager T, Xie X, Burley SK, Nakatani Y, et al. A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*. 1996 Mar 28;380(6572):356-9.
675. Xie X, Kokubo T, Cohen SL, Mirza UA, Hoffmann A, Chait BT, et al. Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*. 1996 Mar 28;380(6572):316-22.
676. Hoffmann A, Oelgeschlager T, Roeder RG. Considerations of transcriptional control mechanisms: do TFIID-core promoter complexes recapitulate nucleosome-like functions? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):8928-35.
677. Hamard PJ, Dalbies-Tran R, Hauss C, Davidson I, Kedinger C, Chatton B. A functional interaction between ATF7 and TAF12 that is modulated by TAF4. *Oncogene*. 2005 May 12;24(21):3472-83.
678. Stevanin G, Azzedine H, Denora P, Boukhris A, Tazir M, Lossos A, et al. Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*. 2008 Mar;131(Pt 3):772-84.
679. Martelange V, De Smet C, De Plaen E, Lurquin C, Boon T. Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3848-55.
680. Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, Baudard M, et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):3307-15.
681. Liggins AP, Lim SH, Soilleux EJ, Pulford K, Banham AH. A panel of cancer-testis genes exhibiting broad-spectrum expression in haematological malignancies. *Cancer Immun*. 2010;10:8.
682. Mathieu MG, Linley AJ, Reeder SP, Badoual C, Tartour E, Rees RC, et al. HAGE, a cancer/testis antigen expressed at the protein level in a variety of cancers. *Cancer Immun*. 2010;10:2.
683. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, San Jose-Eneriz E, et al. Epigenetic regulation of human cancer/testis antigen gene, HAGE, in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):153-62.
684. Finley D, Chau V. Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*. 1991;7:25-69.
685. Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med*. 2000 Oct;6(10):1073-81.
686. Hochstrasser M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):813-5.
687. Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M. Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Dec;13(12):755-66.
688. Shen LN, Geoffroy MC, Jaffray EG, Hay RT. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J*. 2009 Jul 15;421(2):223-30.
689. Hattersley N, Shen L, Jaffray EG, Hay RT. The SUMO protease SENP6 is a direct regulator of PML nuclear bodies. *Mol Biol Cell*. 2011 Jan 1;22(1):78-90.
690. Mukhopadhyay D, Arnaoutov A, Dasso M. The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *J Cell Biol*. 2010 Mar 8;188(5):681-92.
691. Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J*. 1999 Nov 15;344 Pt 1:189-97.
692. Zhou R, Snyder PM. Ned4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4518-23.
693. Heiland I, Erdmann R. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J*. 2005 May;272(10):2362-72.
694. Bonnet C, Espagne E, Zickler D, Boissard S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V. The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Mol Microbiol*. 2006 Oct;62(1):157-69.
695. Ji T, Liu D, Shao W, Yang W, Wu H, Bian X. Decreased expression of LATS1 is correlated with the progression and prognosis of glioma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:67.
696. Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5496-509.

697. Cooke IE, Shelling AN, Le Meuth VG, Charnock ML, Ganesan TS. Allele loss on chromosome arm 6q and fine mapping of the region at 6q27 in epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Apr;15(4):223-33.
698. Mazurenko N, Attaleb M, Gritsko T, Semjonova L, Pavlova L, Sakharova O, et al. High resolution mapping of chromosome 6 deletions in cervical cancer. *Oncol Rep*. 1999 Jul-Aug;6(4):859-63.
699. Fujii H, Zhou W, Gabrielson E. Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 May;16(1):35-9.
700. Yang X, Li DM, Chen W, Xu T. Human homologue of *Drosophila* lats, LATS1, negatively regulate growth by inducing G(2)/M arrest or apoptosis. *Oncogene*. 2001 Oct 4;20(45):6516-23.
701. Xia H, Qi H, Li Y, Pei J, Barton J, Blackstad M, et al. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene*. 2002 Feb 14;21(8):1233-41.
702. Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, et al. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1380-5.
703. Jiang Z, Li X, Hu J, Zhou W, Jiang Y, Li G, et al. Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci Res*. 2006 Dec;56(4):450-8.
704. Verploegen S, Ulfman L, van Deutekom HW, van Aalst C, Honing H, Lammers JW, et al. Characterization of the role of CaMKI-like kinase (CKLiK) in human granulocyte function. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1076-83.
705. Rodriguez-Mora OG, LaHair MM, McCubrey JA, Franklin RA. Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5408-16.
706. Gylfe AE, Katainen R, Kondelin J, Tanskanen T, Cajuso T, Hanninen U, et al. Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer. *PLoS Genet*. 2013;9(10):e1003876.
707. Serova LI, Nankova B, Kvetnansky R, Sabban EL. Immobilization Stress Elevates GTP Cyclohydrolase I mRNA Levels in Rat Adrenals Predominantly by Hormonally Mediated Mechanisms. *Stress*. 1997 May;1(3):135-44.
708. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996 Aug 19;392(1):49-53.
709. Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Mar;83(3):1025-8.
710. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, et al. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5367-73.
711. Tung KH, Goodman MT, Wu AH, McDuffie K, Wilkens LR, Nomura AM, et al. Aggregation of ovarian cancer with breast, ovarian, colorectal, and prostate cancer in first-degree relatives. *Am J Epidemiol*. 2004 Apr 15;159(8):750-8.
712. Barlowe CK, Appling DR. Isolation and characterization of a novel eukaryotic monofunctional NAD(+)-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1990 Jul 31;29(30):7089-94.
713. Verdi JM, Bashirullah A, Goldhawk DE, Kubu CJ, Jamali M, Meakin SO, et al. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10472-6.
714. Qin H, Percival-Smith A, Li C, Jia CY, Gloor G, Li SS. A novel transmembrane protein recruits numb to the plasma membrane during asymmetric cell division. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19;279(12):11304-12.
715. Chen J, Lai F, Niswander L. The ubiquitin ligase mLin41 temporally promotes neural progenitor cell maintenance through FGF signaling. *Genes Dev*. 2012 Apr 15;26(8):803-15.
716. Macoska JA, Xu J, Ziemnicka D, Schwab TS, Rubin MA, Kotula L. Loss of expression of human spectrin src homology domain binding protein 1 is associated with 10p loss in human prostatic adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2001 Mar-Apr;3(2):99-104.

717. Kagawa N, Maruno M, Suzuki T, Hashiba T, Hashimoto N, Izumoto S, et al. Detection of genetic and chromosomal aberrations in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors with DNA microarrays. *Brain Tumor Pathol.* 2006 Apr;23(1):41-7.
718. Halbwedl I, Ullmann R, Kremser ML, Man YG, Isadi-Moud N, Lax S, et al. Chromosomal alterations in low-grade endometrial stromal sarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma as detected by comparative genomic hybridization. *Gynecol Oncol.* 2005 May;97(2):582-7.
719. Yang ZM, Han XP, Wu SF, Yin YF, Wang K, Gao J, et al. [Analysis of chromosomal abnormalities in pancreatic cancer by spectral karyotyping]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2010 Nov;39(11):767-71.
720. Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, Dahl RJ, O'Fallon JR, Scheithauer BW, et al. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Nov;5(4):357-74.
721. Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics.* 1996 Jun 1;34(2):250-4.
722. Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* 2003 Jul 10;105(5):625-9.
723. Bunik VI, Degtyarev D. Structure-function relationships in the 2-oxo acid dehydrogenase family: substrate-specific signatures and functional predictions for the 2-oxoglutarate dehydrogenase-like proteins. *Proteins.* 2008 May 1;71(2):874-90.
724. Danhauser K, Sauer SW, Haack TB, Wieland T, Stauffer C, Graf E, et al. DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7;91(6):1082-7.
725. Xu WY, Gu MM, Sun LH, Guo WT, Zhu HB, Ma JF, et al. A nonsense mutation in DHTKD1 causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree. *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7;91(6):1088-94.
726. Edler D, Stenstedt K, Ohrling K, Hallstrom M, Karlgren M, Ingelman-Sundberg M, et al. The expression of the novel CYP2W1 enzyme is an independent prognostic factor in colorectal cancer - a pilot study. *Eur J Cancer.* 2009 Mar;45(4):705-12.
727. Stenstedt K, Hallstrom M, Ledel F, Ragnhammar P, Ingelman-Sundberg M, Johansson I, et al. The expression of CYP2W1 in colorectal primary tumors, corresponding lymph node metastases and liver metastases. *Acta Oncol.* 2014 Jul;53(7):885-91.
728. Travica S, Pors K, Loadman PM, Shnyder SD, Johansson I, Alandas MN, et al. Colon cancer-specific cytochrome P450 2W1 converts duocarmycin analogues into potent tumor cytotoxins. *Clin Cancer Res.* 2013 Jun 1;19(11):2952-61.
729. Wellstein A. ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers. *Front Oncol.* 2012;2:192.
730. Kurtz A, Schulte AM, Wellstein A. Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog.* 1995;6(2):151-77.
731. Zhang N, Zhong R, Wang ZY, Deuel TF. Human breast cancer growth inhibited in vivo by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J Biol Chem.* 1997 Jul 4;272(27):16733-6.
732. Aigner A, Brachmann P, Beyer J, Jager R, Raulais D, Vigny M, et al. Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients. *Ann Oncol.* 2003 Oct;14(10):1525-9.
733. Mailleux P, Vanderwinden JM, Vanderhaeghen JJ. The new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA is selectively present in the meningeothelial cells of human meningiomas. *Neurosci Lett.* 1992 Aug 3;142(1):31-5.
734. Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1792-7.
735. Czubayko F, Schulte AM, Berchem GJ, Wellstein A. Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14753-8.
736. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokinines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1814-9.
737. Weber D, Klomp HJ, Czubayko F, Wellstein A, Juhl H. Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res.* 2000 Sep 15;60(18):5284-8.

738. Satyamoorthy K, Oka M, Herlyn M. An antisense strategy for inhibition of human melanoma growth targets the growth factor pleiotrophin. *Pigment Cell Res.* 2000;13 Suppl 8:87-93.
739. Grzelinski M, Bader N, Czubayko F, Aigner A. Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma. *Int J Cancer.* 2005 Dec 20;117(6):942-51.
740. Schramm A, von Schuetz V, Christiansen H, Havers W, Papoutsi M, Wilting J, et al. High activin A-expression in human neuroblastoma: suppression of malignant potential and correlation with favourable clinical outcome. *Oncogene.* 2005 Jan 20;24(4):680-7.
741. Yoshinaga K, Inoue H, Utsunomiya T, Sonoda H, Masuda T, Mimori K, et al. N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 1;10(17):5702-7.
742. Kaneda H, Arao T, Matsumoto K, De Velasco MA, Tamura D, Aomatsu K, et al. Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2011 Oct 11;105(8):1210-7.
743. Vivacqua A, Romeo E, De Marco P, De Francesco EM, Abonante S, Maggiolini M. GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17beta-estradiol and 4-hydroxitamoxifen in breast and endometrial cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(3):1025-35.
744. Bonora E, Graziano C, Minopoli F, Bacchelli E, Magini P, Diquigiovanni C, et al. Maternally inherited genetic variants of CADPS2 are present in autism spectrum disorders and intellectual disability patients. *EMBO Mol Med.* 2014 Jun;6(6):795-809.
745. Valiente M, Andres-Pons A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, et al. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem.* 2005 Aug 12;280(32):28936-43.
746. Soos JM, Krieger JI, Stuve O, King CL, Patarroyo JC, Aldape K, et al. Malignant glioma cells use MHC class II transactivator (CIITA) promoters III and IV to direct IFN-gamma-inducible CIITA expression and can function as nonprofessional antigen presenting cells in endocytic processing and CD4(+) T-cell activation. *Glia.* 2001 Dec;36(3):391-405.
747. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature.* 2011 Mar 17;471(7338):377-81.
748. Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):486-94.
749. <http://www.genecards.org/>.
750. Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, Hosono N, Aoi T, Yasuda M, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nat Genet.* 2011 Oct;43(10):1001-4.
751. Anelli L, Zagaria A, Coccaro N, Tota G, Impera L, Minervini CF, et al. A novel t(4;16)(q25;q23.1) associated with EGF and ELOVL6 deregulation in acute myeloid leukemia. *Gene.* 2013 Oct 15;529(1):144-7.
752. Guernsey DL, Jiang H, Hussin J, Arnold M, Bouyakdan K, Perry S, et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *Am J Hum Genet.* 2010 Jul 9;87(1):40-51.
753. Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BK, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4051-8.
754. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR, et al. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1100-6.
755. Mawrin C, Kirches E, Schneider-Stock R, Boltze C, Vorwerk CK, von Mawrin A, et al. Alterations of cell cycle regulators in gliomatosis cerebri. *J Neurooncol.* 2005 Apr;72(2):115-22.
756. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 1995 Nov 9;378(6553):206-8.
757. Serra-Pages C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M. Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15611-20.

758. Kriaievska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Liprin beta 1. a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5229-35.
759. Kitao A, Sato Y, Sawada-Kitamura S, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):616-26.
760. Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlen P, et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* 2011 Jul 20;30(14):2762-78.
761. Lynch SA, Bond PM, Copp AJ, Kirwan WO, Nour S, Balling R, et al. A gene for autosomal dominant sacral agenesis maps to the holoprosencephaly region at 7q36. *Nat Genet.* 1995 Sep;11(1):93-5.
762. Harrison KA, Druey KM, Deguchi Y, Tuscano JM, Kehrl JH. A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues. *J Biol Chem.* 1994 Aug 5;269(31):19968-75.
763. Ferguson S, Gautrey HE, Strathdee G. The dual role of HLXB9 in leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Mar;56(3):349-52.
764. Davidson G, Shen J, Huang YL, Su Y, Karaulanov E, Bartscherer K, et al. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell.* 2009 Dec;17(6):788-99.
765. Miyagaki H, Yamasaki M, Miyata H, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, et al. Overexpression of PFTK1 predicts resistance to chemotherapy in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2012 Feb 28;106(5):947-54.
766. Pang EY, Bai AH, To KF, Sy SM, Wong NL, Lai PB, et al. Identification of PFTAIRE protein kinase 1. a novel cell division cycle-2 related gene, in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology.* 2007 Aug;46(2):436-45.
767. Machesky LM, Li A. Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol.* 2010 May;3(3):263-70.
768. Hashimoto Y, Kim DJ, Adams JC. The roles of fascin in health and disease. *J Pathol.* 2011 Jul;224(3):289-300.
769. Sleeman J, Steeg PS. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1177-80.
770. Kim SJ, Choi IJ, Cheong TC, Lee SJ, Lotan R, Park SH, et al. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):1035-45 e1-2.
771. Roma AA, Prayson RA. Fascin expression in 90 patients with glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol.* 2005 Dec;9(6):307-11.
772. Gunal A, Onguru O, Safali M, Beyzadeoglu M. Fascin expression [corrected] in glial tumors and its prognostic significance in glioblastomas. *Neuropathology.* 2008 Aug;28(4):382-6.
773. Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4591-602.
774. Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT. The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia.* 2008 Feb;10(2):149-59.
775. Al-Alwan M, Olabi S, Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Al-Tweigeri T, et al. Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. *PLoS One.* 2011;6(11):e27339.
776. Shan D, Chen L, Njardarson JT, Gaul C, Ma X, Danishefsky SJ, et al. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 8;102(10):3772-6.
777. Kraft R, Kahn A, Medina-Franco JL, Orlowski ML, Baynes C, Lopez-Vallejo F, et al. A cell-based fascin bioassay identifies compounds with potential anti-metastasis or cognition-enhancing functions. *Dis Model Mech.* 2013 Jan;6(1):217-35.
778. Hata S, Hamada J, Maeda K, Murai T, Tada M, Furukawa H, et al. PAX4 has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *Int J Oncol.* 2008 Nov;33(5):1065-71.
779. Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, Gredler R, Akiel MA, Robertson CL, et al. Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *Int J Oncol.* 2015 Feb;46(2):465-73.

780. Huang H, Reed CP, Zhang JS, Shridhar V, Wang L, Smith DI. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 1999 Jun 15;59(12):2981-8.
781. Ross PL, Cheng I, Liu X, Cicek MS, Carroll PR, Casey G, et al. Carboxypeptidase 4 gene variants and early-onset intermediate-to-high risk prostate cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:69.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикации в международни реферирани списания с импакт фактор

1. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. IDH1/IDH2, but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Research Article. Biomed Res Int.* 2014;2014:654727, doi: 10.1155/2014/654727, Epub 2014 Apr 24, IF 2013 (2,706), цитирания - 6

2. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky, R. Kaneva. Expression of *SOX* genes as potential prognostic biomarkers in glial tumours. *Research Article. GENE.* IF 2013 (2,082)

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 4,788

Публикации в български списания

1. **Г. Станчева**, Т. Горанова, А. Миткова, Р. Кънева, В. Митев. Биомаркери с прогностична и предиктивна стойност при малигнени глиални тумори. *Обзорна статия. Studia Oncologica*, брой 2, година VI, 2014.

Научни прояви във връзка с дисертационния труд:

Участия в български и международни научни конгреси и конференции

1. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Gene expression of *SOX2*, *SOX6*, *SOX8* and *SOX9* and its prognostic role in patients with gliomas. Poster presentation. *The 23rd Meeting of European Association for Cancer Research*, 5-8 July 2014, Munich, Germany /*EJC Suppl.* 5, Vol 50 (2014): 698, S168/

2. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Gene expression of *MMP9* and its prognostic role in patients with gliomas. Poster presentation. *The European Human Genetics Conference*, 08-11 June 2014, Milano, Italy /*Eur J Hum Genet*, 2014, Vol 22 (suppl 1): 479, J12,119/

3. **Г. Станчева**, Т. Горанова, М. Лалева, М. Каменова, А. Миткова, Н. Велинов, Р. Кънева, Г. Поптодоров, В. Митев, Н. Габровски. Прогностично значение на соматични мутации в гените *IDH1* и *IDH2* при Български пациенти с мултиформен глиобластом. *XXII национална конференция по неврохирургия*, 24-26 Октомври 2013, Велинград, България

4. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Prognostic Significance of Somatic Mutations in *IDH1* and *TP53* Genes in Bulgarian Patients with Glioblastoma Multiforme Abstract. *15th World Congress of Neurosurgery & World Federation of Neurosurgical Societies*, 8-13 September 2013, Seoul, Korea. /Abstract No. FA1231/

5. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Prognostic significance of *IDH1* mutations and 1p/19q co-deletion I patients with glial tumours. Poster presentation. *The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013*, Paris, France /Eur J Hum Genet, 2012, Vol 21 (suppl 2): 281. P11.068/
6. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Molecular biomarkers with predictive value in glioma patients Poster presentation. *The 10th Meeting of European Association of Neurooncology, 06-09 September 2012*, Marseille, France /Neuro-Oncology September 2012, Vol.14 (suppl 3): P124/
7. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. A novel missense mutation in *IDH2* gene of a glioma patient. *The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012*, Nuremberg, Germany. /Eur J Hum Genet, 2012, 20 (suppl 1): 166, P06,48/
8. Stefano Pierini, Teodora Goranova, **Gergana Stancheva**, Maria Laleva, Margarita Kamenova, Atanaska Mitkova, Nikolay Velinov, Radka Kaneva, George Poptodorov, Vanio Mitev, Nikolay Gabrovsky. MGMT promoter hypermethylation is a frequent event in glioma patients but has no prognostic value. *The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012*, Nuremberg, Germany. /Eur J Hum Genet, 2012, 20 (suppl 1): 186, P06,144/
9. N. Gabrovsky, **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, R. Kaneva. *IDH1* and *IDH2* mutations – prevalence and prognostic significance in glial tumours. *The 14-th European Congress of Neurosurgery, 9-14 October 2011, Rome, Italy.*/Nov 30, 1999; 9675/
10. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, St. Gabrovsky, P.Vanev, N. Gabrovsky. Comparison of instruments for quality of life measurement in Bulgarian patients with malignant glial tumors. *The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 23-27 September 2011, Stockholm, Sweden.*/ European Journal of Cancer, Vol 47, Suppl. 3: 519, S123/
11. T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, M. Kamenova, M. Laleva, N.Velinov, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. MGMT promoter methylation in Bulgarian patients with glial tumors. *The 4-th International Congress of Molecular Medicine, 27-30 June 2011, Istanbul, Turkey.* /In vivo 25: 526, 2011/
12. **G. Stancheva**, T. Goranova, M. Laleva, M. Kamenova, A. Mitkova, N. Velinov, R. Kaneva, G. Poptodorov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *IDH1*. *IDH2* and *TP53* mutations in Bulgarian patients with glial tumours. Poster presentation. *The European Human Genetics Conference 2011, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.* /Eur J Hum Genet, 2011, 19 (suppl 2): 198, P06,042/
13. T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, G. Poptodorov, N. Velinov, V. Mitev, N. Gabrovsky. Mutations in *IDH1* and *TP53* as prognostic biomarkers in Bulgarian patients with gliomas. Poster presentation. *The 9th Meeting of European Association of Neurooncology 16-19 September 2010, Maastricht, The Netherlands.* /NEURO ONCOL 2010 Sep; 12(Suppl 3): 33/
14. T. Goranova, **G. Stancheva**, A. Mitkova, R. Kaneva, G. Poptodorov, N. Velinov, V. Mitev, N. Gabrovsky. *IDH1* and *IDH2* mutations in Bulgarian patients with glial tumours Poster presentation. *The 21st Meeting of European Association for Cancer Research 26-29 June 2010, Oslo, Norway.* /EJC Supplements 8, No. 5 (2010): 224-225/
15. **G. Stancheva**, T. Goranova, S. Jordanov, A. Mitkova, I. Chalakov, G. Poptodorov, R. Kaneva, V. Mitev, N. Gabrovsky, K. Kunev. Promoter hypermethylation in Bulgarian patients with glial and laryngeal cancer. Poster presentation. *The 21st Meeting of European Association for Cancer Research 26-29 June 2010, Oslo, Norway.* /EJC Supplements 8, No. 5 (2010) 220/

Приложение I.

Таблица I.1. Мутации и полиморфизми в гените IDH1, IDH2 и TP53 – екзоми 5, 6, 7 и 8 намерени при изследваните 212 тумора.

Тумор №	Мутации					
	IDH1	IDH2	TP53			
			ex5	ex6	ex7	ex8
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	c.725 G>A C242Y	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	c.853G>A E285K
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	c.535C>A H179N	-	-	-
7	c.395G>A R132H c.315C>T G105G	-	-	-	-	c.817C>T R273C
8	c.395G>A R132H c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	c.524G>A R175H	-	-	-
14	c.395G>A R132H	-	c.523C>A R175S	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16 [†]	c.395G>A R132H	-	-	-	del 759_61	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
21	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.817C>T R273C
22	-	-	-	-	-	-
23	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	c.395G>A R132H c.315C>T G105G	-	-	-	-	c.838A>G R280G
27	-	-	-	-	-	-
28	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
29	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-

Приложение I.

31	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
32	c.315C>T G105G	-	c.524G>A R175H	-	-	-
33	-	-	-	-	del 716_21	-
34	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	c.315C>T G105G	-	c.455C>T P152L	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	c.395G>A R132H	-	-	c.672+48g>a	-	c.817C>T R273C
40	-	-	-	-	-	-
41 [†]	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.921+27g>a
42	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.817C>T R273C
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	c.672+31a>g	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
49	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-
52 [†]	c.395G>A R132H	-	-	-	del 759_61	-
53	-	-	-	-	c.742C>T R248W	c.799C>T R267W
54	-	-	-	c.672+48g>a	-	-
55	c.395G>A R132H	-	-	-	c.775G>C D259H	-
56	-	-	-	-	-	c.841G>C D281H
57	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	c.841G>C D281H c.921A>G A307A
59	-	-	-	-	-	c.844C>T R282W
60	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-
62	c.395G>A R132H c.315C>T G105G	-	-	-	c.742C>T R248W	-
63	-	-	-	-	-	c.806G>T S269I
64	-	-	-	-	-	-

Приложение I.

65	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-
68 [#]	-	-	-	-	-	c.817C>T R273C
69 [‡]	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
71	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.841G>C D281H
72	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	c.773A>T E258V	-
81	-	-	-	-	-	c.857A>T E286V
82	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	c.847C>T R283C
87 [#]	-	-	-	-	-	c.817C>T R273C
88 [‡]	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
91	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
92	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-
94	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	c.841G>C D281H
96	c.395G>A R132H	-	c.395A>G K132R	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	c.773A>T E258V	-
99	-	-	-	-	-	c.841G>C D281H
100	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	c.850A>T T284S

Приложение I.

105 ⁷	-	-	-	-	-	c.817C>T R273C
106 ⁸	-	-	-	-	-	-
107 ⁷	-	-	-	-	-	c.817C>T R273C
108 ⁹	-	-	-	-	-	-
109	-	-	c.427G>A V143M	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-
112	-	c.386A>GK129R	-	-	-	-
113	NA	-	-	NA	-	-
114	-	-	-	-	-	NA
115	NA	-	-	NA	-	-
116	NA	-	NA	NA	-	-
117	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-
119	NA	-	-	-	-	NA
120	-	-	NA	NA	-	NA
121	NA	-	NA	NA	-	NA
122	NA	-	NA	NA	NA	NA
123	NA	-	-	-	-	-
124	-	-	NA	NA	-	NA
125	NA	-	NA	NA	-	NA
126	NA	-	NA	NA	NA	NA
127	NA	-	NA	NA	-	NA
128	-	-	-	-	-	-
129 ¹⁰	-	-	c.524G>A R175H	-	-	-
130	NA	-	-	NA	-	c.853G>A E285K
131	NA	-	-	-	-	-
132	c.395G>T R132L	-	c.392A>G N131S	-	-	-
133	NA	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-	-
136	-	-	-	c.639A>G R213R	-	-
137	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
138 ¹¹	-	-	-	-	-	-
139	-	-	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-	-
141	-	-	-	c.672+48G>A	-	-
142 ¹¹	-	-	-	-	-	-
143	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	c.734G>A G245D	-
145	-	-	-	-	-	-
146	-	-	-	-	-	-
147	-	-	-	-	-	-
148	-	-	-	-	-	-
149 ¹⁰	-	-	c.524G>A R175H	-	-	-
150	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-

Приложение I.

151	c.395G>A R132H	-	-	-	NA	-
152	-	-	-	-	NA	-
153	c.395G>A R132H	-	-	-	NA	c.850A>C T284P
	c.315C>T G105G					
154	NA	-	c.496T>C S166T	NA	NA	NA
155	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
156	NA	-	-	-	-	-
157 ¹²	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
158	NA	-	NA	NA	NA	NA
159	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-
161	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.817C>T R273C
162	-	-	-	-	-	-
163	-	-	-	-	-	-
164	-	-	-	-	-	c.821T>C V274A
165	c.394C>G R132G	-	-	c.639A>G R213R	-	c.817C>T R273C
166	c.395G>A R132H	-	c.473G>A R158H	-	-	-
167	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-
169	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.817C>T R273C
170	-	-	-	-	-	-
171	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
	c.315C>T G105G					
172	-	-	-	-	-	-
173	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
174	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
175	c.395G>A R132H	-	-	-	-	c.818G>A R273H
	c.315C>T G105G					
176	-	-	-	-	-	-
177 ¹²	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
178	-	-	c.469G>C V157L	c.643A>G S215G	-	-
179 ⁸	-	-	-	-	-	-
180	c.315C>T G105G	-	c.524G>A R175H	-	-	-
181	-	-	-	-	-	-

Приложение I.

182	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
183	-	-	-	-	-	-
184	-	-	-	-	c.773A>T E258V	-
185	-	-	-	-	-	-
186	-	-	-	-	-	-
187	c.315C>T G105G	-	-	-	-	-
188	-	-	-	-	-	-
189	-	-	-	-	-	-
190	-	-	-	-	-	-
191	-	-	-	c.672+31A>G	-	-
192	-	-	-	-	-	-
193	-	-	-	-	-	-
194	-	-	-	-	-	-
195	-	-	-	-	-	-
196	-	-	-	-	-	c.841G>C D281H
197	-	-	-	-	NA	-
198	-	-	-	-	-	-
199	NA	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-
201	c.395G>A R132H	-	c.523C>A R175S	-	-	-
202	NA	-	-	-	NA	-
203	NA	-	-	-	-	NA
204	NA	-	-	-	-	-
205	-	-	-	-	-	-
206	-	-	-	-	-	-
207	c.395G>A R132H	-	-	-	-	NA
	c.315C>T G105G					
208	NA	-	-	-	-	-
209	NA	-	-	NA	-	NA
210	NA	-	-	-	-	-
211 ⁹	c.395G>A R132H	-	-	-	-	-
212	NA	-	-	-	c.742C>T R248W	-

В синьо са отбелязани SNPs, наситено оранжево – хетерозиготни мутации, жълто – хомозиготни мутации; NA- не беше извършен анализ поради невъзможна амплификация на ДНК фрагмента или свършил ДНК сток от туморната тъкан

¹ Тумори 16, 52 и 41 са на един и същи пациент, отстранени съответно при 2, 3 и 4 хирургична резекция на туморна тъкан; ² Тумори 48 и 65 са на един и същи пациент; ³ Тумори 50 и 67 са на един и същи пациент; ⁴ Тумори 51 и 63 са на един и същи пациент; ⁵ Тумори 68 и 87 са на един и същи пациент; ⁶ Тумори 69 и 88 са на един и същи пациент; ⁷ Тумори 105 и 107 са на един и същи пациент; ⁸ Тумори 106 и 179 са на един и същи пациент; ⁹ Тумори 108 и 211 са на един и същи пациент; ¹⁰ Тумори 129 и 149 са на един и същи пациент; ¹¹ Тумори 138 и 142 са на един и същи пациент; ¹² Тумори 157 и 177 са на един и същи пациент.

Приложение I.

Таблица I.2. Мутации и полиморфизми в генът TP53 – екзони 2, 3, 4, 9, 10 и 11, намерени при изследваните 212 тумора.

№	TP53					
	ex2	ex3	ex4	ex9	ex10	ex11
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	NA
4	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	NA
5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	NA	c.77T>A L26L	c.215C>G R72P	-	c.1042T>A L348M	NA
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16 ¹	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	c.74+38C>G	NA	-	-	NA	NA
31	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32	NA	-	-	-	-	NA
33	c.74+38C>G	-	-	-	-	NA
34	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	NA	NA
35	c.74+38C>G	-	c.215G>C R72P	-	NA	NA
36	c.74+38C>G	-	-	-	-	-
37	c.74+38C>G	-	c.339 341delCTT	-	-	-
38	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41 ¹	c.74+38C>G	-	-	-	c.1100+30A>T	-
42	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
43	c.74+38C>G	-	-	-	-	-
44	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
45	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
46	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
47	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
48 ²	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-

Приложение I.

49	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
50 ³	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
51 ⁴	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
52 ¹	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
53	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
54	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
55	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
56	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
57	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
58	NA	NA	NA	NA	NA	NA
59	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i> <i>c.299A>G Q100R</i>	-	-	-
60	<i>c.34C>T P12S</i> <i>c.74+38C>G</i>	<i>c.77T>A L26H</i> <i>c.79C>A P27H</i>	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
61	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
62	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
63 ⁴	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
64	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.155A>G Q52R</i> <i>c.215C>G R72P</i> <i>c.374C>T T125M</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
65 ²	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
66	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
67 ³	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
68 ⁵	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
69 ⁶	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
70	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1044G>A L348L</i>	-
71	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
72	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
73	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
74	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
75	NA	NA	NA	NA	NA	NA
76	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
77	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
78	-	<i>c.96+2T>C</i>	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
79	-	<i>c.96+2T>C</i>	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
80	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	<i>c.920-6T>C</i> <i>c.921A>G p.A307A</i> <i>c.993+22T>C</i>	-	-
81	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
82	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
83	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
84	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
85	<i>c.74+38C>G</i>	<i>c.96+2T>C</i>	-	-	-	-
86	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-

Приложение I.

87 ⁵	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
88 ⁶	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
89	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
90	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
91	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
92	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
93	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
94	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
95	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
96	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
97	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
98	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
99	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
100	NA	-	NA	NA	NA	NA
101	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
102	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
103	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
104	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
105 ⁷	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
106 ⁸	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
107 ⁷	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
108 ⁹	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
109	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
110	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
111	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
112	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
113	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
114	<i>c.74+38C>G</i> <i>rs1642785</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
115	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
116	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
117	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
118	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
119	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
120	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
121	NA	-	NA	NA	NA	NA
122	NA	-	NA	NA	NA	NA
123	NA	-	NA	NA	NA	NA
124	-	-	NA	NA	NA	-
125	NA	-	NA	NA	NA	-
126	NA	NA	NA	NA	NA	NA
127	NA	-	NA	NA	NA	-

Приложение I.

128	NA	-	NA	NA	NA	-
129 ¹⁰	-	-	-	-	-	-
130	NA	-	NA	NA	NA	NA
131	NA	-	NA	NA	NA	NA
132	NA	-	NA	NA	NA	NA
133	NA	-	NA	NA	NA	NA
134	-	-	-	c.993+12T>C	-	-
135	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
136	c.75+38C>G	c.77T>A L26H	c.215C>G R72P	-	-	-
		c.79C>A P27H				
137	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	c.1024C>T R342* c.1100+30A>T	-
138 ¹¹	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
139	c.75+38C>G	c.77T>A L26H	c.215C>G R72P	-	-	-
		c.79C>A P27H				
140	-	-	-	-	-	-
141	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	c.1100+30A>T	-
142 ¹¹	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
143	c.75+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
144	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
145	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
146	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-
147	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
148	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
149 ¹⁰	-	-	-	-	-	-
150	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
151	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	c.1010G>A R337H c.1100+30A>T	-
152	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-
153	-	-	-	-	c.1044G>A L348L	-
154	NA	-	c.215C>G R72P	NA	NA	NA
155	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
156	NA	-	c.215C>G R72P	-	NA	NA
157 ¹²	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-
158	NA	NA	c.215C>G R72P	NA	-	NA
159	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-
160	c.74+38C>G	-	c.374C>T T125M	-	-	-
			c.215C>G R72P			
161	-	-	c.215C>G R72P	-	c.997C>A R333S	-
162	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
163	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	c.1101+30A>T	-
164	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
165	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
166	-	-	c.215C>G R72P	-	-	-
167	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	c.995T>G I332S	-

Приложение I.

168	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
169	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1101+28C>A</i>	-
			<i>c.338T>G F113S</i>			
170	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1042T>A L348M</i>	-
171	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	<i>c.1015G>T E339*</i>	-
172	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
173	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
174	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
175	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
176	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
177 ¹²	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
178	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
179	NA	-	-	-	-	NA
180 ⁸	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
181	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
182	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
183	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
184	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
185	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215G>C R72P</i>	-	NA	NA
186	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
187	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
188	-	-	-	-	-	-
189	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
190	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
191	-	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
192	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
193	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
194	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
195	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
196	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.151G>A p.E51K</i>	-	-	-
			<i>c.215C>G R72P</i>			
197	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	<i>c.920-12C>A</i>	-	-
198	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
199	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
200	<i>c.74+38C>G</i>	-	-	-	-	-
201	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
202	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
203	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
204	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
205	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
206	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-
207	<i>c.74+38C>G</i>	-	<i>c.215C>G R72P</i>	-	-	-

Приложение I.

208	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
209	c.74+38C>G	-	c.215C>G R72P	-	-	-
210	c.74+38C>G	-	-	-	-	-
211 ⁹	c.74+38C>G	-	-	-	-	-
212	-	-	-	-	c.1090 G>A p.A364T	-

В синьо са отбелязани SNPs, наситено оранжево – хетерозиготни мутации, жълто – хомозиготни мутации; NA- не беше извършен анализ поради невъзможна амплификация на ДНК фрагмента или свършил ДНК сток от туморната тъкан

¹ Тумори 16, 52 и 41 са на един и същи пациент, отстранени съответно при 2, 3 и 4 хирургична резекция на туморна тъкан; ² Тумори 48 и 65 са на един и същи пациент; ³ Тумори 50 и 67 са на един и същи пациент; ⁴ Тумори 51 и 63 са на един и същи пациент; ⁵ Тумори 68 и 87 са на един и същи пациент; ⁶ Тумори 69 и 88 са на един и същи пациент; ⁷ Тумори 105 и 107 са на един и същи пациент; ⁸ Тумори 106 и 179 са на един и същи пациент; ⁹ Тумори 108 и 211 са на един и същи пациент; ¹⁰ Тумори 129 и 149 са на един и същи пациент; ¹¹ Тумори 138 и 142 са на един и същи пациент; ¹² Тумори 157 и 177 са на един и същи пациент.

Приложение II.

Таблица II.1. Резултати от изследването за наличие на делеции в изследваните райони на хромозоми 1 и 19 изследваните 212 тумора.ю

Пациент	1p															1q			19p		19q								
	NOTCH2	TNFRSF4	GNB1	TNFRSF14	TP73	PARK7	MFN2	PTAFR	FAF1	PPAP2B	CYP2J2	LPHN2	GTF2B	DPYD	NRAS	LMNA	CRB1	TNNI2	SMARCA4	LDLR	CCNE1	PDCD5	UPK1A	TGFB1	ZNF342	PPP1R15A	BAX	CHMP2A	
1																		del											
2																													
3						del	del	del																					
4																													
5																													
6																													
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8																										del	del	del	
9																													
10																													
11																													
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13																													
14																													
15																													
16 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18																													
19							del				del													del					
20				del	del	del	del				del													del	del	del	del	del	del
21						del	del															del	del	del		del	del	del	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23						del	del	del							del										del				
24																													
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26																													
27																													

Приложение II.

28	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del						del	del	del	del	del	del	del	del
29										del	del																
30						del			del	del	del	del	del						del	del	del	del	del				
31																											
32																											
33																											
34																											
35																											
36						del	del	del																			
37						del	del	del																			
38																											
39						del	del	del							del												
40						del	del	del																del	del	del	
411																											
42	del																										
43							del	del	del	del	del	del	del	del	del		del			del	del	del	del	del	del	del	del
44						del	del	del																			
45						del																					
46																											
47																											
48 ²																											
49	del											del															
50 ³																											
51 ⁴																											
52 ¹																											
53																											
54																											
55	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
56																											
57																											
58																											
59																											
60																											
61																											

Приложение II.

62	del																								
63 ⁴																									
64																									
65 ²																									
66								del																	
67 ³																									
68 ⁵																									
69 ⁶																									
70																									
71	del							del	del										del						
72																									
73																									
74																									
75		del	del	del	del	del																			
76																									
77																									
78							del									del	del		del						
79																	del								
80								del	del							del	del		del		del				
81																									
82																									
83																									
84																									
85									del												del	del	del	del	del
86						del																			
87 ⁵																									
88 ⁶																									
89		del	del	del	del	del	del									del	del	del							
90								del																	
91	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del			del	del	del	del	del	del	del	del
92	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del				del	del	del	del	del	del	del
93	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del				del	del	del	del	del	del
94		del	del	del	del	del	del	del										del	del	del	del	del	del	del	del
95																									

Приложение II.

96																											
97																											
98											del	del	del		del						del						
99																											
100																											
101																											
102																		del									
103																											
104																											
105 ⁷											del																
106 ⁸																											
107 ⁷											del																
108 ⁹											del	del	del	del													
109																											
110																											
111																del					del						
112																											
113											del	del	del	del													
114																											
115																											
116																											
117																											
118																											
119																											
120																											
121																del					del						
122											del	del	del	del	del						del				del		del
123																											
124																											
125																											
126																del											
127																del	del										
128																											
129 ¹⁰																					del	del			del		del

Приложение II.

130																												
131	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del						del	del	del	del	del	del	del	del	
132	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del					del	del	del	del	del	del	del	del	del	
133																												
134																												
135																												
136																												
137																												
138 ¹¹																												
139						del	del	del	del																			
140																												
141																												
142 ¹¹																												
143	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del			del	del	del	del	del	del	del	del	
144																						del	del	del				
145																												
146																												
147		del	del	del	del	del	del								del	del	del				del	del	del	del				
148		del	del															del	del	del					del	del	del	
149 ¹⁰			del	del	del															del	del	del	del	del	del			
150		del	del	del	del	del									del	del	del	del	del		del	del	del	del				
151																												
152																												
153																												
154	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del						del	del	del	del	del	del	del	del	
155																												
156	del	del	del	del	del	del	del	del						del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	
157 ¹²																												
158																												
159	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del				del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	
160																												
161																				del	del	del	del	del	del	del	del	
162																												
163																												

Приложение II.

164																											
165																											
166																				del	del	del	del	del	del	del	del
167																											
168		del	del	del	del	del	del																del	del	del		
169																											
170																											
171																											
172																											
173	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del						del	del	del	del	del	del	del	del
174																											
175																				del	del	del	del	del	del		
176																											
177 ¹²																											
178																											
179																											
180 ⁸																											
181																											
182																											
183																											
184																											
185	del	del	del	del	del	del	del	del		del				del		del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
186									del																		
187																											
188																											
189																											
190						del									del		del										
191																											
192																											
193																											
194																											
195																											
196																											
197	del								del	del	del	del	del	del	del	del	del										

Приложение II.

198																										
199																										
200																										
201	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del							del		
202																del	del									
203		del	del	del	del	del	del	del										del	del	del	del	del	del	del	del	del
204		del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del					del	del	del	del	del	del	del
205				del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del		del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
206																del	del	del	del	del	del	del	del			
207				del	del													del	del	del	del	del	del	del	del	del
208																	del	del	del							
209																										
210	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
211 ⁹		del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del										del	del	del
212				del	del											del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del

¹ Тумори 16, 52 и 41 са на един и същи пациент, отстранени съответно при 2, 3 и 4 хирургична резекция на туморна тъкан; ² Тумори 48 и 65 са на един и същи пациент; ³ Тумори 50 и 67 са на един и същи пациент; ⁴ Тумори 51 и 63 са на един и същи пациент; ⁵ Тумори 68 и 87 са на един и същи пациент; ⁶ Тумори 69 и 88 са на един и същи пациент; ⁷ Тумори 105 и 107 са на един и същи пациент; ⁸ Тумори 106 и 179 са на един и същи пациент; ⁹ Тумори 108 и 211 са на един и същи пациент; ¹⁰ Тумори 129 и 149 са на един и същи пациент; ¹¹ Тумори 138 и 142 са на един и същи пациент; ¹² Тумори 157 и 177 са на един и същи пациент.

Легенда

Без Делеции

Делеция

Липса на Амплификация

-Липса на ДНК матрица-

Приложение III.

Таблица. III.1. Резултати от изследването за промоторно хиперметиране на MGMT гена.

Тумор №	Промоторно хиперметиране на MGMT (MS-HRM)
1	M/U
2	M/U
3	M/U
4	M/U
5	M/U
6	M
7	U
8	M/U
9	M/U
10	U
11	M/U
12	U
13	M/U
14	M/U
15	U
16 ¹	M/U
17	M
18	M
19	M/U
20	U
21	M/U
22	U
23	M/U
24	M/U
25	U
26	M/U
27	M/U
28	M/U
29	U
30	M/U
31	M/U
32	M/U
33	M/U
34	M/U
35	U
36	M/U
37	U
38	M/U
39	U
40	U
41 ¹	M/U
42	U
43	U

Тумор №	Промоторно хиперметиране на MGMT (MS-HRM)
44	M
45	U
46	M
47	M
48 ²	M
49	M/U
50 ³	M
51 ⁴	U
52	M/U
53	M/U
54	U
55	M
56	M/U
57	M/U
58	U
59	M
60	M/U
61	M
62	M/U
63 ⁴	U
64	M/U
65 ²	M/U
66	M/U
67 ³	U
68 ⁵	U
69 ⁶	M/U
70	M/U
71	U
72	M/U
73	M/U
74	M/U
75	U
76	M/U
77	M
78	M
79	M/U
80	M/U
81	M/U
82	M
83	M/U
84	M
85	U
86	M/U

Приложение III.

87 ⁵	U
88 ⁶	M/U
89	M/U
90	M
91	M/U
92	U
93	M/U
94	M/U
95	M/U
96	U
97	M/U
98	M/U
99	M/U
100	U
101	M
102	M/U
103	U
104	M/U
105 ⁷	M/U
106 ⁸	M/U
107 ⁷	M/U
108 ⁹	U
109	U
110	M
111	U
112	U
113	M/U
114	M
115	M
116	U
117	U
118	U
119	M
120	U
121	U
122	U
123	U
124	U
125	M/U
126	U
127	U
128	U
129 ¹⁰	U
130	U
131	U
132	U
133	U

134	U
135	M/U
136	M/U
137	U
138 ¹¹	M
139	M
140	M
141	U
142 ¹¹	U
143	M
144	M/U
145	M
146	U
147	M
148	U
149 ¹⁰	M
150	M
151	M/U
152	M/U
153	U
154	U
155	M/U
156	U
157 ¹²	U
158	U
159	U
160	M
161	M
162	M
163	U
164	M/U
165	M/U
166	U
167	U
168	U
169	U
170	U
171	U
172	U
173	U
174	U
175	M/U
176	U
177 ¹²	M
178	U
179	U
180 ⁸	M/U

Приложение III.

181	U
182	U
183	U
184	U
185	U
186	M
187	U
188	U
189	M
190	U
191	M/U
192	M/U
193	U
194	U
195	M
196	U

197	NA
198	NA
199	U
200	U
201	U
202	U
203	M/U
204	M/U
205	M/U
206	U
207	M/U
208	U
209	M/U
210	U
211 ⁹	M/U
212	U

M – метилирани; U – неметилирани.

¹ Тумори 16, 52 и 41 са на един и същи пациент, отстранени съответно при 2, 3 и 4 хирургична резекция на туморна тъкан; ² Тумори 48 и 65 са на един и същи пациент; ³ Тумори 50 и 67 са на един и същи пациент; ⁴ Тумори 51 и 63 са на един и същи пациент; ⁵ Тумори 68 и 87 са на един и същи пациент; ⁶ Тумори 69 и 88 са на един и същи пациент; ⁷ Тумори 105 и 107 са на един и същи пациент; ⁸ Тумори 106 и 179 са на един и същи пациент; ⁹ Тумори 108 и 200 са на един и същи пациент; ¹⁰ Тумори 129 и 149 са на един и същи пациент; ¹¹ Тумори 138 и 142 са на един и същи пациент; ¹² Тумори 157 и 177 са на един и същи пациент.

Таблица.IV.1.

Проби	HIF1A	CO	HIF2A	CO	HIF3A	CO	CAIX	CO	EGFR	CO	TGFb2	CO
1	2,28	0,35	1,85	0,37	0,35	0,05	261,36	8,51	1,75	0,29	2,38	0,57
2	5,81	0,22	2,02	0,37	0,08	0,01	0,05	0,00	0,23	0,03	10,26	1,54
3	1,57	0,35	1,81	0,34	0,09	0,04	58,87	1,70	5,48	1,41	4,41	0,65
4	2,41	0,91	1,52	0,19	1,22	0,10	3,58	0,23	3,43	0,39	1,00	0,20
5	2,94	0,82	1,02	0,15	0,58	0,04	0,38	0,01	48,94	5,04	6,95	1,32
6	1,90	0,27	0,08	0,01	0,19	0,06	1,11	0,12	44,41	10,84	0,77	0,38
7	3,78	0,85	0,64	0,06	0,64	0,02	34,06	0,86	4,13	1,25	2,06	0,25
8	1,80	0,65	0,55	0,03	0,01	0,00	7,03	0,19	36,58	4,42	2,39	0,12
9	2,05	0,23	0,92	0,09	0,28	0,08	7,50	0,23	1,08	0,18	2,43	0,20
10	6,22	0,23	2,41	0,29	0,03	0,00	111,12	5,50	118,07	15,41	5,34	0,06
11	1,90	0,85	0,68	0,09	1,23	0,08	52,73	1,45	16,32	2,38	1,56	0,14
12	1,40	0,38	0,90	0,05	0,13	0,03	16,77	0,78	260,06	12,43	2,57	0,82
13	2,20	0,31	0,69	0,08	0,83	0,32	19,81	0,37	1,96	0,28	10,68	1,27
14	1,17	0,55	1,86	0,54	1,79	0,17	1,11	0,06	1,46	0,40	1,93	0,12
15	3,64	0,48	1,62	0,03	0,61	0,07	16,98	0,07	78,36	5,57	2,24	0,57
16	3,77	0,56	2,39	0,49	0,98	0,27	8,57	1,19	13,11	0,03	3,40	0,51
17	2,14	0,31	1,66	0,14	0,26	0,03	0,89	0,04	4,42	0,38	1,60	0,28
18	2,62	0,40	2,45	0,32	0,79	0,14	15,03	0,40	3,78	1,01	4,69	0,49
19	2,21	0,10	1,72	0,14	0,10	0,02	51,54	2,26	0,96	0,28	4,02	0,61
20	4,56	0,63	1,75	0,15	1,07	0,11	31,18	0,85	0,79	0,13	5,76	0,78
21	2,72	0,11	1,03	0,18	0,44	0,17	3,38	0,22	13,95	0,99	3,27	0,26
22	5,57	1,87	2,69	0,14	0,25	0,04	131,61	1,32	54,48	10,29	6,25	1,02
23	3,34	0,32	0,83	0,06	0,36	0,08	50,59	0,16	3,01	0,31	2,92	0,05
24	2,48	0,78	2,53	0,27	1,80	0,14	0,35	0,09	4,53	0,71	1,13	0,22
25	8,12	3,04	2,00	0,14	0,36	0,10	41,35	1,54	6,32	1,15	11,81	2,15
26	2,43	0,70	2,33	0,23	4,42	0,22	0,11	0,02	41,90	8,13	3,04	0,25
27	3,77	0,89	1,50	0,32	0,58	0,07	4,23	0,21	1,21	0,24	2,67	0,46
28	3,18	1,04	0,74	0,05	0,07	0,01	183,87	4,27	5,52	0,65	3,38	0,75
29	1,02	0,07	0,01	0,05	0,09	0,01	7,99	0,66	0,25	0,04	0,31	0,06
30	2,18	0,23	0,66	0,08	1,59	0,14	0,06	0,02	3,99	1,98	1,52	0,09
31	5,27	0,45	2,66	0,38	0,07	0,00	33,05	1,55	2,95	0,26	3,63	0,20
32	2,18	0,44	0,98	0,20	0,17	0,02	0,17	0,13	13,77	1,71	0,74	0,01
33	0,57	0,05	0,21	0,01	0,06	0,01	10,00	1,80	0,36	0,13	0,31	0,16
34	7,82	1,89	1,84	0,30	3,96	0,25	118,36	18,91	1,47	0,06	2,64	0,37
35	2,85	1,09	1,29	0,10	0,16	0,02	0,24	0,04	4,69	0,60	4,98	1,09
36	3,12	0,02	2,04	0,52	0,20	0,07	98,34	14,02	1,59	0,22	4,97	0,82
37	2,62	0,19	6,37	1,01	0,19	0,03	201,83	6,70	17,95	4,74	3,39	0,63

Приложение IV.

38	1,27	0,31	1,57	0,34	3,14	0,20	4,73	0,39	23,13	4,59	3,56	0,04
39	0,19	0,07	0,13	0,04	0,19	0,12	0,53	0,00	1,25	0,09	0,52	0,14
40	1,67	1,18	1,30	0,10	1,48	0,48	9,70	1,20	3,70	0,27	2,40	0,90
41	0,92	0,05	0,11	0,06	0,04	0,06	20,01	1,38	0,74	0,12	1,97	0,35
42	1,50	0,00	0,56	0,10	0,05	0,02	21,88	1,03	1,48	0,34	2,52	0,53
43	1,58	0,28	0,99	0,06	2,42	0,29	0,05	0,01	5,73	1,49	4,38	0,33
44	2,16	0,26	1,84	0,26	0,19	0,07	66,93	2,47	1,43	0,28	1,26	0,12
45	1,21	0,34	0,67	0,03	0,18	0,01	0,07	0,01	3,05	0,34	1,93	0,69
46	1,75	0,50	1,44	0,19	0,19	0,03	150,97	3,38	3,42	0,27	1,74	0,14
47	2,83	0,30	0,16	0,03	2,71	0,02	0,09	0,00	0,61	0,17	0,24	0,04
48	1,48	0,16	1,16	0,10	8,13	1,99	0,13	0,00	0,19	0,06	1,04	0,15
49	1,57	0,12	0,28	0,01	0,01	0,00	6,83	0,07	2,40	0,18	1,13	0,32
50	7,13	1,88	2,36	0,18	0,27	0,03	3,41	0,04	1,15	0,39	5,28	0,67
51	0,96	0,66	0,20	0,01	0,75	0,12	0,05	0,01	2,60	0,09	1,07	0,12
52	0,97	0,17	0,13	0,04	0,20	0,05	10,50	0,11	0,61	0,14	2,37	0,16
53	2,87	0,23	1,17	0,26	0,10	0,02	21,80	2,18	0,69	0,15	11,72	1,06
54	1,36	0,13	0,30	0,03	0,04	0,01	1,95	0,06	18,67	3,18	1,34	0,44
55	1,49	0,48	0,44	0,18	0,15	0,02	69,65	1,62	12,72	1,13	1,99	0,28
56	0,90	0,11	1,20	0,12	0,11	0,03	64,92	1,24	16,37	0,95	1,07	0,20
57	3,88	0,09	0,73	0,19	0,06	0,04	20,77	0,45	43,92	2,29	2,93	0,39
58	4,75	0,69	1,28	0,03	1,82	0,37	23,49	0,76	5,15	0,17	1,48	0,07
59	2,54	0,67	1,98	0,14	0,28	0,14	31,45	1,07	1,44	0,44	1,99	0,54

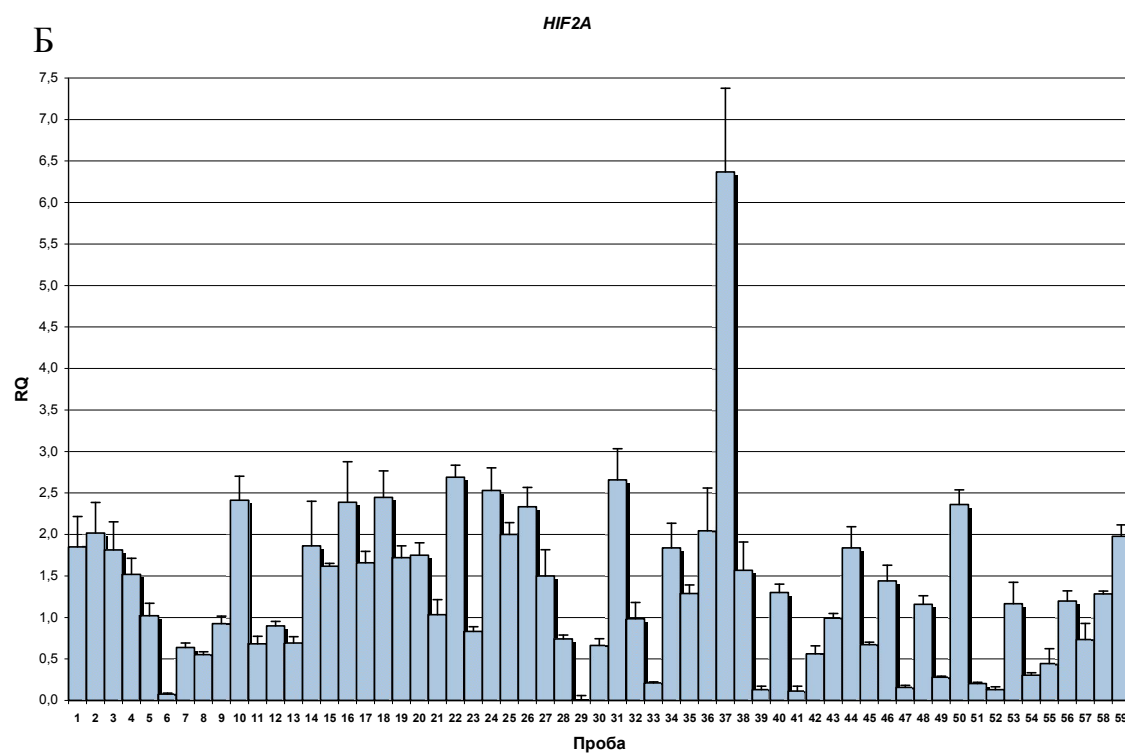
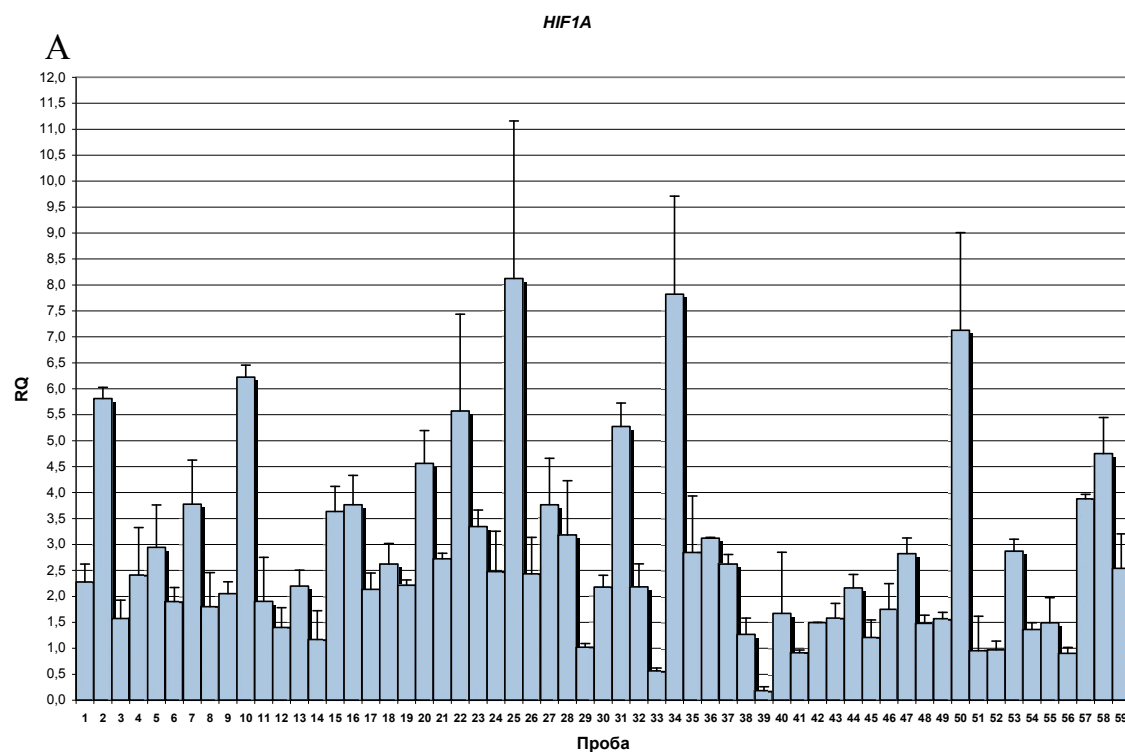
Приложение IV.

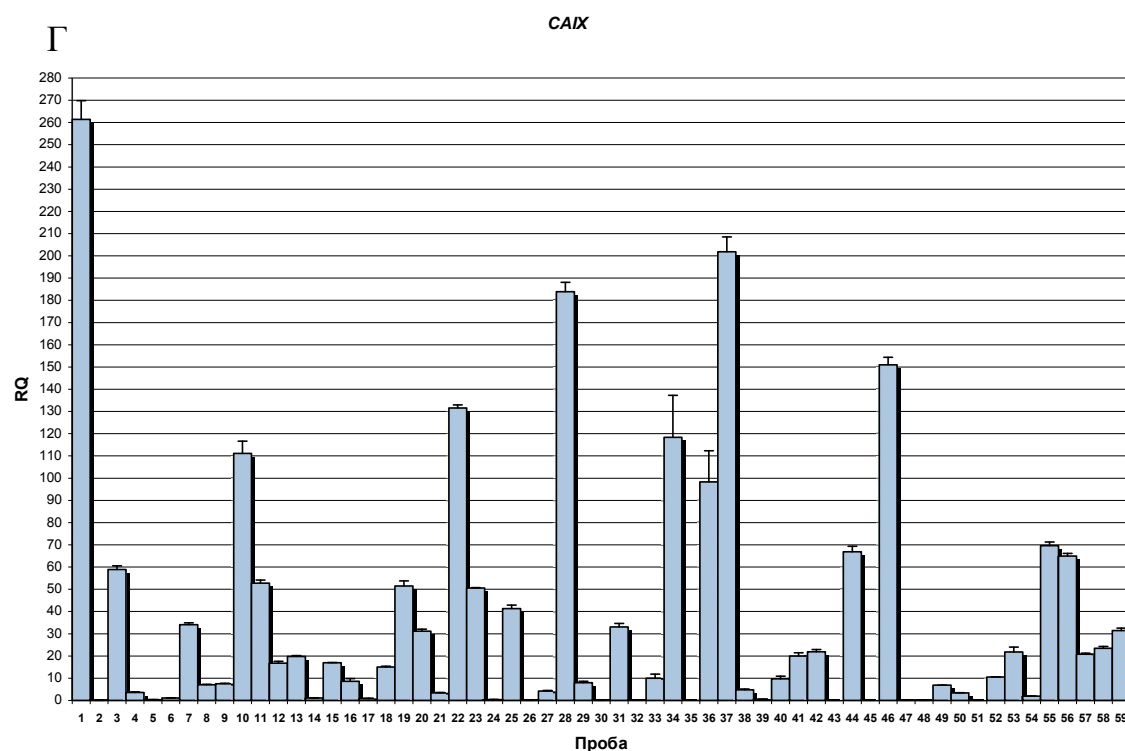
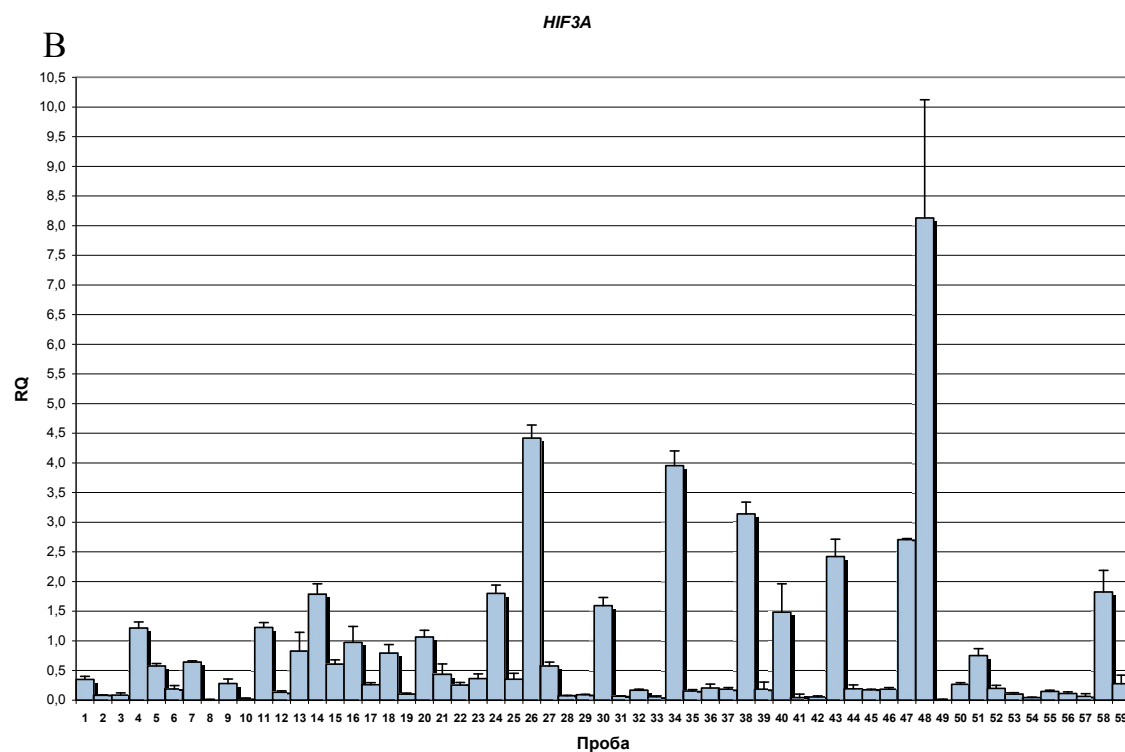
Таблица. IV.2.

Проби	KDR	CO	FLT1	CO	VEGFA	CO	MMP9	CO	SOX2	CO	SOX6	CO	SOX8	CO	SOX9	CO
1	2,40	0,58	1,59	0,18	37,15	0,01	47,26	5,75	1,05	0,02	9,76	0,92	2,54	0,22	1,99	0,24
2	0,73	0,03	0,77	0,02	1,78	0,40	0,01	0,00	1,16	0,03	2,71	0,05	0,67	0,10	1,63	0,14
3	2,48	0,53	0,25	0,04	92,76	1,31	27,17	0,84	1,21	0,21	1,73	0,11	0,25	0,05	1,86	0,26
4	1,11	0,07	0,95	0,02	2,52	0,09	0,10	0,00	2,99	1,62	5,24	0,37	3,45	1,17	3,58	0,30
5	1,33	0,13	1,70	0,08	5,42	0,49	5,70	1,32	3,57	1,46	3,88	0,31	2,40	0,61	8,14	0,30
6	0,40	0,22	0,25	0,03	5,82	0,56			3,12	0,96	5,76	0,36	1,33	0,33	3,19	1,21
7	0,70	0,06	1,12	0,23	10,09	0,55	3,99	1,27	0,48	0,21	3,72	0,03	4,18	0,17	3,75	0,25
8	0,77	0,03	0,69	0,05	4,89	0,02	355,87	50,92	1,08	0,13	0,36	0,02	0,74	0,01	1,78	0,11
9	2,27	0,29	1,56	0,17	9,39	0,69	403,78	1,87	3,50	1,05	3,28	0,07	16,00	4,33	4,31	0,35
10	1,20	0,06	1,52	0,26	39,10	3,88	21,32	2,84	3,17	0,80	1,06	0,01	0,20	0,02	2,41	0,30
11	0,24	0,05	0,77	0,15	19,27	1,24	27,68	3,13	0,25	0,07	0,72	0,08	1,40	0,24	3,05	0,31
12	1,58	0,52	1,67	0,10	7,09	0,52	247,91	45,01	1,39	0,35	1,46	0,23	2,23	0,34	3,42	0,66
13	0,58	0,14	1,03	0,07	40,60	0,06	112,04	5,76	4,82	1,70	3,82	0,14	3,06	0,29	2,45	0,39
14	1,76	0,44	1,88	0,24	1,43	0,13	0,59	0,33	1,14	0,46	1,03	0,04	0,53	0,25	0,97	0,23
15	0,67	0,06	0,54	0,07	36,97	4,02	21,62	2,76	2,43	0,17	1,28	0,03	2,60	0,38	4,24	0,57
16	0,88	0,05	0,81	0,24	24,98	2,38	5,53	0,14	2,80	0,88	1,06	0,18	0,98	0,22	3,92	0,55
17	0,69	0,04	1,49	0,07	1,21	0,21	0,55	0,16	6,09	0,25	1,45	0,11	6,63	3,36	2,89	0,23
18	4,86	0,89	1,50	0,67	7,68	0,38	78,75	11,39	9,16	1,73	1,41	0,18	4,09	0,74	1,30	0,29
19	4,38	0,62	1,96	0,30	13,95	3,92	163,48	43,06	7,60	1,36	4,18	0,16	7,37	1,31	0,74	0,11
20	9,14	0,11	0,99	0,25	25,38	3,48	52,94	11,02	20,88	9,08	6,34	0,54	4,09	0,23	9,92	1,01
21	2,48	0,63	1,51	0,18	10,81	2,44	72,54	10,59	6,33	1,17	1,86	0,16	3,89	0,96	7,87	0,26
22	4,62	0,22	2,51	0,38	41,66	8,60	210,96	2,42	11,44	0,57	0,93	0,27	0,95	0,08	4,57	0,38
23	1,50	0,06	0,81	0,11	9,12	2,84	13,37	1,55	7,12	2,28	0,25	0,03	0,83	0,31	2,96	0,30
24	1,13	0,40	1,40	0,34	1,79	0,35	0,84	0,05	1,60	1,31	15,02	0,72	2,47	1,07	2,69	0,21
25	2,16	0,40	1,47	0,62	42,82	0,64	23,62	1,17	3,88	0,00	1,94	0,05	1,52	0,23	6,10	0,34
26	4,05	0,82	0,27	0,08	1,37	0,12	0,37	0,15	6,42	2,10	4,30	0,08	1,47	0,08	6,04	0,29
27	8,76	1,48	2,13	0,16	5,68	1,14	8,21	0,47	1,37	0,44	3,66	0,46	1,17	0,47	2,24	0,04
28	0,94	0,09	0,65	0,32	15,86	0,00	1,89	0,03	3,16	0,00	1,36	0,10	0,01	0,01	3,43	0,92
29	0,04	0,00	0,03	0,02	2,94	0,35	0,71	0,52	0,14	0,02	0,08	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00

Приложение IV.

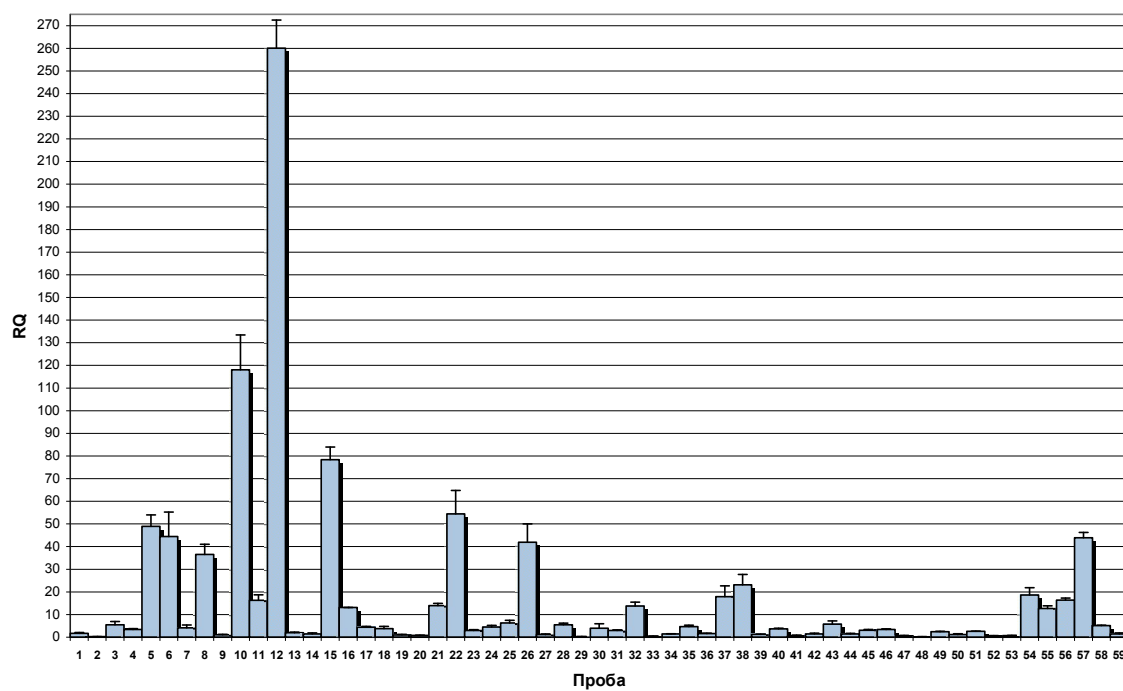
30	0,67	0,26	0,59	0,12	0,59	0,04	0,21	0,18	2,19	1,99	3,63	0,35	1,43	0,21	2,58	0,22
31	5,04	0,75	3,25	0,28	46,07	4,05	31,70	9,92	0,92	0,04	1,69	0,10	0,08	0,10	8,93	0,53
32	0,89	0,05	0,68	0,05	2,08	0,38	0,04	0,07	2,86	0,54	4,92	0,37	4,95	0,04	0,44	0,11
33	0,52	0,14	0,33	0,04	6,35	0,23	1,11	0,12	1,16	0,06	2,37	0,19	0,54	0,18	0,12	0,01
34	1,13	0,24	1,58	0,12	91,24	13,56	7,68	2,70	5,62	2,40	2,24	0,06	1,03	0,75	10,07	0,32
35	1,63	0,18	0,92	0,10	0,89	0,17	0,66	0,35	2,88	0,93	4,82	0,12	5,57	0,80	1,45	0,12
36	2,15	0,31	3,76	0,18	21,57	4,65	3,06	0,48	0,44	0,22	0,61	0,05	0,03	0,04	1,77	0,11
37	0,54	0,61	0,79	0,12	72,69	10,23	21,78	0,89	0,48	0,75	0,74	0,13	0,08	0,06	1,02	0,20
38	0,78	0,05	2,21	0,96	15,99	1,16	3,95	0,72	0,24	0,00	1,16	0,23	1,41	0,58	3,69	1,20
39	0,06	0,02	0,16	0,02	0,18	0,03	0,11	0,06	0,74	0,10	0,54	0,01	1,70	1,58	0,80	0,19
40	0,70	0,15	1,26	0,02	1,36	0,26	0,35	0,17	3,61	0,03	4,14	0,81	43,37	25,88	1,68	0,64
41	0,16	0,03	0,13	0,09	8,40	1,12	0,13	0,12	2,34	0,13	0,77	0,04	0,99	0,05	1,37	0,36
42	0,65	0,11	0,81	0,24	3,07	0,79	66,86	23,26	1,19	0,57	0,60	0,05	0,52	0,38	0,72	0,09
43	0,19	0,06	0,80	0,10	0,49	0,05	0,07	0,08	1,24	1,92	5,94	0,09	2,98	2,67	2,86	0,55
44	2,76	0,27	0,79	0,22	24,02	3,15	86,70	20,00	1,48	0,12	0,54	0,04	0,26	0,03	0,94	0,10
45	0,33	0,07	0,87	0,12	0,56	0,07	0,02	0,02	0,26	0,06	2,14	0,22	3,03	0,71	1,47	0,31
46	0,62	0,06	0,82	0,14	45,38	5,10	44,10	2,13	1,08	0,06	0,78	0,02	0,37	0,05	1,02	0,19
47	0,38	0,04	0,36	0,07	0,43	0,05			2,25	0,63	1,44	0,03	1,19	0,21	0,90	0,16
48	0,11	0,04	0,27	0,09	3,97	0,85	7,79	2,39	1,07	0,20	5,76	0,22	0,23	2,14	0,18	0,04
49	0,39	0,04	0,39	0,07	0,80	0,08	5,84	0,51	4,40	2,47	2,92	0,08	4,27	2,16	2,63	0,56
50	2,81	0,18	3,17	0,51	5,96	1,11	101,37	15,13	0,11	0,01	0,68	0,09	0,76	0,04	2,37	0,38
51	0,14	0,03	0,29	0,05	0,23	0,02	0,10	0,12	1,69	0,23	1,85	0,03	3,78	6,30	0,90	0,02
52	0,27	0,03	0,28	0,03	0,82	0,03	2,28	0,08	0,15	0,02	0,14	0,01	1,39	0,22	0,55	0,07
53	1,42	0,03	0,48	0,05	2,81	0,12	7,80	1,55	1,91	0,48	0,05	0,00	0,00	0,00	0,36	0,03
54	0,31	0,03	0,26	0,02	0,45	0,05	0,14	0,08	3,39	0,90	2,07	0,07	15,62	2,40	1,48	0,05
55	0,33	0,04	0,63	0,12	21,63	3,34	1,03	0,05	0,23	0,02	0,97	0,12	3,21	0,31	1,47	0,23
56	0,81	0,19	0,84	0,07	14,75	0,92	1,34	0,19	0,76	0,11	0,28	0,03	0,65	0,11	0,50	0,10
57	0,43	0,00	0,78	0,10	8,19	2,09	6,43	0,50	0,70	1,21	1,25	0,20	0,18	0,06	4,41	0,05
58	3,10	0,13	1,78	0,33	4,80	0,22	78,59	3,24	3,76	0,64	0,41	0,03	5,02	0,50	1,90	0,23
59	1,72	0,04	1,62	0,62	10,01	0,05	41,19	3,97	3,74	0,06	1,69	0,18	0,64	0,87	0,89	0,02





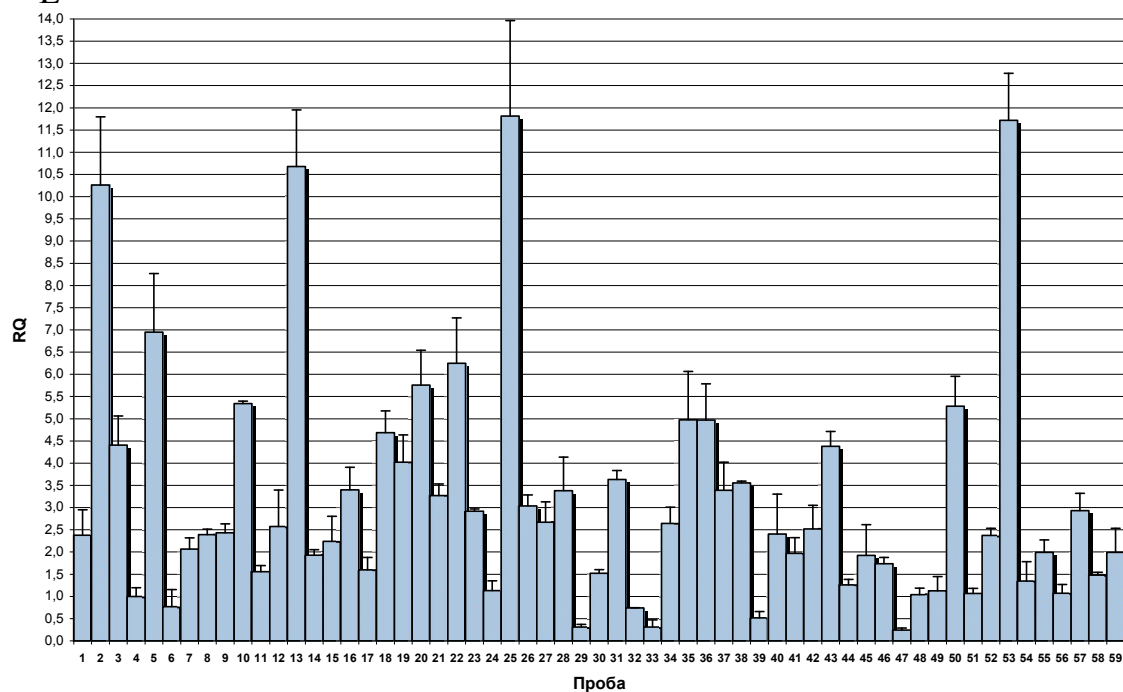
Д

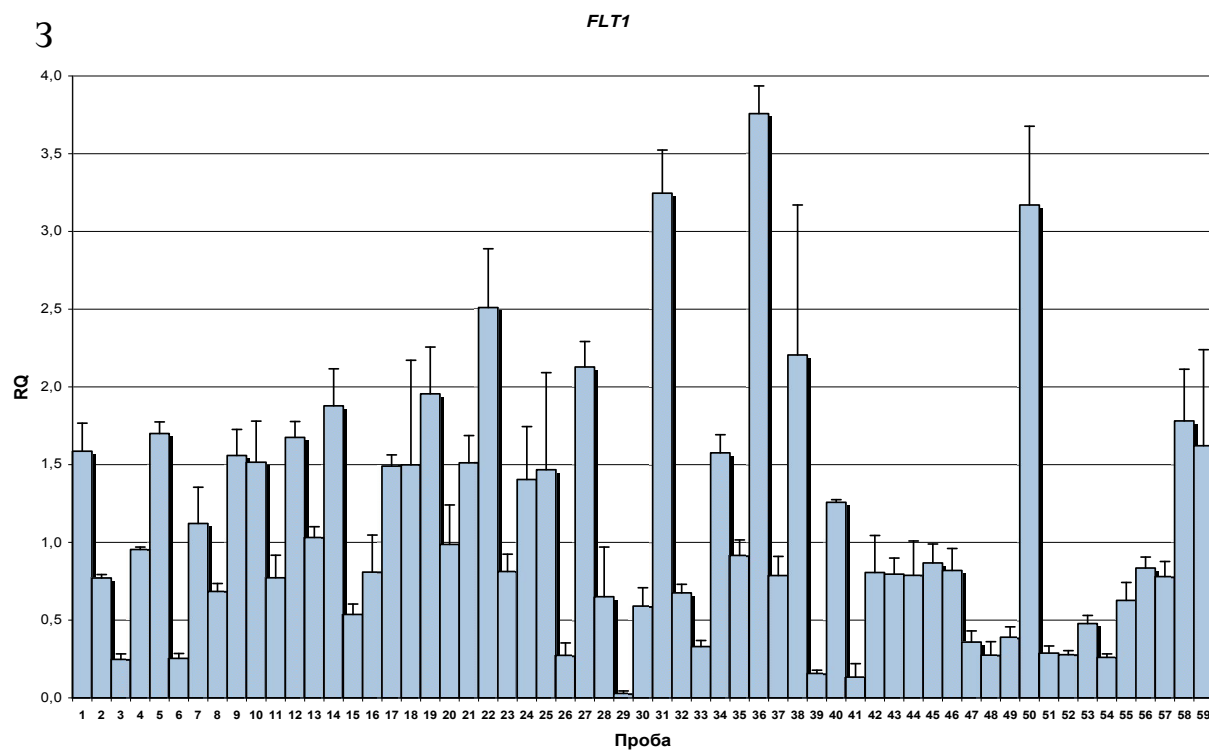
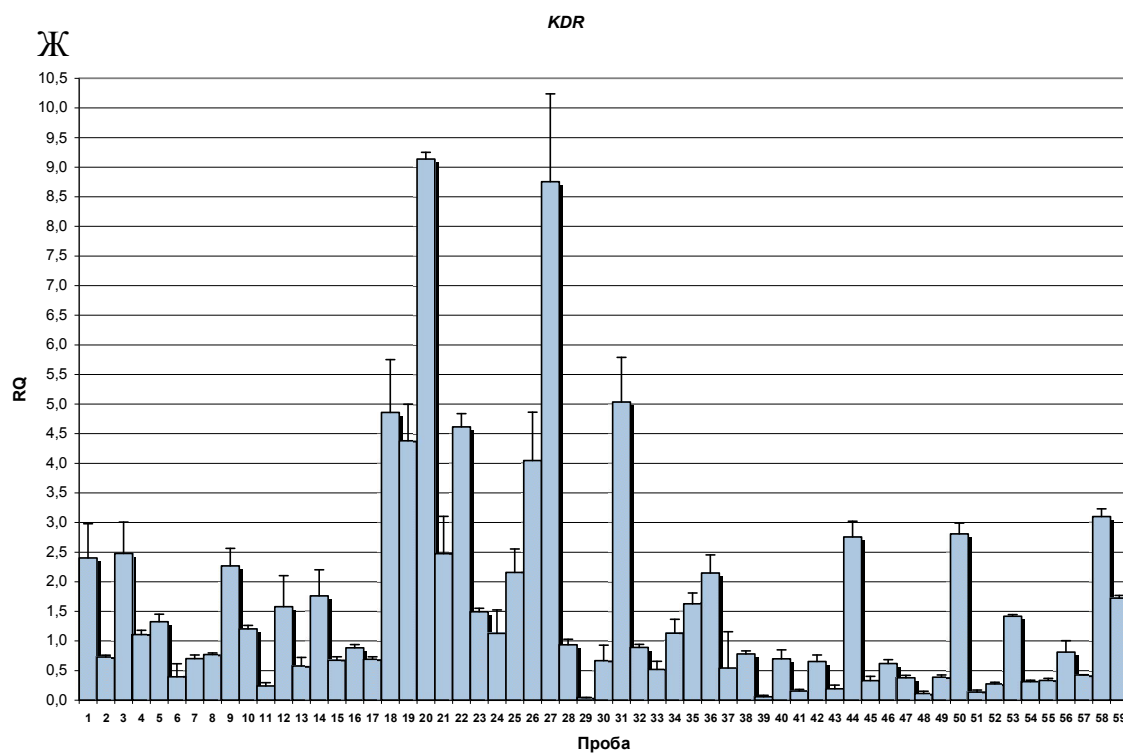
EGFR

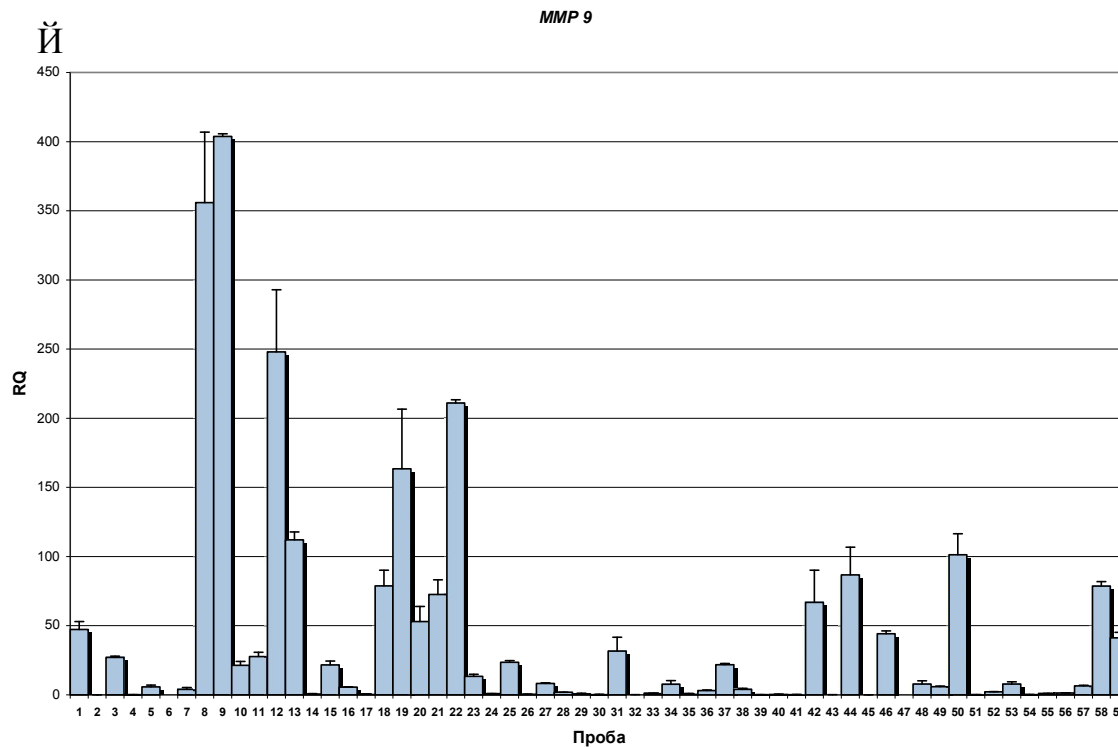
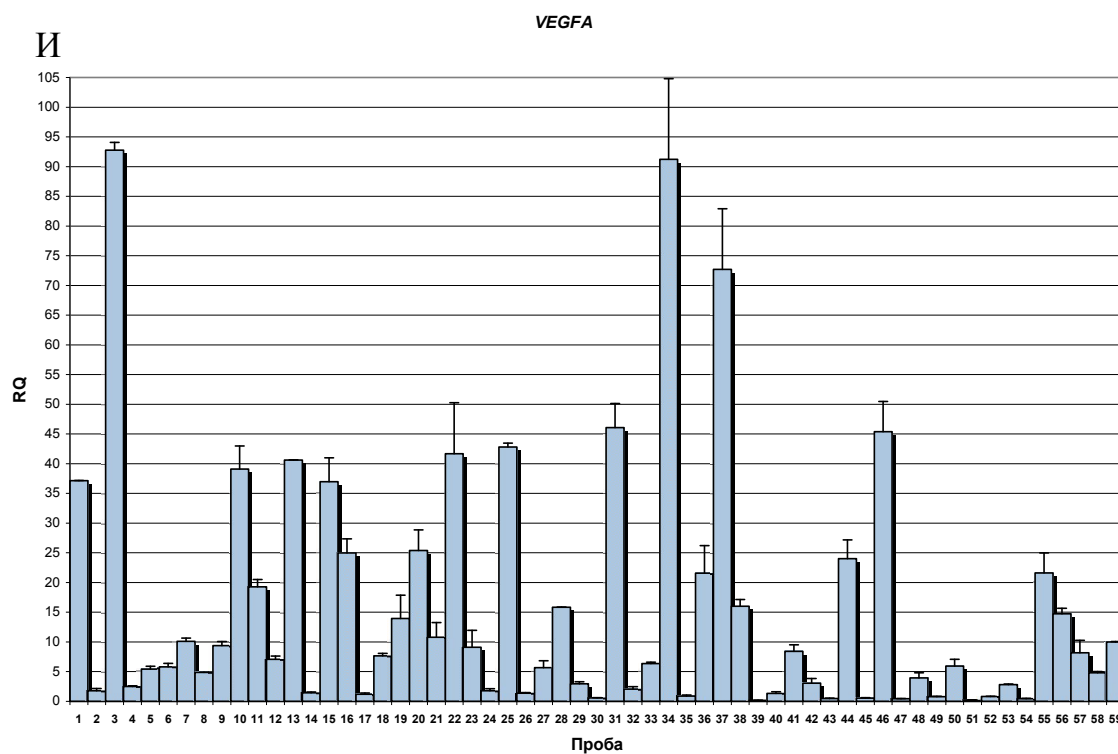


Е

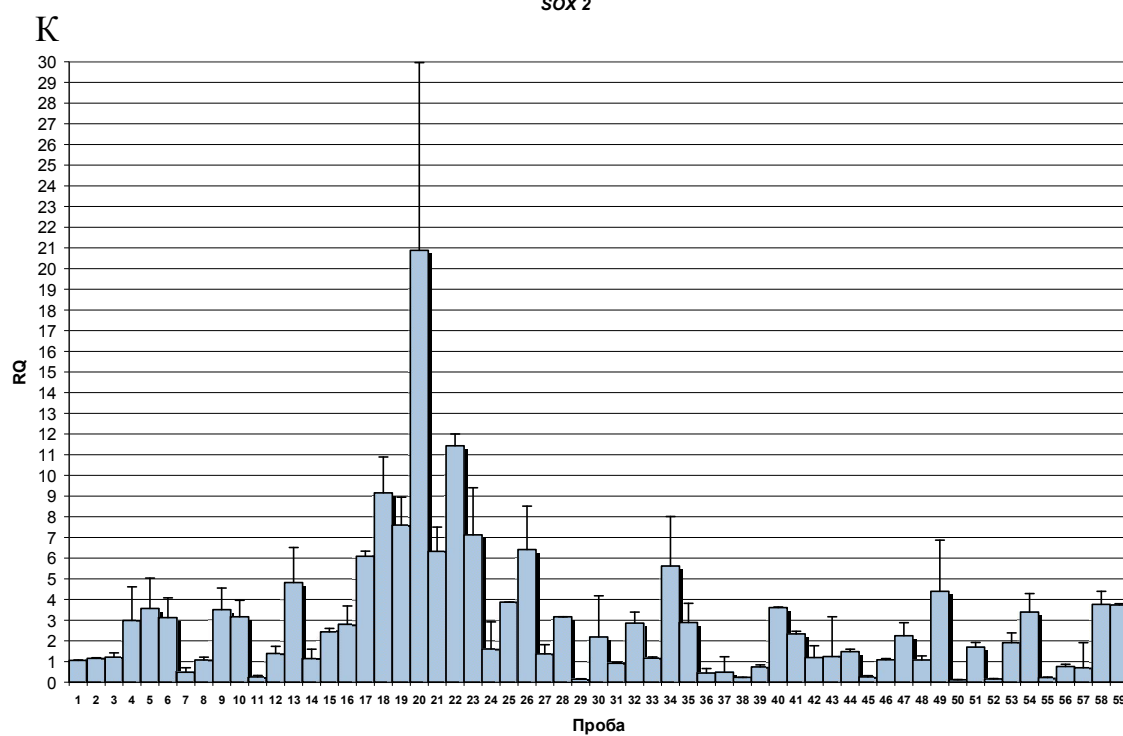
TGF-b2



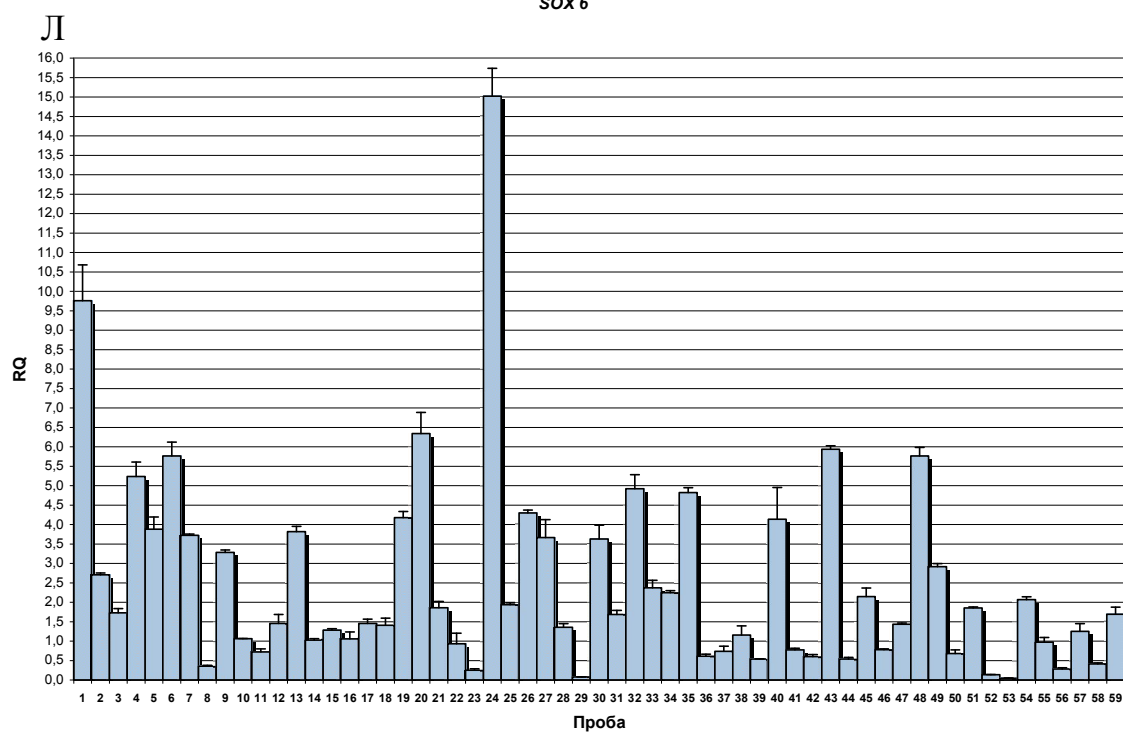


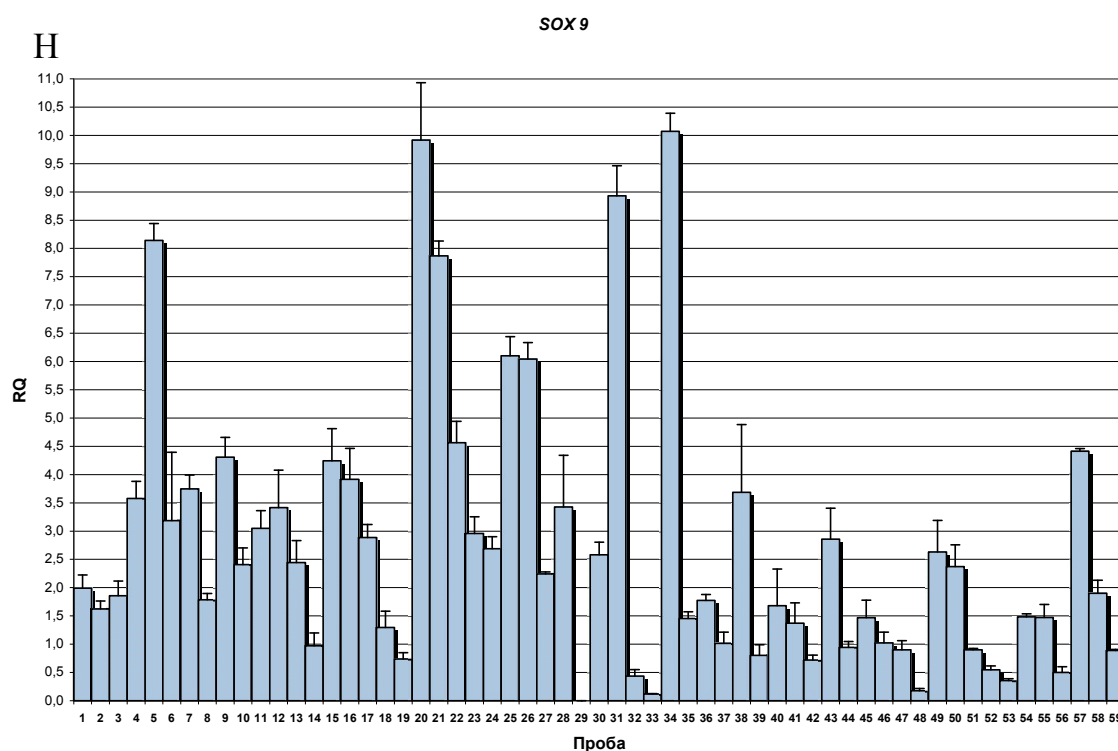
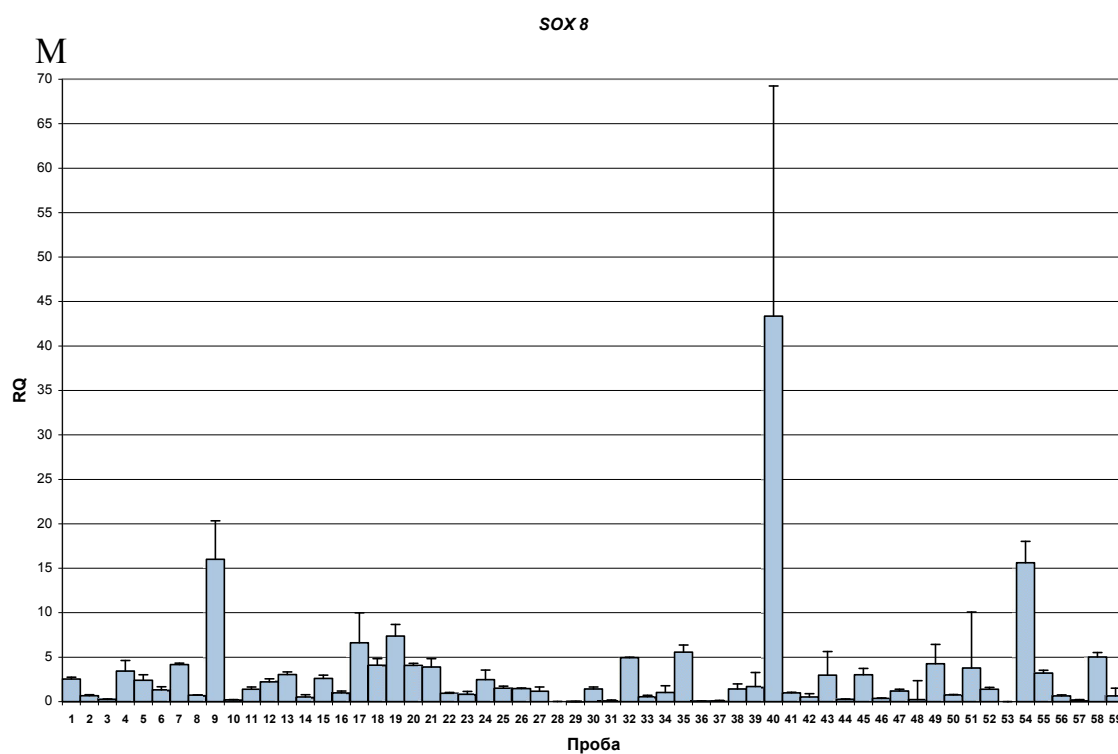


SOX 2



SOX 6





Фигура. II.1. Визуализация на изменението в експресията при 59 пациента (RQ стойността показва промяната на експресията в пъти; RQ под 0,5 – понижена, RQ между 0,5 и 2 – нормална, RQ над 2 – повишена експресия) на следните гени: А. HIF1A; Б. HIF2A; В. HIF3A; Г. CAIX; Д. EGFR; Е. TGF- β 2; Ж. KDR; З. FLT1; И. VEGFA; Й. MMP9; К. SOX2; Л. SOX6; М. SOX8; Н. SOX9