МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

****

Роля на дерегулирани микроРНКи, промяна в броя копийни варианти (CNV) и цитомегаловирусен инфекциозен статус като диагностични и прогностични биомаркери при пациенти с глиомни тумори

ДИСЕРТАЦИЯ

за

присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

на

Емилия Красимирова Николова

Докторска програма: Молекулярна биология

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Проф. Албена Първанова Тодорова – Георгиева, дбн

Акад. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

София, 2025

„Умът не е съд, който трябва да се напълни, а огън, който трябва да се разпали.“
— Плутарх

Посвещавам този труд на дъщеря ми – София,

една сбъдната мечта, която се появи по време на дисертацията ми и пандемията от COVID-19.

Благодаря на семейството ми – за любовта, търпението и за това, че запалиха в мен искрата на любознателността и стремежа към знание.

Изказвам своята дълбока признателност към моя научен ръководител – проф. Албена Тодорова, която не спираше да вярва в мен, дори когато аз се колебаех. Благодаря ѝ, че ми даде свободата да експериментирам и да се развивам като самостоятелен учен. Нейното менторство и вяра в потенциала на хората бяха ключови за пътя, който извървях.

Сърдечно благодаря на моите колаборатори – д-р Лили Лалева, д-р Милко Милев, доц. д-р Тома Спириев, доц. д-р Дилян Фердинандов, както и на всички медицински специалисти и колеги, които направиха възможно осъществяването на този труд.

Благодаря и на всички близки и приятели, които ме подкрепяха и вдъхновяваха през целия този път.

Дисертационният труд съдържа 183 страници, 59 фигури и 35 таблици.

Цитирани са 231 литературни и 6 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, гр. София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договори №Д-118/2018 и № Д-127/2019.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на катедрен съвет на Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София и решение на факултетен съвет протокол № 3/20.02.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.05.2025 г. от 12 ч. в Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет - София, ул. Здраве 2, гр. София пред научно жури в състав:

Външни членове:

- Чл.–кор. проф. Сорен Бохос Хайрабедян, дбн – Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН - становище
- Доц. д-р Тома Юриев Спириев. дм – Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“ - рецензия
- Доц. Стефка Крумова Иванова, дв – НРЛ „Морбили, Паротит, Рубеола“, НЦЗПБ - становище

Вътрешни членове:

- Проф. Радка Петрова Кънева, дб - Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София - становище
- Доц. Д-р Атанаска Петрова Еленкова, дм - Катедра по ендокринология на Медицински факултет, Медицински университет – София - рецензия

Резервни членове:

Проф. Албена Георгиева Йорданова, дб - външен резервен член за МУ – София
Доц. д-р Дилян Фердинандов, дм - вътрешен резервен член за МУ – София

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

Настоящата дисертация и съдържащите се в нея научни резултати, текстове и графики са защитени съгласно ЗАПСП. Използването им за научни, образователни или други цели е допустимо <u>само при коректно цитиране</u> или **<u>след изричното съгласие на автора</u>**.

Съдържание

Използвани съкращения: 7
РЕЗЮМЕ 8
SUMMARY 9
ВЪВЕДЕНИЕ 10
Литературен обзор 12
1. Дифузни глиоми– предизвикателство за учени и лекари 13
1.1. Анатомия 13
1.2. Епидемиология 14
1.3. Рискови фактори 15
1.4. Симптоми 16
1.5. Скрининг, ранна диагностика и прогностични фактори 17
1.6. Класификация на глиомите според СЗО 18
1.7. Биомаркери – надежда за персонализираната медицина 21
1.7.1. Какво е биомаркер? 21
1.8. Генетични биомаркери 21
1.9. Промяна на броя генни копия като биомаркер 24
1.10. Подходи за лечение при глиомите 28
1.11. МикроРНКи – двукратните нобелови лауреати с обещаващ потенциал 31
1.11.1 Класификация и структура на микроРНКите 32
1.11.2. Биогенеза на микроРНКите 32
1.11.3. Роля на микроРНКите като биомаркери 34
1.11.4. МикроРНКи като биомаркери при глиоми 35
1.11.5. Терапии, базирани на микроРНКи 36
1.12. Вирусни агенти, свързани с мозъчните тумори 37
1.12.1. Структура и класификация на херпесните вируси 37
1.13 Цитомегаловирус 38
1.13.1. Структура на ЦМВ 38
1.13.2. Инфекция, симптоматика и диагностика на ЦМВ 39
1.13.3. Роля на ЦМВ в туморогенезата 41
1.13.4. Лечение на ЦМВ 42
1.13.5. ЦМВ-базирани терапии при глиобластом 42
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 44
2. ЦЕЛ 45
3. ЗАДАЧИ 45
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 46
4. МАТЕРИАЛИ 47
4.1. Клинични материали 47
4.2. Предварителна обработка и съхранение на материалите 49
5. МЕТОДИ 50
5.1. Изолиране на тотална РНК с фракция от микроРНК 50
5.2. Определяне концентрация на изолирана тотална РНК 52

5.3. Полимеразно-верижна реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR) 52
5.4. Амплификация на ДНК фрагменти с PCR в реално време (real-time PCR) 53
5.5. Синтез на копиДНКи 54
5.5.2. Реакция на лигиране на адапторите 56
5.5.3. Реакцията на обратна транскрипция (RT) 57
5.5.4. Реакция на преамплификационно намножаване на микроРНКи 58
5.6. Експресионен анализ на микроРНКи с количествена полимеразно-верижна реакция в реално време (qPCR) 59
5.7. Селекция на ендогенни референтни контроли 61
5.8. Екзогенна контрола 61
5.9. Количествено изчисляване на генната експресията на микроРНКите чрез qPCR 62
5.10. Изолиране на ДНК от свежа тъкан 62
5.11. Изолиране на ДНК от FFPE парафинови блокчета 64
5.12. Определяне концентрация на изолираната геномна ДНК 65
5.13. Анализ на CNVs с Мултиплексна лигазно-зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification - MLPA) 65
5.14. PCR анализ на *IDH1* и *IDH2* гените 69
5.15. Електрофореза в агарозен гел 71
5.16. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотид трифосфати (ддНТФ) 71
5.16.1. Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI3130 Sequence Genetic Analyzer 72
5.16.2. Подготовка на пробите и директно секвениране по Sanger 72
5.17. Провеждане на PCR в реално време за установяване наличието на вируси в изследваните проби 74
5.18. Статистически анализи 76
5.18.1. Проверка на хипотеза 76
5.18.2. Предварително изследване на данните (EDA-explore data analysis) 77
5.18.3. Тест на Хи-квадрат - χ^2 (Chi-Square Test) 78
5.18.3.1 Точен тест на Фишер (Fisher's Exact Test) 78
5.18.4. Тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney U тест) 79
5.18.5. Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis) тест 79
5.18.6. Корелационни анализи 80
5.18.7. Регресионен анализ 81
5.18.8. Анализ на оцеляването (Survival Analysis) 82
5.18.8.1. Тест на Каплан – Майер (Kaplan-Meier) 82
5.18.8.2. log-rank тест 82
5.18.9. Модел на пропорционалните опасности на Кокс (Cox proportional hazards model) 83
5.18.10. Анализ на ROC кривите (Receiver Operating Characteristic curve) 84
5.18.11. Статистически софтуери, използвани в дисертацията 86
РЕЗУЛТАТИ 87
6.1. Епидемиологична характеристика на изследваната представителна извадка от пациенти с глиоми. . 88
6.2. Анализ на генната експресия на микроРНКите при пациенти с глиоми 91
6.3. Резултати от генетичните анализи 105

6.3.1. MLPA анализи за определяне броя копийни варианти (CNVs) при набор от гени, засегнати при глиомите ... 106
6.3.2. Асоциации между клинико-патологичните характеристики и CNVs ... 110
6.3.3. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier analysis) според CNV статуса на изследваните гени ... 111
6.3.4. Резултати от секвениране по Sanger на *IDH1* и *IDH2* гените. ... 113
6.3.5. Анализ на асоциациите между клинико-патологичните характеристики и *IDH1* ... 115
6.3.6. ROC анализ на според *IDH1* статуса ... 115
6.3.7. Анализ на оцеляването според *IDH1* статуса ... 115
6.3.8. Корелация между наблюдаваните CNVs, мутациите в *IDH1* гена и експресионните нива на микроРНКите ... 117
6.3.9. Модели на логистична регресия ... 117
6.3.10. Провеждане на регресионни модели на Кокс ... 119
6.4. Резултати от ДНК анализа на ЦМВ ... 121
6.5. Анализ на генна онтология (ГО) ... 121
6.6. Диагностичен и прогностичен алгоритъм ... 125
ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ... 127
7.1. Обсъждане на резултатите, получени при анализ на клиничните характеристики на изследваната кохорта от пациенти. ... 128
7.2. Обсъждане на резултатите, получени при експресионен анализ на микроРНК в изследваната кохорта от пациенти ... 131
7.3. Обсъждане на резултатите, получени при генетичните анализи в изследваната кохорта от пациенти. ... 140
7.4. Обсъждане на резултатите, получени при инфекциозния анализ за детекция на ЦМВ в изследваната кохорта от пациенти. ... 149
7.5. Обсъждане на резултатите, получени при комбинираните анализи на експресията на микроРНКи и CNVs. ... 151
7.6. Настоящи и бъдещи терапии за лечение на глиоми ... 156
7.6.1. МикроРНК-базирани терапии ... 157
7.6.2. Терапии, свързани със статуса на изследваните гени ... 160
7.6.3. ЦМВ-базирани терапии ... 163
7.7. Силни и слаби страни на настоящето проучване ... 165
8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 166
9. ИЗВОДИ ... 167
10. ПРИНОСИ ... 168
11. Публикации, участия, научни проекти и награди във връзка с дисертацията ... 169
11.1. Публикации ... 169
11.2. Участия в научни конгреси и семинари ... 169
11.3. Участия в проекти ... 170
11.4. Награда ... 170
Библиография: ... 171

Използвани съкращения:

AKT: a serine/threonine protein kinase
AUC: area under the curve
BAX: Bcl-2 Associated X-protein
CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CNVs – copy number variations
CXCR4: X-C Chemokine Receptor 4
EGFR: epidermal growth factor receptor
EMT: epithelial-mesenchymal transition
EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) и NCIC (National Cancer Institute of Canada)
FC: fold change
HGG: high-grade gliomas
HOXD10: homeobox D10
IDH: isocitrate dehydrogenase
IGF1R: insulin-like growth factor 1 receptor
KLF4: kruppel like factor 4
KPS: Karnofsky performance status
LGG: low-grade gliomas
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MGMT: O 6 -methylguanine - DNA methyltransferase
mTOR: mammalian target of rapamycin
miRNA (miR): micro ribonucleic acid
mRNA: messenger RNAs
MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
NF1: Neurofibromin 1
NF-kB: Nuclear factor kappa B
NFKBIA:Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor, Alpha
NSCLC: non-small cell lung cancer
OS- Overall Survival
PDCD4: Programmed Cell Death 4
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinases
PTEN: phosphatase and tensin homolog
PFS-Progression-Free Survival
RAS: rat sarcoma virus
ROC: receiver operating characteristics
RT-qPCR - – reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
SPRY2: Sprouty homolog 2
TMZ: Temozolomide
TTF- Tumour-treating fields
TP53: tumour protein p53
WHO: World Health Organization
ВСГ – високостепенни глиоми
НАДФ: никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат
НСГ - нискостепенни глиоми
СЗО: Световната Здравна Организация
CNS5- Central Nervous System 5 (пето издание на класификацията на тумори на ЦНС от СЗО

РЕЗЮМЕ

Глиомите са сред най-често срещаните първични мозъчни тумори, като тяхната хетерогенност и агресивност изискват нови диагностични и терапевтични стратегии. В настоящото изследване анализирахме експресионните профили на селектирани микроРНКи и копийните вариации (Copy Number Variations - CNVs) при български пациенти (n=76) с високостепенни (ВСГ) и нискостепенни глиоми (НСГ), с цел идентифициране на потенциални биомаркери за диагностика, прогноза и стратификация на пациентите.

Нашите резултати показаха, че всички изследвани микроРНК са дерегулирани при глиоми в сравнение с контролни проби, като **miR-7, miR-21, miR-491 и miR-10b** демонстрират най-добър диагностичен потенциал. Освен това, **miR-491** показа най-добър потенциал за разграничаване между ВСГ и НСГ, следван от miR-7 и miR-34a, което подчертава и обещаващата им роля като градиращи биомаркери. Селектираният микроРНК профил показа и прогностичен потенциал по отношение на общата преживяемост (OS) и преживяемостта без прогресия (PFS).

Сред най-често срещаните копийни вариации (CNVs) идентифицирахме делеция на *CDKN2A*, амплификация на *EGFR* и делеция на *PTEN*, последвани от делеция на *TP53*, амплификация на *PDGFRA* и *MIR26A2*.

Установихме генетични промени, близки до туморните, в макроскопски „нормално“ изглеждащата, съседна мозъчна тъкан.

Не установихме статистически значимо присъствие на ЦМВ ДНК в изследваните глиомни проби.

Създадохме диагностичен модел, базиран на амплификация на ***EGFR*,** делеция на ***PTEN*,** див тип ***IDH1*** и ниски нива на **miR-491**, който разграничава ВСГ от НСГ с точност **86.1%**. Прогностичните анализи показаха, че делеция на ***CDKN2A*** **и** ***PTEN*,** напредналата **възраст**, диагноза **ВСГ** и див тип ***IDH1*** са свързани с **по-кратка OS**, докато амплификация на *EGFR* и *PDGFRA*, наличие на артериална хипертония и делеция на *PTEN* са предиктори за по-кратка PFS.

Получените резултати предлагат комбинация от биомаркери с диагностична и прогностична стойност, обединени в предложните алгоритми, с цел подобряване стратификацията и проследяването на пациентите. Вярваме, че данните от настоящия дисертационен труд са реално приложими в клиничната практика и могат да послужат като основа за бъдещи таргетни терапии при пациенти с глиоми.

SUMMARY

Gliomas are among the most common primary brain tumours with aggressive behaviour and molecular heterogeneity necessitating new diagnostic and therapeutic strategies. In this study, we analyzed the expression profiles of selected microRNAs and copy number variations (CNVs) in Bulgarian patients (n=76) with high-grade (HGG) and low-grade gliomas (LGG) to identify potential biomarkers for diagnosis, prognosis, and patient stratification.

Our results showed that all studied microRNAs were deregulated in gliomas compared to control samples and miR-7, miR-21, miR-491 and miR-10b demonstrated the highest diagnostic potential. Interestingly, miR-491 exhibited the best ability to distinguish between HGG and LGG, followed by miR-7 and miR-34a, highlighting their promising role as grading biomarkers. The selected microRNA profile also showed prognostic potential regarding overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).

Among the most frequent CNVs, we identified *CDKN2A* deletion, *EGFR* amplification, and *PTEN* deletion, followed by *TP53* deletion, and amplification of *PDGFRA,* and *MIR26A2*.

We also observed genetic alterations similar to tumour-specific changes in the "normal-looking" adjacent brain tissue.

We did not detect statistically significant presence of CMV DNA in the analyzed glioma samples.

We developed a diagnostic model based on *EGFR* amplification, *PTEN* deletion, wild-type *IDH1*, and low levels of miR-491, which differentiates HGG from LGG with 86.1% accuracy. Prognostic analyses revealed that *CDKN2A* and *PTEN* deletions, older age, and wild-type *IDH1* were associated with shorter OS, while *EGFR* and *PDGFRA* amplification, arterial hypertension, and *PTEN* deletion were predictors of shorter PFS. The obtained results propose a combination of biomarkers with diagnostic and prognostic value, integrated into the suggested algorithms, to improve patient stratification and monitoring. We believe that the findings of this dissertation are clinically applicable and could serve as a basis for future targeted therapies in glioma patients.

„Мозъкът е най-сложното нещо във Вселената и въпреки това всички имаме по един.“

— David Eagleman

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът: скритата пандемия

Живеем в изключително динамично и вълнуващо време, белязано от невероятни технологични иновации. Тези постижения трансформират медицината и здравеопазването, и допринесоха за удвояване на продължителността на живот в повечето държави по света. И докато преди един век главните причини за заболеваемост и смъртност са били инфекциозните болести, то в момента пред здравеопазването стои предизвикателството да се справи със заболявания, свързани предимно с начина на живот и околната среда.

Според Световната Здравна Организация (СЗО) и доклад, относно световната ракова статистика (Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN), раковите заболявания са водеща причина за заболеваемост и смъртност сред населението на Европа и САЩ, след сърдечно-съдовите заболявания (1). В световен мащаб новите случаи на рак са достигнали близо 20 милиона и са причинили смъртта на почти 10 милиона човека. Смята се, че тези стойности ще се удвоят до 2040 г., поради което това заболяване добива размери на глобална епидемия или пандемия (1). За сравнение, пандемията от COVID-19 (SARS-CoV-2), е причинила около 7 милиона смъртни случая от 2020 г. до 2025 г.

Ракът е хетерогенна група от заболявания, характеризиращ се с неконтролиран клетъчен растеж и пролиферация. Мултифакторната му природа възниква от сложното взаимодействие на генетични фактори, фактори на околната среда и начина на живот. Развитието на рака включва сложни молекулярни и генетични промени, които нарушават нормалните регулаторни механизми на клетъчното делене, диференциация и апоптоза. Генетичните мутации, независимо дали са наследени или придобити, играят критична роля в инициирането на канцерогенезата. Също така експозицията на околната среда, като излагане на канцерогенни фактори, прекарани инфекции, включително физическа активност и диета, допринасят значително за вероятността за развитие на неопластичен процес.

През последните години в някои западноевропейски държави (Швейцария, Швеция, Англия и др.) смъртността при част от туморните заболявания намалява, благодарение на активните скринингови програми с цел ранна диагностика и

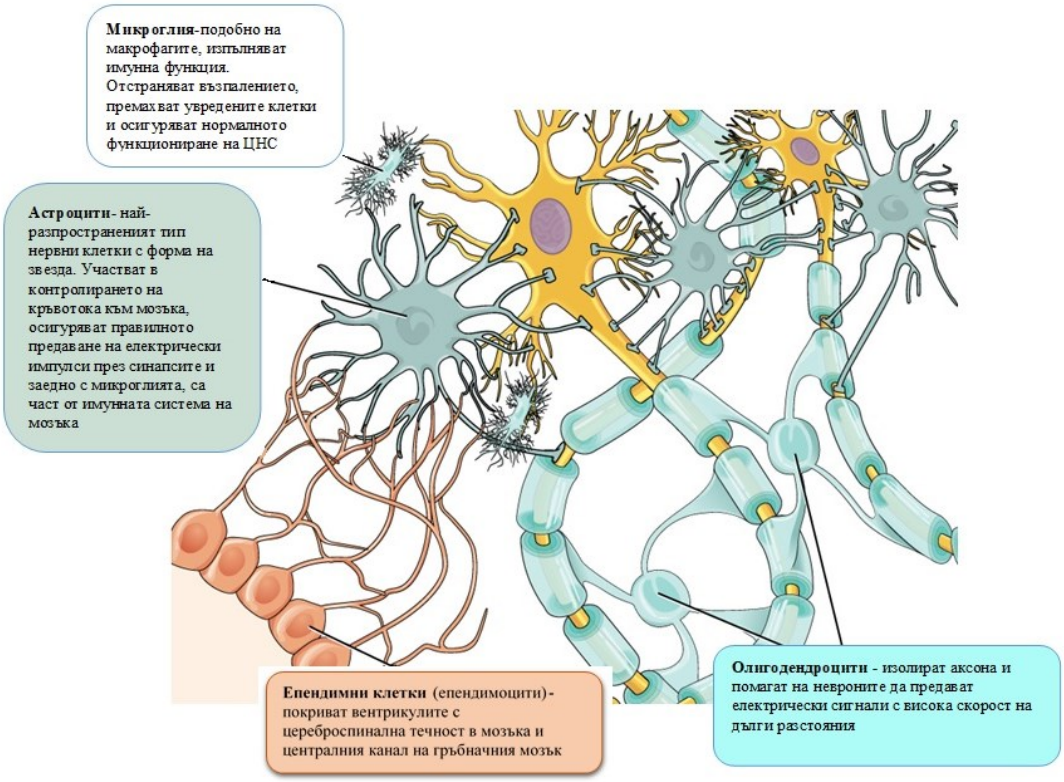
превенция, както и съвременното лечение. Въпреки напредъка, все още съществуват трудни за диагностика и лечение тумори, каквито са високостепенните мозъчни тумори, с изключително лоша прогнозата за пациентите. Фундаменталните проучвания при глиалните мозъчни тумори (глиоми) и разбирането им като мултифакторни заболявания е от основно значение за разработването на програми за превенция, диагностика и терапевтични стратегии.

Литературен обзор

1. Дифузни глиоми– предизвикателство за учени и лекари

1.1. Анатомия

Глиомите са тумори, засягащи главния мозък на централната нервна система (ЦНС), които произхождат от глиалните клетки. Името им - „глия“ на латински означава „лепило“ и преди са смятани за лепилото, което поддържа невроните заедно. Вече е известно, че освен поддържащата функция, глията играе решаваща роля за нормалното функциониране на невроните и предаването на сигнали между тях, използвайки йони и невротрансмитери. В ЦНС най-голям брой са глиалните клетки, които според структурата и функцията си се разделят на астроцити, олигодендроцити, микроглия и епендимни клетки (фиг.1.1). Въз основа на вида нервни клетки, от които произхождат, глиомите се разделят на астроцитоми, олигодендроглиоми, епендимоми. Всички те споделят подобни характеристики като неясни граници с инфилтративен модел на растеж към съседните клетки и прогресия към злокачественост с течение на времето.



Фигура 1.1. Видове глиални клетки и техните функции (адаптирано от https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology). Освен поддържаща роля, различните видове глиални клетки участват в контролирането на микросредата, комуникацията между клетките и редица други процеси, важни за развитието и функционирането на нервната система.

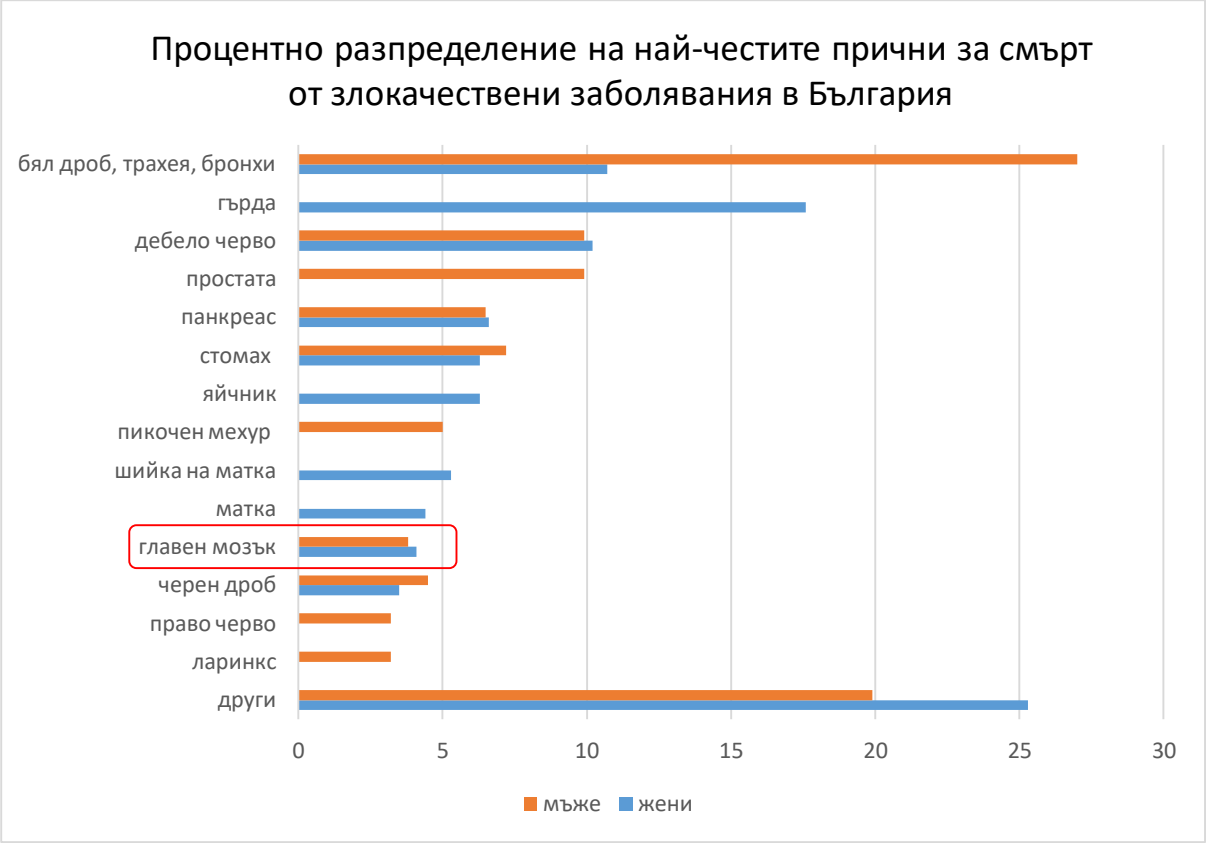
1.2. Епидемиология

Според последните данни на СЗО през 2021 г. туморите на ЦНС са с честота около 1.6% и са причина за около 2.6% от смъртните случаи при злокачествени заболявания в САЩ (1). За периода 2017-2021 г. туморите, обхващащи главния мозък (т.нар. мозъчни тумори) и периферните нерви, са на първо място по смъртност при юноши и младежи до 20 г. (21%) и на второ място при деца до 14 г. (2).

Най-често срещаният злокачествен глиален тумор се нарича глиобластом. За съжаление, глиобластомът е трети по честота след менингиомите и хипофизните аденоми. Само 53.7% от пациентите с тази диагноза доживяват една година. Наблюдаваната средна продължителност на живота е около 17 месеца за пациентите с метилиран промотор на *MGMT* (O^6-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза) и 12.4 месеца без наличие на метилиране (3).

Мозъчните тумори могат да се появят на всяка възраст, но някои видове са по-чести на определени етапи от живота. Например педиатричните мозъчни тумори са най-честите солидни тумори при деца. Глиомите, включително глиобластомите и астроцитомите, се диагностицират по-често с увеличаване на възрастта, с пикова честота при по-възрастни хора.

Разпределението по пол варира според вида на тумора, като глиомите, показват 1.6 пъти по-висока честота при мъжете спрямо жените (4). В България, според "Националния раков регистър", мозъчните тумори са причина за смъртта на 3,8% от мъжете и 4,1%. (фиг. 1.2). Според процентното разпределение на най-честите злокачествени заболявания в България за 2017 г., туморите на ЦНС са на първо място при възрастовата група до 14 г., на 3-то и 4-то място, съответно при мъже и жени до 29 г.



Фигура 1.2. Разпределение по пол на най-честите причини за смърт от злокачествени заболявания в България. Мозъчните тумори са причина за смъртта на 3,8% от мъжете и 4,1% от жените през 2017 (www.sbaloncology.bg)

1.3. Рискови фактори

Диагностицираните случаи на мозъчни тумори са предимно спорадични, случайни събития, като процентът на наследствените, генетично детерминирани заболявания е относително малък. Някои рискови фактори са свързани с повишена вероятност за развитие на мозъчни тумори.

1.3.1. Йонизираща радиация - излагането на висока доза йонизиращо лъчение, като например от терапевтично лъчение за други състояния или професионално излагане, е добре установен рисков фактор за рак на мозъка. Така например пациенти, подложени на лъчелечение в областта на главата при лечение на рак по време на детството си, са изложени на повишен риск от развитие на глиоми години или дори десетилетия по-късно. При хора изложени на облъчване от атомни бомби и тестване на ядрени оръжия, също се наблюдава повишена честота на развитието на глиоми (5).

1.3.2. Генетични фактори - няколко редки генетични синдрома се асоциират с повишен риск от развитието на различни мозъчни тумори, поради наличието на генетични

аберации. Това са Неврофиброматоза тип I и II (*NF*), Туберозна склероза (*TSC1, TSC2*), Синдром на Турко, Ли-Фраумени синдром *(TP53)*, Фон Хипел Линдау (*VHL*), Линч синдром (*MLH*1, *MLH*2, *MSH*6, *PMS*2), Синдром на Кауден (*PTEN)*, меланома-неврален системен туморен синдром, болест на Олиер и Мафуци синдром (6). Наличието на фамилна анамнеза за мозъчни тумори, може да е свързана с 2-кратно увеличение на риска от развитие на глиом. Честотата на фамилна обремененост е по-ниска от 5% (7).

1.3.3. Други фактори - епидемиологичните проучвания изследват възможната връзка между други рискови фактори и развитието на глиоми, като продължителното излагане на мобилни телефони, черепни травми, излагане на пестициди, нефтени продукти, имуносупресия, винилов хлорид и аспартам, хранителните N-нитрозо съединения, които се образуват от наличието на нитрити и нитрати в преработените меса, цигарен дим, козметични продукти и др., но до момента доказателствата са противоречиви и не е потвърдена категорична връзка между тях.

1.4. Симптоми

Компресията и вътречерепното налягане, които предизвикват глиомите, най-често е причина за главоболие, епилептичен припадък, неврологични дефицити, включително мускулна слабост, изтръпване или загуба на координация. Появата на неврологичните симптоми може да бъде информативна за агресивността и поведението на тумора – при поява на симптоми седмици преди това – туморът е бързорастящ, а ако симптомите предшестват години диагнозата, обикновено е бавнорастящ тумор. Повечето докладвани симптоми в дълъг интервал от време не са специфични и включват отпадналост, главоболие, световъртеж и др. (8), като зависят от засегнатия отдел на мозъка (фиг. 1.3).

Чести симптоми според локализацията на тумора



Фигура 1.3. Най-честа симптоматика, според локализацията на мозъчния тумор (адаптирано от https://www.ivybraintumorcenter.org)

1.5. Скрининг, ранна диагностика и прогностични фактори

Основните методи за диагностициране на глиоми са ядрено-магнитен резонанс (ЯМР), молекулярно-генетичен и хистологичен анализ. Хисто-молекулярният анализ определя вида и степента на тумора, и насочва към курса на лечение.

На този етап няма клинично одобрен алгоритъм за скрининг и ранна диагностика, както и липсват циркулиращи биомаркери. Благодарение на натрупаните данни от молекулните изменения при мозъчните тумори, в допълнение на хистологичната оценка, пациентите получават по-точна диагностика и определяне степента на тумора, прогноза на хода на развитието, и отговора към терапията (9).

Ниската възраст и високият пърформанс статус при поставяне на диагнозата са главните позитивни прогностични фактори при пациенти с глиоми (10). Мутацията в

IDH и коделецията *1p/19q* са били с важно прогностично значение при класификацията на глиомите, като след 2016 г. са генетични характеристики. *MGMT* промоторното метилиране е предиктивен фактор за отговора към терапията с алкилиращи агенти, въпреки че към настоящия момент почти всички глиоми се третират с химиотерапия на базата на алкилиращи агенти.

Следоперативните усложнения и неврологични дефицити са негативни прогностични фактори, които се отразяват на бъдещата терапия и качеството на живот, както на пациентите, така и на техните семейства или хората, които се грижат за тях (табл. 1.1). По-ниската степен на резекция и по-голямото количество останал тумор са също негативни прогностични фактори при всички степени глиоми. Установено е, че туморите с мутантен *IDH* са всъщност по-подходящи и податливи на цялостна резекция (7). Според настоящите препоръки, превенцията на нови неврологични увреждания и дефицити е по-важна от степента на резекция.

Таблица. 1.1. Позитивни и негативни прогностични фактори при пациенти с глиоми

Позитивни прогностични фактори	**Негативни прогностични фактори**
Възраст < 40	Напреднала възраст
KPS > 70	KPS ≤ 70
Пълна резекция на тумора	Непълна резекция на тумора
Липса на неврологични дефицити	Наличие на неврологични дефицити
Малък размер на тумора	Размер на тумора > 3-4 см
Липса на следоперативните усложнения	Наличие на следоперативните усложнения

1.6. Класификация на глиомите според СЗО

Преди 2016г., класификацията на туморите на ЦНС се е основавала на хистологичната оценка. С развитието на молекулярната генетика, туморите на ЦНС се профилират все по-прецизно, което е предпоставка за включването на набор от генетични маркери в последващите класификации. В петото издание на класификацията на туморите на ЦНС (Central Nervous System 5-CNS5) публикувано от СЗО през 2021г., броят на генетичните маркери е допълнен, с цел по-прецизна диагностика и прогноза, оптимизиран мониторинг на пациентите, както и възможности за лечение, важни елементи на персонализираната медицина (9).

Настоящата дисертация беше стартирана по време на класификацията на СЗО от 2016 г., като обобщението на резултатите и заключенията са съобразени с препоръките на класификацията от 2021 г. Разликите между двете класификации са представени в таблица 1.2.

Таблица 1.2. Сравнение на класификацията на туморите на ЦНС от 2021 г. и 2016 г.

Хистология	Класификация от 2016	Степен по СЗО	Класификация от 2021	Степен по СЗО, ЦНС
астроцитом	дифузен астроцитом, *IDH*-мутантен или норма	II	астроцитом, *IDH*-мутантен	2
олигодендроглиом	олигодендроглиом *IDH*-мутантен и с коделеция на 1p/19q	II	олигодендроглиом *IDH*-мутантен и с коделеция на 1p/19q	2
анапластичен олигодендроглиом	анапластичен олигодендроглиом, *IDH*-мутантен коделеция на 1p/19q	III	олигодендроглиом *IDH*-мутантен и с коделеция на 1p/19q	3
анапластичен астроцитом	анапластичен астроцитом, *IDH*-мутантен или норма	III	астроцитом, *IDH*-мутантен	3
			астроцитом, *IDH*-мутантен с хомозиготна делеция на *CDKN2A/B*	4
глиобластом	глиобластом, *IDH*-мутантен или норма	IV	глиобластом, *IDH*-норма (див тип) или астроцитом с по-ниска хистологична степен, но наличие на мутация в промотора на *TERT*; *EGFR* амплификация; ампл./загуба на хромозоми 7/10	4

Глиомите спадат към първата група, обхващаща – глиоми, глионеврални и невронални тумори. Те от своя страна се разделят на 6 подгрупи глиални тумори, от които в настоящата дисертация са включени предимно дифузни глиоми при възрастни (това са преобладаващите първични мозъчни тумори), както и няколко педиатрични дифузни глиоми. Дифузните глиоми се разделят на нискостепенни (НСГ) и високостепенни (ВСГ), според поведението на тумора и прогнозата. Дифузните глиоми при възрастните (adult-type diffuse glioma) включват астроцитом, олигодендроглиом и глиобластом.

Според класификацията от 2021г., СЗО препоръчва прилагането на т.нар. „пластова структура на доклада“ (layered report structure), целяща по-прецизна и интегрирана диагноза на глиомите. Хистопатологията, степенуването на тумора и молекулярно-

генетичната информация се комбинират, за да се формира интегрирана крайна диагноза (табл. 1.3). Препоръчва се използване на 1-ва, 2-ра, 3-та, или 4-та степен по СЗО ("CNS WHO grade") (9).

Таблица 1.3. Интегрирана диагноза според препоръките на СЗО

1 пласт (Layer 1)	**Интегрирана диагноза**	**Дифузен астроцитом, *IDH*-мутантен, 2 степен по СЗО**
2 пласт (Layer 2)	Хистопатологична диагноза	Дифузен астроцитом
3 пласт (Layer 3)	Степен по СЗО	2-ра степен по СЗО
4 пласт (Layer 4)	Молекулярно-генетичен анализ	*IDH1:p.R132H*-мутация, *ATRX*-мутация, *TP53*-мутация

Използването на NOS („неупоменати по друг начин") и NEC („некласифицирани другаде") се препоръчват от СЗО, като NOS означава, че не е проведен молекулярен анализ и/или молекулярната информация не е достатъчна за поставяне на конкретна диагноза. Докато NEC показва, че са проведени генетични анализи, но резултатите не предоставят точна диагноза в рамките на класификационната схема на СЗО (9).

След класификацията от 2021 г. диагноза като „анапластичен астроцитом" вече не се използва и тези тумори се означават като астроцитом, *IDH*-мутантен, 3та степен по СЗО (9). Степента на туморния растеж, както и неговата агресивност се отразяват със скала от 1 до 4, обозначена с арабски цифри, вместо използваните преди римски цифри (11,12). Дифузните глиоми при възрастни, обхващат 3 категории и техните характеристики са посочени в таблица 1.4.

Таблица 1.4. Дифузни глиоми при възрастни според СЗО (2021 г.).

Тумор	**Степен**	**Генетична характеристика**
Астроцитом, *IDH*-мутантен	2, 3, 4	*IDH*-мутация
Олигодендроглиом, *IDH*-мутантен, с *1p/19q*-коделеция	2, 3	*IDH*-мутация и *1p/19q*-коделеция
Глиобластом, *IDH*-див тип	4	*IDH*-див тип

1.7. Биомаркери – надежда за персонализираната медицина

1.7.1. Какво е биомаркер?

Биомаркерът е молекула, която може да бъде измерена и стойността й отразява присъствието на дадена болест или възможността за развитие. Биомаркерите играят важна роля, както в класифицирането на туморите, така и при тяхната диагностика, прогноза и терапевтична предикция. Въз основата на валидирани биомаркери се разработват бъдещи таргетни терапии за различни заболявания.

Високата смъртност, нарастващата заболеваемост и минималният напредък в преживяемостта и качеството на живот на пациентите с глиоми, налагат активните проучвания и търсенето на биомаркери с цел подобряване на диагностиката, мониторинга и лечението на тези тумори (4).

1.8. Генетични биомаркери

Натрупаните генетични изследвания показват, че най-засегнатите сигнални пътища при агресивните глиоми са: инактивиране на p53 и ретинобластомния (Rb) път, засягане на фосфатидилинозитол-3 киназния път (PI3K-phosphoinositide 3-kinases) и дерегулация на рецептор-тирозинкиназните пътища (RTK) (13,14).

В класификацията на туморите на ЦНС от 2021 г., все по-голям брой генетични изменения са включени и се препоръчват от световните експерти с цел по-прецизно охарактеризиране на мозъчните тумори. Към използваните *IDH1/2, 1p/19q* и *MGMT*, са добавени и допълнителни генетични аберации като промяна в броя копийни варианти на дадени гени, промоторно метилиране и други.

- **Астроцитом, *IDH*-мутантен**

При астроцитоми, *IDH*-мутантен тип се откриват мутации в гените, кодиращи изоцитрат дехидрогеназа 1 (*IDH1*) и 2 (*IDH2*). Това са НАДФ (никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат) - зависими ензими съответно в цитоплазмата и в митохондриите, които конвертират изоцитрат до алфа-кетоглутарат. При тази реакция се отделя НАДФН, който редуцира реактивни кислородни радикали. Мутации в тези гени водят до увеличаване на оксидативния стрес, тъй като вместо стандартния продукт - алфа-кетоглутарат, се синтезира онкометаболита - 2-хидроксиглутарат. Миссенс (missence) мутации в кодон 132 на *IDH1* или кодон 172 на *IDH2* се свързват с т.нар. глиомен

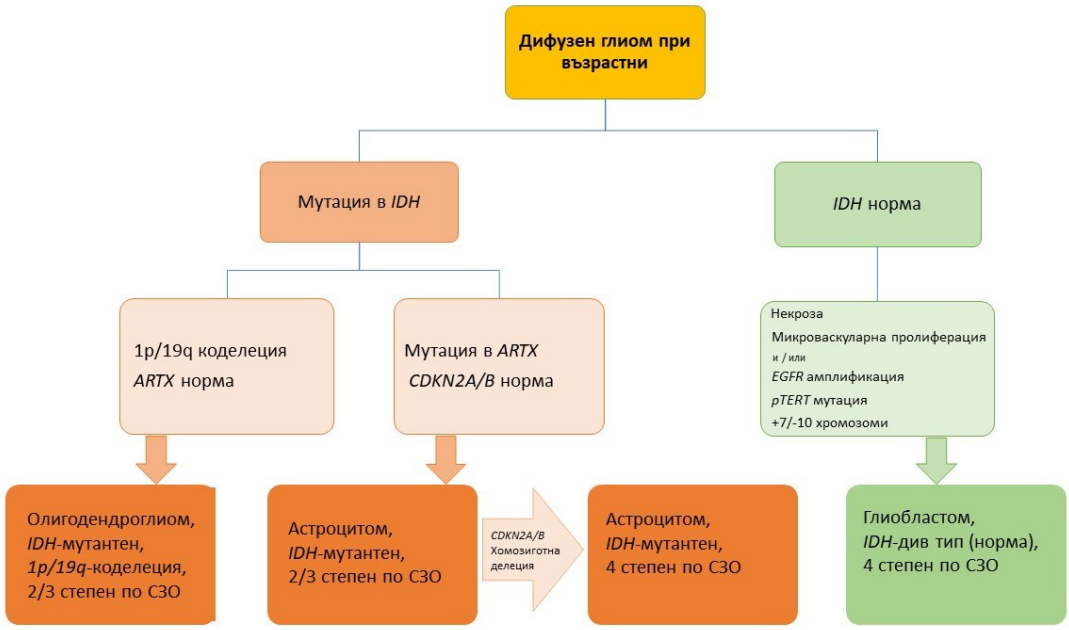
фенотип с метилиране на островите от CpG (glioma CpG island methylator phenotype – G-CIMP), свързани с хиперметилиране и генно заглушаване.

Определянето на *IDH* статуса лежи в основата на класификацията от 2021 г. Степента на тумора се определя от хистологичния анализ и допълнителни генетични маркери. Освен утвърдените хистологични маркери (присъствието на некроза и/или микроваскуларна пролиферация), наличието на хомозиготна делеция на *CDKN2A/B (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A/B*)* е показател за лоша прогноза (15), както и маркер за 4-та степен по СЗО (фиг.1.4) (11). *CDKN2A* кодира два протеина - p14 и p16, а *CDKN2B* кодира p15, които регулират клетъчния цикъл, растеж и ангиогенеза. Хомозиготна делеция на *CDKN2A/B* корелира с глиомагенезата и прогресията на тумора чрез неконтролируема клетъчна пролиферация (16,17). *IDH*-мутантни астроцитоми често са с липса на експресия на ATRX и с мутация в *TP53*. Липсата на ATRX при *IDH*-мутантни глиоми е достатъчна за диагноза астроцитом.

- **Глиобластом, *IDH*-див тип**

Това е най-често срещаният глиален мозъчен тумор при възрастните, с честота около 47.1% от всички злокачествени мозъчни тумори. Глиобластомът се характеризира с огромна интратуморна хетерогенност, което е в основата на изключително лошата прогноза, въпреки съвременното лечение. Към момента комбинацията от хирургическа резекция с цел отстраняване на над 95% от тумора, радио и химиотерапия не успява да предотврати честите рецидиви, поради инвазивната природа на тумора (14). Пет годишният период на оцеляване, дори и след агресивна терапия е все още по-нисък от 10%.

Диагнозата глиобластом, *IDH*-див тип, 4-та степен по СЗО на ЦНС се поставя при липса на мутация в *IDH1*/2 гените, независимо от наличието или липсата на хистологични данни за микроваскуларна пролиферация и некроза (15). В случаите, когато липсва некроза или микроваскуларна пролиферация, е препоръчително да се изследват типичните за глиобластома генетични аберации - мутация в промотора на *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), амплификация на *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) гена, кодиращ рецептора на епидермалния растежен фактор и/или профил +7/-10 (амплификация на 7-ма хромозома, в комбинация със загуба на 10-та хромозома). Ако само едно от тези изменения се открие, тези тумори се класифицират като *IDH* див-тип глиобластоми (фиг.1.4), поради лошата им прогноза, дори при липса на некроза и микроваскуларизация (18).



Фигура 1.4. Класификационен алгоритъм при дифузните глиоми.

Наличието на допълнително копие на хромозома 7 заедно със загуба на хромозома 10 (+7/-10) са сред маркерите за поставяне на диагноза глиобластом, и включват няколко генетични аберации, характерни за високостепенните глиоми. *PDGFA* (Platelet Derived Growth Factor Subunit A), който кодира тромбоцитния растежен фактор-субединица А и *EGFR* са разположени на засегнатата 7-ма хромозома и са често засегнати при мозъчните тумори. При загуба на 10-та хромозома се засяга функцията на разположените върху нея туморсупресорни гени *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) и *MGMT* (19). Амплификацията на *EGFR* и делецията на *PTEN* са често наблюдавани при глиомите (20).

EGFR е трансмембранна тирозинкиназа, която активира PI3K пътя. Амплификацията е често срещана при глиобластоми и корелира с агресивно туморно поведение и лоша прогноза, повишена ангиогенеза, клетъчен растеж, метастазиране и потисната апоптоза (14,21). Делецията на екзони 2-7 на *EGFR* гена води до формиране на мутантен вариант – *EGFRvIII*. При този вариант се наблюдава неконтролируемо делене на клетките вследствие постоянна трансдукция към ядрото на сигнала за растеж и делене, без да е необходимо свързването на лиганд към рецептора (21).

Генът *TERT* кодира каталитичната субединица на ензима, отговорен за поддържане дължината на теломерите. Най-често докладваните мутации в промоторния регион на гена (C228T с честота около 75% и C250T) водят до двукратно повишение на активността на ензима, което е свързано с обезсмъртяване на клетката (22). Мутации в промотора на *TERT* гена са докладвани при някои видове рак, включително меланом, метастазирали

тумори и мозъчни тумори (23). Тези мутации се откриват при около 70-80% от глиобластомите, 60–70 % от олигодендроглиоми и 35-55% астроцитоми (24). Наличието им корелира с лоша прогноза на пациентите и резистентност към лъчелечение (25).
MGMT (O^6 –methylguanine – DNA - methyltransferase) е ДНК репариращ ензим, който премахва алкиловите групи на O^6 позиция в гуанина. При пациенти с метилиран промотор на *MGMT* гена се наблюдава повишена продължителност на живот при терапия с алкилиращи агенти като Темозоломид. Промоторното метилиране на *MGMT*, при глиоми и глиобластоми, към настоящия момент, е основен предиктивен генетичен маркер по отношение на терапията с алкилиращи агенти и повишената преживяемост (3,26).

- **Олигодендроглиом, *IDH*- мутантен и с *1p/19*-коделеция**

IDH-мутантни дифузни глиоми с коделеция на *1p/19q* се диагностицират като олигодендроглиоми (12). При олигодендроглиомите имунохистохимичните анализи показват запазена експресия на ATRX (Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X) и/или на TP53 (12). При тези тумори също хомозиготната делеция на *CDKN2A* в хромозома 9p21 се асоциира с понижена продължителност на живота (16). Наличието на ко-делеция *1p/19q* и/или експресия на ATRX насочват към диагноза олигодендроглиом, *IDH*-мутантен.

1.9. Промяна на броя генни копия като биомаркер

Злокачествените глиоми се характеризират с неконтролируема пролиферация на туморните клетки. Инвазията на глиомните клетки изисква деградация на клетъчния матрикс, синтез и експресия на рецептори, ангиогенеза, промяна на цитоскелета. Тези събития са вследствие на генетични нарушения като генна амплификация, делеция, соматични мутации и натрупваща се геномна нестабилност. Силната способност за инфилтрация към съседната тъкан възпрепятства хирургичното отстраняване и води до чести рецидиви и висока смъртност.

При последните две класификации на глиомите (от 2016г. и 2021г.), към генетичните маркери са добавени т.нар CNVs (Copy Number Variations) или гени с променен брой копия. Някои от докладваните CNVs при пациенти с глиоми и техните функции са показани на таблица 1.5.

Таблица 1.5. Често срещани CNVs и тяхната функция при пациенти с глиоми

Ген	Локация	Вид промяна	Функция
EGFR	7p11.2	Амплификация	Участва в предаване на клетъчни сигнали свързани с процесите на пролиферация, диференциация, развитие, миграция и оцеляване
		Делеция на 2-7 екзони	*EGFR vIII* е фузионен вариант вследствие на делеция на 2-7 екзони. Това води до липса на извънклетъчен домейн, постоянна активност на рецептора и предаване на сигнала към ядрото
CDKN2A	9p21.3	Делеция	Тумор супресор, участващ в контрола на клетъчния цикъл. Хомозиготна делеция на *CDKN2A* локуса корелира с глиомагенезата и прогресията на тумора чрез неконтролируема клетъчна пролиферация
PTEN	10q23.3	Загуба на хетерозиготност на 10q (LOH)	Тумор супресор, инхибиращ PI3K/Akt/mTOR, регулиращ клетъчния растеж, ангиогенеза, метастазиране и резистентност към терапия. Възстановяването на PTEN инхибира гликолизата и потиска метаболизма на глиобластома. Делеция на *PTEN* е свързана с терапевтична резистентност
MDM2	12q14.3-15	Амплификация	Онкоген – амплификацията му води до понижаване и деградация на p53
PDGFRA	4q12	Амплификация	*PDGFRA* активира PI3K/Akt/mTOR и RAS/MAPK, които участват е клетъчната пролиферация, миграция, оцеляване и онкогенеза. Амплификацията на *PDGFRA* корелира с по-висока туморна степен.
TP53	17p13.11	Мутации Делеция	Тумор супресор, регулиращ клетъчния растеж, пролиферация, ДНК репарация, апоптоза и др.

Генетичните аберации, свързани с промените в броя копия - CNVs представляват амплификация или делеция на ДНК фрагменти с дължина между 1 кб до 1 мб в рамките на един или няколко гена и могат да са, както герминативни, така и соматични. Гените, засегнати от CNVs при глиомните тумори са част от p53, ретинобластомния (RB) и receptor tyrosine kinase - RTK сигналните пътища.

Амплификация на гените *EGFR* и *PDGFRA*, които са част от RTK сигналната система, повлияват RAS/RAF/MAPK пътя и PI3K/AKT/mTOR (27). Активността на phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) се инхибира от туморсупресорния ген *PTEN*. Загубата на *PTEN*, открита в около 36% от глиомите, води до активация на този път и свързаните с него процеси, както и до терапевтична резистентност (14). Около 50% от пациентите с амплификация на *EGFR* са с *EGFRvIII* - фузионен вариант вследствие делеция на екзони 2-7 на *EGFR* и постоянна активност на рецептора с предаване на сигнала към ядрото (21).

При около 10-13% от глиомите се открива амплификация на *PDGFRA*, която често е придружена с амплификация и/или мутация на *EGFR*. За съжаление до момента терапиите срещу *EGFR, EGFRvIII* и *PDGFRA* не са показали задоволителен клиничен отговор (7).

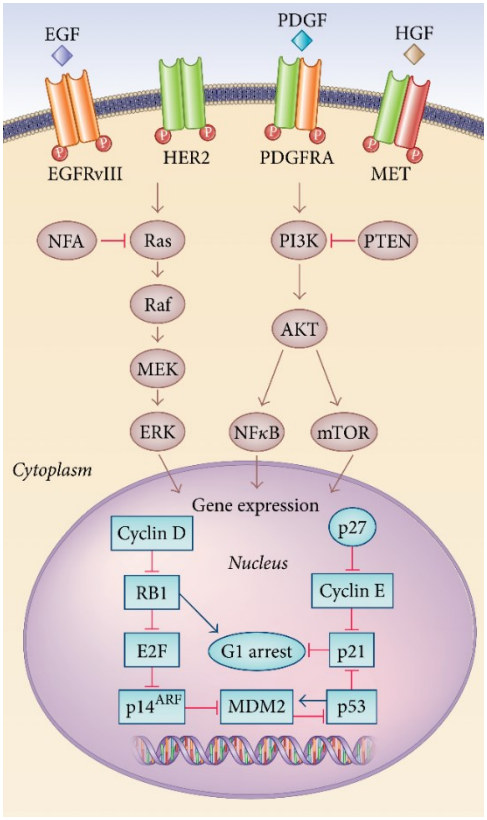
TP53 пътят включва туморсупресорния ген *TP53* (тумор протеин 53), който регулира клетъчния цикъл и диференциация, апоптоза, репарацията на ДНК и др. Мутация или делеция на този ген води до инактивирането му, което може да стане и индиректно с другите гени, участващи в този сигнален път. Онкогенът *MDM2* инхибира p53 чрез убиквитиниране и протеазомно разграждане на p53. Продуктът на *CDKN2A* - p14 е антагонист на MDM2 и предотвратява заглушаването на p53. CNVs, засягащи p53 пътя са с честота около 87% при глиобластоми и включват делеция на *TP53*, амплификация на *MDM2* и делеция на *CDKN2A* (14).

Към RB пътя спада протеинът RB1, който регулира прогресията от G1 към S-фазата на клетъчния цикъл. Кодираният от *CDKN2A* протеин - p16 се свързва към CDK4 (циклин зависима киназа 4) и инхибира образуването на комплекса CDK4/циклин D1, като по този начин инхибира прехода от G1 към S-фаза. Промяна в експресията или CNVs на *CDK4*, *CDKN2A* или *RB* води до нарушаване на този път и активиране на клетъчната пролиферация. CNVs, засягащи RB пътя включват делеция на *CDKN2A* и амплификация на *CDK4* (фиг. 1.5) (14,28).

Фигура 1.5. Най-често срещани промени в клетъчните сигнални пътища, открити при глиоми. RAS/RAF/MAPK (митоген-активирана протеин киназа) пътят води до клетъчна пролиферация, диференциация и миграция.

PI3K/AKT/mTOR пътят активира клетъчната пролиферация, оцеляване чрез прогресия на клетъчния цикъл и инхибиране на апоптозата.

Продуктите на *CDKN2A* - p14 и p16, които са част от p53 и RB пътя, инхибират MDM2 и CDK4, и заедно с протеините p53 и RB1 осъществяват арест на клетъчния цикъл в G1 фаза.



Информацията за CNVs освен диагностична има и прогностична стойност, тъй като амплификацията на *EGFR*, делецията на *TP53* и *CDKN2A* се свързват с лоша прогноза за пациентите (21,29,30) и терапевтична резистентност при глиобластом (14).
Делецията на *CDKN2A* корелира със значително по-къси преживяемост без прогресия на заболяването (PFS-Progression Free Survival) и обща преживяемост (OS- Overall Survival) при пациенти с глиоми (15,22). Хомозиготната делеция на *CDKN2A/B* е част от алгоритъма за класификация на 4-та степен по СЗО на *IDH*-мутантни астроцитоми, като маркер за силна агресивност и малигненост (11).

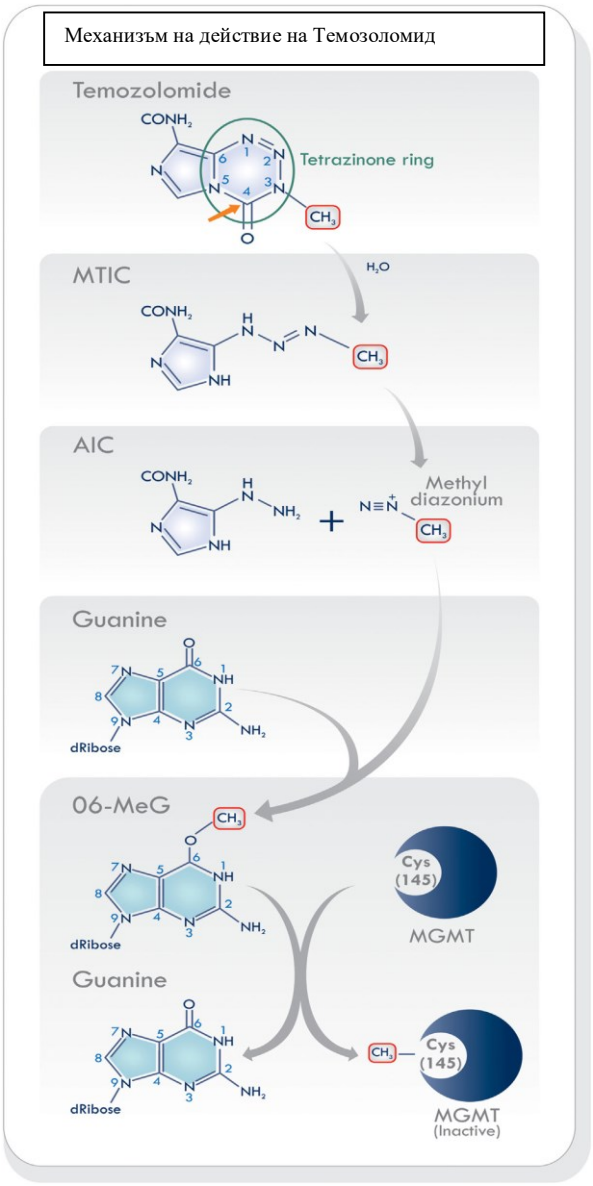
Докладвани са и други CNVs при глиомните тумори, но тяхната роля като биомаркери все още е обект на проучване. Вероятно с масовото приложение на генетичните анализи и натрупването на данни, CNVs като източник на геномна нестабилност, засягаща ключови клетъчни процеси и допринасящи за неогенезата, ще играят все по-важна роля при отдиференцирането на глиомите. Следователно, проучването на допълнителни CNVs, с цел профилиране на глиомите би допринесло за по-прецизната им класификация, стратификация на пациентите и би дало основа за бъдещи таргетни лечения.

1.10. Подходи за лечение при глиомите

През последните години, за разлика от други видове тумори, дифузните глиоми остават трудни за диагностика и лечение, както и с предимно лоша прогноза в зависимост от степента по СЗО. Причината за това е скритото развитие на заболяването с късна манифестация на симптомите, инфилтрация в съседната здрава тъкан и молекулярна хетерогенност. Тези особености затрудняват цялостното хирургично отстраняване и водят до поява на рецидиви, и резистентност към терапията. Понастоящем съществуващият стандарт за лечение на високостепенни глиоми и глиобластом включва максимално хирургично отстраняване, доколкото е възможно, следвано от лъчетерапия и химиотерапия с алкилиращи агенти. Цялостната резекция на тумора е много рядка, поради инфилтрацията му в съседна „здрава“ тъкан (14). Използването на флуоресцентно – базирани багрила за визуализация като 5-аминолевулинова киселина/5-аминолевулинова киселина хидрохлорид (Gliolan) подпомага по-цялостната и прецизна резекция (31).

Първоначално използвани като химични оръжия по време на първата световна война, алкилиращите агенти са първите и най-ранните антиракови препарати, при тестването на които се наблюдавало значително намаляване на туморната маса. И така още през 40-те години е докладвано първото им приложение като антираков химиотерапевтик (32). Алкилиращите агенти са високореактивни вещества, които играят ролята на електронни акцептори (електофили) и взаимодействат с електронни донори (нуклеофили), като ДНК, протеини и др., и като резултат се осъществява трансфер на алкилна група. Главният клетъчен таргет е ДНК, като алкилирането на азотните бази нарушава комплементарността по време на репликация и транскрипция. Така генотоксичността им се използва за потискане на туморогенезата.

Темозоломид (TMZ - Temozolomide) е монофункционален некласически алкилиращ агент с три съседни азотни атома (20) (фиг. 1.6). Темозоломидът е устойчив на киселинното pH на стомаха и се активира при хидролиза и pH > 7.0.



Фиг. 1.6. Механизъм на действие на Темозоломид (TMZ).

Темозоломидът се активира, чрез хидролитично срязване на пръстена (зелено) и отварянето му. Полученият продукт (5-(3-monomethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide - MTIC) е нестабилен и се преобразува в аминоимидало-4карбоксамид (5-aminoimidazole- 4-carboxamide-AIC), и високо-реактивни радикали (methyl diazonium), които метилират ДНК, като добавят метиловата група към гуанин или аденин (N7-MeG (60–80%), N3-MeA (10–20%), и O6-MeG (5–10%)).

Поправката на метилираната база може да се извърши от функциониращ MGMT репарационен ензим, като O^6-метилгуанинът е най-рядък (5–10%), но и най-цитотоксичен.

По време на репликацията, системата за поправка на некомплементарни бази води до спиране на клетъчния цикъл и насочване на клетката към деградация.

През 2005 г. във фаза III на клинично проучване към EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) и NCIC (National Cancer Institute of Canada) се наблюдава повишена продължителност на живот при пациенти, лекувани с адювантен Темозоломид и лъчетерапия спрямо пациенти с адювантна лъчетерапия (33). Това води до включването на Темозоломид като конкоминантна химиотерапия (34). Други схеми на лечение използват комбинация от ломустин с прокарбазин и винкристин в режим означен като PCV. Като цяло, алкилиращите агенти от нитрозоуреен клас като ломустин, кармустин, нимустин или фотемустин, причиняват левкопения и тромбоцитопения. Поради тази причина химиотерапията с Темозоломид е предпочитана пред PCV поради безопасността ѝ и по-малкото странични ефекти. Ползата от химиотерапия с алкилиращи агенти трябва да бъде преценена в контекста на дългосрочната токсичност и появата на хипермутантен фенотип, и по-малигнено поведение на тумора, особено при пациенти с мутантен *IDH*, при които се очаква по-дълга продължителност на живота. Комбинацията

само от лъчетерапия и хирургия е довела до повишаване преживяемостта от 3-4 до 7-12 месеца (7).

Характерна за глиобластома е хипоксията, която е свързана с микроваскуларна пролиферация и некроза на тумора (35). Това дава основания за терапевтично приложение на Бевацизумаб - антитяло срещу васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF-Vascular endothelial growth factor). За лечение на рецидив и наличие на микроваскуларизация се използва Бевацизумаб в комбинация с ломустин (14). Бевацизумаб е одобрен за лечение на рецидивирал глиобластом в САЩ, Канада, Швейцария и др. страни извън ЕС (Европейски съюз), но не и в ЕС, тъй като общата преживяемост-OS не е статистически удължена след приложението му (7).

Имунотерапията навлиза все по-широко в практиката, но за разлика от други тумори, тук, имунотерапията често не показва подобрение и се наблюдава бързо развитие на резистентност (7).

Полетата за лечение на тумори (Tumour-treating fields- TTF) са ново одобрено лечение за глиобластом. Използва се неинвазивно външно устройство, което създава електрическо поле с нисък интензитет и честота (~200kHz). Това води до инхибиране на туморната пролиферация и клетъчна смърт в делящите се клетки. Комбинацията от TTF и Темозоломид след стандартната терапия увеличава общата преживяемост от 16 до 20,9 месеца, с по-добро качество на живот (36).

Проблемите свързани с неефективната терапия при глиобластом са вследствие на нарушена експресия на множество гени, водеща до туморна хетерогенност, инфилтриращата природа на тумора, неуспешно суплементиране на медикамента и развитието на резистентност. Смята се, че комбинацията от подходи с цел мултигенно таргетиране би повишило ефективността на терапията и поради тази причина редица проучвания са насочени към повлияване на специфични онкогенни сигнални пътища.

1.11. МикроРНК – двукратните нобелови лауреати с обещаващ потенциал

Установено е, че само 2-3% от човешкия геном се състои от протеин-кодиращи гени, а голяма част от така наречената в миналото "ненужна ДНК - junk DNA", всъщност кодира РНК, с изключително важна регулаторна функция, наречена некодираща РНК. По този начин РНК молекулата не е само посредник между ДНК и съответния протеин, а е важен регулатор на голям брой жизненоважни процеси като клетъчно развитие, растеж, диференциация, делене, инфекциозни възпалителни процеси и патогенеза.

През 2006 г. Андрю Файър и Крейг Мело получават Нобелова награда за физиология и медицина за откритието, че двойноверижни РНК молекули могат да заглушават експресията на специфичен ген чрез разрушаване на съответстващата му иРНК, като по този начин потискат синтеза на белтък. Този процес, наречен РНК интерференция (RNAi) представлява генно заглушаване, който се среща при всички организми, чиито клетки притежават ядро.

Няколкостотин гена в нашия геном кодират къси РНК молекули, наречени микроРНКи (microRNAs, miRNAs, miRs) и малки интерфериращи РНКи (siRNAs). Именно тези РНК молекули активират механизмите на РНК интерференцията и в резултат таргетната иРНК се разгражда или инхибира, така че съответният протеин не може да бъде произведен. Използването на микроРНК молекули за регулиране на генната експресия се оказа фундаментално за еукариотните клетки - от едноклетъчни организми до хора. Колкото по-сложен е даден организъм, толкова по-голям е броят на тези некодиращи РНКи. РНК интерференцията играе важна роля за изключването на гените по време на развитието на организма, служи като механизъм за защита срещу паразитни и вирусни инфекции, транспозони, контролиране на клетъчната функция и в борбата с различни заболявания. РНК интерференцията се проучва за лечение на различни заболявания, включително сърдечно-съдови заболявания, рак и метаболитни нарушения (37). След като присъствието на микроРНКите се потвърждава при хората, в следващите години се установява връзката им с различни заболявания (38).

През 2024 година Нобеловата награда за физиология и медицина беше присъдена на Виктор Амброс и Гари Ръвкън за откритието точно на микроРНКите и тяхната роля в регулацията на генната експресия. Техните изследвания, започнали през 1993 г., разкриват как микроРНКите регулират важни физиологични и патологични процеси, включително автоимунитета и възпалителни реакции. Тези открития поставят началото на абсолютно ново изследователско направление и през следващите десетилетия са

идентифицирани много ключови компоненти, свързани с механизмите на микроРНК-базираната генна регулация.

1.11.1 Класификация и структура на микроРНКите

Некодиращите РНКи обхващат две групи, до сега известни, РНКи:

♥ къси некодиращи РНКи – микроРНКи, къси интерфериращи РНКи, пиРНКи, ядърцеви (нуклеоларни) РНКи, малки ядрени РНКи

♥ дълги некодиращи РНКи (lncRNAs)

МикроРНКите и късите интерфериращи РНКи регулират процеси като клетъчен цикъл, растеж, диференциация, делене, апоптоза, васкуларизация, малигнизация и др. До момента са известни около 2700 микроРНКи, които участват в генната регулация при човек (www.mirbase.org).

МикроРНКите са къси едноверижни РНКи с дължина около 18-25 нуклеотида. Зрелите микроРНКи се свързват с 3‘- UTR (нетранслиращ се регион) на иРНК и осъществяват важен посттранскрипционен контрол на голям брой таргетни иРНКи, като се прекратява белтъчният синтез чрез деградиране или заглушаване на тези иРНК (РНК интерференция) (39). Те са еволюционно консервативни, като е установено, че около 1-2% от човешката ДНК кодира микроРНКи, които контролират над 50% от протеин-кодиращите гени (40). МикроРНКите са локализирани в междугенни региони (> 1кб отдалечени от даден ген) или в интрони.

1.11.2. Биогенеза на микроРНКите

Основният път на синтез на зрелите, функционално активни микроРНКи преминава през няколко етапа:

♥ Синтез на първичен РНК продукт (primary - pri-miRNAs), кодиран от интрони или други некодиращи последователности в ДНК молекулата. Транскрибират се от РНК полимераза II.

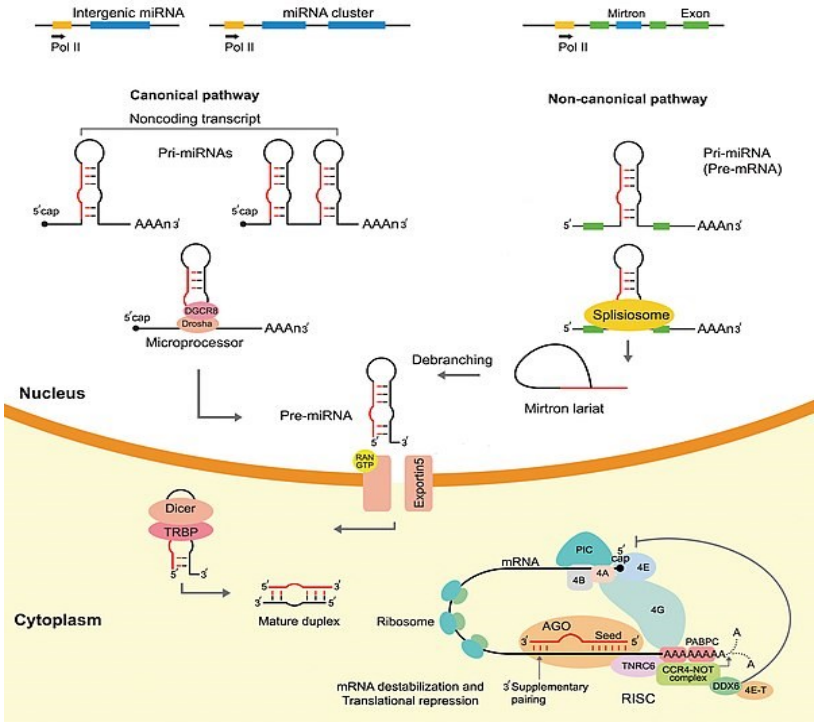
♥ Процесинг на pri-miRNA от рибонуклеаза III (Drosha) и РНК-свързващ протеин-DiGeorge critical region 8, сформиращи микропроцесорен комплекс (Drosha-DGCR8 complex). Образува се мултипротеинен комплекс и се получава прекурсорната микроРНК - pre-miRNA.

♥ Този комплекс се транспортира към цитоплазмата, чрез белтък – Експортин-5, свързан с Ran-GTP ко-фактор (RanGTP-XPO5).

♥ Нарязване на pre-miRNA от комплекса - Dicer-TRBP, включващ рибонуклеаза III (Dicer) и РНК, свързващ протеин до къса двойноверижна микроРНК (40).

♥ Двете вериги на микроРНКта се разделят на 5p или 3p и една от тях се свързва към протеини от семейството на Аргонавтите (Ago), оформяйки микроРНК-индуциран заглушаващ комплекс (miRNA-induced silencing complex – RISC). Това е функционално активен рибонуклеопротеинен (РНП) комплекс, който защитава микроРНК от деградация (фиг. 1.7).

Освен описания главен път за синтез на микроРНКи (canonical pathway), съществуват и различни алтернативни пътища (non-canonical pathways) според комбинацията от протеини и ензими (Drosha, Dicer, exportin 5, AGO2), които винаги водят до синтез на RISC комплекс (41). RISC комплексите, осъществяват регулаторната си роля, свързвайки се чрез непълна комплементарност към таргетната иРНК. Перфектната комплементарност води до срязване на иРНК от Ago2 протеина, докато несъответствие в центъра изключва срязването на иРНК и позволява временната репресия на транслацията ѝ.



Фигура 1.7. Синтез на микроРНКи. Два пътя на синтез на микроРНКи. В неканоничния път (Mirtron), pri-miRNAs се процесират до pre-miRNAs от сплайсозомата и ензима за разклоняване, за да генерират двойноверижни бримкови структури. РНК продуктът на сплайсинг приема форма, подобна на pre-miRNA и се прехвърля в цитоплазмата чрез експортин 5, за да продължи по главния или каноничния път (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MicroRNA_biogenesis.jpg.)

По този начин микроРНКите потискат синтеза на определени протеини без почти да афектират нивото на иРНКи (42). Голяма част от микроРНКите инхибират 3′-UTR на иРНК, но се срещат и такива, потискащи 5‘-нетранслиращия се участък на иРНК (43). Номенклатурата за означаването на микроРНКите включва: обозначение на вида на организма (например hsa за homo sapiens), съкращението на микроРНКата - microRNA или по-краткото - miR, номерация (например – 21, - 7 и т.н.) и означаване посоката на микроРНК веригата от двойноверижния комплекс (5p или 3p) преди разделянето й и формирането на RISC комплекса. Например hsa-miR-7-5p, означава 5‘ веригата на микроРНК номер 7 при човек.

1.11.3. Роля на микроРНКите като биомаркери

Над десетилетие, проучванията върху микроРНКите разкриват вълнуващи доказателства за ролята им в човешкото развитие и регулацията на различни заболявания. Тъй като микроРНКите регулират ключови процеси, като клетъчна пролиферация, диференциация, ангиогенеза, апоптоза и др., съвсем логично бяха докладвани редица проучвания за участието им в процесите на карциногенезата (44,45). Освен като важни регулатори, натрупаните данни подчертават техния потенциал като биомаркери за диагноза, прогноза и предикция на ефекта от лечението при почти всички онкологични заболявания (46,47).

Установено е, че тъканите имат уникален микроРНК профил, като отклоненията в експресионния им профил при различни болести, особено при рак, са обект на огромен научен интерес. Много изследвания подкрепят ролята на микроРНКите при туморогенезата, като глиоми, рак на гърдата, белия дроб, простатата, панкреаса, дебелото черво и др. (48–52). Като се има предвид тумор-специфичния микроРНКов модел на експресия, забележителната стабилност, присъствието им както в тъканите, така и в различни телесни течности (кръв, урина, цереброспинална течност, слюнка), микроРНКите са смятани за обещаващи биомаркери. В зависимост от функцията на гените, които кодират таргетната иРНК, микроРНКи изпълняват роля на туморсупресори или протоонкогени (онкомир-oncomiR) (51,53,54).

Предвид описания потенциал на микроРНКите, проучванията върху ролята, потенциалното им клинично и терапевтично приложение в невро-онкологията набират все по-голяма популярност.

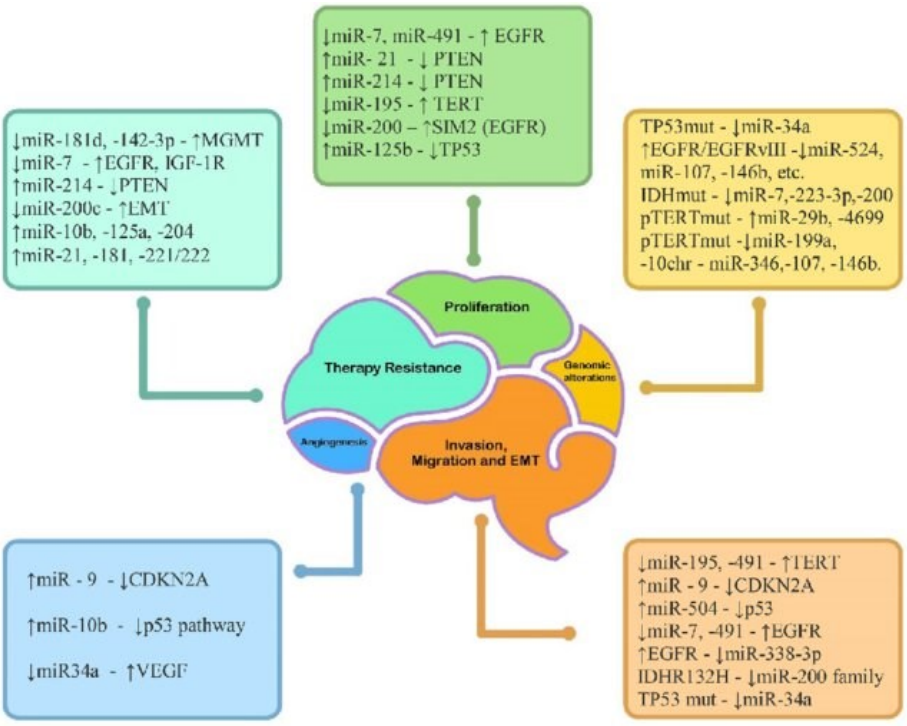
1.11.4. МикроРНКи като биомаркери при глиоми

След като през 2005 г. първата микроРНК с променена експресия беше идентифицирана в глиобластоми, нарастват публикациите, доказващи дерегулацията на редица микроРНКи (55,56). Така например, miR-21-5p, която е свръхекспресирана при глиобластом в сравнение с нормална тъкан, е установено, че изпълнява антиапоптозна функция, влияейки на каспазите при глиобластоми (55,57). MiR-10b не се открива при нормална мозъчна тъкан, докато при глиоми експресията й корелира със степента на агресивност на тумора. Тази микроРНК индуцира глиомагенезата, туморната пролиферация и регулира процесите на епително-мезенхимен преход (epithelial–mesenchymal transition-EMT) (58,59). Невро-специфичната miR-124 е потисната при глиобластом и води до увеличаване на раковите стволови клетки (cancer stem cells – CSC), и стимулира онкогенезата (60). Друг пример е miR-155, чиято експресия корелира с повишаване на възпалението и е завишена при мозъчни тумори. Потискането на miR-155 води до повишаване на терапевтичната ефективност на Темозоломид чрез индуциране на апоптоза, което прави тази микроРНК потенциален биомаркер и терапевтичен таргет при глиоми (61).

Комбинацията от няколко микроРНКи показва по-добър биомаркерен потенциал и екипът на Santangelo и сътр. добавят към miR-21, още две микроРНКи - miR-222 и miR-124-3p за разграничаване на степените глиоми и здрави контроли. Те наблюдавали след-хирургично нормализиране в серума и подчертават техния биомаркерен потенциал за мониторинг с цел контрол на рецидивите (60).

МикроРНКите е доказано, че могат да променят пропускливостта на кръвно-мозъчната бариера (КМБ), което има важна роля при патологични процеси, засягащи ЦНС. Смята се, че нарушената КМБ е пропусклива за преминаването на микроРНКи от цереброспинална течност към кръвта, но с времето в кръвта концентрацията им намалява. Здравата КМБ не пропуска свободното движение на RISC или екзозоми с микроРНКи, поради масата им от около 14 kDa (пропускат се до 400 Da). MiR-98 и let-7 понижават пропускливостта на КМБ като понижават цитокините и прикрепването на левкоцитите (62).

Нивата на микроРНКите се повлияват и при наличие на CNVs. Амплификацията или делецията на определени гени в процеса на туморогенезата води до дерегулация на близко разположените микроРНКи и допълнително нарушаване на ключови сигнални пътища и процеси (фиг.1.8). Проучването на тези изменения е от решаващо значение за идентифициране на потенциални биомаркери и терапевтични таргети при глиомите.



Фигура 1.8. Примери за дерегулирани микроРНКи и генетични биомаркери, участващи в патогенезата и терапията на глиоми. МикроРНКите регулират ключови процеси като туморна пролиферация, ангиогенеза, инвазия и EMT, терапевтична резистентност, като нивата им се повлияват от генетичните аберации при глиомите. TP53-Туморен протеин; IGF-1R-Инсулиноподобен растежен фактор 1 рецептор; SIM2-единичен хомолог 2; -10 chr - загуба на хромозома 10.

1.11.5. Терапии, базирани на микроРНКи

Терапевтични подходи, използващи микроРНКи включват възстановяване на туморсупресорните микроРНКи и инхибиране на онкогенните микроРНКи. Нивата на туморсупресорните микроРНКи могат да се възстановят или директно (с двуверижни или едноверижни синтетични микроРНКи) или индиректно чрез таргетиране промоторното хиперметилиране на заглушени микроРНКи. Прилагането на CRISPR/Cas9 се използва за възстановяване на делетирани ДНК участъци, кодиращи микроРНКи (62).

Инхибирането на онкогенните микроРНКи с повишена експресия, се осъществява с антисенс олигонуклеотиди, антагомири, заключени нуклеинови киселини (LNA) срещу определени микроРНКи, микроРНКови гъби (дълги или кръгови некодиращи РНКи), към които се свързват таргетните микроРНКи и др. (63). Така например супресията на онкогенната miR-21 чрез прилагане на анти-miR-21-LNA методика при миши модели води до апоптоза на глиобластомните ракови клетки (64).

МикроРНКите активно се изследват и като допълваща терапия за намаляване на химиорезистентността при глиомите. Например комбинацията на някои микроРНКи като miR-370-3p и TMZ в миши модели води до намаляване на туморния размер спрямо прилагане само на TMZ (65). Нормализирането на miR-198 и miR-181b е свързано с намаляване на резистентността към TMZ и намален туморен растеж (66,67).

Проучванията върху възможностите за приложение на микроРНК-базирани терапии са изключително актуален въпрос. Голям брой научни групи са насочили усилията си в тази посока като целта е по-ефективна комбинирана терапия, таргетираща повече засегнати гени и сигнални пътища, които са в основата на молекулярната хетерогенност при високорисковите глиоми.

1.12. Вирусни агенти, свързани с мозъчните тумори

Поради хетерогенната природа на мозъчните тумори, те са широко изследвани в различни биологични направления. Хроничното възпаление е един от факторите, водещ до трансформация на клетките, натрупване на мутации и малигнизация. Предполага се, че години преди появата на туморната формация и селекцията на клетки, носещи типичните мутации, в заобикалящата среда персистират процеси на възпаление. Тези процеси водят до нарушаване на клетъчните сигнални системи, регулацията на клетъчния цикъл и процеси свързани с клетъчното стареене (68). Една от причините за редица клетъчни изменения е персистиращата инфекция с вирусни агенти с онкогенен потенциал. През последните години поредица научни доклади изтъкват връзката между глиомагенезата и присъствието на вируси от херпесното семейство, като цитомегаловирус (ЦМВ) и др. (69).

1.12.1. Структура и класификация на херпесните вируси

Херпесните вируси са голяма група ДНКови вируси с четирислойна структура линейна двойноверижна ДНК, затворена в икосаедричен нуклеокапсид, който е заобиколен от протеинова обвивка-тегумент и външна двуслойна обвивка от липиди и гликопротеини.

Повече от 90% от възрастните са носители на един или няколко човешки херпесните вируси - ЧХВ. ЧХВ са категоризирани в три подсемейства: алфа (α), бета (β) и гама (γ) (табл.3.1). Вирусът на херпес симплекс 1 и 2 (HSV1 и HSV2) и вирусът на варицела зостер (VZV) принадлежат към α подсемейството, ЦМВ, ЧХВ-6 и ЧХВ-7 са към

β подсемейството, докато ЕБВ и вирусът, причиняващ саркома на Капоши (КСХВ) или наричан още ЧХВ-8 са към γ подсемейството. ЧХВ могат да причинят латентна или литична инфекция. Докато ЕБВ и КСХВ имат доказан онкогенен потенциал, други водят до неопластичен фенотип на клетката вероятно чрез процес на т.нар „онкомодулация“ (69).

Таблица 1.6. Класификация на човешките херпесни вируси

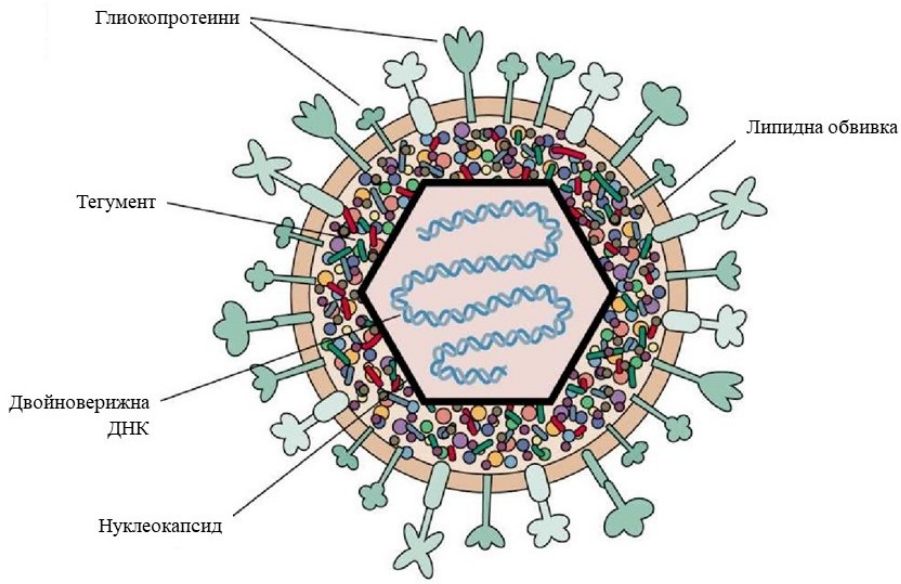
Подсемейство	Вирус	Заболяване	Таргетни клетки
Алфа	HSV-1	Орален херпес, енцефалит, кератоконюктивит	Епителни клетки, неврони
	HSV-2	Генитален херпес, неонатален херпес, менингит	Неврони, епителни клетки
	VZV	Варицела, херпес зостер	Епителни клетки, неврони, моноцити, дендритни клетки, Т и Б лимфоцити
Бета	CMV	Неонатални инфекции, хепатит, ретинит, пневмония	Повечето видове клетки. Моноцити и лимфоцити
	HHV-6	Розеола (шеста болест)	Лимфоцити, моноцити, дендритни клетки, неврони, епителни, глиални клетки и др.
	HHV-7	Розеола (шеста болест), умора и др.	CD4+ Т клетки
Гама	EBV	Инфекциозна мононуклеоза, лимфом на Бъркит и Ходжкин, назофарингеален карцином, синдром на хроничната умора и др.	В и Т клетки, дендритни, мускулни, NK клетки
	KSHV	Сарком на Капоши	В клетки, ендотелни, епителни, фибробласти и др.

1.13 Цитомегаловирус

1.13.1. Структура на ЦМВ

ЦМВ, наричан още човешки херпес вирус –5 (HHV5), спада към β подсемейството на херпесните вируси. Той е линеен двуверижен ДНКов вирус, който е широко разпространен човешки патоген. Вирусната частица (вирион) се състои от нуклеокапсид, капсид, тегумент и вирусна обвивка (фиг. 1.9). Нуклеокапсидът е централно разположена структура с форма на икосоедър, в която се намира двойноверижната ДНК. Нуклеокапсидът е обграден от протеинова обвивка, наречена капсид. Над капсида се

намира т.нар. тегумент, който съдържа множество вирусни протеини и ензими, важни за ранните етапи на инфекцията и за регулация на клетъчните процеси. Най-отвън е двуслойна липидна мембрана, която произлиза от клетъчната мембрана на гостоприемника. В тази обвивка се намират гликопротеини, които са важни за разпознаването и свързването с клетката-гостоприемник. Освен при вирусната адхезия и сливане с клетъчната мембрана, гликопротеините участват и в механизмите на избягване на имунната система на гостоприемника.



Фигура 1.9. Структура на ЦМВ (адаптирано от (70)). В центъра е двойноверижна ДНК с дължина около 230-240 килобази (kb), която от обградена от нуклеокапсид, капсид, тегумент и вирусна обвивка. По повърхносатта са разположени гликопротеини – gB (участва в сливането на вирусната обвивка с клетъчната мембрана), gH/gL комплекса (участва при вирусната инвазия и инфекцията на клетките), gM/gN комплекса (участва в сглобяването на вирусните частици и напускането на клетката).

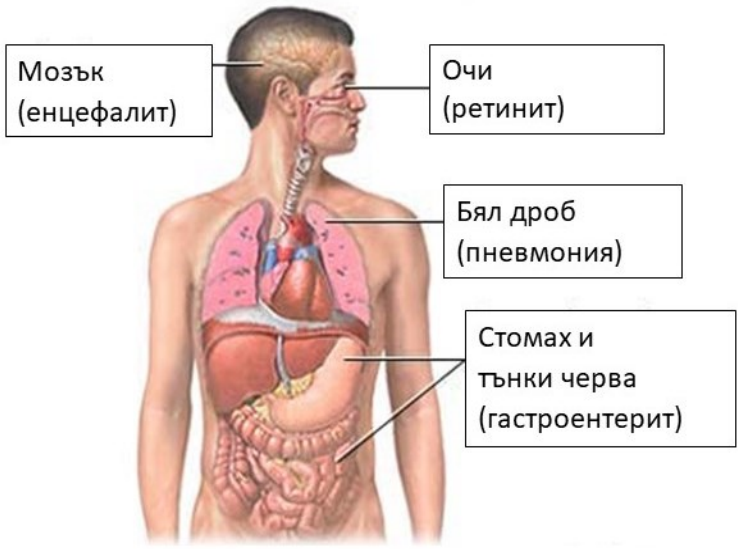
Геномът кодира повече от 200 протеина и се разделя на незабавни ранни гени (IE), ранни гени (E) и късни гени (L). IE гените се активират веднага след инфекцията и са важни за началото на вирусния репликативен цикъл. Ранните - E гени се активират преди репликацията на вирусната ДНК и кодират протеини, важни за репликацията и регулацията на вирусната експресия. Късните (L) гени кодират структурните протеини на вируса, необходими за сглобяването на новите вириони.

1.13.2. Инфекция, симптоматика и диагностика на ЦМВ

Първичната инфекция с ЦМВ започва с виремия и лизиране на клетките на гостоприемниците, като в последствие вирусът преминава в латентна форма, която е асимптоматична и е характерна предимно за миелоидните клетки. При здрави индивиди,

вследствие на имуносупресивни състояния (при други бактериални или вирусни инфекции или бременност), както и при трансплантации, автоимунни състояния, химиотерапия и др.) е възможно вирусът да се реактивира, при което от латентна форма отново да премине в литична.

При тези състояния ЦМВ се активира и започва вирусна репликация. Тези епизоди на редуване между латентна фаза и реактивация водят до селектиране на генетична вариабилност в генома на ЦМВ. Последните данни от най-съвременните молекулярно-генетични анализи потвърждават, че геномът на ЦМВ е значително по-вариабилен спрямо всички други вируси от херпесното семейство и показват адаптивността на този вирус към променящата се микросреда на гостоприемника (71). Реактивацията на ЦМВ се свързва с патологични изменения и е докладвана в почти всички човешки органи (фиг.1.10).



Фигура 1.10. ЦМВ се открива при инфекция на ЦНС (енцефалит), окото (ретинит), бял дроб (пневмония), стомах и тънки черва (гастроентерит), вътреутробни инфекции и др.

ЦМВ се разпространява чрез слюнка, урина, сексуален контакт и кръвопреливане. Голям процент от хората се заразяват в даден момент от живота си, но през повечето време вирусът предизвиква леки или никакви симптоми при здрави хора.

Диагностиката на ЦМВ най-често е чрез серологичен тест за антитела срещу вируса, за да се провери имунният отговор на организма към инфекцията. Молекулярни тестове за откриване и количествено определяне на вирусна ДНК се извършват най-често с полимеразно-верижна реакция (PCR). PCR анализът може да бъде направен върху серумна, кръвна, тъканна проба, цереброспинална течност и др.

Симптоматиката за ЦМВ е неспецифична и най-често първоначалните симптоми включват повишена температура, отпадналост с болки в мускулите, възпалено гърло, подути лимфни възли, гадене, понякога се наблюдава кожен обрив и др.

1.13.3. Роля на ЦМВ в туморогенезата

ЦМВ е активно изследван като вирусен етиологичен агент, свързан с различни тумори, като рак на гърдата, дебелото черво, цервикс, простатен карцином и др. (72). ЦМВ-вирусни нуклеинови киселини и протеини са открити в клетки от глиобластом (73,74) и се предполага, че участват в развитието и прогреса на мозъчните тумори, посредством механизма на онкомодулацията. Това е способност на вирусни некодиращи РНКи да нарушават нормалната функция на ключови регулаторни гени и клетъчни сигнални системи (75). Това води също така до индуциране на имуносупресия и активиране на онкогенен фенотип (69,76). Така например ЦМВ експресира проонкогенните протеини IE1 и US28, които подпомагат избягването на имунната система, предотвратяват клетъчната смърт и промотират клетъчното оцеляване и безсмъртие (77). При раковите клетки успешното избягване на имунната реакция е свързано с EMT, метастазиране и рецидиви. От друга страна раковите клетки предоставят благоприятни условия за вирусна реактивация и репликация и така се получава взаимно благоприятна среда за развитие на вируса и туморните клетки (77).

Първите данни, свързващи наличието на ЦМВ при различни стадии на злокачествени глиоми са представени през 2002 г. от Cobbs и колеги (78). Въпреки противоречивите публикации, на този етап е прието, че последователности, кодирани от ЦМВ ДНК се срещат в почти всички глиоми (73). ЦМВ геномът кодира над 200 протеина и 12 микроРНКи, с онкомодулаторен потенциал, засягащ клетъчната пролиферация, инвазия, имуносупресия, апоптоза или автофагия и ангиогенеза.

Също така, има данни, че пациентите с глиоми и активна ЦМВ инфекция, живеят по-малко от пациенти, при които не се открива вирусен товар или той е нисък (74). Други автори отхвърлят връзката между ЦМВ и глиомагенезата, като не откриват вирусни последователности при NGS секвениране при 111 глиобластоми (79).

Според някои теории, реактивацията на ЦМВ се задейства при прилаганите имуносупресивни схеми на лечение на различните онкологични заболявания, което води до допълнително сриване на имунната система. При 80% от тези пациенти вирусна ДНК се открива и в периферна кръв, което предполага системна реактивация или излъчване от туморните клетки. Смята се, че гостоприемници на вируса са малка популация от

туморни клетки наречена глиобастомни стволови клетки (GSC), като се отчита присъствие на вирусни продукти на транскриптомно и протеомно ниво. Също така, е наблюдавана връзка между ЦМВ и метастази при рак на гърдата, като вирусна ДНК е открита при 98% от мозъчните метастази на тези пациенти (80).

Въпреки, че последните години ЦМВ се свързва предимно с процесите на онкомодулация, публикувани наскоро данни предлагат този вирус да бъде включен към списъка на онкогенните вируси (69,77). Така, ако тези данни бъдат потвърдени, ЦМВ ще стане осмият признат онкогенен вирус, заедно с ЕБВ, КСХВ, Човешки папиломен вирус (HPV), Хепатит В и С (HBV, HCV), човешки Т-лимфотропен вирус (HTLV) и Меркел клетъчен полиомен вирус (MCPyV) (77).

Открито е, че вирусният протеин IE1 повлиява клетъчни пътища, като p53 и Rb, свързани със супресия на раковите клетки и поправка на ДНК увреждания, като успоредно активира c-Myc и по този начин индуцира клетъчната трансформация. Вероятно, подобно на ЧПВ, способността на ЦМВ за клетъчна трансформация ще се окаже, че зависи от щама на вируса. При високорисковите щамове на ЦМВ, като DB, BL, се наблюдава трансформация на клетките в гигантски полиплоидни ракови клетки (PGCCs- polyploid giant cancer cell). Тези събития корелират с повишена експресия на c-Myc, активиране на PI3K/Akt пътя и потискане на p53 пътя (81).

Тъй като характерна особеност на ДНКовите онковируси е инактивиране на p53 и RB сигналните пътища, преодоляване на G1/S чекпойнт механизмите и активната клетъчна пролиферация, все повече данни подчертават вероятната онкогенна функция на ЦМВ.

1.13.4. Лечение на ЦМВ

Най-често използваните лекарства за потискане на ЦМВ репликацията са ганцикловир, валганцикловир и фоскарнет. Лечението има за цел да контролира инфекцията и да облекчи симптомите, и обикновено се прилага за кратък интервал от време (1-3 седмици). Ако е необходима дългосрочна терапия, анти-ЦМВ имуноглобулин може да се използва, когато други лекарства не действат.

1.13.5. ЦМВ-базирани терапии при глиобластом

През последните години се натрупаха обнадеждаващи данни за ЦМВ-базирани терапии при пациенти с глиобластоми. Въз основа на данните, че вирусният

фосфопротеин 65 (pp65) се експресира в над 90% от глиобластомите, но не и в околната нормална мозъчна тъкан (82), се разработват обнадеждаващи имунотерапии. Екип от учени изолират дендритни клетки от периферната кръв на пациенти с новодиагностициран глиобластом. Тези клетки се активират да разпознават pp65 РНК на ЦМВ и така се стимулират CD4+ и CD8+ ефекторни Т клетки, които са специфични към ЦМВ и успяват да убият автоложните туморни клетки. Тази терапия е приложена при малко рандомизирано пилотно проучване, при което пациентите, получили ЦМВ pp65-специфични дендритни клетки, комбинирани с тетанус-дифтериен токсоид, показват забележително подобрена преживяемост без прогресия (PFS) между 15,4–47,3 месеца и обща преживяемост (OS) (20,6–47,3 месеца) в сравнение с контролите (82). При фаза I на въпросното проучване (NCT00639639), при ваксиниране на новодиагностицирани пациенти с глиобластом с pp65- дендритни клетки и сравняването на PFS и OS с тези на текущата стандартна терапия, се наблюдава лимфопения, увеличени регулаторни Т клетки, но и удължен PFS - 25,3 месеца и OS - 41,1 месеца. Друго клинично проучване при пациенти с рецидивирал глиобластом доказва, че автоложни ЦМВ-специфични Т клетки, използвани за терапия са с минимални странични ефекти и безопасни, водещи до удължени PFS и OS (83).

Обнадеждаващи резултати докладват и екип от болницата към университета в Каролинска, които прилагат анти-ЦМВ терапия с валганцикловир при първични и вторични глиобластоми и докладват статистически значително удължена продължителност на живот и при двете групи спрямо контролната група със стандартна терапия (84).

Всички тези данни доказват актуалността на проучванията върху ролята на ЦМВ в глиомагенезата и антитуморната терапия.

Заключение: Мозъчните тумори са мултифакторни заболявания, при които напредъкът по отношение на диагностиката и контрола на рецидивите остава ограничен, особено при ВСГ. Предвид, че през последните години някои държави демонстрират спад в случаите на някои онкологични заболявания, смятаме че въвеждането на персонализиран подход за диагностика и мониторинг би могло да подобри прогнозата на пациентите с глиоми и да оптимизира лечението.

ЦЕЛ

И

ЗАДАЧИ

2. ЦЕЛ

Настоящата научна разработка цели да проведе мултидисциплинарен молекулярно–генетичен анализ, за да оцени ролята на дерегулирани микроРНКи, гени с променен брой копия (CNVs) и присъствието на активна ЦМВ инфекция като биомаркери за диагностика и прогнозиране хода на заболяването при пациенти с глиоми.

3. ЗАДАЧИ

За изпълнението на целта си поставихме следните задачи:

3.1. Подбор на български пациенти с различни степени на глиоми.

3.2. Изолиране на тотална РНК и микроРНКи. Провеждане на експресионни анализи на предварително селектирани микроРНКи чрез TaqMan технология и количествен PCR в реално време.

3.3. Изолиране на геномна ДНК. MLPA анализ на вариации в броя копия на гени (CNVs), засягащи ключови сигнални пътища, секвениране по Сангер на *IDH1* и *IDH2* гените и PCR анализ за детекция на ЦМВ репликация.

3.4. Статистически анализ на получените резултати (SPSS, R) и сравнение със световната база данни.

3.5. Селекция на диагностични и прогностични биомаркери, и предлагане на персонализиран подход (алгоритъм) при пациенти с глиоми.

МАТЕРИАЛИ

И

МЕТОДИ

4. МАТЕРИАЛИ

4.1. Клинични материали

В рамките на настоящия дисертационен труд проведохме молекулярно-генетични изследвания при 76 пациенти с първични мозъчни тумори (глиоми), в периода 2018-2024 г. Пациентите са насочени за анализ след подписано информирано съгласие за извършване на изследванията и невро-хирургична операция. Изследванията, обект на настоящата дисертация, са одобрени от Комисия по етика на научните изследвания към МУ-София (КЕНИМУС) и са частично финансирани от спечелени конкурси „Млад Изследовател“ по договори № Д-118/2018 и Д-127/2019 на МУ-София.

Клиничните данни за всички пациенти са получени от следните медицински структури:

- ♥ Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение „Св. Иван Рилски“, гр. София
- ♥ Университетска Многопрофилна Болница „Аджибадем Сити Клиник Токуда“, гр. София
- ♥ Генетична медико-диагностична лаборатория "Геника"

Клинико-патологичните характеристики на изследваните пациенти са представени в (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Клинико-патологични характеристики на пациентите, включени в настоящия дисертационен труд

Показател	Глиоми N (%)	Група	
		Високостепенни глиоми Степен по СЗО 3-4, N (%)	Нискостепенни глиоми Степен по СЗО 1-2, N (%)
N (%)	76 (100)	54 (71.05)	22 (28.95)
Възраст (средно ± SD)	49.73 ± 17.77	56.5 ± 14.1	40 ± 20.2
>= 60	32 (42.11)	30 (39.47)	2 (2.63)
<60	44 (57.98)	24 (31.58)	20 (26.32)
Пол			
мъж	34 (44.74)	26 (34.21)	8 (10.53)
жена	42 (55.26)	28 (36.84)	14 (18.42)
Степен по СЗО			
1 степен по СЗО	4 (5.26)		4 (5.26)
2 степен по СЗО	18 (23.68)		18 (23.68)
3 степен по СЗО	7 (9.21)	7 (9.21)	
4 степен по СЗО	46 (61.84)	46 (61.84)	
KPS статус ± SD	69.79 ± 15.54	65.1 ± 14.6	80.5 ± 13
≥ 70	43 (56.58)	24 (31.58)	19 (25)
< 70	30 (39.47)	27 (35.53)	3 (3.95)
Липсва информация	3 (3.95)	3 (3.95)	
Лечение			
Химиотерапия	3 (3.95)	3 (3.95)	0 (0)
Лъчетерапия	3 (3.95)	1 (1.32)	2 (2.63)
Лъчетерапия + химиотерапия	51 (%)55 (72.37)	49 (64.47)	6 (7.89)
Без терапия	15 (19.74)	2 (2.63)	13 (17.11)
Рецидив			
Да	22 (28.95)	15 (19.74 %)	7 (9.21)
Не	54 (71.05)	40 (52.63)	14 (18.42)
Размер			
Под 3 см	9 (11.84)	6 (7.89)	3 (3.95)
3 см < 5 см	47 (61.84)	30 (39.47)	17 (22.37)
Над 5 см	18 (23.68)	16 (20.05)	2 (2.63)
Липсва информация	2 (2.63)	2 (2.63)	
Най-чести допълнителни заболявания			
Артериална хипертония (АХ)	31 (40.79)	24 (31.58)	7 (9.21)
Захарен диабет (ЗД)	11 (14.47)	8 (10.53)	3 (3.95)
Без заболявания	4 (52.63)	3 (3.95)	1 (1.32)
Липсва информация	7 (9.21)	5 (6.58)	2 (2.63)
Преживяемост			
Жив	21 (27.63)	5 (6.58)	16 (21.05)
Починал	56 (73.68)	48 (63.16)	8 (10.53)

SD – стандартно отклонение; **KPS –** пърформанс статус по Карновски

Пърформанс статус по Карновски (Karnofsky Performance Status-KPS) е широко използвана скала за оценка на физическото състояние на пациентите, която отразява тяхната способност да изпълняват ежедневни дейности. Скалата обхваща от 0 до 100%, като 100% показва пълна физическа активност, без симптоми или физически ограничения, а 0% означава смърт. KPS е част от международно използваните клинични характеристики на пациентите с глиоми, като този показател помага за предсказване на прогнозата и планирането на лечението. Пациенти с високи стойности на KPS (над 70%) имат по-добри шансове за лечение и възстановяване спрямо пациенти с по-ниски стойности, които често имат увредено общо състояние и по-лоша прогноза.

Включените 15 контроли, представени от ненеопластични тъкани, са събрани през същия период. Поради спецификата на изследваната тъкан и инвазивността на пробовземането, селектираните контроли включват проби от пациенти, насочени за неврохирургична операция с немалигнен произход, проби от съседна туморна тъкан и комерсиално-поръчана контрола на мозъчна тъкан.

В настоящата дисертация са анализирани туморни проби, отговарящи на предварително зададени критерии за включване и изключване.

4.1.1. Критерии за включване в изследването

- ♥ проби от пациенти с подписано информирано съгласие
- ♥ първичен глиален тумор
- ♥ интактност и качество на изолираните ДНК и РНК, необходими за последващите анализи

4.1.2. Критерии за изключване

- ♥ пациенти с диагноза различна от глиален тумор
- ♥ липса на информирано съгласие или отказ на пациентите от последващи анализи
- ♥ ниско качество на изолираните ДНК или РНК, поради деградация или недостатъчен материал за предвидените анализи

4.2. Предварителна обработка и съхранение на материалите

Туморната тъкан, след неврохирургичното отстраняване, се поставя веднага в криоепруветка с разтвор (RNA later, Qiagen, Germany), който стабилизира РНК, предотвратява действието на РНази, деградирането на РНК и запазва ДНК. Събраните туморни проби се номерират и подреждат в биобанка, като се съхраняват на – 80°C до последващата екстракцията генетичния материал.

5. МЕТОДИ

5.1. Изолиране на тотална РНК с фракция от микроРНК

Събраните тъканни проби се хомогенизират в QIAzol Lysis реактив и тотална РНК, включваща микроРНКи, изолирахме с комерсиален кит - miRNeasy mini kit (Cat. No. 217004, Qiagen, Germany), според инструкциите на производителя.

Протокол на изолирането:

i. Тъкан до 5 мг се поставя в 700 микролитра (мкл) QIAzol Lysis

ii. Хомогенизиране на тъканта, добавяне на 5мкл екзогенна (spike-in) контрола – cel-miR-39 и инкубиране за 5 мин на стайна температура

iii. Добавяне на 140 мкл хлороформ и вортексиране за 15 мин

iv. Инкубиране за 2-5 мин на стайна температура

v. Центрофугиране за 15 мин на 12 000g при 4°C

vi. Прехвърляне на водната фаза в нова епруветка и добавяне на 1.5 обема (около 525 мкл) етанол (100%). Внимателно миксиране с пипета

vii. 700 мкл от получения разтвор се прехвърлят в колонка RNeasy MinElute

viii. Центрофугиране на ≥8 000g (≥10 000rpm) за 15 сек на стайна температура и изхвърляне на отделената на дъното течност

ix. Остатъкът от пробата с етанол се прехвърля отново в колонката, центрофугира се при същите условия и отново преминалата през колонката течност се изхвърля

x. Добавят се 700 мкл RWT - промиващ буфер към колонката

xi. Центрофугиране на ≥8 000g (≥10 000rpm) за 15 сек на стайна температура и изхвърляне на отделената на дъното течност

xii. Добавят се 500 мкл RPE буфер към колонката

xiii. Центрофугиране на ≥8 000g (≥10 000rpm) за 15 сек на стайна температура и изхвърляне на отделената на дъното течност

xiv. Добавят се 500 мкл RPE буфер към колонката

xv. Центрофугиране на ≥8 000g (≥10 000rpm) за 2 мин на стайна температура. Изхвърляне на събирателната епендорфка и отделената на дъното течност

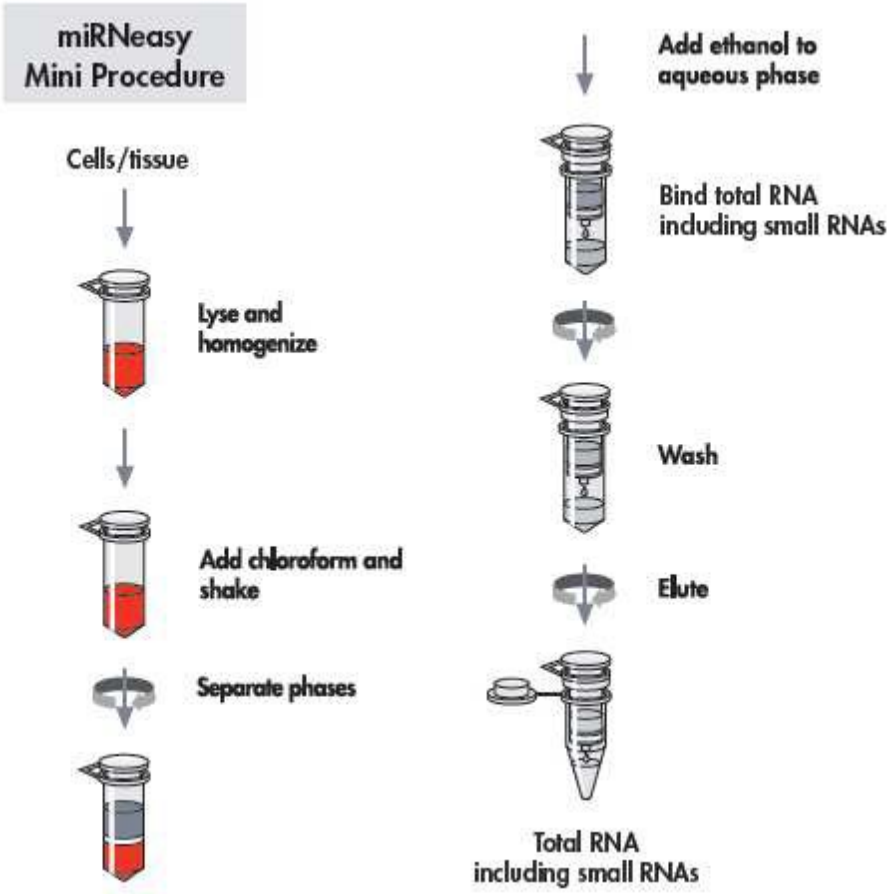
xvi. RNeasy MiniElute колонката се поставя в нова събирателната епендорфка и се центрофугира за 1 мин на максимални обороти, за да се изсуши мембраната

xvii. Поставяне на колонката в нова 1.5 мл епендорфка и добавяне на 30-50 мкл вода, пречистена от РНази (RNase free water) върху центъра на мембраната

xviii. Центрофугиране за 1 мин на максимални обороти

xix. Съхраняване на елуента на -80°C

Принципът на изолиране комбинира фенол/гуанидин тиоцианат-базиран лизис на клетките (QIAzol Lysis реактив) и силициево-базирана мембрана за свързване и изолиране на РНК. QIAzol Lysis осигурява инхибиране на РНазите и протектира РНК от деградация. РНК фракцията се съдържа в горната - водна фаза, ДНК е в средната, а в долната органична фаза са белтъците (фиг. 5.1).



Фигура 5.1. Схема на РНК изолиране с miRNeasy mini kit

При изолирането на РНК се добави екзогенен синтетичен микроРНКов олигонуклеотид (C. elegans miR-39 miRNA mimic, IDT, Germany), означаван накратко като cel-miR-39, за проследяване качеството на изолираните микроРНКи, контрол на изолирането и синтез на копиДНК. Лиофилизираната cel-miR-39 се разтваря до 100 наномола и от този разтвор се приготвят аликвоти по 50 мкл работен разтвор, които се

съхраняват на -80°C, с цел предотвратяване на деградация при повтарящи се цикли на замразяване и размразяване.

5.2. Определяне концентрация на изолирана тотална РНК

Количеството и чистотата на изолираната тотална РНК се измери на NanoDrop 2000 спектрофотометър (Thermo Fisher Scientific, USA). Чистите РНК проби дават съотношение A260/280 между 1.9 – 2.1, като стойности под 1.8 показват примеси от белтъци. Също така, чистите РНК проби имат съотношение A260/A230 около 2-2.2. При по-ниско съотношение е възможна контаминация с въглехидрати, гуанидин хидрохлорид и др. Отговарящите на критериите за качество и чистота РНКи бяха използвани за последващи анализи.

5.3. Полимеразно-верижна реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Полимеразно-верижната реакция (PCR) представлява ензимно намножаване (амплификация) на таргетни ДНК последователности с помощта на специфични праймери и Taq полимераза. Taq полимеразата е термостабилна ДНК полимераза I, кръстена на термофилния микроорганизъм **T**hermus **aq**uaticus.

При стандартния, конвенционален PCR се използват два вида праймери (синтетични олигонуклеотиди) – прав (F-forward) и обратен (R-reverse). Правият праймер се свързва с кодиращата верига (в посока 5'-3'), а обратният се свързва с некодиращата (посока 3'-5'). Тези праймери хибридизират със срещуположните вериги и служат като субстрати на полимеразата, синтезираща комплементарни вериги чрез добавяне на нуклеотиди.

Същността на PCR техниката за амплифициране на специфичен участък от ДНК включва следните стъпки:

i. денатурация на геномната двойно-верижна ДНК (92-98°C) до едноверижни фрагменти

ii. хибридизация (анилинг) - свързване на праймерите към комплементарните им участъци в двата края на таргетната ДНК секвенция (50-70°C). Температурата за хибридизация е специфична за всяка двойка праймери, като зависи от тяхната дължина и GC нуклеотиден състав, и се определя по следната формула:

T°C хибридизация = ((A+T)x2+(G+C)x4)-5°C

iii. елонгация (синтез) на нова ДНК верига чрез удължаване на хибридизиралите праймери от термостабилната (Taq) полимераза (70-75°C). Температурата, при която се постига най-висока полимеразна активност е около 72°C, като зависи от използвания ензим.

Амплификацията на таргетни нуклеотидни последователности протича в повтарящи се цикли (около 20-40), всеки състоящ се от редуване на денатурация на ДНК, анилинг на праймерите към ДНК матрицата и синтез на нови вериги, при което таргетната секвенция между праймерите се амплифицира множество пъти.

Амплифицираните фрагменти може да се разделят според размера си. За визуализация на амплифицираните фрагменти беше използвана агарозна гел електрофореза след оцветяване на гела с етидиев бромид и флуоресценция на УВ светлина (трансилюминатор).

5.4. Амплификация на ДНК фрагменти с PCR в реално време (real-time PCR)

Този метод позволява амплифициране и количествено определяне на специфични ДНК последователности в реално време, измерено след всеки цикъл чрез използването на флуоресцентни маркери. Увеличението на флуоресцентния сигнал е правопропорционално на броя на ДНК ампликоните, синтезирани в експоненциална фаза на PCR реакцията. Два от най-често използваните метода за визуализация при PCR в реално време са TaqMan и SYBR Green.

♥ **TaqMan метод**

При този метод в реакцията се включват TaqMan сонди (синтетични олигонуклеотиди), състоящи се от флуоресцентно репортерно багрило (напр. FAM), прикрепено към 5' края и гасително багрило (напр. TAMRA), прикрепено към 3' края. Сондата хибридизира към таргетната ДНК последователност по време на анилинга, между двата праймера, и когато ензимът достигне до TaqMan сондата, той я разгражда, отделяйки репортерното багрило от гасителя. Това води до генериране на флуоресцентен сигнал, който се детектира и измерва количествено в реално време по време на PCR амплификация. При този метод се осигурява висока специфичност поради комплементарността на сондата и матрицата. Използването на различни флуорофори в мултиплексни PCR анализи позволява амплифициране и откриване на множество ДНК

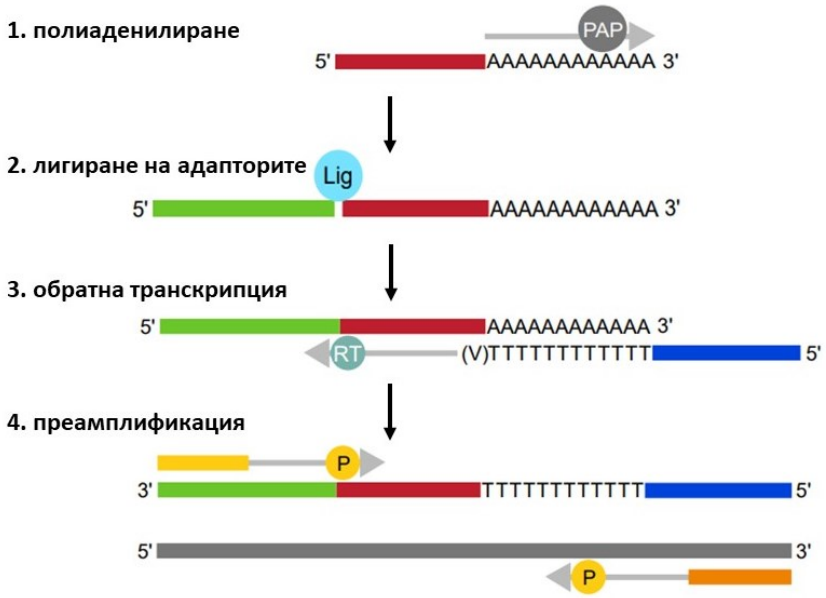
таргети едновременно. Най-честите приложенията на TaqMan включват анализ на генна експресия, SNP генотипиране, количествено определяне на вирусен товар и бактериална детекция.

♥ **SYBR Green**

SYBR Green е флуоресцентно багрило, което се свързва с двойноверижна ДНК, при което емитира флуоресценция. Багрилото се добавя към PCR реакционната смес и интензитетът на флуоресценция се наблюдава в реално време, докато PCR амплификацията напредва. С всеки цикъл количеството на PCR продукта се увеличава и флуоресцентният сигнал от свързания SYBR Green също се увеличава. Въпреки, че SYBR Green се характеризира с универсалното си приложение и рентабилността си, това багрило може да се свърже с неспецифични PCR продукти или димери на праймери, което да доведе до фалшиво положителни сигнали.

5.5. Синтез на копиДНКи

За синтез на копиДНК използваме комерсиален кит - TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). При зрелите микроРНК с дължина над 18 нуклеотида за разлика от иРНК липсват поли А опашка и шапка. TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit използва 3' поли-А опашка и 5' лигиране на адапторна последователност, за да удължи зрелите микроРНКи, преди обратната транскрипция. Универсалните RT праймери разпознават универсалните последователности, добавени към 5' и 3' удължените краища на всички микроРНКи в пробата. След това тези микроРНКи се транскрибират в копиДНК (cDNA). За да не се пропуснат ниско експресираните микроРНК, получената копиДНК допълнително се амплифицира с помощта на универсални (miR-Amp) праймери. При този метод miR-Amp праймерите разпознават универсалните последователности, добавени към 5' и 3' краищата на зрелите микроРНКи, което трябва да гарантира липса на амплификационни отклонения.
На фиг. 5.2 е представена схемата и стъпките за синтез на копиДНК с кита TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.



Фигура 5.2. Синтез на копиДНК. 1. Реакция на полиаденилиране с поли(А) полимеразата, която добавя 3'-аденозинова опашка към микроРНКите. 2. Реакция на лигиране (свързване) на адаптера - микроРНК с поли(А) опашка се подлага на адапторно лигиране в 5' края. Адапторът действа като място за свързване на правия (forward) праймер за miR-Amp реакцията на преамплификция. 3. Реакция на обратна транскрипция (RT)- универсален RT праймер се свързва с 3' поли(А) опашката и микроРНК се транскрибира обратно. 4. Универсалните прави (F) и обратни (R) праймери увеличават броя на копиДНК молекулите, с цел преамплифициране на ниско експресирани микроРНКи. Получената копиДНК се използва за TaqMan Advanced miRNA анализите.

5.5.1. Добавяне на поли(А) опашка (полиаденилиране)

Като матрица за синтез на копиДНК използваме 10 ng тотална РНК. В микроцентрофужна епруветка от 1,5 ml се приготвя поли(А) реакционен микс за необходимия брой реакции с реактивите (табл. 5.1).

Таблица 5.1. Приготвяне на реакционен микс за полиаденилиането

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
10Х Поли (А) Буфер	0.5
АТФ	0.5
Поли(А) ензим	0.3
Вода без РНази	1.7

Към 2 мкл от изолираната РНК се добавят 3 мкл от поли(А) микса. Получената количество от 5 мкл в епруветката се вортексира и центрофугира за кратко, след което се поставя в PCR на следната програма (табл.5.2)

Таблица 5.2. Програма на PCR апарата за реакцията на полиаденилиане

Стъпка	Температура	Време
Полиаденилиране	37°C	45 мин
Спиране на реакцията	65°C	10 мин
Пауза	4°C	До следващата стъпка

След приключване на програмата веднага се започва със следващата стъпка.

5.5.2. Реакция на лигиране на адапторите

В микроцентрофужна епруветка от 1,5 мл се приготвя микс за лигиране на адапторите за необходимия брой реакциите съгласно таблица 5.3.

Таблица 5.3. Приготвяне на реакционен микс за лигиране на адапторите

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
5X ДНК лигазен буфер	3
50% ПЕГ 8000	4.5
25X лигазен адаптор	0.6
РНК лигаза	1.5
Вода без РНази	0.4

Миксът за лигиране се вортексира, за да се смеси напълно, след това се центрофугира за кратко, за да се отстранят въздушните мехурчета. В следваща стъпка 10 мкл от получената реакционна смес за лигиране се добавят към продукта на поли(А) реакцията до получаване на общ обем от 15 мкл. Получената проба се центрофугира отново за кратко и се поставя в PCR със следната програма (табл.5.4).

Таблица 5.4. Програма на PCR апарата за реакцията за лигиране на адапторите

Стъпка	Температура	Време
Лигиране	16°C	60 мин
Пауза	4°C	До следващата стъпка

След приключване на програмата максимално бързо се продължава със следващата стъпка.

5.5.3. Реакцията на обратна транскрипция (RT)

В микроцентрофужна епруветка от 1,5 мл се приготвя RT реакционен микс (табл.5.5).

Таблица 5.5. Приготвяне на реакционен микс за RT реакцията

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
5X RT буфер	6
дНТФ микс (по 25 mM всеки)	1.2
20X универсален RT праймер	1.5
10X RT ензим	3
Вода без РНази	3.3

Полученият RT микс се вортексира и центрофугира за кратко, като 15 мкл от RT реакционния микс се добавят към реакцията на свързване на адапторите до получаване на общ обем от 30 мкл. Получената проба се вортексира и центрофугира отново за кратко. Поставя се в PCR апарата със следната програма (табл.5.6).

Таблица 5.6. Програма на PCR апарата за RT реакцията

Стъпка	Температура	Време
Обратна транскрипция	42°C	15 мин
Спиране на реакцията	85°C	5 мин
Пауза	4°C	До следващата стъпка

След приключване на програмата може да се продължи със следващата стъпка на преамплификация или получената копиДНК да се съхрани на –20°C до 2 месеца.

5.5.4. Реакция на преамплификационно намножаване на микроРНКи

Допълнително беше проведена и преамплификация с цел детекция на по-ниско експресирани микроРНКи. В нова 1,5 мл епендорфка се приготвя miR-Amp реакционен микс според необходимите реакции (табл. 5.7).

Таблица 5.7. Приготвяне на реакционен микс за преамплификационната miR-Amp реакция

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
2X miR-Amp мастер микс	25
20X miR-Amp праймерен микс	2.5
Вода без РНази	17.5

Отново вортексираме и центрофугираме за кратко miR-Amp микса, за да смесим реактивите и отстраним въздушните мехурчета. Прехвърляме 45 мкл от miR-Amp микса към 5 мкл от RT реакцията (копиДНК) до краен обем 50 мкл. Разбъркваме и центрофугираме за кратко. Поставя се в PCR апарат със следната програма (табл. 5.8).

Таблица 5.8. Програма на PCR апарата за преамплификационната miR-Amp реакция

Стъпка	Температура	Време	Цикъл
Активиране на ензима	95°C	1 мин	1
Денатуриране	95°C	3 сек	14*
Хибридизация и синтез	60°C	30 сек	
Спиране на реакцията	99°C	10 мин	1
Пауза/ съхранение	4°C	До следваща стъпка	-

**При високи стойности на Ct, циклите могат да бъдат удължени до 18.*

Получените продукти на преамплификационната реакция могат да се съхраняват на -20 °C, препоръчително до 2 месеца или да се използват веднага за анализ на генната експресия (експресионен анализ) с полимеразно-верижна реакция в реално време (qPCR).

5.6. Експресионен анализ на микроРНКи с количествена полимеразно-верижна реакция в реално време (qPCR)

Нивата на експресия на изследваните микроРНКи са анализирани чрез TaqMan метод със специфично белязани сонди и праймери за амплификация на таргетните микроРНКи. Получената копиДНК беше разредена и използвана за последващ експресионен анализ, чрез TaqMan Advanced miRNA assay, според инструкциите на производителя.

Протокол за TaqMan Advanced miRNA теста:

i. Размразяване на пробите върху лед, внимателно разбъркване и центрофугиране за кратко
ii. Приготвяне на 1:10 разреждане на копиДНК матрица (5 мкл от преамплификационния продукт miR-Amp се добавят към 45 мкл 0,1X TE буфер)
iii. Внимателно разбъркване на TaqMan Fast Advanced мастер микса
iv. В 1,5 мл микроцентрофужна епруветка се приготвят PCR реакционен микс съгласно таблица 5.9.
v. Вортексиране и кратко центрофугиране на PCR микса
vi. Добавяне на 5 мкл от разредената копиДНК матрица към 15 мкл от PCR реакционния микс, до краен обем 20 мкл на реакция
vii. Вортексиране и кратко центрофугиране на PCR микса, за да се смеси напълно съдържанието

Таблица 5.9. Приготвяне на реакционен микс за експресионен анализа на микроРНК

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
TaqMan Fast Advanced (2X) мастер микс	10
TaqMan Advanced miRNA (20X) праймерен микс	1
Вода без РНази	4

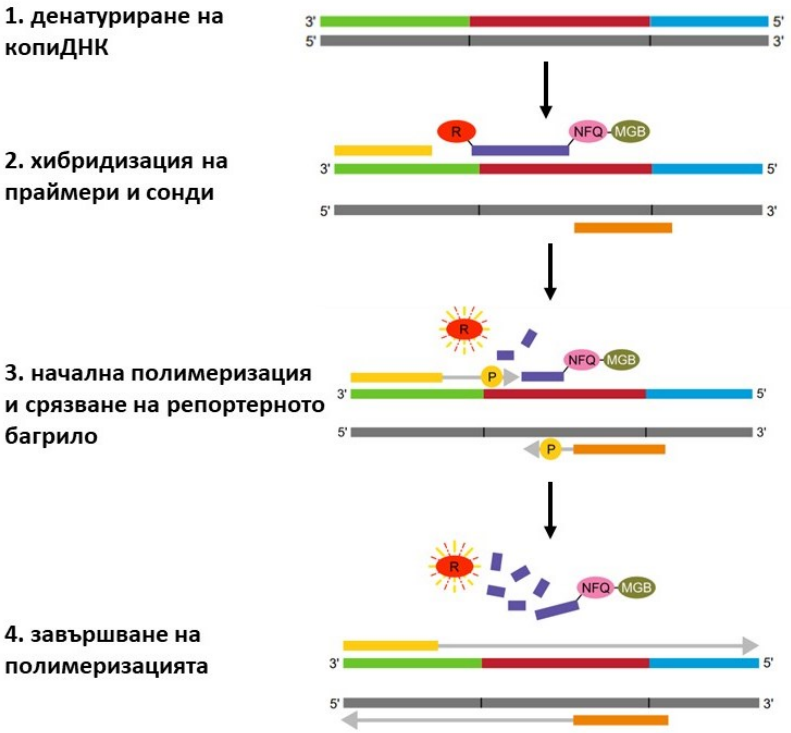
Реакцията на амплификация се извършва в PCR апарат (DT prime, DNA Technology) със следната програма за qPCR (табл. 5.10).

Таблица 5.10. Програма на PCR апарата за експрсионен анализ

Стъпка	Температура	Време	Цикъл
Активиране на ензима	95°C	20 сек	1
Денатуриране	95°C	3 сек	40
Хибридизация и синтез	60°C	30 сек	

Използваните TaqMan™ сонди съдържат: репортерно багрило - FAM в 5' края на сондата; нефлуоресцентно гасително багрило - NFQ в 3′ края на сондата; свързващо вещество за малката бразда (MGB -minor groove binder) в 3' края на сондата, което повишава температурата на топене (Tm), без да увеличава дължината на сондата и позволява използване на по-къси сонди.

Принципът на TaqMan Advanced miRNA анализа с qPCR е представен на фиг.5.3.



Фигура 5.3. Стъпки на TaqMan Advanced miRNA qPCR анализа. 1. КопиДНК денатурира, за да може правите и обратните праймери да се свържат с комплементарни последователности 2. Местата за свързване на праймерите варират в зависимост от таргетната микроРНК последователност. На фигурата се вижда как обратният праймер частично припокрива микроРНК последователността. Сондата TaqMan MGB (в лилаво) хибридизира специфично между правия и обратния праймер. Когато сондата е интактна, близостта на репортерното багрило (R-FAM) и гасителя (NFQ) потиска флуоресценцията. 3. Хибридизацията на сонди и праймери към копиДНК е последвана от начало на полимеризация, при което ДНК полимеразата срязва сондите, които са хибридизирали с таргетната микроРНК. Това води до отделянето на репортерното багрило от сондата и отдалечаване от гасителя, и съответно до флуоресценция на репортера (R). Увеличението на флуоресценцията възниква само ако е налице комплементарност с целевата микроРНК. 4. След определен брой цикли, по време на които се генерира различно ниво на флуоресценция в зависимост от нивото на таргетите, полимеризацията завършва.

Експресионните профили на таргетните микроРНКи се сравняват и нормализират спрямо селектираните контроли.

5.7. Селекция на ендогенни референтни контроли

Ендогенните контроли показват генна експресия, която трябва да е относително постоянна в различни видове тъкани или клетки. Нормализирането на генната експресия на изследваните таргети спрямо ендогенни контроли е понастоящем е един от най-точнните методи за коригиране на потенциални отклонения, които могат да са причинени от разлики в количеството на изходния материал, ефективност на обратната транскрипция (RT) и качеството на изолираните РНКи. Няма универсална ендогенна контрола и затова е необходимо експериментално да се тества и провери стабилността на избраната ендогенна контрола или набор от контроли за конкретната изследвана тъкан.

За нормализиране на получените резултати от експресионните анализи тествахме hsa-miR-191 и hsa-miR-877. Hsa-miR-191 е подбрана по препоръка на производителя (Thermo Fisher Scientific) като една от стабилните ендогенни контроли за коректно нормализиране на резултатите, докато hsa-miR-877-5p подбрахме по литературни данни. Подбраните контроли са със следните секвенции:

- hsa-miR-191-5p с последователност: 5′-CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG-3′
- hsa-miR-877-5p с последователност: 5′-CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG-3′

5.8. Екзогенна контрола

Екзогенната контрола е синтетичен РНКов олигонуклеотид, сходен с микроРНКите като дължина, която обаче не присъства в изследваната пробата (в случая при хора). Екзогенната микроРНК се добавя към пробата по време на изолирането на РНК. С тези контроли се проверява и ефективността на екстракцията. Особеното при методиката на TaqMan Advanced miRNA анализа, е че екзогенните контроли са 5'-фосфорилирани.

Секвенцията на cel-miR-39-3p е: 5′-P-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3′

5.9. Количествено изчисляване на генната експресията на микроРНКите чрез qPCR

Относителната промяна в генната експресията на подбраните микроРНКи се изчислява като флуоресцентния сигнал на таргетната микроРНК се съпоставя спрямо контролния сигнал. Изменението на генната експресия при изследваните пациенти беше изчислена с помощта на т.нар. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода въведен от Ливак и сътр. (85). За определяне на експресията на таргетните микроРНКи се определя средната стойност на Ct (cycle threshold) от повторенията на всеки пациент. Измерените средни Ct стойности на всеки пациент бяха сравнени със средните стойности на miR-877. Екзогенната cel-miR-39 беше анализирана за контрол на стъпките за изолиране, обратна транскрипция и експресионния анализ.

По следната формула беше изчислена Δ Ct за всяка таргетна микроРНК:

Δ Ct = Ct (таргетната микроРНК) – Ct (ендогенна микроРНК)

След това се пресмята ΔΔCt по формулата:

ΔΔCt = ΔCt (пациент) - ΔCt (контрола)

Относителното изменение в експресията се изчислява като $\mathbf{FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}}$. Тази стойност показва колко пъти експресията (FC - fold change) на даден пациент е променена спрямо контролата.

При **FC ≥2.0** съответната микроРНК е с повишена експресия, докато ако **FC <0.5** се отчита понижаване на експресията на таргетната микроРНК. Междинните стойности се приемат като нормална експресия или подлежат на допълнително проследяване при гранични резултати. С този метод сравняваме туморни проби и нормални контроли, високостепенни спрямо нискостепенни глиоми, както и различните степени глиоми помежду си (1-4 ст. по СЗО). За нормализиране експресията на микроРНКите използвахме материали от съседна мозъчна тъкан на тумора на разстояние около 2 см, мозъчна тъкан от пациенти с немалигнени заболявания и комерсиална РНК от нормален мозък - Total RNAs - human adults normal brain tissues (Cat. № R1234035-50, Biochain, USA).

5.10. Изолиране на ДНК от свежа тъкан

От събраните туморни проби се изолира тотална ДНК по две методики, които след това бяха сравнени.

♥ Методика с фенол/хлороформ, която се препоръчва за тъкани, богати на мазнини като мозъчната тъкан

Туморната тъкан се подлага на хомогенизиране, ресуспендиране във физиологичен разтвор и предобработка с протеиназа К за 10 часа при 56°С. Еднакви количества от пробата и следните реагенти (фенол : хлороформ : изоамилов алкохол в съотношение 25:24:1) се смесват и след това се вортексират за 15 секунди. Центрофугират се за 5 мин на 14000 rpm. Горната прозрачна фаза внимателно се отделя в нова епруветка, в която предварително сме добавили 0.5 обема от 7.5М амониев ацетат. След това прибавяме 2.5 обема 99% леден етанол, с цел преципитация на ДНК. Следва центрофугиране за 30 мин на 14000 rpm. Утайката с преципитираната ДНК се промива 2 пъти със 70% етанол и след всяко промиване се центрофугира за 2 мин на 14000 rpm. Така промитата утайка се оставя да изсъхне на 56°С за около 5-10 минути и се ресуспендира в 100-150 µl ТЕ буфер. Изолираните ДНКи се етикетират и съхраняват във фризер при -20°С до последващи изследвания.

♥ Изолиране на геномна ДНК от свежа мозъчна тъкан с комерсиален кит QIAamp DNA Mini Kit (Cat. № 51304, Qiagen, Germany), според инструкциите на производителя.

Протокол на ДНК изолирането с QIAamp DNA Mini Kit:

i. Към тъкан до 25 мг, поставена в 1.5мл епендорфка се добавят 180 мкл ATL буфер и 20 мкл Протеиназа К (20мкг/мл)

ii. Вортексиране и инкубиране на 56°С, с периодично вортексиране до пълно лизиране на тъканта (1-3 часа). Кратко центрофугиране на епендорфката

iii. Добавят се 200мкл AL буфер към лизата. Вортексиране за 15сек.

iv. Инкубиране на 70°С за 10 мин., след което центрофугиране за 5 сек., за да се премахнат капчиците от капака на епендорфката

v. Добавят се 200 мкл етанол (96-100%). Вортексиране за 15 сек. и кратко центрофугиране

vi. Прехвърляне на пробата към QIAamp mini spin колонката

vii. Центрофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин. Поставяне на QIAamp колонката в нова събирателна епруветка от 2мл

viii. Добавяне на 500 мкл AW1 буфер и центофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин и изхвърляне на отделената на дъното течност

ix. Добавяне на 500 мкл AW2 буфер и центрофугиране на пълни обороти (14 000 rpm) за 3 минути. Изхвърляне на отделената течност и допълнително центрофугиране на пълна скорост за 1 мин, за пълно елиминиране на AW2 буфера

x. QIAamp колонката се поставя в нова 1.5 мл епендорфка и се добавят 200 мкл AE буфер или дестилирана вода за елуиране

xi. Инкубиране на стайна температура за 1 минута и центрофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 минута. При проби с по-висока концентрация е възможно повторение на стъпките за елуиране.

Отделеният елуент с високомолекулна ДНК се съхранява на -20°C до последващ анализ.

5.11. Изолиране на ДНК от FFPE парафинови блокчета

Допълнително сравнение за съвпадение на генетичните резултати и ефективността на ДНК анализите е направено при двадесет ДНКи, изолирани от свежа туморна тъкан и от FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). Изолирането на ДНК от FFPE парафинови блокчета беше извършено с комерсиален кит QiAmp DNA FFPE Tissue kit (Cat. № 56404, Qiagen, Germany), според инструкциите на производителя.

Протокол на изолирането на ДНК с QiAmp DNA FFPE Tissue kit:

i. Депарафинизиране на парафиновите блокчета (FFPE): срезове с дебелина до 10 μm се поставят в 1.5 мл епруветка тип „Eppendorf", добавя се 1мл ксилол и се инкубира на стайна температура за 30 мин.

ii. Центрофугира се 5 мин. на 14 000 rpm и супернатантата се изхвърля. Повтарят се предходните стъпки

iii. Към утайката се прибавя 1мл 96% етанол и се инкубира на стайна температура за 15 мин.

iv. Центрофугира се 5 мин. на 14 000 rpm и супернатанта се изхвърля. Повтарят се миенето с етанол

v. Към утайката се прибавя 1мл дестилирана вода и се центрофугира при горепосочените условия

vi. Суши се на 37°C за 10 мин. или до пълното изпаряване на течността

vii. Прибавя се 20 мкл Протеиназа K (20 ng/ml) и 180 мкл ATL тъканен лизиращ буфер
viii. Инкубира се на 56°C, като се следи за разграждането на материала (между 2-24ч.)
ix. След пълното лизиране на тъканта се вортексира и инкубира за 1ч. на 90°C.
x. Добавят се 180 мкл AL буфер (лизисен буфер) и отново се вортексира
xi. Добавят се 200 мкл 95% етанол и се вортексира енергично, след което се центрофугира за кратко
xii. Прехвърляне на пробата към QIAamp колонката
xiii. Центрофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин. Поставяне на QIAamp колонката в нова събирателна епруветка от 2мл
xiv. Добавяне на 500 мкл AW1 буфер. Центрофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин и изхвърляне на отделената на дъното течност
xv. Добавяне на 500 мкл AW2 буфер. Центрофугиране на пълни обороти (14 000 rpm) за 3 минути
xvi. QIAamp колонката се поставя в нова 1.5 мл епендорфка и се добавят 200 мкл AE буфер или дестилирана вода за елуиране.
xvii. Инкубиране на стайна температура за 1 минута
xviii. Центрофугиране на 6000 x g (8000 rpm) за 1 минута
xix. Съхраняване на отделения елуент с ДНК на -20°C до последващ анализ

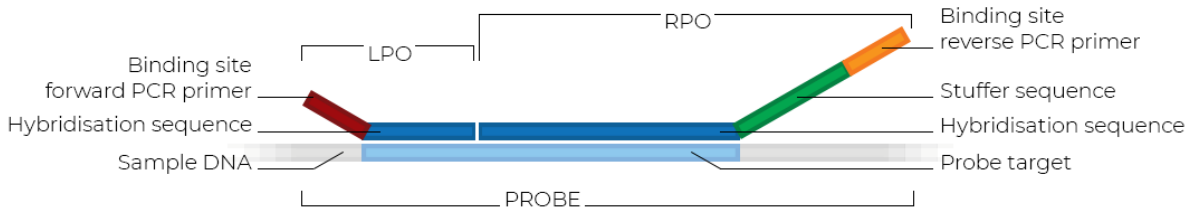
5.12. Определяне концентрация на изолираната геномна ДНК

Количеството и чистотата на изолираната ДНК се измери на NanoDrop 2000 спектрофотометър (Thermo Fisher Scientific, USA). Чистите ДНК проби дават съотношение A260/280 около 1.8, като стойности под 1.6 показват примеси от белтъци, а стойности над 2 – контаминация с РНК.

5.13. Анализ на CNVs с Мултиплексна лигазно-зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification - MLPA)

Широко използвана методика за анализ на промяна в броя копийни варианти (copy number variation – CNV) при неголеми геномни райони е мултиплексната лигазно-зависима амплификация MLPA. Този метод позволява анализ на делеции и дупликации при гени, регулиращи важни клетъчно-сигнални пътища, нарушени при мозъчните тумори.

При MLPA едновременно могат да се амплифицират до 50-60 олигонуклеотида-сонди, които са комплементарни и детектират таргетните ДНК последователности. При този анализ се използва една двойка универсални праймери, които амплифицират специфичните за таргетните гени сонди, за разлика от стандартния мултиплексен PCR (фиг. 5. 4).



Фигура 5.4. Схема на MLPA сонда (probe), състояща се от лява и дясна олигонуклеотидна част (LPO и RPO) със свързващи последователности към универсални праймери (прав – forward PCR праймер и обратен – reverse PCR праймер) и комплементарни участъци към таргетните гени (www.mrcholland.com).

Провеждането на MLPA анализ води до синтез на набор от PCR ампликони с приблизителна дължина 90-500 нуклеотида, които се разделят и анализират с капилярна електрофореза. Полученият електрофоретичен профил се сравнява с профила на референтни проби и се установява дали има изменения в броя копия на даден ген (делеция или дупликация).

♥ **Подготовка на пробите за MLPA анализ**

След екстракцията на ДНК от събраните глиомни проби се пристъпва към приготвяне на MLPA реакционната смес, според инструкциите на кита SALSA MLPA P105- Glioma 2 probemix (Lot. № D2-0217, MRC Holland, Netherland).

Протокол на MLPA анализа (фиг. 5.5):

i. Денатурация. Първоначално 5 мкл ДНК с концентрация между 50-250 нг се добавя към 3 мкл TE буфер и се денатурира за 5 мин на 98ºC, след което се охлажда до 25 ºC.

ii. Хибридизация на сондите към изолираната ДНК. Микс от специфични полусонди хибридизират към съседни таргетни последователности като към денатурираната проба се добавя 1.5 мкл микс от сонди и 1.5 мкл MLPA буфер за хибридизация. Получения микс се денатурира за 1 мин на 95ºC и хибридизират за 16 часа на 60 ºC.

iii. Лигиране на хибридизиралите сонди. Следващата стъпка е лигирането (свързването) на сондите, при успешно протекла хибридизация. Добавят се по 3 мкл съответно лигазни буфери Ligase-65: буфер А и буфер В, 25 мкл пречистена

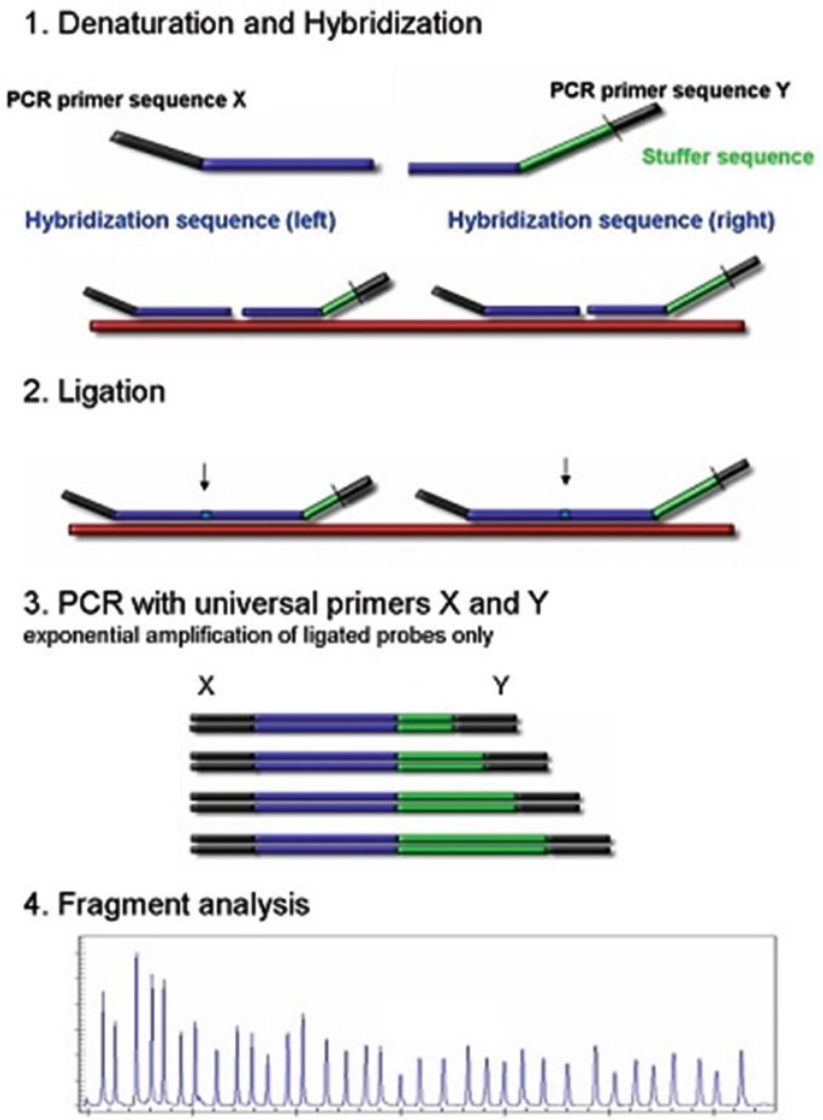
вода за инжекции и 1 мкл лигаза - Ligase-65. Инкубиране за 15 мин на 54 ºC. Следва термично инактивиране на лигазата при 98ºC за 5 мин и се поставят на 4ºC.

iv. PCR амплификация. Полученият общ фрагмент-сонда се амплифицира, като се използват универсални флуоресцентно белязани праймери и се получават различни по дължина ампликони. Компонентите на реакцията са: универсален праймер микс– 2 мкл; вода – 7.5 мкл и SALSA полимераза – 0.5 мкл. По 10 мкл от този амплификационен микс се добавя към всяка лигирана проба. Програмата на амплификационната реакция включват 35 цикъла (95 ºC – 30 сек, 60 ºC – 30 сек, 72 ºC – 60 сек) и 1 цикъл 72ºC – 20 мин.

v. Фрагментно разделяне, чрез капилярна електрофореза. По 2.5. мкл от всяка амплифицирана проба се смесват с 12 мкл формамид (Lot. № 2309912, Applied Biosystems) и 0.6 мкл ROX 500 стандарт (Cat. GMC-GT500R-PLUS, Lot. № A81869P, Amplia, Bratislava, Slovak Republic), подлагат се на денатурация на 95ºC за 5 мин и се поставят в лед. Всеки праймер е флуоресцентно белязан, което позволява фрагмента да бъде визуализиран по време на разделянето му с капилярна електрофореза.

vi. Визуализиране с капилярна електрофореза

Фрагментното разделяне се визуализира като електрофореграма и се анализира със следните софтуерни продукти Coffalyzer.net и GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).



Фигура 5.5. Последователност от стъпки при MLPA анализа. (1) Денатуриране на екстрахираната ДНК. И хибридизация на MLPA сондите, като всяка сонда се състои от два олигонуклеотида, хибридизиращи към съседни таргетни секвенции от ДНК. (2) Лигиране на двете сонди в една по-дълга цяла сонда. (3) PCR амплификация на лигираните сонди, като за различните сонди се използват еднакви праймерни двойки. (4) Фрагментно разделяне с капилярна електрофореза – отчитане флуоресценцията на белязаните праймери и генериране на специфична електрофореграма за анализ на данните.

♥ **Интерпретация на резултатите**

С този метод относителната височина на всеки фрагмент се сравнява (нормализира) с тази на референтните (контролни) ДНК проби, това съотношение показва относителния брой копия. Делецията се визуализира като намалена височина на пика, а амплификацията като повишаване два или повече пъти. Хетерозиготната делеция ще доведе до снижаване на пика с 35-50% на съответния амплификационен продукт. За интерпретация се използват следните cut-off стойности за крайното съотношение - final ratio (FR) на сондите (табл.5.11).

Таблица 5.11. Интерпретация на MLPA анализа и cut-off стойности на FR на сондите

Статус спрямо броя копия	Крайното съотношение Final ratio (FR)
Норма	0.80 < FR < 1.20
Хомозиготна делеция	FR = 0
Хетерозиготна делеция	0.40 < FR < 0.65
Хетерозиготна дупликация	1.30 < FR < 1.65
Хомозиготна дупликация	1.75 < FR < 2.15

В настоящата разработка е използван SALSA MLPA P105-Glioma 2 - D2-0217 probemix. С него могат да се определят промени в броя копия –делеции/дупликации на гени като *PDGFRA, EGFR, CDKN2A, PTEN, TP53, CDK4-MIR26A2-MDM, NFKBIA* и др. Китът съдържа 55 сонди, както и 12 контролни фрагменти, детектиращи различни автозомни локации, които е известно, че са сравнително стабилни като брой копия при глиомните тумори.

5.14. PCR анализ на *IDH1* и *IDH2* гените

Необходимите праймери за PCR амплификация на таргетните участъци на *IDH1* и *IDH2* са представени в таблица 5.12.

Таблица 5.12. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *IDH1* и *IDH2*

Ген	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
IDH1 F	5’-GAGATGGACGCCTATTTGTAAG-3’	328bp
IDH1 R	5’-ACGAAATATTCTGGGTGGC-3’	
IDH2 F	5’-CACTTCCCACTCCTTGACAC-3’	306bp
IDH2 R	5’-AATGGAACTATCCGGAACATC-3’	

F - Forward primer (прав праймер); R- Reverse primer (обратен праймер)

Оптимизацията на условията на PCR реакциите включват промени в температурата и времето за хибридизация на праймерите, концентрация на компонентите, време за синтез на желания продукт. Финализираните условия с оптималните концентрации на компонентите в реакционната смес са посочени в Таблица 5.13.

Таблица 5.13. Концентрация на компонентите, участващи в PCR реакцията за намножаване на *IDH1* и *IDH2* гените

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
Високомолекулна ДНК (50-100 ng)	2
Праймер F и R (0.2μM всеки)	1
Разтвор на 0.2 μM дНТФ	2
10x Prime Taq буфер	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq (0.1 U)	0.1
Дестилирана вода	16.4

Крайният обем на реакцията е 25 мкл. Реактивите дНТФ, Prime Taq буфер, термостабилна полимераза - Prime Taq бяха поръчани от GENET BIO (Chungnam, Korea). Получената реакционна смес беше вортексирана и центрофугирана за кратко. Програмата на PCR за амплификация на крайните, специфични продукти е посочена в таблица 5.14.

Таблица 5.14. PCR програма за амплификация на *IDH1* и *IDH2* фрагментите

Стъпка	Температура	Време	Цикъл
Начална денатурация на ДНК	95ºC	5 мин	1
Денатурация	95ºC	30 сек	35
Хибридизация на праймери	60ºC	30 сек	
Синтез на нова ДНК верига	72ºC	40 сек	
Завършване на синтеза	72ºC	5 мин	1

5.15. Електрофореза в агарозен гел

Качеството и относителното количество на получените чрез PCR амплификационни продукти се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 3% агарозен гел и хоризонтална електрофорезна система, като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер, спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент. ДНК фрагментите се разделят в зависимост от молекулната им маса, а разтвореният в агарозата етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина.

Използвани буфери за агарозната гел-електрофореза:

- 1x TBE буфер: TRIS – 90 mmol/l; Борна киселина – 90 mmol/l; Na2EDTA – 1 mmol/l
- Буфер за нанасяне на пробите: 0.25% бромфенол блу; 25% фикол

Агарозният гел беше изготвен върху нивелирна масичка и ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800 mm), със стартови гребени с размери на ямките 5x4x1 mm. Хоризонталната електрофореза беше проведена на апарат за подводна гелелектрофореза A. Hartenstein (Wuerzburg, Germany) и токоизправител Consort EV222 (Turnhout, Belgium). Пробите бяха визуализирани на трансилюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH (Vienna, Austria) и архивирани на фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc. (Santa Clara, CA, USA).

5.16. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотид трифосфати (ддНТФ)

Секвенирането по Sanger позволява определяне на нуклеотидната последователност на участък от ДНК. Базира се на PCR, като в основата е случайното включване на 2', 3'-дидезоксинуклеотид 5'-трифосфати (ддНТФ), които не позволяват удължаване на растящата ДНК верига. Поради липсата на 3'-хидроксилна група, реакцията се прекратява в различни места. В резултат на това се получават различни по дължина ДНК фрагменти с еднакво начало и различен край, определен от включването на един от четирите вида ддНТФ. Тези фрагменти се разделят електрофоретично и се визуализират благодарение на флуоресцентно белязаните терминиращи ддНТФ.

5.16.1. Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI3130 Sequence Genetic Analyzer

Автоматичният секвенатор ABI3130, използвайки капилярната гел-електрофореза разделя ДНК фрагментите с разлика един нуклеотид. В секвенционната реакция освен стандартните дНТФ се използват и терминиращи флуоресцентно белязани ддНТФ, чиято флуоресценция се детектира с аргонов лазер. Всеки от четирите ддНТФ (ддГ, ддА, ддТ и ддЦ) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при $\lambda = 488$ nm (това е дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в секвенатора). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин. Всеки от четирите акцептора на ддНТФ емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

5.16.2. Подготовка на пробите и директно секвениране по Sanger

Директното секвениране по Sanger включва следните стъпки:

i. PCR амплификация на желания ДНК фрагмент

PCR амплификацията на желания ДНК фрагмента се извършва при описаните по-горе условия за съответните гени.

ii. Пречистване на амплифицираната ДНК

Пречистването на амплификационния продукт включва премахване на останалите в пробата дНТФ и праймери, които биха повлияли по-нататъшните реакции. Това се осъществява с ензимния микс ExoSAP-IT (Cat. № 78205, ThermoFisher Scientific) описан от Werle и сътр. (86). ExoSAP-IT реагентът съдържа два хидролитични ензима в буфер - Екзонуклеаза I (Exo), която разгражда едноверижни ДНК фрагменти (неизползваните праймери след PCR реакцията) и алкална фосфатаза (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP), която премахва 5’- фосфатния остатък от дНТФ, като така ги инактивира. Предимство на ензимния метод на пречистване е, че няма загуби на продукт при процедурата, използва се много малко количество матрица, бързо и лесно за изпълнение.

Протокол на ензимния метод на пречистване:

- ♥ В епендорфка от 0.5 ml се смесват 1.5 мкл амплификационен продукт и 0.5 мкл ExoSAP-IT.
- ♥ Инкубира се на 37ºC за 30 min, след което реакцията се спира чрез инактивиране на ензимите на 80ºC за 15 min.

Така пречистената ДНК матрица може да се съхранява на -20ºC.

iii. Провеждане на секвенционна реакция

За секвенционната реакция е използван кит за секвениране BigDyeTerminator v.3.1 sequencing kit (Applera Corporation, Norwalk, CA, USA).

Протокол на секвенционната реакция: към пречистената ДНК матрица се добавят 0.3 мкл праймер с концентрация 10 пикомола/мкл, 2 мкл (5x) секвенционен буфер, 1 мкл от BigDyeTerminator v.3.1, дестилирана вода до краен обем 10 мкл. Реагентите се поставят в PCR апарат с програма посочена в табл. 5.15.

Таблица 5.15. Програма за провеждане на секвенционната реакция

Стъпка	Температура	Време	Брой цикли
Денатурация на ДНК	95ºC	20 сек	
Хибридизация на праймери	50ºC	15 сек	25
Синтез на нова ДНК верига	60ºC	3 мин	

iv. Преутаяване на секвенционния продукт

Секвенционните продукти се преципитират (преутаяват) с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди.

Протокол за преутаяване на секвенционния продукт:

- ♥ Към секвенционната проба се добавят 1/10 от обема 1.5M натриев ацетат с pH>8 / 250 mM EDTA буфер и се размесва добре чрез неколкократно пипетиране.
- ♥ Добавя се 80 мкл студен абсолютен етанол, вортексира се и се центрофугира за 15 мин при 12 000 rpm. Супернатантата се отстранява внимателно.

- ♥ Получената утайка се промива с 200 мкл 80% етанол, вортексира се и се центрофугира за 10 мин на 12 000 rpm.
- ♥ Супернатантата се премахва чрез изсмукване с вакуум и утайката се суши за 12 часа при стайна температура на тъмно.

Сухата утайка може да се съхранява на тъмно при стайна температура за няколко дни.

v. Разтваряне на секвенционния продукт и електрофоретично разделяне

Към сухите утайки се добавят 12 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, CA, USA). Пробата се вортексира. Поставя се в PCR апарата за денатурация за 5 мин на 94ºC и се прехвърля върху лед за 5 мин. Следва отново вортексиране и леко центрофугиране, за да се събере цялото количество на дъното. Така приготвената проба е готова за електрофоретично разделяне и анализ. Пробите се разделят електрофоретично на капилярна електрофореза ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Woburn, MA, USA).

vi. Визуализиране на резултатите

Секвенционните данни се обработват автоматично от програмата ABI3130 Data Collection Software v3.0 и се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

За провеждането на PCR реакцията, ензимното пречистване на получения продукт и последващата секвенционна реакция се използват следните апарати: GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA) и Bioer XP cycler, (Hangzhou, P.R. China). Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

5.17. Провеждане на PCR в реално време за установяване наличието на вируси в изследваните проби

Изолираната тотална ДНК от събраните проби се анализира за наличието на активна ЦМВ инфекция. За детекция се използва комерсиален кит - AmpliSens® CMV-screen/monitor-FRT PCR (FRT-100 F), (Cat. № R-V7-100-S, AmpliSens, Russia).

Китът е базиран на TaqMan метода за детекция на специфични последователности от генома на ЦМВ. При изолирането на всяка ДНК се добавя 10 мкл вътрешна контрола - STI-87 (IC) към лизираната проба.

Протокол за PCR амплификацията:

i. Приготвя се смес от буфера PCR-mix-2-FRT и полимеразата TaqF, като 30 мкл от полимеразата се добавят към епруветката с 300 мкл PCR-mix-2-FRT, на кита. Получената смес се вортексира без да се разпенва и може да се съхранява до 2-3 месеца при 2-8 °C.

ii. За всяка реакция се използват 10 мкл PCR-mix-1-FL CMV screen/monitor и 5 мкл от приготвената по-горе смес (PCR-mix-2-FRT и TaqF).

iii. Към получения микс от 15 мкл се добавят 10 мкл от изолираната ДНК до краен обем 25 мкл.

Получената реакционна смес се вортексира и центрофугирана за кратко (табл.5.16).

Таблица 5.16. PCR реакция за детекция на ЦМВ

Реактив	Количество за една реакция (мкл)
PCR-mix-2-FRT + TaqF	5
PCR-mix-1-FL CMV screen/monitor	10
ДНК	10
Краен обем	25

Програмата на PCR за амплификация на крайните, специфични продукти е посочена в табл. 5.17.

Таблица 5.17. Програма на PCR апарата за амплификация на ЦМВ

Стъпка	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация на ДНК	95ºC	15 мин	1
Денатурация	95ºC	5 сек	
Хибридизация на праймери	60ºC	20 сек	5
Синтез на нова ДНК верига	72ºC	15 сек	
Денатурация	95ºC	5 сек	
Хибридизация на праймери	60ºC	30 сек	40
Синтез на нова ДНК верига	72ºC	15 сек	

В анализите бяха включени положителни контроли и негативни контроли, според инструкциите на производителя. За мониториране на ДНК екстракцията и последващата амплификационна реакция са добавени две контроли:

- ♥ екзогенна – синтетичен олигонуклеотид (Internal Control STI-87)
- ♥ ендогенна – ДНК фрагмент на β-глобиновия ген

Използването на β-глобиновия ген позволява мониториране на етапите на екстракция и ДНК амплификация, както и адекватността на съхранение на пробите. Амплификацията на всеки таргетен ген се осъществява, чрез флуоресцентно белязани праймери.

При анализа на данните амплификацията на β-глобиновия ген се наблюдава на канала за FAM флуорофора, амплифицираната ДНК на ЦМВ се отчита на канала за JOE, а екзогенната контрола STI-87 (IC) се отчита на ROX (табл.5.18). Резултатите се отчитат в зависимост от това дали флуоресцентната крива пресича специфично зададения threshold – граничното ниво.

Таблица 5.18. Флуоресцентни канали за интерпретация на PCR резултатите

Кит	FAM	JOE	ROX
AmpliSens CMV-FRT PCR kit	β-глобинов ген	ДНК фрагмент от Pol гена на CMV	Синтезирана секвенция - Internal Control STI-87L (IC)

5.18. Статистически анализи

5.18.1. Проверка на хипотеза

В настоящата дисертация бяха използвани статистически тестове, които имат за цел да проверят дали наблюдаваните разлики и резултати не са случайни и дали попадат в рамките на грешката. Това се осъществява чрез проверка на хипотеза. Хипотезата за дадена популация се тества (проверява) чрез анализ на събраните данни от изследваната представителна извадка. Първоначално дефинираме нашата хипотеза като съществуват два вида хипотези - нулева хипотеза (H0) и алтернативна хипотеза (H1). Според нулевата хипотеза няма връзка или разлика между групите или променливите, като при H0 наблюдаваните резултати са случайни. Според алтернативната хипотеза - H1 съществува връзка между групите/променливите.

H0: μ1=μ2 средноаритметични стойности на генералната съвкупност за двете групи са равни

H1: μ1≠ μ2 средноаритметичните стойности на генералната съвкупност за двете групи са различни

Съществуват две възможности от грешки - отхвърляне на H0, когато тя е вярна, наричана грешка от I род или α грешка и приемане на H0, когато тя не е вярна, наричана грешка от II род или β грешка.

Събраните доказателства за отхвърлянето на H0 се обозначават като **вероятност или p-стойност**. За да отхвърли нулевата хипотеза, изследователят задава т.нар. ниво на значимост или α, което най-често е 0.05. Така при $p \leq \alpha$ (0.05) се отхвърля нулевата хипотеза и наблюдаваните резултати са достатъчно доказателство, че H1 хипотезата е вярна. Докато при $p > \alpha$, H0 не се отхвърля.

5.18.2. Предварително изследване на данните (EDA-explore data analysis)

Това е критична стъпка в процеса на анализ на данните, преди да се пристъпи към по-нататъшни статистически анализи. Целта е да се определи разпределението на данните, качеството им, наличие на аномалии в данните и др., с цел подбор на правилен параметричен или непараметричен статистически тест и последващи анализи.

Статистическите тестове се разделят на две големи групи: параметрични и непараметрични тестове.

♥ **Параметричните тестове** са вид статистически тестове, които изискват определени предположения относно разпределението на данните в популацията, от която са взети извадките. Това включва нормално разпределение на данните и известни параметри като средно и стандартно отклонение. Параметричните тестове са точни и ефективни, когато условията им са изпълнени. Нарушенията на предположенията могат да доведат до неверни заключения и най-често са вследствие на малка извадка, неравномерно разпределени извадки, различие във формата на разпределението на извадките. Всяко нарушение води до увеличаване на вероятността да се допусне грешка от първи род. Примери за параметрични тестове включват t-теста за сравнение на средни стойности, ANOVA (анализ на вариацията/дисперсията), корелационния анализ на Пиърсън и др.

♥ **Непараметричните тестове** се използват, ако предпоставките за параметричните тестове не са изпълнени. При непараметричните тестове не се изисква предположение относно разпределението на данните (популацията). За разлика от параметричните тестове, които изискват определени параметри (средно и стандартно отклонение) да бъдат известни и да следват нормално разпределение, непараметричните тестове са по-гъвкави и могат да се използват за анализ на данни, които не отговарят на тези предположения. Те са особено полезни при работа с малки извадки, рангови данни или когато данните са на номинално или ординално ниво. Примери за непараметрични тестове включват теста на Ман-Уитни, теста на Уилкоксън, Крускал-Уолис теста и теста на Каплан-Майер. Препоръчително е при непараметричните тестове данните да се представят като медиана и съответния процентил.

Медиана – средна точка (стойност на променлива), която разделя половината от наблюденията на две половини, под и над нея.

Процентил (percentile) представлява стойност, под която се намира даден процент от разпределението. Например, 75-тият процентил е стойността на променливата, при която 75% от наблюдаваната извадка е под тази стойност и съответно 25-ти процентил е стойността на променливата, при която 25% от наблюдаваните стойности са под тази стойност.

5.18.3. Тест на Хи-квадрат - χ^2 (Chi-Square Test)

Това е статистически метод, използван за изследване на връзката между категорийни променливи. Този тест сравнява и оценява наблюдаваните и очакваните честоти в различни категории.

5.18.3.1 Точен тест на Фишер (Fisher's Exact Test)

Точният тест на Фишер (Fisher's Exact Test) е подобен на теста на Хи-квадрат. Той се използва за анализ на категорийни променливи, особено когато имаме малки извадки, очакваните честоти в някои клетки са < 5 и се работи с 2x2 таблици. При големи извадки тестът на Фишер и тестът на Хи-квадрат дават сходни резултати, но при малки извадки тестът на Фишер е по-точен и се предпочита.

За определянето на силата на асоциацията между категорийни променливи може да се използва показателят Cramer's V. Стойността му варира от 0 (няма връзка) до 1 (пълна връзка). Този показател не зависи от размера на извадката, позволява сравнение

между различни изследвания и оценява ефекта на връзката, не само статистическата значимост.

Интерпретация на Cramer's V за 2x2 таблици:

- < 0.1- незначителна връзка
- 0.1-0.3 - слаба връзка
- 0.3-0.5 - умерена връзка
- 0.5 - силна връзка

5.18.4. Тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney U тест)

Това е непараметричен статистически тест, който проверява дали разпределението между **две независими** групи е статистически значимо. Данните са ординални и нямат нормално разпределение, като се сравняват **медианите**, а не средноаритметичните стойности. Нулевата хипотеза на този тест твърди, че няма разлика между разпределението на двете групи.

5.18.5. Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis) тест

Тестът на Крускал-Уолис е непараметричен статистически тест, който сравнява разпределенията между **три и повече независими групи**. Тестът се базира на сравняване ранговете на наблюденията. Ако тестът отхвърли нулевата хипотеза и покаже разлика в медианите на групите с $p < 0.05$, означава, че има различие в разпределението на групите. За да се конкретизира различието се провеждат допълнителни тестове, включващи теста на Dunn’s post-hoc тест (сравява двойките групи) и Бонферони (Bonferroni) за корекция на стойностите. **Dunn’s post-hoc тестът** е приложение на корекция на нивото на значимост след използване на Крускал-Уолис теста, за да се предотврати увеличаване на вероятността от тип I грешка при извършване на множество сравнения между групи. Този тест извършва сравнение на всички възможни двойки между групите и осигурява коригирани стойности на p. **Корекцията на Бонферони** се прилага, когато се извършват многократни хипотезни тестове и има риск от увеличаване на вероятността за получаване на фалшиво положителни резултати. Тази корекция намалява нивото на значимост, като дели предварително зададеното ниво на значимост (например 0.05) на броя на извършените тестове. Така, се осигурява по-строг критерий за статистическа значимост.

5.18.6. Корелационни анализи – идентифицира асоциацията (корелацията) между две случайни променливи. Прилага се за анализ на корелацията между експресионните нива на микроРНК и клинико-патологични променливи (напр. OS, PFS, степен на тумора и др.). Най – често се използват коефициент на корелация на Пиърсън, ранг на корелация на Спирмън.

♥ **Корелационен анализ на Пирсън (Pearson correlation)**

Този анализ измерва **линейната връзка** между две количествени променливи. Степента на корелация се отбелязва с „**r" (**коефициент на корелация на Пирсън) и заема стойности от -1 до +1. При r = 0 липсва линейна зависимост между променливите, т.е. липсва корелация. На единица изменение на едната променлива стойностите на другата се променят със стойността на коефициента r. При r = 1 (-1) има пълна положителна (отрицателна) линейна връзка между стойностите на двете променливи. За интерпретация на стойностите на корелацията най-често се използват следните интервали:

- $0.1 \leq |r| < 0.3$ – слаба корелация
- $0.3 \leq |r| < 0.5$ – умерена корелация
- $0.5 \leq |r| < 0.7$ – значителна корелация
- $0.7 \leq |r| < 0.9$ – силна корелация
- $0.9 \leq |r| < 1$ – много силна корелация

Предположенията, които трябва да бъдат изпълнени за прилагане на корелационния анализ Пирсън са **нормално разпределение на данните, линейна връзка между променливите, интервална или метрична скала на данните и липса на значителни отклонения** (outliers).

♥ **Рангова корелация на Спирмън (Spearman's rank correlation)**

Непараметричен метод за измерване на степента на корелация между две променливи. Този тест не изисква данните да са нормално разпределени и е подходящ за рангови (ординални) данни или за непрекъснати данни, които не отговарят на предположенията за нормалност. Коефициентът на Спирмън се означава с ρ или r_s. Диапазонът на коефициента (ρ или rs) може да варира от -1 до +1, като rs близък до +1/-1 показва пълна положителна/отрицателна монотонна връзка.

Интерпретацията включва:

- $\rho = 0$ показва липса на монотонна връзка
- $0.1 \leq |\rho| < 0.3$ – слаба корелация
- $0.3 \leq |\rho| < 0.5$ - умерена корелация
- $0.5 \leq |\rho| < 0.7$ - значителна корелация
- $0.7 \leq |\rho| < 0.9$ - силна корелация
- $0.9 \leq |\rho| < 1$ - много силна корелация

При този метод може да се определи корелацията между две променливи, когато връзката е монотонна (възходяща или низходяща), но не е необходимо да е линейна.
При установена корелационна зависимост между две случайни променливи със статистическа значимост, може да се направи регресионен анализ, за да се потърсят причинно-следствените връзки.

5.18.7. Регресионен анализ

При регресионния анализ се оценява как зависимата променлива (вследствие) се променя и варира като функция от промените на независимите променливи (причините). Това е анализ, който ни дава информация за **причинно-следствените връзки**. Коефициентът на регресия се означава с β и има следната интерпретация: ако $\beta>0$, то повишаването на независимата променлива води до повишаване на зависимата, докато при $\beta<0$ повишаването на независимата променлива води до понижаване стойността на зависимата. Измерва се освен силата и характерът на тази връзка, като този анализ е широко използван при експериментални данни.

♥ **Линейна регресия**

Това е статистически метод, използван за оценка на връзката между зависима променлива и една или повече независими променливи (предиктори) чрез линейно уравнение. Основната цел е да се предскаже стойността на зависимата променлива въз основа на стойностите на независимите променливи.

♥ **Логистична регресия**

Представлява статистически метод, използван за моделиране на **бинарна зависима** променлива (с два възможни изхода, като 0 и 1) чрез логистична функция. Тя оценява вероятността дадено събитие да се случи въз основа на една или повече независими променливи.

При наличието на статистически значима връзка между зависимата и независимата променливи може да определим силата на тази връзка с т. нар. OR (odd ratio). OR представлява риска да се случи определено събитие под въздействието на дадена независима променлива при една група в сравнение с друга група, при която липсва тази променлива. Ако OR = 1 вероятността е еднаква за пациентите и контролите и заболяването не е свързано с дадената променлива. При OR >1 повишаването на променливата е рисков фактор и е свързана със заболяването. Докато при OR<1 има обратна зависимост и изследваната променлива е с протективен характер. Тесен 95% доверителен интервал (CI – confidence interval) показва висока точност на OR.

5.18.8. Анализ на оцеляването (Survival Analysis)

Анализът на оцеляването оценява връзката и влиянието на показателите, които ни интересуват спрямо преживяемостта или периода без рецидив на пациентите. Тестът на Каплан-Майер и log-rank теста са сред най-често използваните за този вид анализ.

5.18.8.1. Тест на Каплан – Майер (Kaplan-Meier)

Това е непараметричен статистически метод за анализ на данните свързани с времето до определено събитие (напр. смърт или рецидив). С този метод може да се оцени преживяемостта след поставяне на диагнозата (OS) или времето до настъпване на рецидив след лечение (PFS). Приложим е при цензурирани данни, когато някои от участниците са изгубени от проследяване или не са изпитали събитието в рамките на изследователския период. Получената крива на оцеляване (survival curve) позволява да се сравняват оцеляването на пациентите при различни условия, различни групи лечения и т.н.

5.18.8.2. log-rank тест

С този непараметричен статистически тест се сравнява разпределението на преживяемостта между две или повече групи и се определя дали при анализа на оцеляването има статистическа разлика при отделните групи. Този тест се базира на предположенията, че наблюденията са независими и групите имат сходни рискове през целия период на наблюдение. Той е широко използван за анализ на времето до събитие като смърт (OS) или рецидив на заболяване (PFS).

С Каплан-Майер теста оценяваме вероятността за оцеляване във времето, докато с log-rank теста сравняваме разпределението на оцеляването между различни групи. Комбинацията им се използва широко за анализ на данни, свързани с time-to-event (време до събитие). Тестовете на Каплан-Майер и log-rank сравняват оцеляването на различни групи, но не дават информация за променливи, които мога да имат връзка и да повлияят оцеляването.

5.18.9. Модел на пропорционалните опасности на Кокс (Cox proportional hazards model)

С този модел се изследва **връзката между времето до събитието** (като смърт или рецидив) и една или повече **прогнозни променливи**. Нарича се още **регресионен модел на Кокс** и е метод, чрез който се оценява съотношението на опасностите (HR – hazard ratio), с цел определяне на влиянието на ко-променливите (напр. генетични маркери, клинични характеристики) върху преживяемостта на пациентите. **HR показва силата и посоката на връзката между предикторите и вероятността да настъпи събитието**. HR >1 показва повишен риск за настъпване на събитието, докато HR < 1 показва понижен риск. Моделите на Кокс предоставят анализ на рисковите фактори, като по този начин се идентифицират значими прогностични индикатори и се подпомага разработването на **персонализирани стратегии в медицината**. Широко използван метод в епидемиологичните проучвания и клиничните изпитвания.

♥ **Еднофакторен модел на Кокс** се използва за оценка на въздействието на една независима променлива върху времето до настъпване на събитие (напр. смърт). Моделът приема, че съществува пропорционална опасност между наблюденията, което позволява оценка на съотношението на опасностите (HR) за различни нива на независимата променлива.

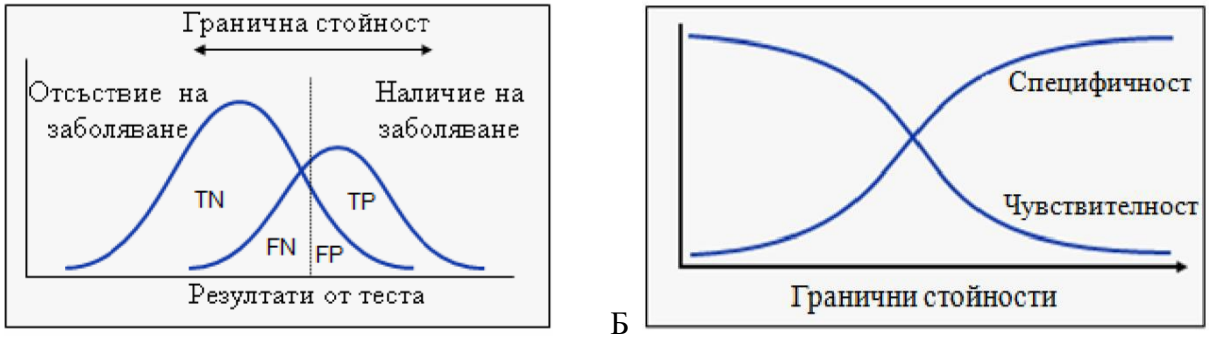
♥ **Многофакторният модел на Кокс** позволява оценка на въздействието на множество независими променливи върху времето до настъпване на събитие. Моделът оценява съотношението на опасностите, като взема предвид комбинираното влияние на всички включени променливи.

Ситуация, при която две или повече независими променливи са силно свързани помежду си (показват колинеарност**)** може да доведе до затруднения при оценката на техния индивидуален ефект върху зависимата променлива. Ако корелацията между две променливи е много висока (над 0.8 или 0.9), това може да е признак за мултиколинеарност. Наличието на мултиколинеарност в моделите на Кокс може да

доведе до неточни коефициенти, което да намали надеждността на модела. Затова изключването на мултиколинеарността е важна стъпка преди пристъпване към моделите.

5.18.10. Анализ на ROC кривите (Receiver Operating Characteristic curve)

Методът на ROC кривите се използва за определяне на диагностичната точност на даден биомаркер за разграничаване на отделни групи пациенти (напр. различни степени глиоми). Този метод предполага, че винаги една част от изследваната група няма да бъде класифицирана правилно, попадайки в т.нар фалшиво негативните (FN - False Negative) или фалшиво позитивните (FP- False Positive) категории, за разлика от правилно класифицираните - истински позитивни (TP - True positive) и истински негативните пациенти (TN- True Negative) (фиг. 5.6).



Фигура 5.6. Графично представяне на разпределението на позитивните и негативните случаи (А); разпределението на специфичността и чувствителността спрямо избраната гранична стойност (Б) *TP (true positive) - истински позитивни; TN (true negative) - истински негативни; FN (false negative) – фалшиво негативни; FP (false positive) - фалшиво позитивни

При този тест се определят няколко показатели, показани на таблиица 5.19.

Таблица 5.19. Диагностични параметри на анализа на ROC кривите

Показател	Формула	Интерпретация
Чувствителност (TPR)	TP / (TP + FN)	Делът на коректно идентифициране положителни случаи
Специфичност	TN / (TN + FP)	Делът на коректно идентифицираните отрицателни случаи
Позитивна предиктивна стойност (PPV)	TP / (TP + FP)	Вероятността позитивният резултат коректно да показва присъствието на заболяването
Негативна педиктивна стойност (NPV)	TN / (TN + FN)	Вероятността негативният резултат коректно да показва отсъствието на заболяването

TPR- True Positive Rate, PPV – positive predictive value, NPV- negative predictive value

ROC кривите графично представят чувствителността (оста y) спрямо 1-специфичност (оста x) при различни прагове на биомаркера. По-високите гранични стойности на маркера повишават специфичността, но намаляват чувствителността, докато по-ниските прагове повишават чувствителността, но намаляват специфичността (увеличат се фалшиво позитивните резултати). Когато се комбинират множество биомаркери, мултимаркерен ROC анализ, се изчисляват коефициентите, определящи тежестта на всеки един от маркерите (87), за да увеличи максимално площта под кривата (AUC), показвайки цялостната диагностична точност. ROC крива близо до горния ляв ъгъл на графиката е индикативна за високо дискриминативни диагностични биомаркери, докато кривите, разположени близо до диагоналната референтна линия са с ниска диагностична точност.

Анализ на площта под кривата - AUC (Area Under the Curve)

Анализът на площта под кривата (AUC) е статистически метод, който оценява качеството на диагностични тестове и модели за класификация. AUC варира между 0 и 1, като:

♥ AUC = 0.5 показва, че тестът не е по-добър от случайно предположение.

♥ AUC = 1 показва, че диагностичният тест напълно разграничава положителни и отрицателни случаи.

Диапазонът за интерпретиране на резултатите е:

- $0.5 < AUC < 0.7$ - слаба диагностична способност.
- $0.7 \leq AUC < 0.8$ - умерена диагностична способност.
- $0.8 \leq AUC < 0.9$ - добра диагностична способност.
- $AUC \geq 0.9$ - отлична диагностична способност.

5.18.11. Анализ на сигналните пътища (pathway analysis)

Това е метод за анализ и интерпретиране на биологичните пътища и молекулярни механизми, които са свързани с изследваните от нас променливи (напр. промяна в експресията на микроРНКи). С тези анализи се изследват сложните мрежи и взаимодействия между гени и протеини, които играят роля в развитието и прогресията на заболяванията. Чрез използването на бази данни като KEGG и Gene Ontology (GO) pathway analysis в комбинация със софтуерни инструменти, е възможно откриването на

ключови регулаторни молекули и потенциални терапевтични таргети, с бъдещо приложение в клиничната практика.

♥ GO е система за класификация, която описва функциите, местоположенията и процесите на гените в различни организми. GO позволява анализ на биологичните пътища и процеси чрез анотиране на гените и идентифициране на функционалните взаимодействия. Функциите на гените се класифицират в три основни категории:

- биологичен процес (Biological Process, BP) показва с какви процеси е свързана функцията на гените (клетъчно делене, метаболизъм и др.).
- молекулярна функция (Molecular Function, MF) - свързване на молекули
- клетъчен компонент (Cellular Component, CC) показва къде е локализирана генната функция (ядро, клетъчна мембрана и др.).

♥ KEGG е база данни с информация за молекулярните реакции и връзките между гени, протеини и метаболити. KEGG позволява анотиране на гени и анализ на биологични пътища, което помага за разбиране на сложните взаимодействия на молекулярно ниво.

5.18.11. Статистически софтуери, използвани в дисертацията

В настоящата дисертация получените резултати бяха анализирани с помощта на следните софтуерни програми:

- SPSS v22.0 (IBM, САЩ) за статистически анализи
- R v.4.4.3 (CRAN, САЩ), като бяха използвани основните пакети от „tidyverse“**,** включително „ggplot2“, „readr“, „survival“, „pROC“ и др.

РЕЗУЛТАТИ

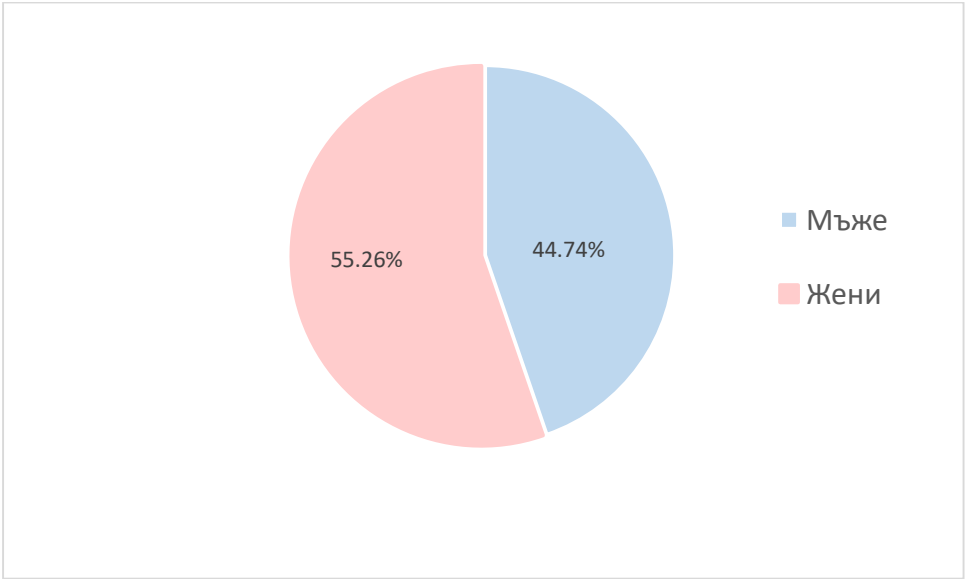
„Човешкият мозък притежава удивителната способност да открива смисъл в хаоса.“
— Мерилин Фъргюсън

6. РЕЗУЛТАТИ

6.1. Епидемиологична характеристика на изследваната представителна извадка от пациенти с глиоми.

В настоящия дисертационен труд са включени 76 пациенти с глиоми. Пациентите са консултирани и насочени към настоящото проучване благодарение на колаборацията с УМБ „Аджибадем Сити Клиник Токуда“, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, и ГМДЛ "Геника".

Средната възраст на изследваните пациенти е 49.73 ± 17.77 г. Разпределението по пол съответно е 42 (55.26%) от пациентите са от женски пол и 34 (44.74%) от мъжки пол (фиг. 6.1).



Фигура 6.1. Разпределение на пациентите по пол.

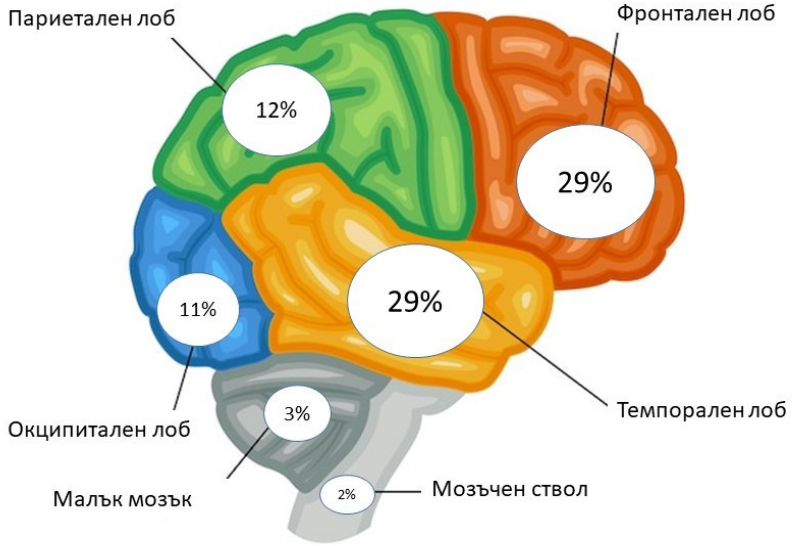
От тях 54 (71.05%) пациенти са с данни за ВСГ (степен 3-та или степен 4-та по СЗО) и 22 (28.95%) пациенти са с данни за НСГ (степен 1-ва или степен 2-ра по СЗО). От групата на високостепенните глиоми 46 (60.52%) пациенти са с диагноза глиобластом - 4-та степен по СЗО и 7 (9.21%) пациенти са с 3-та степен по СЗО, от които 4ма (5.3%) пациенти са с диагноза олигодендроглиом и 3ма (3.9%) са с диагноза астроцитом. Групата на НСГ обхваща 18 (23.68%) пациенти с 2-ра степен по СЗО – 2ма (2.6%) с диагноза олигодендроглиом и 16 (21.1%) с астроцитом, както и 4 (5.26 %) пациенти с астроцитом, 1-ва степен по СЗО (фиг. 6.2).



Фигура 6.2. Разпределение на пациентите според степента по СЗО. Степен 1-ва и 2-ра се отнасят към групата на НСГ, степен 3-та и 4-та се отнасят към групата на ВСГ.

По отношение на KPS статуса, 43 (56.58%) пациенти са с показател по – висок или равен на 70, от тях 24 (31.58%) са с ВСГ, а 19 (25%) са с НСГ. Броят на пациентите с KPS статус по-нисък от 70 е 30 (39.47%), от които 27 (35.53%) са ВСГ и 3 (3.95%) са с НСГ. От изследваната извадка 20 (26.32%) пациенти са с рецидивирали глиоми, а 56 (73.68%) пациенти са с първични глиоми.

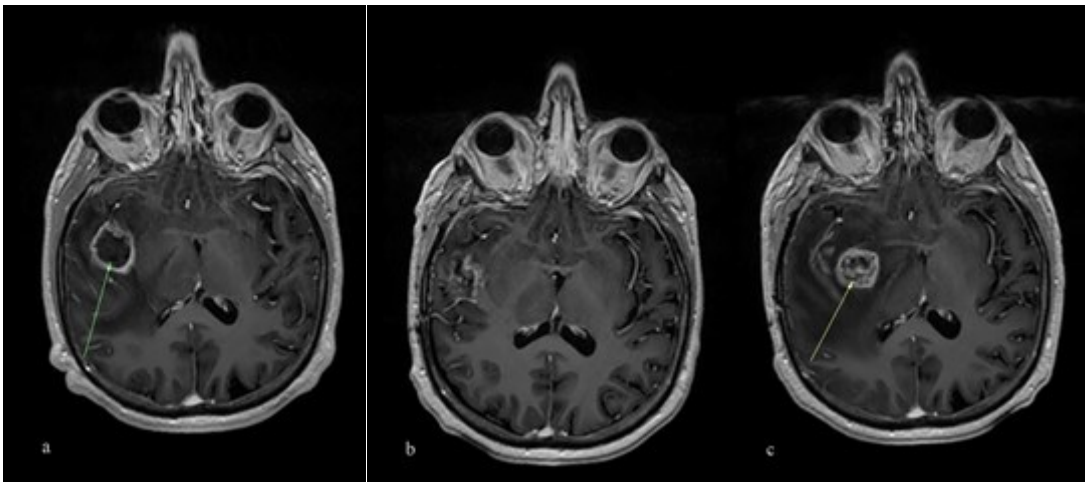
При 17 (22.37%) пациенти размерът на тумора е над 5 см, при 47 (61.84%) е между 3-5 см, само при 9 (11.84%) е под 3 см, докато за 3 (3.95%) пациенти липсват данни. Разпределението на глиомните тумори, според локализацията при изследваната кохорта, е представено на фигура 6.3. При 29% от изследваните пациенти са засегнати фронталният и темпоралният дял, 12% са локализирани париетално, 11% са локализирани окципитално, 3% са локализирани в малкия мозък и 2% засягат мозъчния ствол.



Фигура 6.3. Процентно разпределение на глиомите според локализация на засегнатите мозъчни дялове. Представените проценти са общи за ВСГ и НСГ при данни за 66 пациенти.

За периода на проследимост на пациентите в извадката от 2018 г. до 2024 г. 54 (71.05%) от пациентите са починали, 19 (25%) пациенти са живи и за трима липсват данни. От живите пациенти 17 са под 50 г. при диагностицирането, като 13 от тях са с диагноза НСГ.

С диагноза глиобластом, най-агресивният и злокачествен тумор, са 46 (60.52%) от изследваните пациенти (фиг. 6.4.).



Фигура 6.4. ЯМР на 58-годишен пациент с глиален тумор (потвърден молекулярно - хистологично като глиобластом). (a) ЯМР преди операцията - със стрелка е показан туморът (b). Следоперативен ЯМР-след пълна хирургическа резекция (c). ЯМР на рецидивирал глиобластом след 5 месеца.

6.1.2. Резултати от анализите за асоциации между клиничните характеристики

Проведените статистически тестове за определяне на асоциации между клинико-патологичните характеристики показаха следните значими резултати:

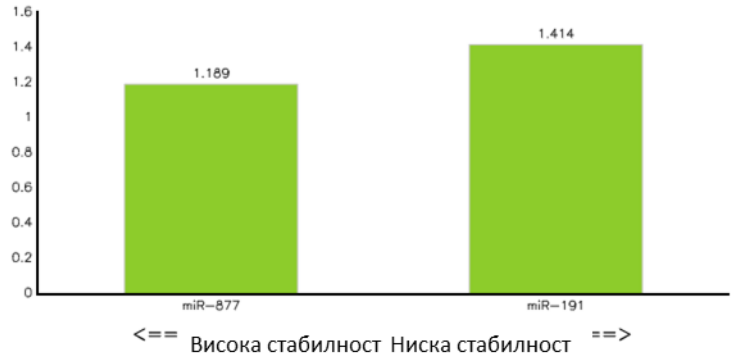
♥ в изследваната извадка **възрастта** на пациентите показа негативна корелация с общата преживяемост (**OS**) (rho = - 0.629, p = 1.13E-9), преживяемостта без рецидив (**PFS**) (rho = -0.446, p = 6.9E-5) и **KPS** (rho = -0.397, p = 3.8E-4). Увеличаването на възрастта е свързано с по-кратки периоди на OS, PFS и по-ниски стойности на KPS. Възрастта на пациентите показа връзка с **вида ВСГ или НСГ** (p=0.001), като ВСГ се наблюдават при пациенти в напреднала възраст.

♥ **KPS** показа корелация с **OS** (rho = 0.479, p = 1.18E-5) и с **PFS** (rho = 0.355, p = 0.002), като ниските стойности на KPS са свързани с по-кратки периоди на обща преживяемост и период без рецидив. Този показател е свързан с вида глиом - **НСГ или ВСГ** (p=1.6E-4), като по-ниски стойности на KPS се наблюдават при пациенти с ВСГ.

6.2. Анализ на генната експресия на микроРНКите при пациенти с глиоми

6.2.1. Спектрофотометричен анализ

Изолираните РНКи от събраните проби бяха измерени спектрофотометрично с NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, DE) преди експресионните анализи, като абсорбционните съотношения A260/280 и A260/230 бяха съответно между 1.76-2.1 и 1.7-2.3. Количеството на РНК в изследваните проби беше в диапазона 105 ng/µl – 953 ng/µl. Експресионните профили на двете потенциални ендогенни контроли (miR-191 и miR-877) бяха анализирани с програмата RefFinder (88). Резултатите показаха, че експресията на miR-877 беше по-стабилна и показа по-малко стандартно отклонение (фиг. 6.5).



Фигура 6.5. Анализ на експресионните данни и определяне на по-стабилно експресирана микроРНК, с цел подбор на ендогенна контрола.

При последващите експресионни анализи, селектираните микроРНКи - miR-21-5p, miR-10b-5p, miR-7-5p, miR-491-5p, miR-34a-5p, бяха нормализирани спрямо експресията на подбраната ендогенна контрола - miR-877.

6.2.2. Експресионни анализи на селектираните микроРНКи

За да оценим разликите в експресията на селектираните микроРНКи при различните степени мозъчни тумори проведохме експресионен анализ. Получените данни бяха анализирани с Крускал-Уолис тест за данни с непараметрично разпределение, за да видим дали има статистически значима разлика между разпределенията на експресионните нива на изследваните микроРНКи при контролната група и различните групи – НСГ и ВСГ (табл. 6.2).

Таблица 6.2. Данни от експресионните анализи на микроРНКи при сравнение на различни степени глиоми и контроли.

МикроРНК	Експресия	Медиана	25-75 процентил	p-стойност
miR - 7	понижена	0.15	0.04-0.48	4.4E-7**
miR - 10b	повишена	$1.1x10^6$	$2.7\text{-}7.2x10^6$	1.4E-5**
miR - 21	повишена	3.84	1.46-13.4	5.34E-5**
miR - 34a	понижена	0.84	0.49-1.6	0.025*
miR - 491	понижена	0.41	0.16-0.75	2.65E-7**

**p<0.05, ** p< 0.001.*

Експресионните анализи показаха, че в изследваната извадка микроРНКи с **понижена експресия са miR - 7 (p = 4.4E-7), miR - 491 (p = 2.65E-7) и miR - 34a (p = 0.025), докато miR - 21 (p = 5.34E-5) и miR - 10b (p = 1.4E-5) са с повишена експресия**, като всичките микроРНКи показват статистически значима разлика в разпределението на нивата на експресия в изследваните групи пациенти.

За да изследваме по-подробно между кои точно групи е наблюдаваната разлика, отчетена с Крускал-Уолис теста, проведохме Dunn's post-hoc тест. Този тест ни позволява да определим при кои групи съответните микроРНКи показват разлика в експресията като се сравняват контролната група с групата на НСГ, групата на ВСГ и

НСГ с ВСГ (табл. 6.3). В таблицата е показано нивото на статистическа значимост преди и след корекцията на Бонферони.

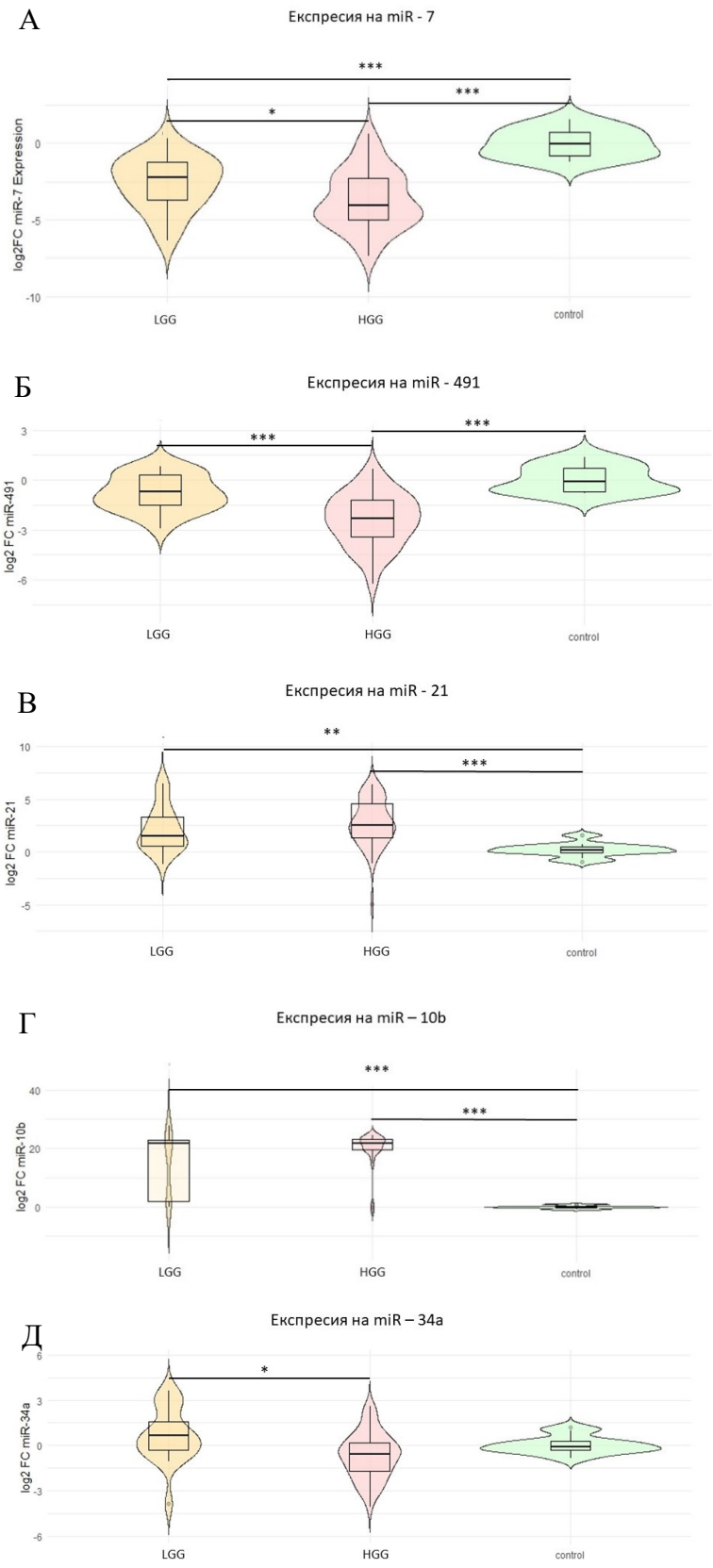
Таблица 6.3. Дерегулирани микроРНКи при различни степени глиоми. С червен шрифт са показани статистически значимите резултати, докато с удебелен и червен шрифт са показани коригираните и значими резултати.

МикроРНК	**miR - 7**		**miR - 21**		**miR – 10b**		**miR - 491**		**miR – 34a**	
Сравнение по групи	**p**	**кор. p**	**p**	**кор. p**	**p**	**кор. p**	**p**	**кор. p**	**p**	**кор. p**
Контрола-LGG	9.19E-5 ***	**2.76E-4** ***	0.001**	**0.003****	2.1E-5 ***	**6.3E-5** ***	0.043*	0.129	0.45	1.35
Контрола-HGG	1.007E-6 ***	**3.02E-6** ***	2.36E-5 ***	**7.08E-5** ***	9.13E-6 ***	**2.74E-5** ***	3.55E-6 ***	**1.07E-5** ***	0.096	0.288
LGG-HGG	0.01*	**0.03***	0.171	0.513	0.46	1.38	1.1E-4	**3.3E-4** ***	**0.014**	**0.042***

*кор.p - коригирана p стойност - нивото на статистическа значимост след Бонферони корекция. *p<0.05, ** p <0.01, *** p< 0.001*

- При miR-7 се наблюдава значително понижение в експресията (p = 3.02E-6) в групата на ВСГ в сравнение с контролната група, както и в групата на НСГ глиоми (p = 2.76E-4) спрямо контролите. Допълнително, miR-7 е по-ниска при ВСГ в сравнение с НСГ (p = 0.03).
- При miR-21 се отчете значимо повишаване на експресията при ВСГ (p = 7.08E-5) и НСГ (p = 0.003) спрямо контролите.
- Експресията на miR-10b е значително повишена при ВСГ (p=2.74E-5), както и при НСГ (p=6.3E-5) спрямо нормална мозъчна тъкан.
- MiR-491 показва по-ниска експресия при ВСГ спрямо контролите (p = 1.07E-5), както и потенциална възможност за разграничаване на ниско от високостепенни глиоми (p=3.3E-4).
- Откриваме по-ниска експресия на miR-34a единствено при ВСГ в сравнение с НСГ (p=0.042).

Резултатите са представени графично на фигура 6.6.



Фигура 6.6. Виолинови диаграми с бокс-плот графики, изобразяваща нивата на експресия на miR-7 (А), miR-491 (Б), miR-21 (В), miR-10b (Г) и miR-34a (Д), при пациенти с НСГ (жълто) и ВСГ (светло червен) в сравнение с контроли (зелен). Данните са анализирани с тест на Крускал - Уолис и резултатите са представени като логаритмична стойност от промяната на относителната експресия (FC) след корекция на Бонферони. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, *FC-fold change*

Експресионните профили на miR-10b показват повишаване на експресията при пациенти с глиоми. В селектираните здрави контроли, както и при някои НСГ не беше отчетена експресия на miR-10b.

6.2.3. Резултати от корелационните анализи

С цел определяне дали наблюдаваните промени в експресията на микроРНКите корелира с клинико-патологичните характеристики на изследваните пациенти проведохме корелационни анализи. Използвахме теста за определяне на рангова корелация на Спирмън, като изчислихме коефициента на Спирмън и определихме посоката на корелацията.

Първо проверихме дали съществува корелация между нивата на изследваните микроРНКи (табл. 6.4).

Таблица 6.4. Корелации между изследваните микроРНКи. Показани са стойностите на корелационните коефициенти на Спирмън - ρ(rho) и нивата на статистическа значимост за всяка микроРНК. Статистически значимите корелации (p<0.05) са отбелязани в червено и *.

	miR-7	miR-10b	miR-21	miR-34a	miR-491
miR-7					
ρ(rho)	1	-0.02	**-0.244***	0.21	**0.505*****
p		0.87	**0.033**	0.06	**3.3E-06**
miR-10b					
ρ(rho)	-0.2	1	**0.289***	0.048	-0.049
p	0.87		**0.011**	0.68	0.68
miR-21					
ρ(rho)	**-0.244***	**0.289***	1	**0.438*****	-0.12
p	**0.033**	**0.011**		**7.66E-5**	0.32
miR-34a					
ρ(rho)	0.213	0.048	**0.438*****	1	**0.422*****
p	0.064	0.68	**7.66E-5**		**1.47E-4**
miR-491					
ρ(rho)	**0.505*****	-0.049	-0.12	**0.422*****	1
p	**3.3E-06**	0.68	0.32	**1.47E-4**	

**p<0.05, ** p <0.01, *** p< 0.001*

Проведените анализи показват следните значими корелации:

- значителна положителна корелация между miR-491 и miR-7, ρ = 0. 505, p=3.3E-06
- умерена положителна корелация между miR-491 и miR-34a, ρ = 0.422, p = 1.47E-4
- умерена положителна корелация между miR-21 и miR-34a, ρ = 0.438, p = 7.66E-5

- слаба отрицателна корелация между miR-21 и miR-7, ρ = -0.244, p = 0.033

- слаба положителна корелация между miR-21 и miR-10b, ρ = 0.289, p = 0.011

Следващата стъпка беше да потърсим корелация между експресионните нива на микроРНКите и клинико-патологичните характеристики на пациентите. Силата и посоката на корелациите между нивата на експресия на селектираните микроРНКи и клинико-патологичните характеристики са показани на таблица 6.5.

Таблица 6.5. Корелации между изследваните микроРНКи и клинико-патологичните характеристики. Показани са стойностите на корелационните коефициенти на Спирмън - ρ(rho) и нивата на статистическа значимост (значимите корелации са отбелязани в червено и *).

	Възраст	Пол	Степен по СЗО	Рецидив	KPS	OS	PFS	Лечение [a]
miR-7								
ρ(rho)	**-0.32****	0.45	**-0.571*****	-0.02	**0.27***	**0.238***	0.19	**-0.36****
p	**0.003**	0.69	**1.8E-8**	0.85	**0.02**	**0.046**	0.139	**0.002**
miR-10b								
ρ(rho)	**0.38*****	-0.01	**0.39****	0.1	-0.084	-0.117	-0.176	0.04
p	**0.0003**	0.9	**2.4E-4**	0.28	0.47	0.326	0.134	0.72
miR-21								
ρ(rho)	**0.291****	-0.08	**0.459****	0.1	**-0.229***	-0.145	**-0.268***	0.1
p	**0.008**	0.45	**1.3E-5**	0.24	**0.046**	0.229	**0.021**	0.38
miR-34a								
ρ(rho)	0.002	0.06	**-0.27***	-0.06	-0.19	0.044	0.077	**-0.24***
p	0.99	0.6	**0.014**	0.6	0.87	0.68	0.51	**0.048**
miR-491								
ρ(rho)	**-0.399***	0.54	**-0.632*****	-0.127	**0.236***	0.217	0.157	**-0.469*****
p	**1.9E-4**	0.62	**1.5E-10**	0.276	**0.048**	0.069	0.224	**3.7E-5**

**p<0.05, ** p <0.01, *** p< 0.001.* [a] Отразява необходимостта от включване на повече от един вид терапия

Проведените анализи показват следните значими корелации между микроРНКите и клинико-патологичните характеристики:

- miR-7 показа значителна отрицателна корелация със степента по СЗО (ρ = -0.571, p= 1.8E-8), умерена отрицателна корелация с възрастта (ρ =-0.32, p=0.003) и избора на лечението, като по-ниските нива на miR-7 са свързани с включването на повече от един вид терапия (ρ = -0.36, p=0.002). Слаба положителна корелация откриваме между miR-7 KPS (ρ = 0.27, p=0.02) и OS (ρ = 0.238, p=0.046).

- miR-10b показа умерена положителна корелация с възрастта на пациентите (ρ = 0.38 p=0.0003) и със степента по СЗО (ρ = 0.39, p = 2.4E-4)

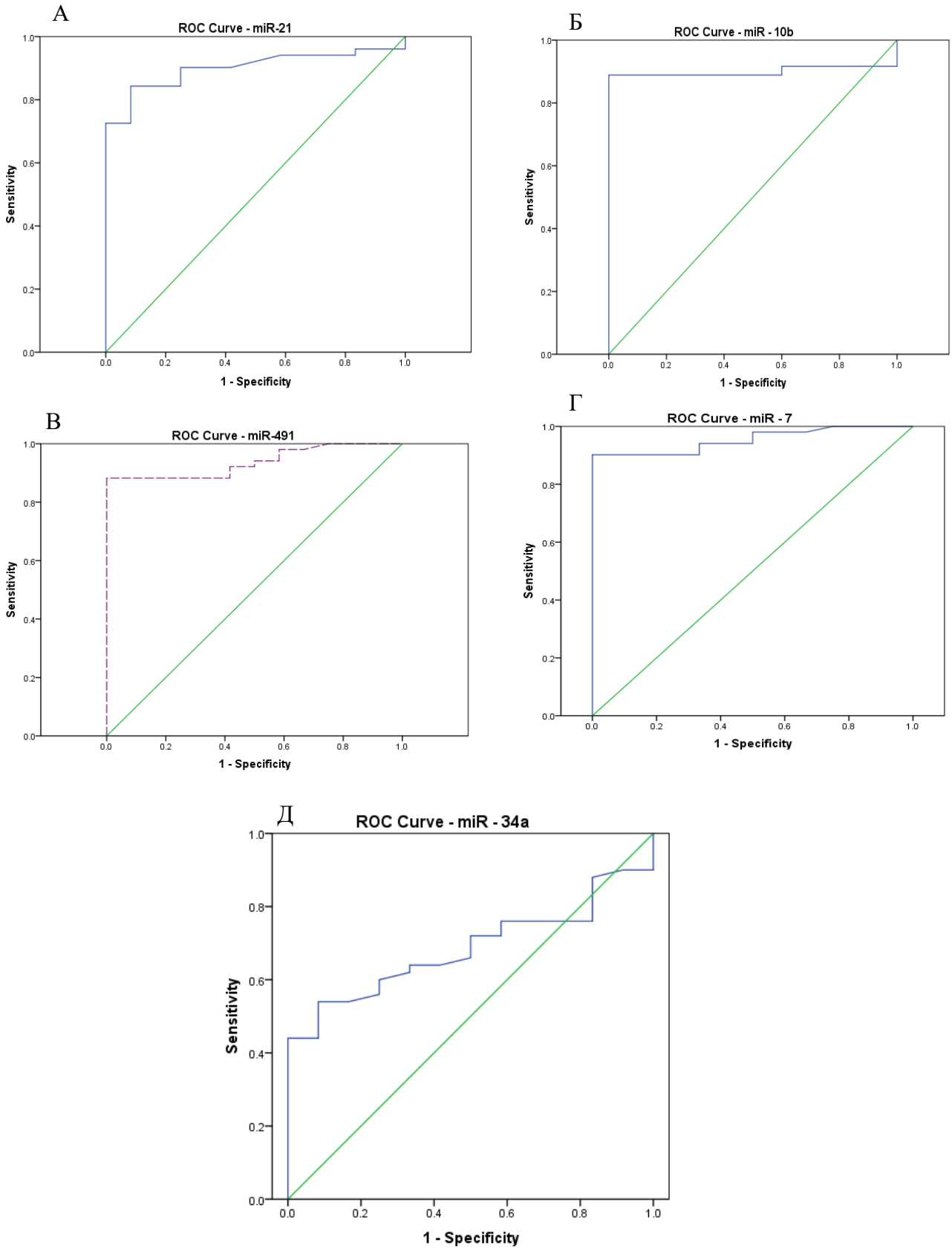
- miR-21 показа умерена положителна корелация със степента по СЗО (ρ = 0.459, p = 1.3E-5) и слаба положителна корелация с възрастта (ρ = 0.291, p = 0.008), както и слаба отрицателна корелация с KPS (ρ = -0.229, p=0.046) и PFS (ρ = -0.268, p=0.021)
- miR-34a показа слаба отрицателна корелация със степента по СЗО (ρ = -0.27, p=0.014) и с лечението (ρ = -0.24, p=0.048)
- miR-491 показа значителна отрицателна корелация със степента по СЗО (ρ = -0.632, p=1.5E-10), умерена с лечението (ρ = -0.469, p =3.7E-5) и възрастта (ρ = -0.399, p = 1.9E-4) и слаба положителна корелация с KPS (ρ = 0.236, p=0.048).

6.2.4. Анализ на ROC кривите и площта под кривата – AUC

За да отговорим на въпроса дали селектираните микроРНК притежават диагностичен биомаркерен потенциал при пациенти с различни степени глиоми проведохме анализ на ROC кривите и изчислихме площта под кривата - AUC.

6.2.4.1. Анализ на ROC кривите при сравнение между ВСГ и контроли

Проведените ROC анализи и изчислената AUC (фиг. 8.7) показаха, че **miR – 7 (AUC = 0.953), miR – 10b (AUC = 0.957), miR – 21 (AUC = 0.90) и miR – 491 (AUC = 0.937)** имат **отличен диагностичен биомаркерен потенциал**, докато miR – 34a показа слаб биомаркерен потенциал за разграничаване между ВСГ и контроли (табл. 6.6).



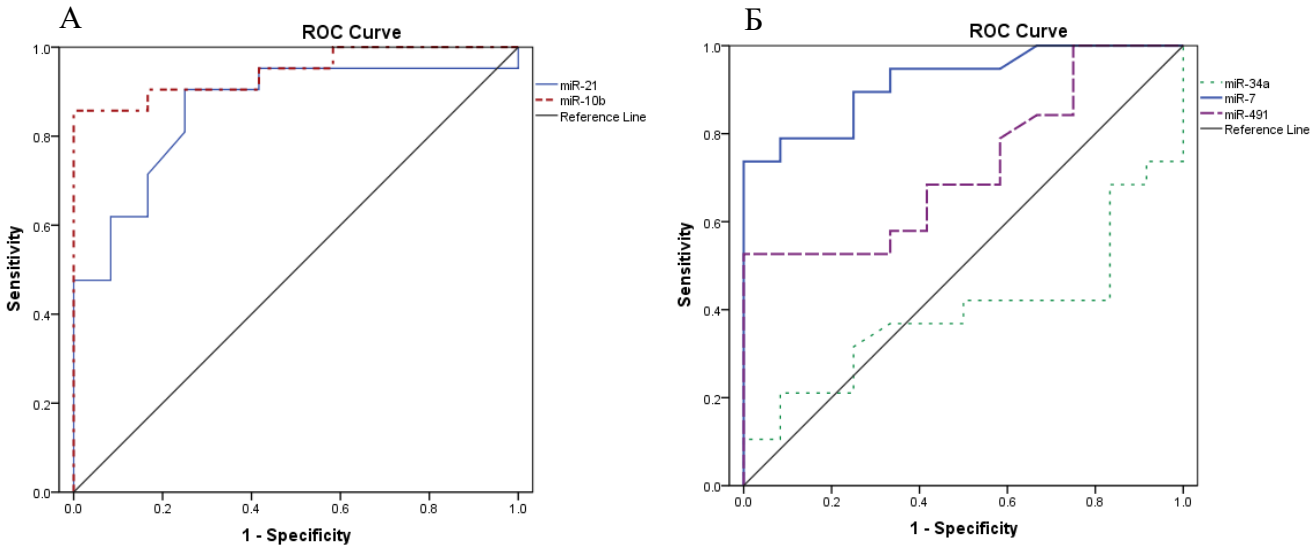
Фигура 6.7. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между ВСГ и контроли. Отличен биомаркерен потенциал откриваме при (А) miR – 21 (AUC = 0.90, 95% CI = 0.824-0.977, p =1.8E-5), (Б) miR – 10b (AUC = 0.957, 95% CI = 0.907-1.0, p =1.05E-6), (В) miR – 491 (AUC = 0.937, 95% CI = 0.879-0.995, p =2.8E-6) и (Г) miR – 7 (AUC = 0.953, 95% CI = 0.905-1.0, p <0.001). miR – 34a (Д) показа слаб биомаркерен потенциал (AUC = 0.685, 95% CI = 0.555-0.815, p =0.048).

Таблица 6.6. Данни от ROC анализите на изследваните микроРНКи при сравняване между ВСГ и нормални контроли.

микроРНК	AUC	95% CI	P стойност
miR - 7	0.953	0.905-1.00	**<0.001**
miR - 10b	0.957	0.907-1.0	**1.05E-6**
miR - 21	0.90	0.824-0.977	**1.8E-5**
miR - 34a	0.685	0.555-0.815	**0.048**
miR - 491	0.937	0.879-0.995	**2.8E-6**

6.2.4.2. Анализ на ROC кривите при сравнение между НСГ и контроли

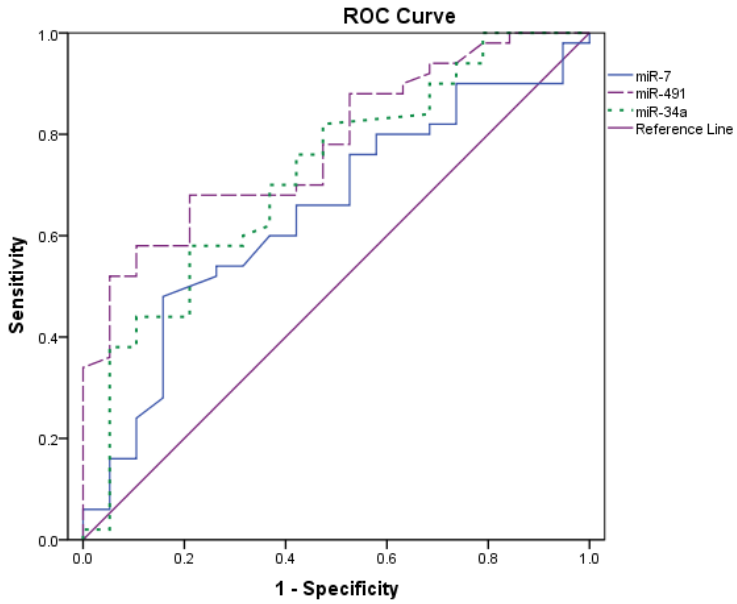
Анализът на на ROC кривите при сравнение между **НСГ и контроли** (фиг. 6.8) показа, че **miR-7** (AUC = 0.919, 95% CI = 0.825-1.0, p =1.07E-4) и **miR-10b** (AUC = 0.944, 95% CI = 0.87-1, p =2.77E-5) притежават **отличен** биомаркерен потенциал. **Добър** биомаркерен потенциал показа **miR-21** (AUC = 0.861, 95% CI = 0.729-0.993, p =0.001). **miR – 491** показа **умерен** биомаркерен потенциал (AUC = 0.726, 95% CI = 0.548-0.904, p =0.037), а miR – 34a не показа биомаркерен потенциал (AUC = 0.393, 95% CI = 0.192-0.593, p =0.32).



Фигура 6.8. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между НСГ и контроли. (А) ROC анализ на miR-10b (AUC = 0.944, 95% CI = 0.87-1, p =2.77E-5) и miR-21 (AUC = 0.861, 95% CI = 0.729-0.993, p =0.001). (Б) ROC анализ на miR-7 (AUC = 0.919, 95% CI = 0.825-1.0, p =1.07E-4), miR – 491 (AUC = 0.726, 95% CI = 0.548-0.904, p =0.037) и miR – 34a (AUC = 0.393, 95% CI = 0.192-0.593, p =0.32).

6.2.4.3. Анализ на ROC кривите при сравнение между НСГ и ВСГ

Анализът на ROC кривите при **сравнение между НСГ и ВСГ** показа, че **miR – 491 (AUC = 0.788, 95% CI = 0.666-0.89, p =3.9E-4)** притежава **умерен** биомаркерен потенциал, докато miR-7 (AUC = 0.692, 95% CI = 0.558-0.827, p =0.01) и miR – 34a (AUC = 0.69, 95% CI = 0.553-0.827, p =0.014) показват слаб биомаркерен потенциал за разграничаване на двете групи глиоми (фиг. 6.9). miR-10b (AUC = 0.547, 95% CI = 0.383-0.711, p =0.536) и miR-21 (AUC = 0.598, 95% CI = 0.446-0.749, p =0.195) не показаха биомаркерен потенциал.

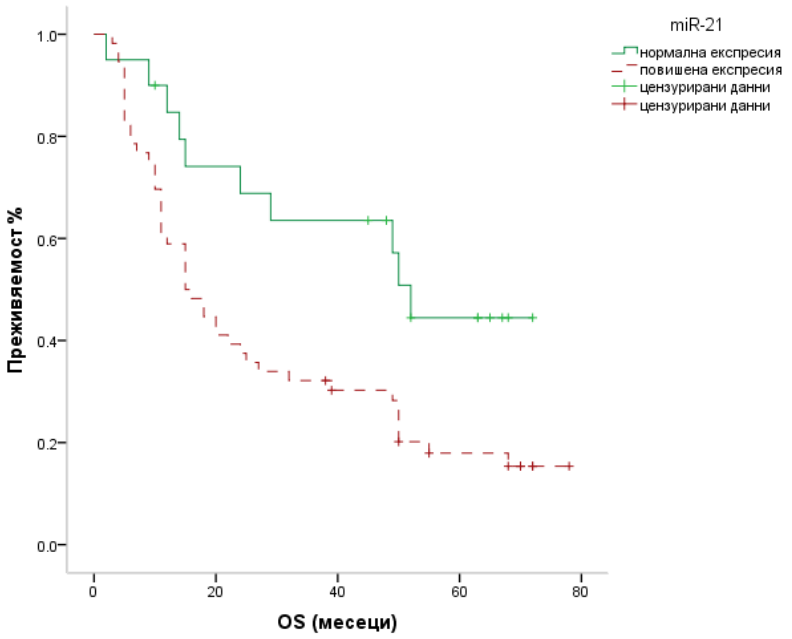


Фигура 6.9. Анализ на ROC кривите и AUC на изследваните микроРНК при сравняване между НСГ и ВСГ

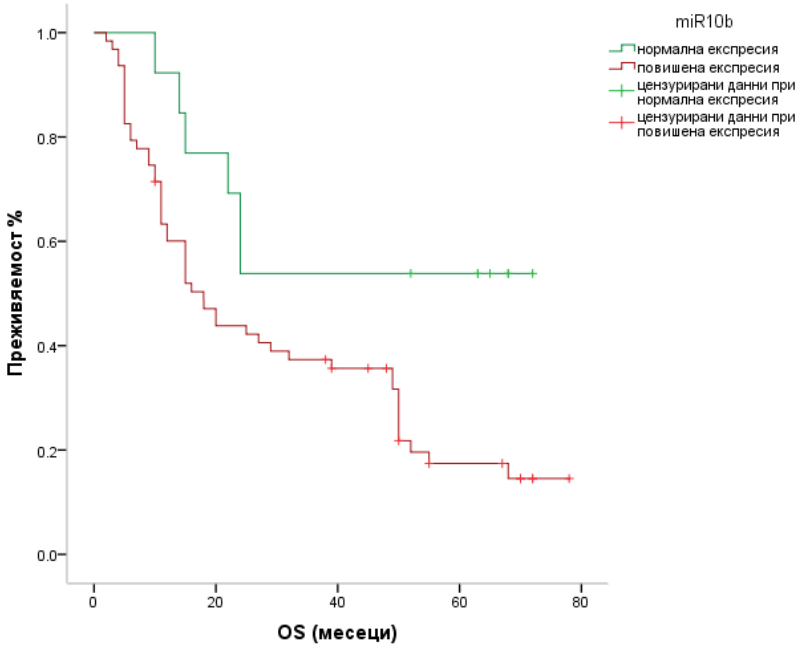
6.2.5. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier) според експресионните нива на селектираните микроРНКи

За да проверим зависимостта на периода на обща преживяемост (OS) и периода без прогресия (PFS) на пациентите според нивата на изследваните микроРНКи, проведохме анализ на оцеляването.

Каплан–Майер кривите на преживяемост и зависимостта на OS от микроРНКите с повишена експресия са показани на фиг. 6.10 и фиг. 6.11. Анализите показаха, че пациентите с **повишени нива на miR-21 (p = 0.014) и miR-10b (p = 0.020)** са със значимо по-кратка обща преживяемост в сравнение с пациенти с нормални нива на тези микроРНКи.



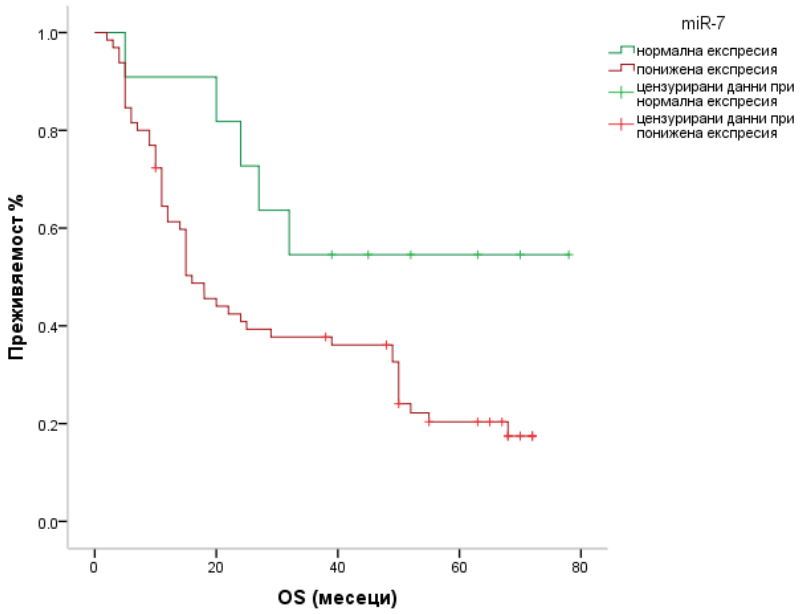
Фигура 6.10. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-21. Тестът на log-rank показа, че високите нива на miR-21 (червено) са свързани с по-кратка преживяемост (p = 0.014) спрямо нормалните стойности (зелено).



Фигура 6.11. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-10b. Високите нива на miR-10b (червено) са свързани с по-кратка преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) при пациенти с глиоми (p = 0.02).

Стойността на медианата на OS при пациентите с **повишена експресия на miR-21** е **15 месеца** (95% CI = 9.50-20.50), докато при пациенти с нормални нива е **52 месеца**

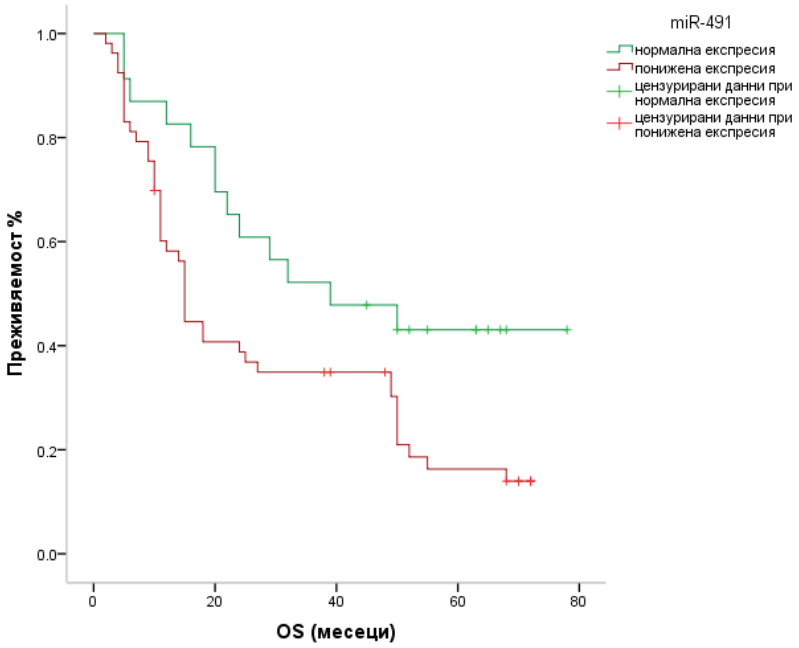
(95% CI = 46.44-57.56). Медианата на OS при пациентите с повишена експресия на **miR-10b е 18 месеца** (95% CI = 11.78-24.22), докато при тези с нормални нива е **58 месеца**. Каплан–Майер кривите на преживяемост според експресията на микроРНКите с понижена експресия са показани на фиг. 6.12 и фиг. 6.13. Анализите показаха, че пациенти с по-ниски нива на miR-7 (p = 0.048) и miR-491 (p = 0.020) са със значимо по-кратка обща преживяемост в сравнение с пациентите с нормални нива на тези микроРНКи.



Фигура 6.12. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-7. Ниските нива на miR-7 (червено) са свързани с по-кратка преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) при пациенти с глиоми (p = 0.048).

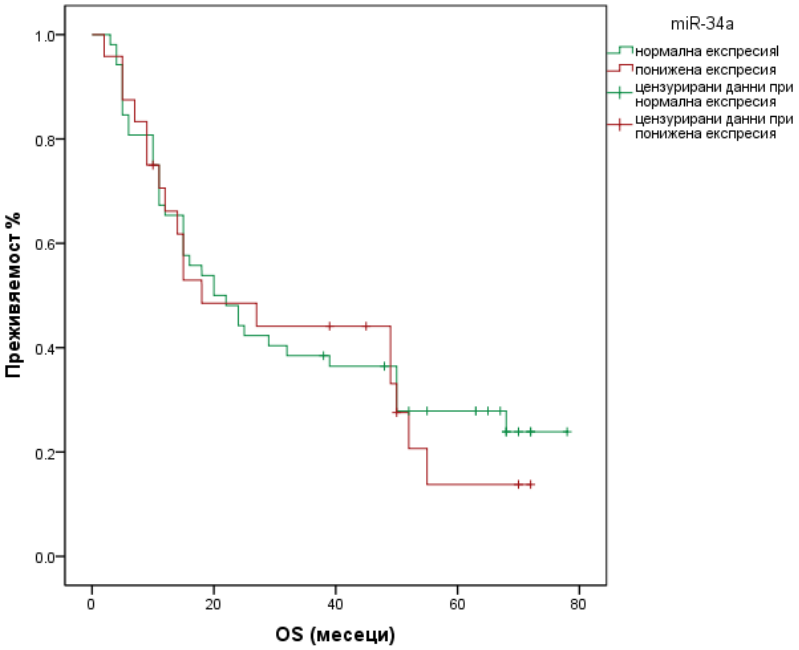
Стойността на медианата на OS при пациентите с **ниска експресия на miR-7 е 16 месеца** (95% CI = 11.36-20.50), докато при тези с **нормални нива е 52.4 месеца** (95% CI = 35.37-69.36).

Стойността на медианата на OS при пациентите с ниска експресия на **miR-491** е **15 месеца** (95% CI = 13.84-16.16), докато при пациентите с нормални нива е **39 месеца** (95% CI = 7.19-70.81).



Фигура 6.13. Каплан-Майер анализ на преживяемостта на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-491. Ниските нива на miR-491 (червено) са свързани с по-кратък период на обща преживяемост в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) (p = 0.020).

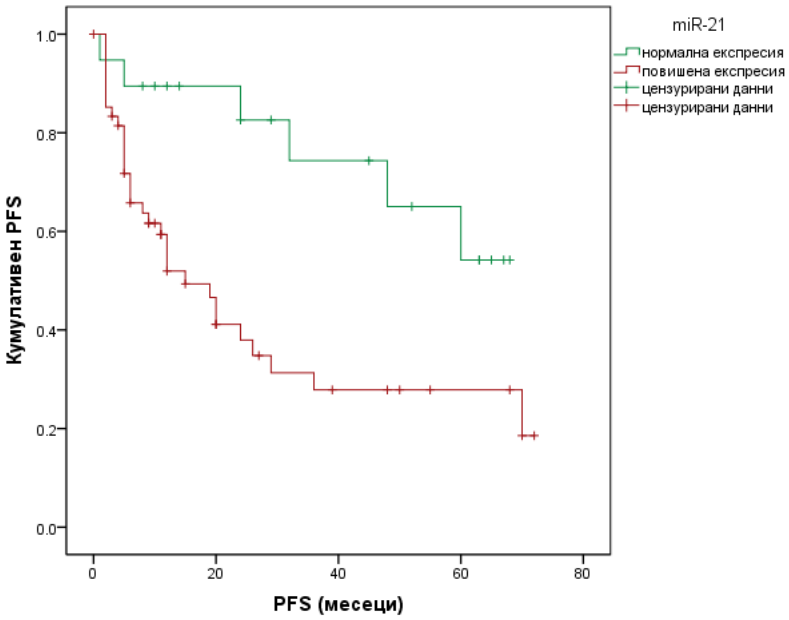
При miR-34a не беше отчетена статистически значима връзка (p = 0.716) между нивата на експресията и преживяемостта на пациентите (фиг. 6.14).



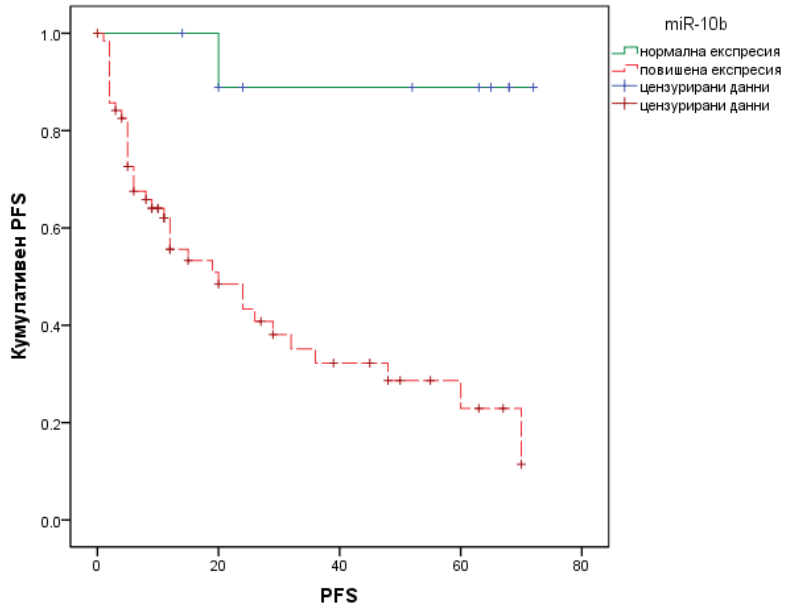
Фигура 6.14. Каплан-Майер анализ на преживяемостта (OS) на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-34a. Понижените нива на miR-34a (червено) не показаха статистически значима връзка с преживяемостта (p = 0.716).

По отношение на **PFS**, установяваме, че **miR-21 (фиг. 6.15), miR-10b (фиг. 6.16) и miR-491** (фиг. 6.17) показват статистически значима връзка с периода без прогресия. По-

високите нива на експресия на miR-21 са свързани с по-кратък период без прогресия (p=0.007)

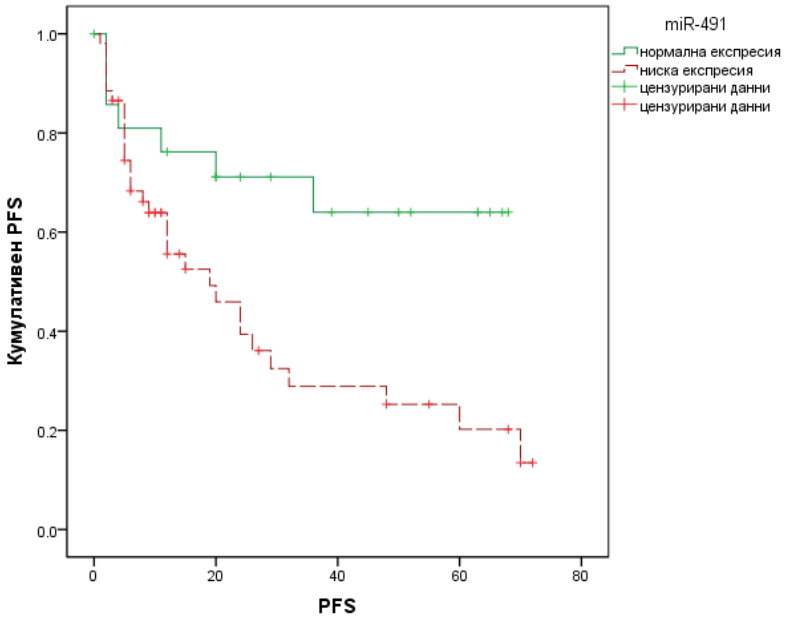


Фигура 6.15. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-21. Повишените нива на miR-21 (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) (p = 0.007). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.



Фигура 6.16. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-10b. Повишените нива на miR-10b (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) (p = 0.002). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

По-високите нива на експресия на miR-10b също са свързани с по-кратък период без прогресия (p=0.002).



Фигура 6.17. Каплан-Майер анализ на PFS на пациентите с глиоми според експресионните нива на miR-491. Ниските нива на miR-491 (червено) са свързани с по-кратък период без прогресия в сравнение с нормални стойности на експресия (зелено) (p = 0.013). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

Каплан-Майер анализът на зависимостта на PFS на пациентите от нивата на miR-491 показа, че по-ниските нива на експресия на miR-491 са свързани с по-кратък период без прогресия (p=0.013). Другите микроРНКи – miR-7 (p=0.46) и miR-34a (p=0.61) не показаха статистически значима връзка с PFS.

6.3. Резултати от генетичните анализи

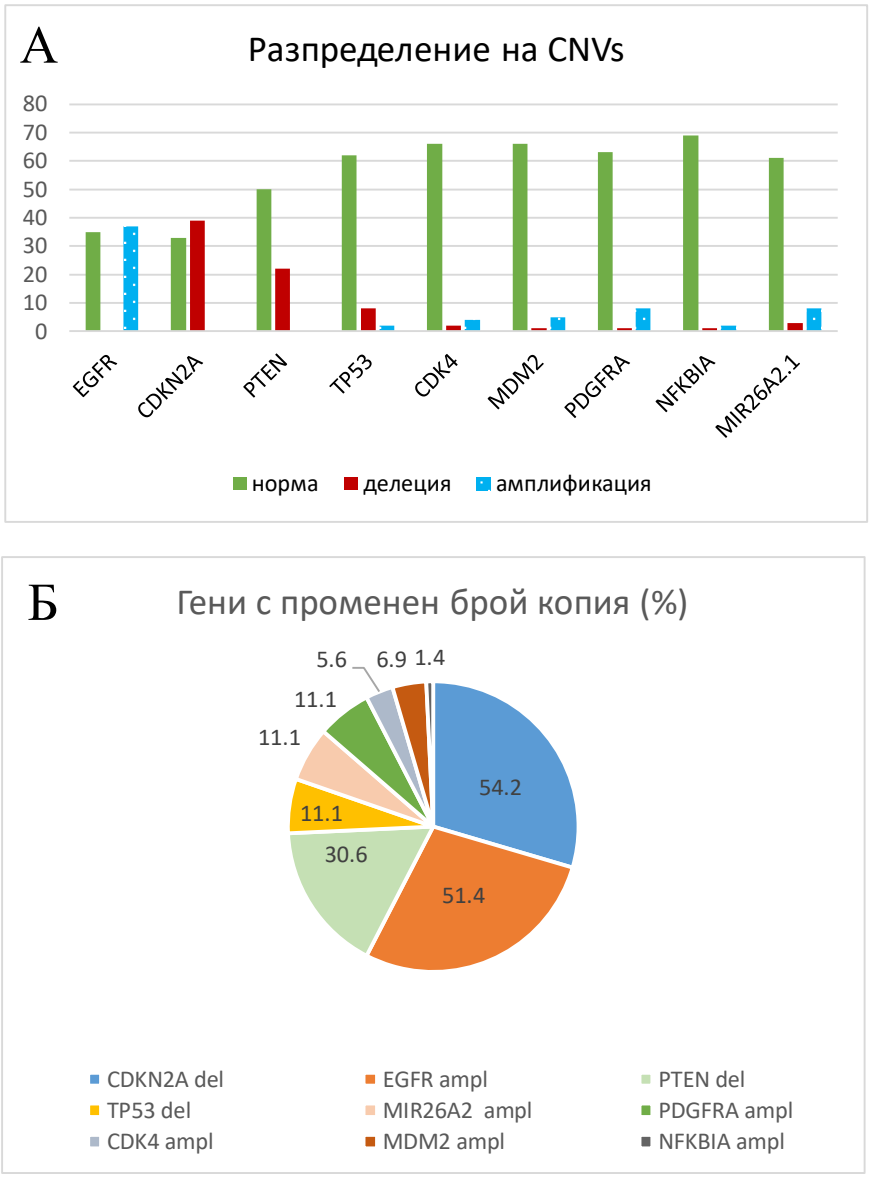
В настоящото изследване бяха сравнени два метода за екстракция на ДНК – метод, базиран на фенол/хлороформ и комерсиален кит - QIAamp DNA Mini Kit. Резултатите показаха, че при десет ДНКи, изолирани с QIAamp DNA Mini Kit, наблюдаваме по-висока чистота (A260/280 = 1.8 – 1.95) в сравнение с методиката, базирана на фенол/хлороформ. Последният метод е по-достъпен, но при него се използват токсични разтворители, които вероятно допринасят за наблюдаваната по-ниска чистота (A260/280 = 1.4 - 1.8), което допълнително оказва негативно влияние на ефикасността на последващите PCR и MLPA анализи. Екстракцията с комерсиалния кит е много по-бърза, изолираните ДНК са с по-висока чистота и минимално наличие на замърсители, както и отчитаме много по-добри показатели и ефикасност на MLPA анализа. Поради тези причини, анализите са проведени върху ДНК, изолирана с QIAamp DNA Mini Kit.

Допълнително беше направено сравнение между резултатите на двадесет ДНК, изолирани от свежа туморна тъкан и от FFPE, след оценка от патолог. Сравнението показа, по-ниска ефикасност на MLPA анализа при ДНК от FFPE, докато свежата тъкан

осигурява по-добри резултати, поради по-високата чистота, интактната ДНК и липсата на замърсители. Генетичните резултати на ДНК, изолирани от двата вида материали съвпадаха.

6.3.1. MLPA анализи за определяне броя копийни варианти (CNVs) при набор от гени, засегнати при глиомите

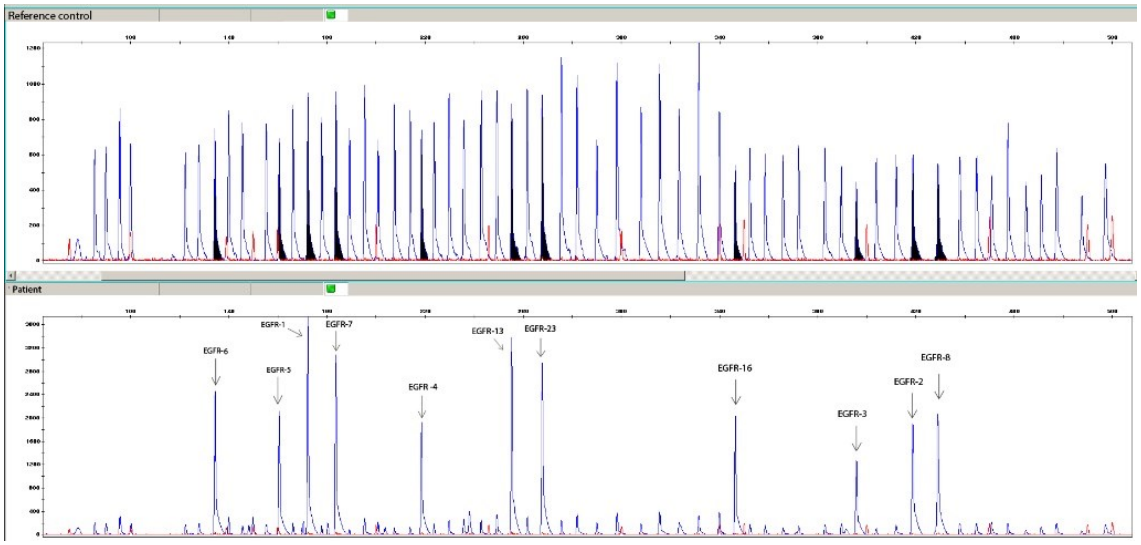
MLPA анализът на гените *EGFR, CDKN2A, PTEN, TP53, PDGFRA, CDK4, MIR26A2, MDM, NFKBIA*, включени в кита показа, че при 61 пациенти се открива една или повече промени в изследваните гени (фиг. 6.18). Четири от пациентите бяха изключени от MLPA анализа, поради лошо качество на пробите и недостатъчен материал за повторение.



Фигура 6.18. Разпределение на промените в броя копия (CNVs) на анализираните гени при изследваната група пациенти с глиоми. Данните са представени като брой CNVs (А) и като пай фигура с проценти (Б).

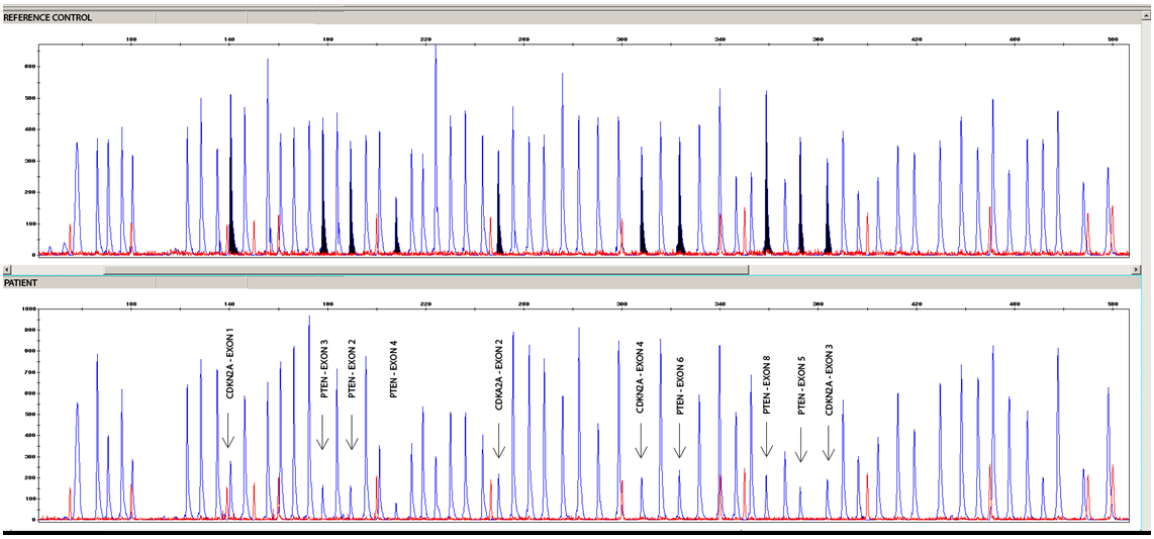
Най - често засегнатият ген с нарушения в броя копия е *CDKN2A*, като при 39 (54.2%) от пациентите с глиоми този ген е делетиран. Хомозиготна делеция откриваме при 20 (27.8%) пациенти, докато хетерозиготна делеция се наблюдава при 19 (26.4%) от пациентите. Важно е да подчертаем, че хомозиготна делеция в нашата извадка се отчете предимно при ВСГ – 19 пациенти, от които 18 са с диагноза глиобластом, докато при НСГ отчитаме само един пациент с хомозиготна делеция. Хетерозиготна делеция на *CDKN2A,* в нашата извадка, се отчете при 14 пациенти с ВСГ и при 5 пациенти с НСГ.

Следващият по честота засегнат ген е *EGFR.* Амплификация в *EGFR* откриваме при 37 (51.4%) от пациентите (фиг. 6.19).



<u>Фигура 6.19.</u> Електрофореграма, показваща амплификация на *EGFR*. Първата електрофореграма е на контрола с маркирани в тъмносиньо пикове на *EGFR*. Втората електрофореграма е на пациент с глиом, като са обозначени силно повишените пикове на отделните екзони на *EGFR* в сравнение с останалите гени.

Делеция на *PTEN* се открива при съответно 22 (30.6 %) от изследваните глиоми. Като CNVs в *CDKN2A, EGFR* и *PTEN* се откриват и в комбинации (фиг. 6.20).

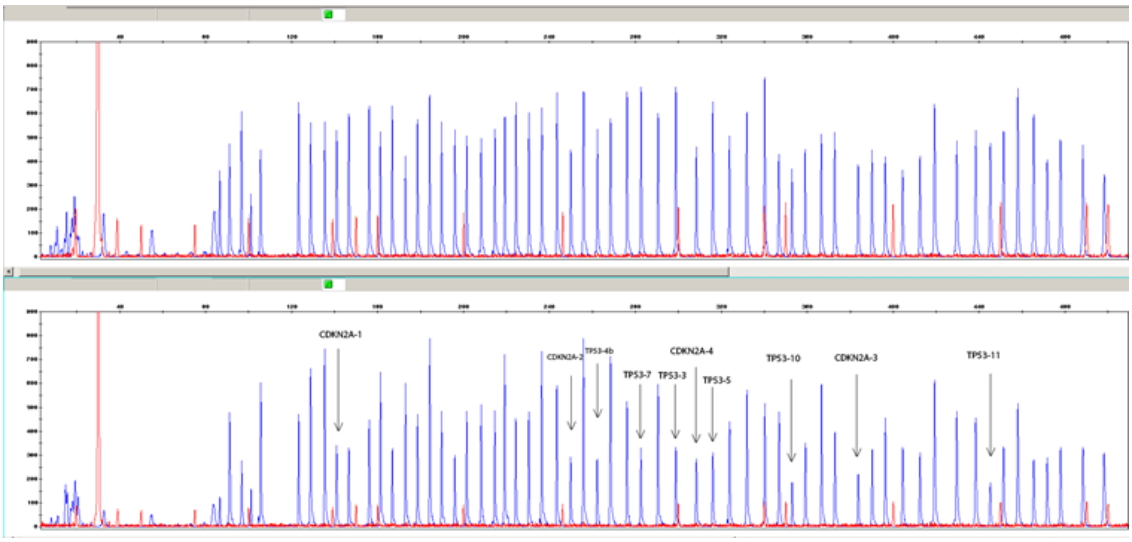


Фигура 6.20. Електрофореграма на нормален профил (горе) и комбинирана делеция на *CDKN2A* и *PTEN* (долу).

При 13 пациенти откриваме едновременна амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A,* и *PTEN.* Един от пациентите (мъж на 55 г.) е с рецидивирал глиобластом и три поредни операции. Интересното при него е, че при първата операция се отчита само амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A,* но не се наблюдава делецията на *PTEN.* Делецията на *PTEN* се отчита при анализ на първия рецидив, който се появява две години след първата операция. Три месеца след това, пациентът постъпва за поредна операция, поради втори рецидив и отчитаме същия CNV профил от предишното изследване. Останалите гени остават непроменени, като и при трите проби отчитаме мутация в *IDH1* и нормални профили на *CDK4, MDM2, MIR26A, TP53, PDGFRA* и *NFKBIA.* Общата продължителност на живот на пациента е 52 месеца от първото постъпване в болницата и 4 месеца след операцията за рецидив и отчитане на едновременното засягане на *CDKN2A, EGFR* и *PTEN.* Още един пациент (жена на 63 г.) с диагноза глиобластом постъпва два пъти в болницата за операция, като при първата операция отчитаме амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A*, докато всички останали гени са с нормални профили. След 5 месеца се наблюдава рецидив и MLPA анализът показва появата допълнително на делеция на *PTEN* и амплификация на *PDGFRA.*
Пациентите със засягане на трите гена - *CDKN2A, EGFR* и *PTEN* са със средна OS от 9 месеца.

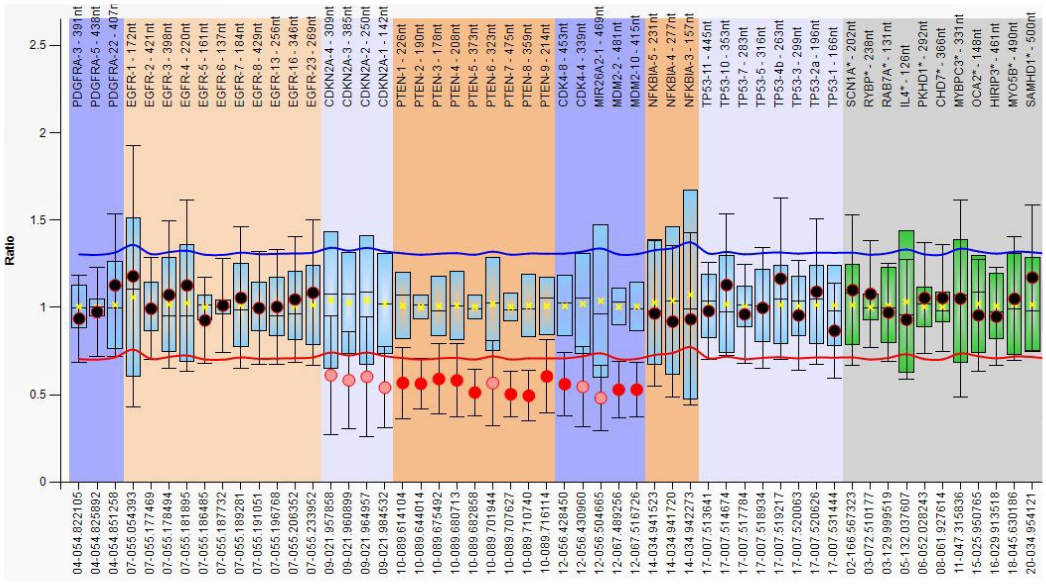
Делеция на *TP53* откриваме при 8 (11.1%) пациенти, докато при двама този ген е амплифициран. Пациентите с амплификации на *TP53* бяха с рецидивирали глиобластоми и допълнителни CNVs, като амплификация на *EGFR, CDK4, MDM2* и делеция на *PTEN*, вероятно вследствие на повишената геномна нестабилност при прогресия на тумора.

Средната OS при пациентите с ВСГ и делеция на *TP53* е 21 месеца, докато при тези с НСГ – 26 месеца. На фигура 6.21 е показана електрофореграма с комбинирана делеция на *CDKN2A* и *TP53*.



Фигура 6.21. Електрофореграма с нормален MLPA профил (горе) и комбинирана делеция на *CDKN2A* и *TP53* (долу).

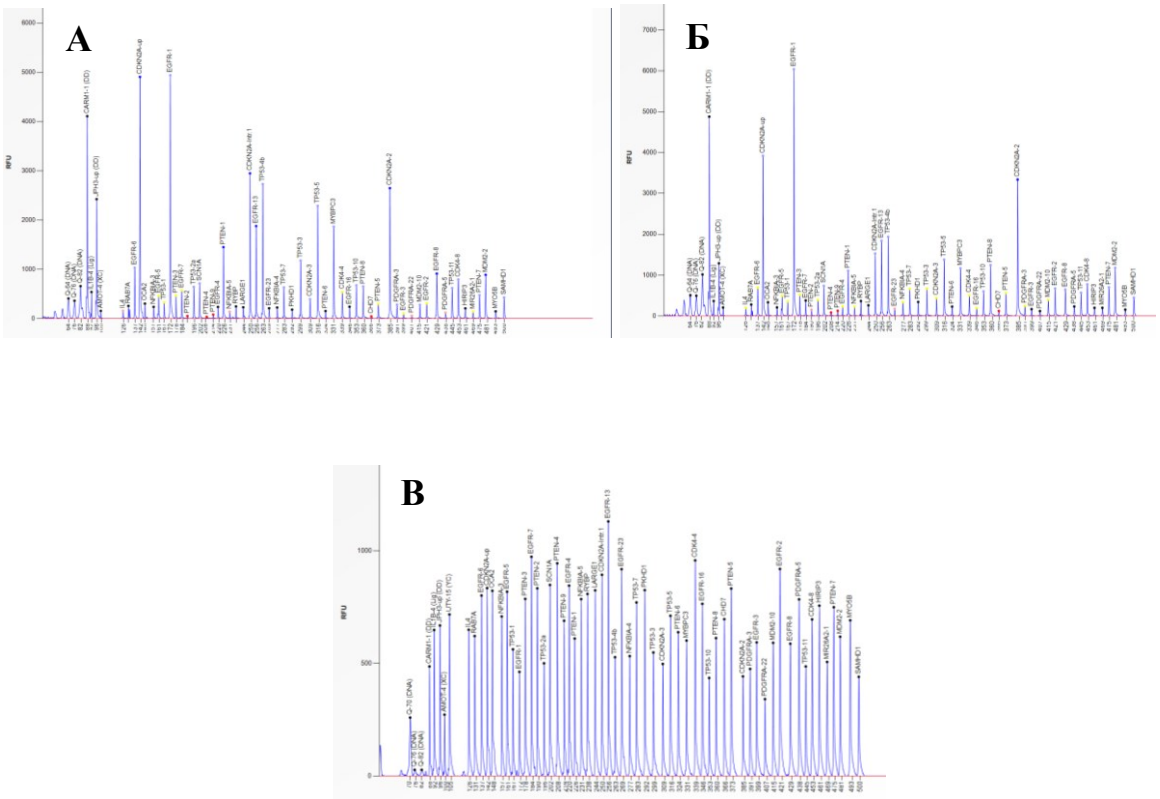
Амплификация на *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2* е открита при съответно 8 (11.1%), 4 (5.6%), 5 (6.9%) от пациентите. Делеции на *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2* също се наблюдават съответно при 3 (4.2%), 2 (2.8%) и един (1.4%) пациент (фиг. 6.22).



Фигура 6.22. MLPA профил с хетерозиготни делеции на *CDKN2A*, *PTEN*, *MIR26A*, *CDK4* и *MDM2*. MLPA анализът разкри интересен случай на пациент със смесена хистологична диагноза (ПНЕТ и глиобластом), при който се открива нетипична делеция на *MDM2, CDK4* и *MIR26A2-1*.

Амплификация на *PDGFRA* се открива при 8 (11.1%) пациенти, а делеция при един. Делеция на *NFKBIA* установяваме при един пациент (1.4%), докато при двама този ген е амплифициран.

Интересен резултат получихме при сравнение на MLPA анализите между съседна макроскопски „здрава контрола“ (на разстояние 2 см) по време на операцията и туморна тъкан. Оказва се, че в някои случаи MLPA профилите са много сходни (фиг 6.23).



Фигура 6.23. Електрофореграми с профил на (А) съседна „здрава“ мозъчна тъкан, (Б) туморна тъкан и (В) нормален профил на пациент без CNVs.

6.3.2. Асоциации между клинико-патологичните характеристики и CNVs

Статистическите анализи за определяне наличието на връзка между изследваните CNVs и клинико-патологичните характеристики показаха, че изследваните промени в броя копия имат връзка с появата на рецидив, степента по СЗО, статуса на оцеляване (жив или починал) и лечението (табл. 6.7).

Таблица 6.7. Асоциации между клинико-патологичните характеристики и CNVs.

	EGFR	*CDKN2A*	*PTEN*	*TP53*	*PDGFRA*	*CDK4*	*MDM2*	*MIR26A*	*NFKBIA*
Степен по СЗО	**0.013***	0.51	**0.04***	0.9	0.2	0.72	0.101	0.25	0.95
Рецидив	0.68	0.78	0.27	**0.04***	0.75	0.61	0.12	0.14	0.48
Статус на оцеляване	**0.002***	**0.021***	**0.027***	0.4	0.055	0.36	0.23	0.17	0.57
Лечение	**0.006***	0.17	0.013	0.2	0.63	0.12	0.1	0.03	0.97

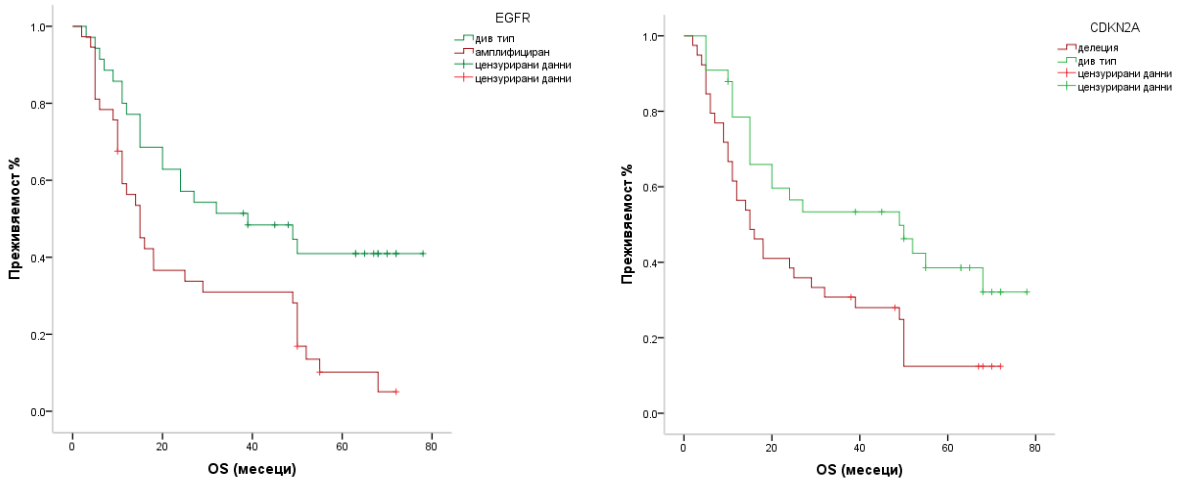
Показана е p стойността, като значимите стойности са отбелязани със *

EGFR показа асоциация със степента по СЗО (p=0.013), като този ген е значително по-често амплифициран при ВСГ в сравнение с НСГ. Съответно, асоциация се наблюдава със статуса на оцеляване (p=0.002) и избора на повече от един вид лечение (p=0.006). *CDKN2A* показа асоциация със статуса на оцеляване (p=0.021), като в края на настоящото проучване всички пациенти с хомозиготна делеция бяха починали. Откритата негативна асоциация индикира, че хомозиготната делеция се свързава повече с лоша прогноза и диагноза ВСГ, за разлика от хетерозиготната делеция.

PTEN показа асоциация със степента по СЗО (p=0.04), като делеция на този ген откриваме при 21 ВСГ, от които 19 пациенти са с глиобластом и само при един пациент с НСГ. Делецията на *PTEN* показа асоциация и със статуса на оцеляване (p=0.027), като 20 от пациентите с делеция са починали, а само двама са живи. *TP53* делецията показа асоциация с отсъствието на рецидиви (p=0.04), като в нашата извадка делеция на този ген се открива само при пациенти без рецидиви.

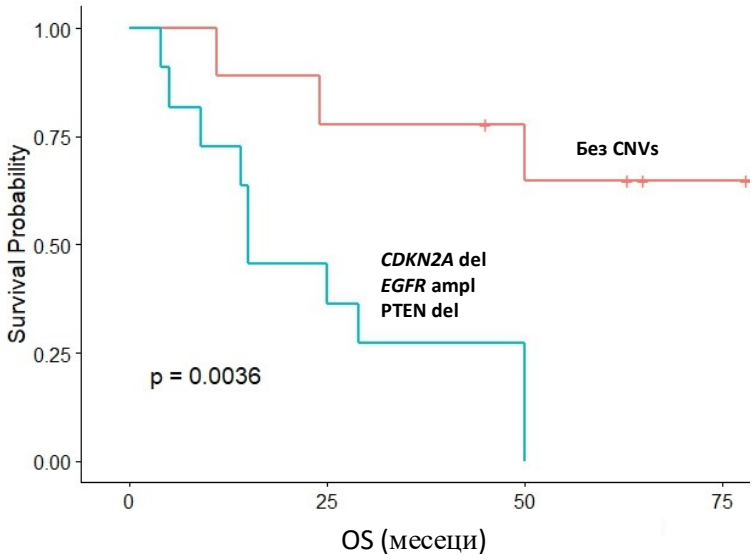
6.3.3. Анализ на оцеляването (Kaplan-Meier analysis) според CNV статуса на изследваните гени

За да определим дали изследваните от нас промени в броя копия на изследваните гени имат връзка с периода на обща преживяемост (OS) на пациентите проведохме анализ на оцеляването. Каплан–Майер кривите на OS според CNV статуса и log-rank тестът показаха, че пациентите с амплификация на *EGFR* (фиг. 6.24А) или делеция на *CDKN2A* (фиг. 6.24Б) са със значимо по-кратка обща преживяемост в сравнение с пациенти с нормални профили на тези гени.



Фигура 6.24. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост (OS) и log-rank тест на пациентите с глиоми според CNV статуса на *EGFR* (А) и *CDKN2A* (Б). А. Амплификацията на *EGFR* (червено) е свързана с по-кратка преживяемост (p = 0.004) спрямо пациентите с див тип *EGFR* (зелено). Б. Делецията на *CDKN2A* (червено) е свързана с по-кратка преживяемост (p = 0.011) спрямо пациентите с див тип *CDKN2A* (зелено).

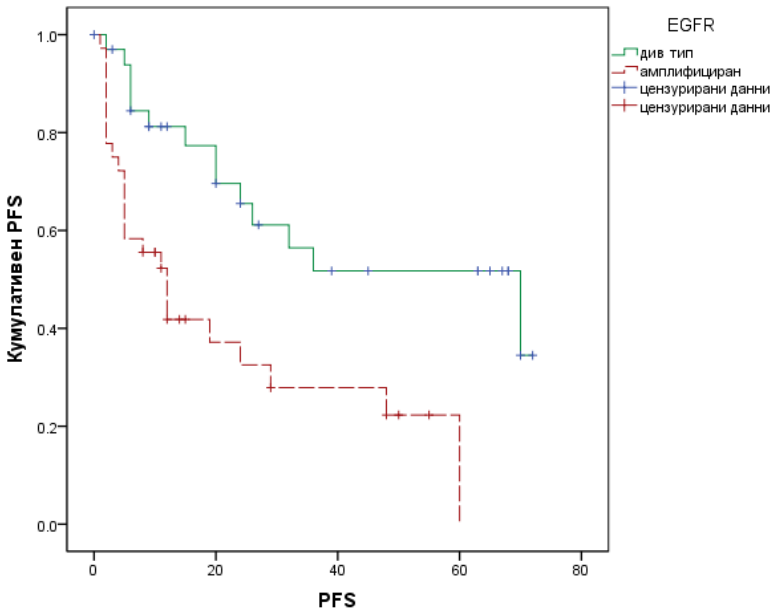
Каплан-Майер анализът показа, че пациенти с комбинация от амплификация на *EGFR*, делеция на *CDKN2A* и *PTEN* живеят значително по-кратко (p=0.0036) спрямо тези с нормален CNV статус на тези гени (фиг. 6.25).



Фигура 6.25. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост (OS) на пациентите с глиоми според трите най-чести CNVs. Тестът на log-rank показа, че комбинацията от делецията на *CDKN2A, PTEN* и амплификация на *EGFR* (синьо) е свързана с по-кратка преживяемост (p = 0.0036) спрямо пациентите с див тип на тези гени (червено).

По отношение на PFS, Каплан–Майер кривите показаха, че пациентите с амплификация на *EGFR* имат по-кратки периоди без прогресия и амплификацията на този ген е свързана с по-бърза поява на прогресия (фиг. 6.26).

Медианата на PFS периода при пациенти с амплификация на *EGFR* е 12 месеца (95% CI = 7.07-16.93) в сравнение с пациенти с нормален профил на този ген, при които медианата е 24 месеца.

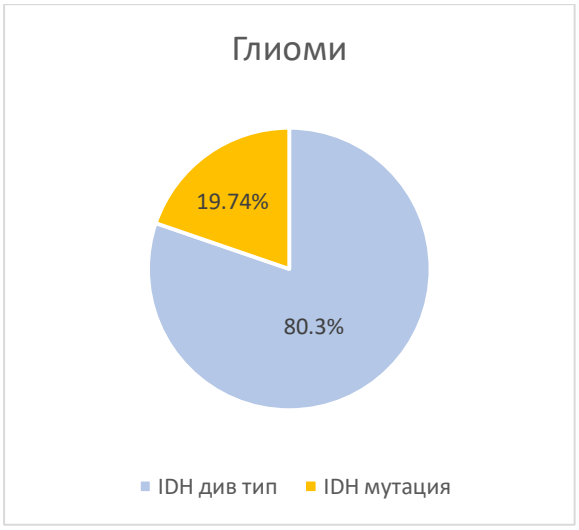


Фигура 6.26. Каплан-Майер анализ на PFS периода на пациентите с глиоми според CNV статуса на *EGFR*. Тестът на log-rank показва, че амплификация на *EGFR* (червено) е свързана с по-кратки PFS периоди (p = 0.001) спрямо пациентите с див тип *EGFR* (синьо). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

Делецията на *CDKN2A* (p=0.363), *PTEN* (p=0.92), *TP53* (p=0.21) и *NFKBIA* (p=0.51), както и амплификацията на *PDGFRA* (p=0.18), *CDK4* (p=0.7), *MDM2* (p=0.82) и *MIR26A2* (p=0.88) не показаха значими връзки с PFS периода в сравнение с пациенти с нормални профили на тези гени.

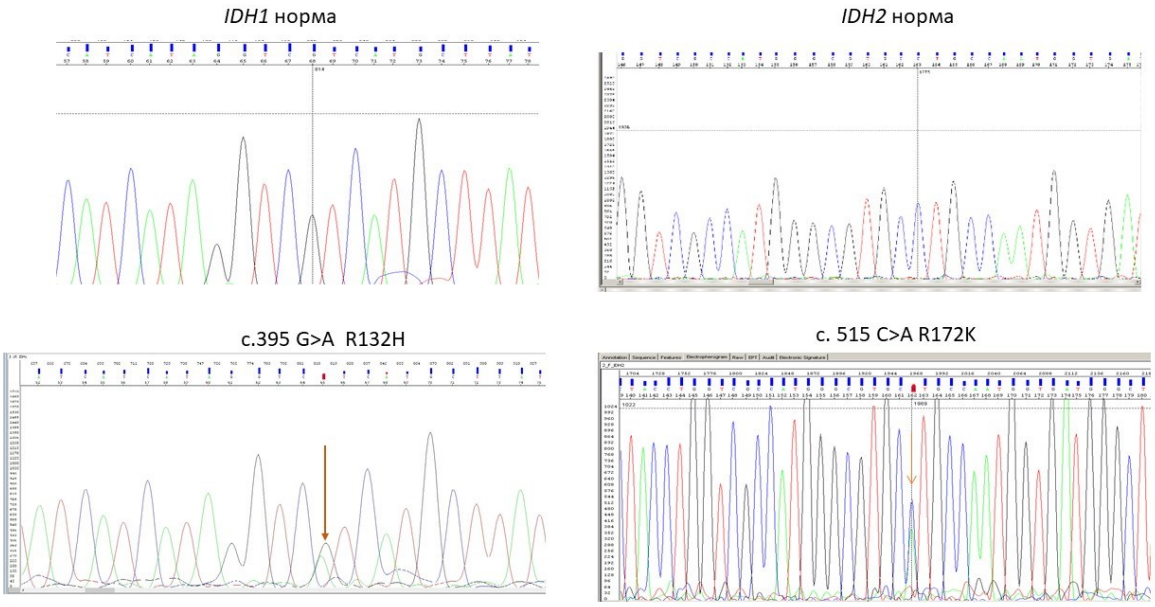
6.3.4. Резултати от секвениране по Sanger на *IDH1* и *IDH2* гените.

В изследваната пациентска извадка извършихме секвениране по Sanger на *IDH1* и *IDH2* гените. Мутации в тези гени се откриват при 15 (19.74%) от пациентите (фиг. 6.27). При ВСГ се откриха 9 мутации в *IDH1*, като от тях 6 пациенти бяха с диагноза глиобластом (2 de novo и 4-ри с рецидивирали вторични глиобластоми), един с олигодендроглиом, 3-та степен по СЗО, и останалите при астроцитоми, 3-та степен по СЗО. При НСГ откриваме 5 мутации в *IDH1* гена и една в *IDH2* гена.



Фигура 6.27. Разпределение на *IDH1/2* мутациите сред изследваната кохорта пациенти с глиоми.

При 9 пациенти наблюдаваме вариант *IDH1* c.395 G>A (R132H) (фиг. 6.28А), при 5 пациенти *IDH1* c.394 C>T (R132C) и само при един *IDH2* c.515 C>A (R172K) (фиг. 6.28Б).



Фигура 6.28. Електрофореграми от секвениране по Sanger на *IDH1* (А) и *IDH2* (Б) гените. (А) Показан е профил на пациент с див тип *IDH1* (горе) и пациент с най-честата мутация в изследваната кохорта при *IDH1* гена c.395 G>A, R132H (червена стрелка). (Б) Показан е профил на пациент с див тип *IDH2* (горе) и профил с мутацията в *IDH2* гена c. 515 C>A R172K (с червена стрелка е отбелязано мястото на мутацията).

Първата мутация, IDH1 c.395 G>A (R132H), се намира в екзон 4 на *IDH1* гена. Тази мутация е транзиция (заменя се пуриновата база гуанин с друга пуринова база - аденин) и води до промяна на аминокиселината аргинин (R) в позиция 132 с хистидин (H). Това е missense мутация, която променя ензимната активност на IDH1. Другата установена missense мутация - IDH1 c.394 C>T (R132C), в екзон 4 на *IDH1* гена, също е транзиция

(цитозина е заменен с тимин), което води до замяна на аминокиселината аргинин (R) на позиция 132 с цистеин (C). Отново тази missense мутация е свързана с променена ензимна активност на IDH1.

Третият вид мутация, IDH2 c.515 C>A (R172K), е разположена в екзон 5 на *IDH2* гена. Тази мутация е трансверсия (цитозин е заменен с аденин), която променя аминокиселината аргинин (R) в позиция 172 с лизин (K). Както и предходните, това е missense мутация, която води до функционални промени в ензима IDH2.

Поради наблюдаваната ниската честота на мутации в *IDH2* гена - само в един пациент, този показател беше изключен от по-нататъшни статистически тестове, поради липса на достатъчно данни за извършване на надеждни анализи.

6.3.5. Анализ на асоциациите между клинико-патологичните характеристики и *IDH1*

Наличието на мутация в *IDH1* показа корелация със следните клинико-патологични характеристики:

- KPS (rho = 0.264, p=0.021)
- обща преживяемост - OS (rho = 0.248, p = 0.031)
- степента по СЗО (rho = -0.251, p = 0.029)

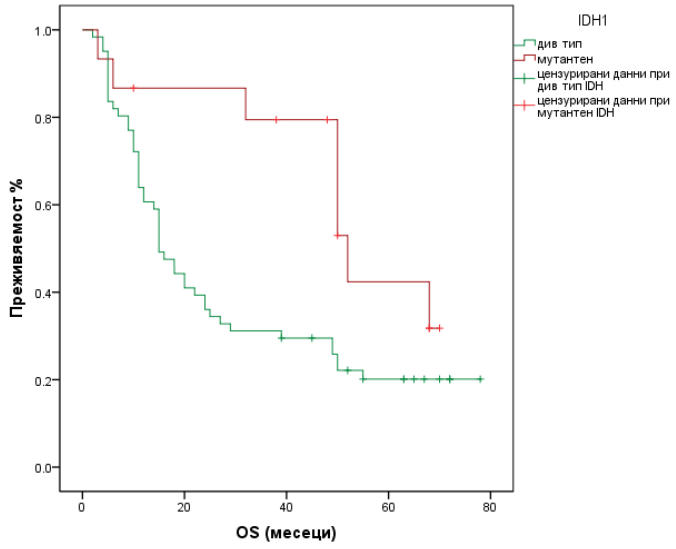
Мутациите се откриват предимно при НСГ или рецидивирали ВСГ от предишни НСГ, докато повечето първични ВСГ от нашата извадка са с нормален *IDH1.*

6.3.6. ROC анализ на според *IDH1* статуса

Като индивидуален маркер, в нашата извадка, според проведения ROC анализ *IDH1* не показва значим диагностичен потенциал (p = 0.413, AUC = 0.561, 95% CI 0.412-0.71) за разграничаване на ВСГ от НСГ.

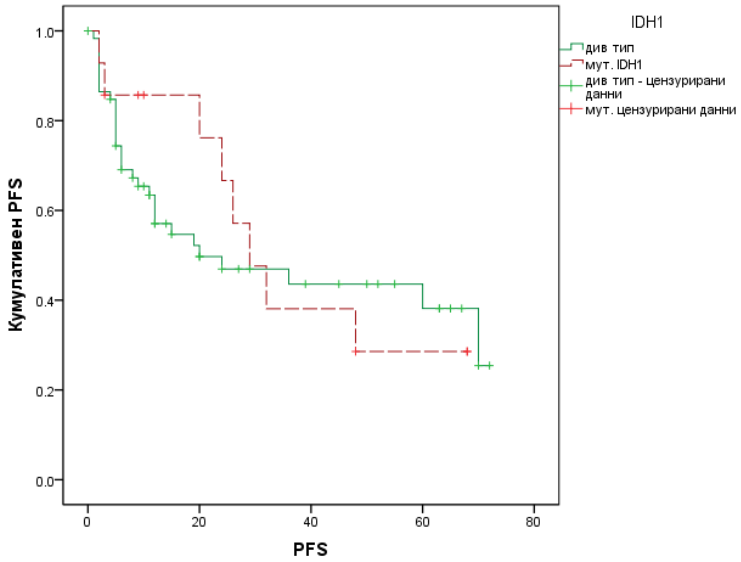
6.3.7. Анализ на оцеляването според *IDH1* статуса

Каплан-Майер анализът показа, че пациентите с наличието на мутация в *IDH1* гена живеят повече (p=0.026) спрямо тези с див тип ген (фиг. 6.29).



Фигура 6.29. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост (OS) на пациентите с глиоми според *IDH1* статуса. Присъствието на мутации в *IDH1* (червено) е свързана с по-дълъг период на преживяемост (p = 0.026) спрямо пациентите с див тип *IDH1* (зелено).

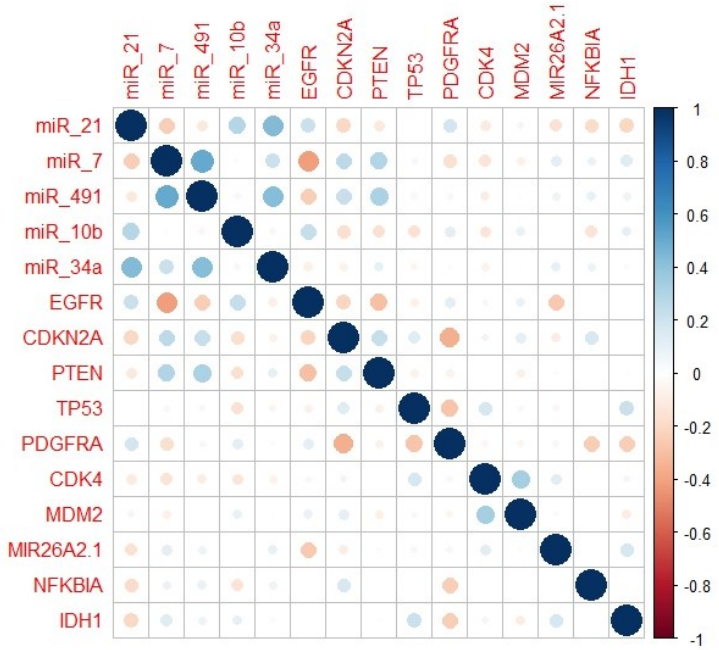
Каплан-Майер анализът на PFS според *IDH1* статуса не показа статиситически значима разлика (p = 0.83) в кривите на пациентите с див тип *IDH1* и с мутация в *IDH1* гена (фиг. 6.30).



Фигура 6.30. Каплан-Майер анализ на PFS според *IDH1* статуса. Пациентите с мутации в *IDH1* (червено) не показаха разлика (p = 0.83) по отношение на PFS спрямо пациентите с див тип *IDH1* (зелено). PFS – период (в месеци) преди появата на рецидив.

6.3.8. Корелация между наблюдаваните CNVs, мутациите в *IDH1* гена и експресионните нива на микроРНКите

Получените резултати от корелационнния анализ между CNVs, *IDH1* статуса и нивата на изследваните микроРНКи са показани на фиг. 4.31.



Фигура 4.31. Корелация между изследваните CNVs и микроРНКите

Проведените корелационни анализи показват следните значими корелации между наличието на CNVs и нивата на микроРНКите:

♥ *EGFR* амплификацията корелира негативно с miR-7 (rho = -0.382, p=0.001), miR-491 (rho = -0.249, p=0.035), докато с miR- 10b показа позитивна корелация (rho = 0.258, p=0.029). Амплификация на *EGFR* се наблюдава по-често при пациенти с по-ниски нива на miR-7.

♥ *PTEN* делецията показа позитивна корелация с miR-7 (rho = 0.268, p=0.023) и miR-491 (rho = 0.322, p=0.006).

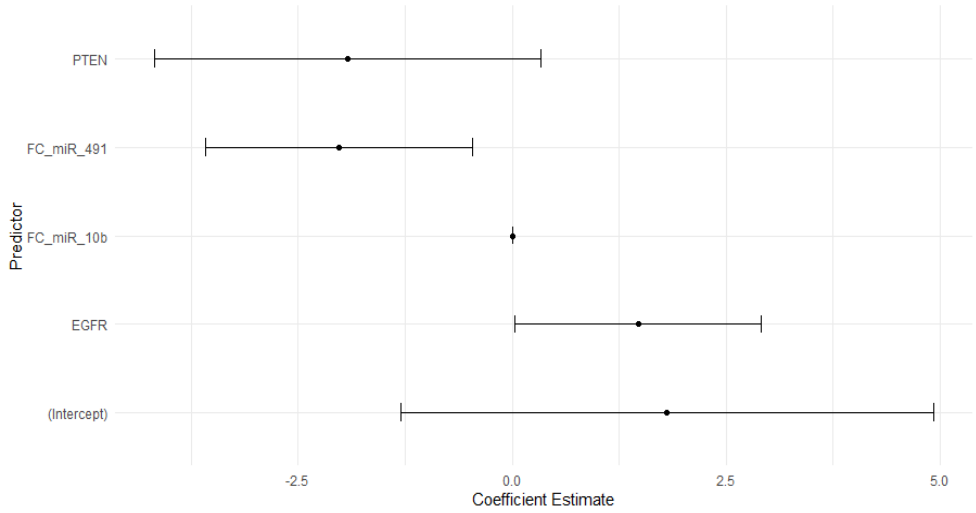
Останалите гени с променен брой копия, както и наличието или отсъствието на мутация в *IDH1*, не показват корелация с изследваните микроРНКи в нашата кохорта.

6.3.9. Модели на логистична регресия

Въз основа на данните от проведените статистически тестове създадохме поредица от модели на логистична регресия, с цел да определим възможностите за **предикция и диференциране на ВСГ и НСГ**. Анализирахме **диагностичния потенциал** на комбинации от променливи, включващи CNVs, нивата на микроРНКите и клинико-

патологичните характеристики. Най-добрите логистични модели, подбрани чрез стъпаловидна селекция на предиктивни променливи, показаха следните значими резултати:

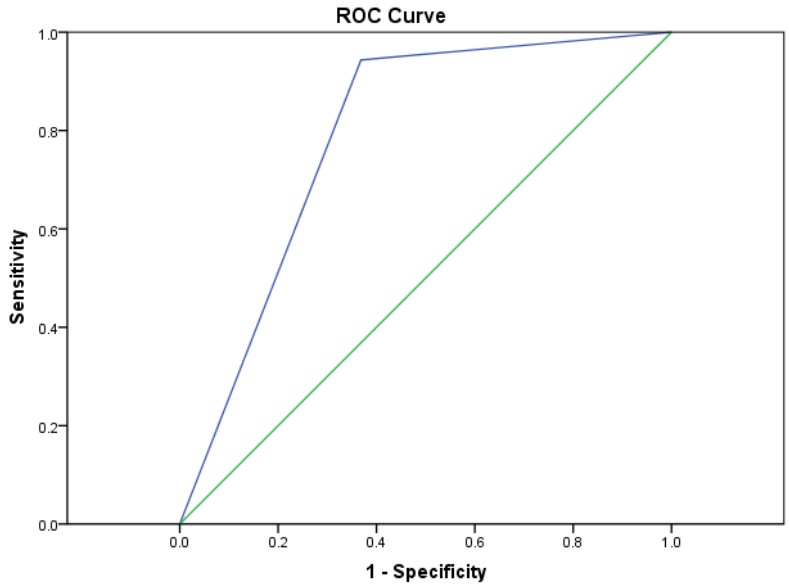
- Комбинацията между понижена експресия на **miR-491** (OR = 0.107, p = 0.004) и амплификация на ***EGFR*** (OR = 6.19, p = 0.009) **разграничава ВСГ от НСГ с точност от 80.6%.**
- Комбинацията между понижена експресия на **miR-491** (OR = 0.12, p = 0.01), амплификация на ***EGFR*** (OR = 5.19, p = 0.02) и делеция на ***PTEN*** (OR = 0.15, p = 0.089) **разграничава ВСГ от НСГ с точност от 81.9%** (фиг.6.32).



Фигура 6.32. Графика на предиктивните коефициенти (B) за всеки предиктор и 95% доверителния интервал. Делецията на *PTEN* повишава вероятността за ВСГ (B= −1.9, p=0.089), пониженатa експресия на miR-491 (B = −2.1, p=0.01) и амплификацията на *EGFR* повишават вероятността за ВСГ (B = 1.6, p=0.02).

♥ Комбинацията между статус на ***IDH1*** (OR = 0.216, p = 0.057), понижена експресия на **miR-491** (OR = 0.12, p = 0.01), амплификация на ***EGFR*** (OR = 5.19, p = 0.02) и делеция на ***PTEN*** (OR = 0.15, p = 0.089) диференцира **ВСГ от НСГ с точност от 86.1%.**

ROC анализът показва, че комбинацията от ниски нива на **miR-491, амплификация на *EGFR*, делеция на *PTEN* и див тип *IDH1*,** е статистически значима в диагностично отношение за **разграничаване на ВСГ от НСГ с AUC = 0.787 (p=2.17E-4, 95% CI 0.648-0.927)** (фиг.6.33).



Фигура 6.33. Анализ на ROC кривите и AUC на комбинацията от miR-491, *EGFR, PTEN* и *IDH1,* при сравняване между ВСГ и НСГ AUC = 0.787 (p=2.17E-4, 95% CI 0.648-0.927).

6.3.10. Провеждане на регресионни модели на Кокс

С цел да проучим дали има връзка между определени предиктори и преживяемостта на пациентите, както и да определим силата и посоката на връзката при значимите предиктори, проведохме поредица еднофакторни и многофакторни модели на пропорционалните опасности на Кокс или регресионни модели на Кокс.

Преди да пристъпим към генериране на моделите на Кокс проучихме възможната колинеарност между променливите. Тъй като в изследваната извадка не откриваме данни за променливи с висока корелация (>0.7), вероятността от мултиколинеарност, която да повлияе на нашите модели на Кокс, беше изключена.

Данните от еднофакторния регресионен модел на Кокс с ниски стойности на p са използвани за създаване на многофакторните модели на Кокс.

♥ **Еднофакторен регресионен модел на Кокс**

Еднофакторният регресионен модел на Кокс показа следните резултати:

- **по-високата експресия на miR-491 и miR-7 е значително свързана с по-дълга преживяемост** (HR = 0.811, 95%CI = 0.685 - 0.961, p=0.0154) и (HR = 0.833, 95% CI = 0.719 - 0.965, p=0.0149). Увеличение с 1 единица в експресията на miR-491 или miR-7

намалява риска от смърт съответно с 18.9% или с 16.7%, докато намаление с 1 единица увеличава риска съответно с 23.3% или 20.1%.

- С **нарастване на възрастта** се увеличава **рискът от смърт**, като с всяка една година рискът **се повишава с 3.7%** (HR = 1.037 p = 0.0362).
- Амплификацията в ***EGFR*** е свързана с увеличен риск от смърт (HR = 2.196, 95% CI = 1.25 - 3.86, p=0.00615). Пациенти с амплификация в *EGFR* имат около **2.2 пъти по – висок риск от смърт** в сравнение с пациенти с нормален ген.
- Нормалният статус на *CDKN2A* гена има протективен ефект и е свързан с по-нисък риск от смърт (HR = 0.528, 95% CI = 0.30-0.929, p=0.027), докато наличието на **делеция на *CDKN2A* гена увеличава риска от смърт**.
- Амплификацията на ***PDGFRA*** показа връзка с **увеличен риск от смърт** (HR = 2.179, 95% CI =1.03 - 4.6, p=0.041).
- Наличието на **мутация в *IDH1* има протективен ефект** и се свързва с намален риск от смърт (HR = 0.443, 95% CI =0.21-0.942, p=0.035) в нашата извадка.

♥ **Многофакторен регресионен модел на Кокс**

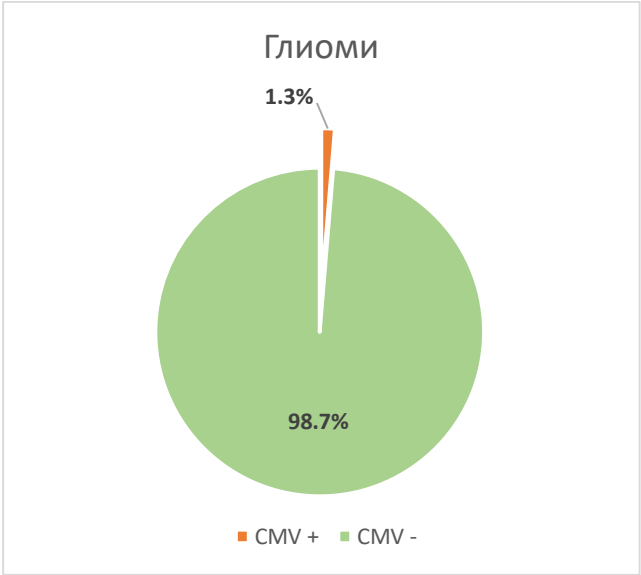
Комбинирането на различни променливи в многофакторен модел на Кокс показа, че комбинацията от **делецията на *CDKN2A*** (HR = 0.57, p<0.05), ***PTEN*** (HR = 0.312, p<0.05), **възрастта** (HR = 1.077, p<0.001), див тип ***IDH1*** (HR = 0.277) са силно значими **предиктори за по-кратка OS**. Индексът на съответствие (C-index) беше 0.768, което предполага добра дискриминационна сила, което означава, че моделът предлага точност на прогнозата от 76.8% според статуса на включените показатели.

Проведеният многофакторен модел на Кокс по отношение на предикторите на **PFS** показа, че комбинацията от ***EGFR*** амплификация (HR = 4.071, p = 0.004), ***PTEN*** делеция (HR = 0.320; p = 0.027), ***PDGFRA*** амплификация (HR = 4.246, p = 0.019), и наличието на **артериална хипертония** (АН) (HR = 3.144 , p = 0.019) са силно значими **предиктори за по-кратки периоди преди прогресия**. Данните показват, че пръсъствието на амплификация на *EGFR* и *PDGFRA* се свързват с четири пъти по-висок риск от прогресия. Наличието на артериална хипертония при пациентите също е свързана с 3 пъти по-висок риск от прогресия, докато нормалния статус на *PTEN* намалява риска от прогресия с 68%.

6.4. Резултати от ДНК анализа на ЦМВ

Изолираната тотална ДНК от събраните 76 проби използвахме за анализ на цитомегаловирусна ДНК. Успоредно с таргетния ЦМВ ген се проследи амплификацията на бета-глобинов ген, използван като вътрешна контрола. В анализа са включени положителна контрола и негативна контрола.

В изследваната пациентска извадка, само при един пациент откриваме ЦМВ инфекция (1.3%) (фиг. 6.34).



Фигура 6.34. Честота на ЦМВ (CMV) сред изследваната популация пациенти с глиоми

ЦМВ ДНК се откри при пациент на 59 г. от мъжки пол, постъпил за повторна операция поради вторично рецидивирал глиобластом. Поради ниската честота на ЦМВ инфекция в изследваната популация от български пациенти с глиоми, не се откри статистически значима връзка с клинико-патологичните характеристики, нивата на микроРНКите и гените с CNVs. Получените резултати не потвърждават асоциация между ЦМВ и глиомагенезата в изследваната кохорта.

6.5. Анализ на генна онтология (ГО)

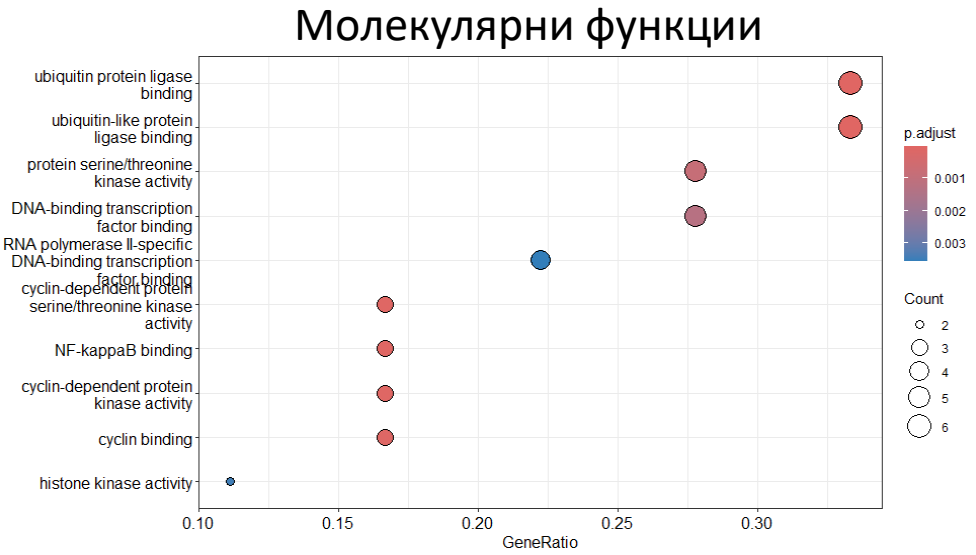
Анализът идентифицира значимите функции, свързани с най-честите и експериментално потвърдени таргетни гени на селектираните микроРНКи (табл. 6.8), както и изследваните гени за CNVs, с цел по-задълбочено разбиране на ролята им в клетъчните процеси.

Таблица 6.8. Валидирани таргети на изследваните микроРНКи

микроРНК	Таргетни гени
miR-21	PTEN, PDCD4, RPS7, RECK, BCL2, RRASGRP, CDC25A
miR-7	EGFR, CALM3, RELA, PAK1, KLF4, RAF1, PIK3CD, IGR1R
miR-10b	HOXD10, PTEN, CDKN2A, TP53, NF1, BCL2, H3F3C/B
miR-491	EGFR, BCL2L12, CDK1, TMEM48, MMP9, TP53, SMAD3
miR-34a	CDK4/6, PDGFRA, MDM4, SIRT1, MYC, NOTCH

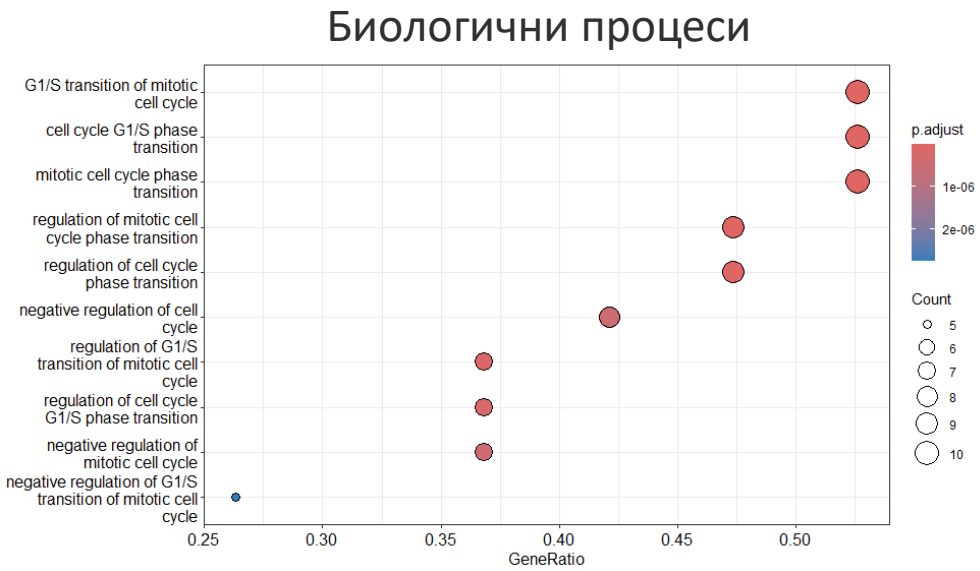
За да разберем различните биологични функции на гените с CNVs и таргетните гени на изследваните микроРНКи, анализирахме ГО термини. Селектирани са 10 от най-важните функции, съответно с най-ниска стойност на p, при праг на $p < 0.05$, определен като статистически значим. Съотношението на гените (gene ratio) показва каква част от селектираните гените са свързани с всяка молекулярна функция, биологичен процес или клетъчен компонент.

Анализът показа, че статистически значими молекулярни функции, в които участват таргетните гени (фиг. 6.35), включват свързване с убиквитин лигаза, регулация на активността на серин/треонин киназите, свързване на транскрипционни фактори към ДНК, свързване на РНК полимера II – специфични транскрипционни фактори към ДНК, регулиране на киназна активност на циклин-зависими протеини, свързване на NF-kB и др.



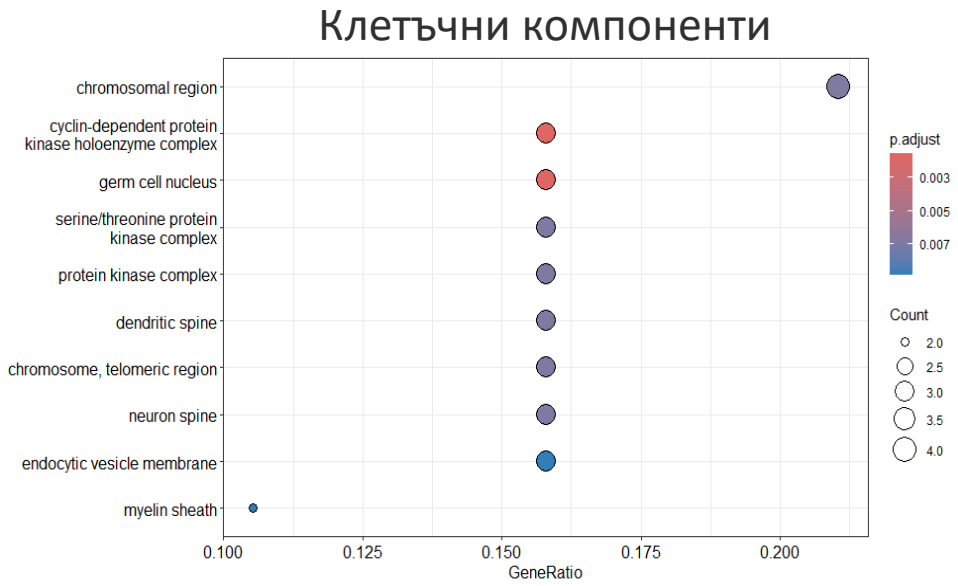
Фигура 6.35. ГО анализ и точкова диаграма (dot plots) за визуализиране обогатяването на молекулярните функции на селектираните гени. По-високото генно съотношение показва, че по-голяма част от нашите гени участват в определена функция (напр. генно съотношение от 0,28 за функцията „киназна активност на серин/треонин протеините“ показва, че 28% от гените в нашия анализ участват в тази дейност. Оста x (gene ratio) представлява резултат от обогатяване (enrichment) на всеки анализиран таргет (десетичен логаритъм на коригираната p стойност), докато оста y изброява съответните идентифицирани функции.

Анализът показа, че биологичните процеси, в които участват таргетните гени включват основно регулация на G1/S прехода от клетъчния цикъл (фиг.6.36).



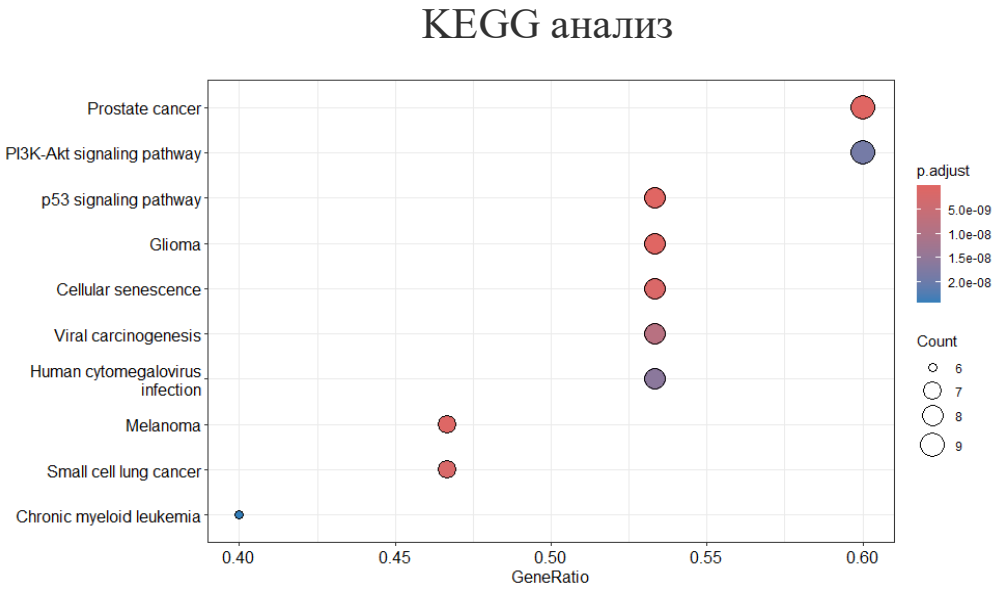
Фигура 6.36. ГО анализ на биологичните процеси, в които участват таргетните гени.

Клетъчните компоненти, свързани с таргетните гени включват хромозомните и теломеразните региони, циклин-зависим протеинкиназен комплекс, ядрата на гаметите, серин/треонин протеинкиназен комплекс, контактите между дендритите, невроните и миелиновата покривка (фиг.6.37).



Фигура 6.37. ГО анализ на клетъчните компоненти, в които участват таргетните гени.

Анализът на KEGG показа, че биологичните пътища и заболяванията, които са значимо асоциирани с нашия сет от гени включва **PI3K-Akt сигналния път**, p53 пътя, клетъчно стареене, **вирусна карциногенеза**, простатен карцином, **глиоми**, инфекция с **ЦМВ**, меланом, дребноклетъчен белодробен карцином, хронична миелоидна левкемия (фиг.6.38).



Фигура 6.38. KEGG анализ на асоциираните биологични пътища и заболявания със селектираните гени.

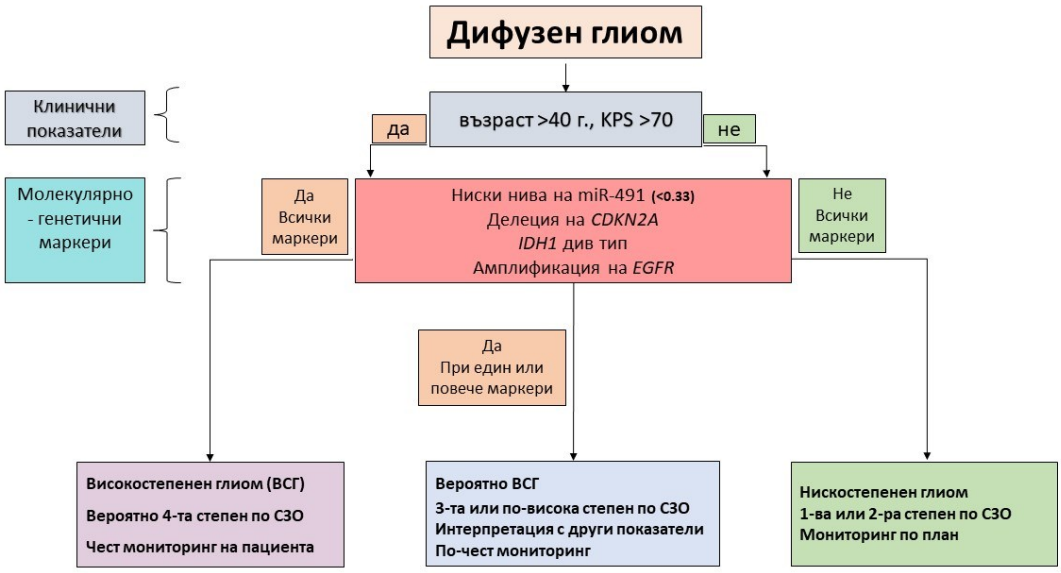
Резултатите от проведените ГО и KEGG анализи показват кои биологични функции или пътища са най-важни за селектирания от нас набор от гени и как те могат да бъдат свързани с конкретни заболявания или фенотипове, с цел по-задълбочен сравнителен анализ и интерпретацията на резултатите.

6.6. Диагностичен и прогностичен алгоритъм

6.6.1. Диагностичен алгоритъм

Получените резултати от описаните по-горе анализи по отношение на биомаркерите с диагностичен потенциал подчертават значението на интегрирането на ниските нива на miR-491, амплификацията на *EGFR*, делецията на *PTEN* и статуса на *IDH1*. Разработеният от нас алгоритъм за диагностика е показан на фигура 6.39.

В нашата извадка статусът на *IDH1* не показва статистически значим диагностичен потенциал (p >0.05) за разграничаване на ВСГ от НСГ, но добавянето му в предложения алгоритъм показа повишаване на диагностичния потенциал до 86.1%.

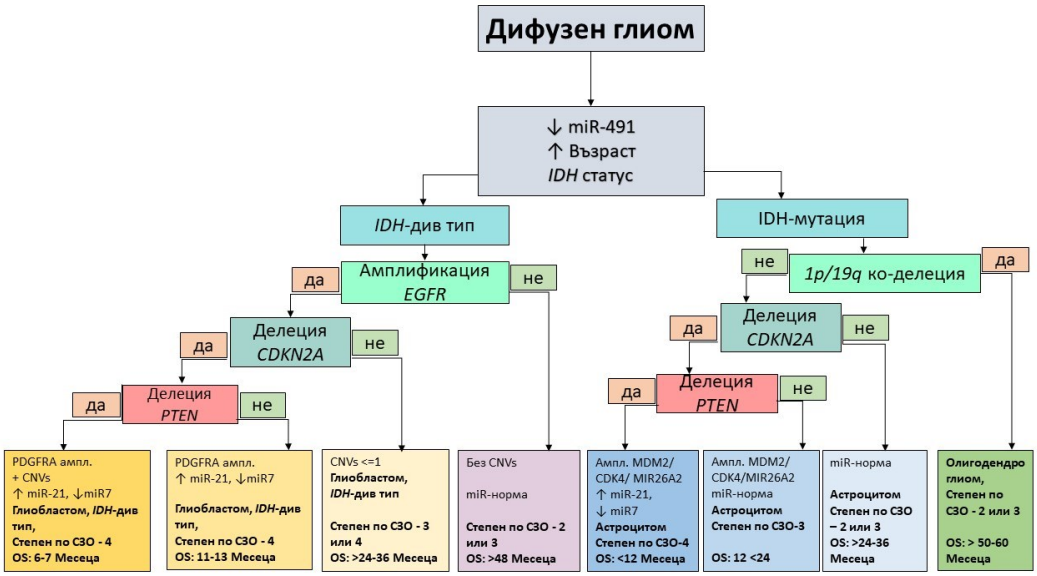


Фигура 6.39. Диагностичен алгоритъм при използване на комбинация от диагностични предиктори, включващ клиничните маркери – възраст >40 г. и KPS >70, и молекулрно-генетичните маркери - статус на *IDH1*, понижена експресия на miR-491, амплификация на *EGFR* и делеция на *PTEN* отдиференцира ВСГ от НСГ с точност от 86.1%.

Бъдещите изследвания трябва да се съсредоточат върху разширяване на размера на извадката, валидиране на резултатите в независими кохорти и разработване на стандартизирани протоколи за клинично прилагане.

6.6.2. Прогностичен алгоритъм

Създадохме класификационно дърво (алгоритъм), което отразява периодите на преживяемост според селектираните маркери, както и класификацията на туморите (фиг. 6.40) Данните от предложения алгоритъм са интегрирани с препоръките на петото издание (CNS5) на класификацията на СЗО от 2021 г.



Фигура 6.40. Прогностичен алгоритъм, комбиниращ диагностичните маркери от CNS5 и получените от нас данни за прогнозиране на преживяемостта на пациентите.

Предложеният алгоритъм (survival decision tree) показва, че нивата на miR-491, заедно с възрастта и *IDH* статуса (според CNS5), могат да служат като първични маркери за стратификация на пациентите. Другите диагностични и прогностични предиктори включват основно делеции на туморсупресорите *CDKN2A* и *PTEN*, както и амплификация на *EGFR*. Натрупването на допълнителни CNVs, свързани с по-висока геномна нестабилност, както и нивата на показаните микроРНКи, са допълнителни прогностични фактори за преживяемостта на пациентите.

Създаването на алгоритми, комбиниращи дерегулирани микроРНКов профил с CNV е сравнително нов подход. Все повече данни подкрепят прилагането на интегрирани стратегии с цел по-цялостно разбиране на туморите на ЦНС, потенциално водещо до по-точни диагностични и прогностични класификации. Бъдещи валидации на настоящите данни могат да бъдат преведени в клиничната практика, предлагайки нови инструменти за диагностика и прогноза на глиомите.

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Въпреки постиженията на съвременната медицина, прогнозата на пациентите особено със злокачествени глиоми остава лоша, поради късната симптоматична изява на заболяването, хетерогенната молекулярна природа и честите рецидиви. Проучванията през последното десетилетие показаха, че глиоми със сходна хистологична картина имат различни молекулярни профили и различна прогноза. В последните класификации на туморите на ЦНС на СЗО все повече генетични биомаркери се одобряват, които заедно с хистологичната оценка, целят да осигурят една по-прецизна класификация (9,12,89). Въпреки това, дори при комбинирана терапия, включваща хирургично отстраняване, лъчелечение и химиотерапия, наблюдаваната честота на рецидиви и прогресия остава висока. Поради тези причини, търсенето на нови диагностични, прогностични и предиктивни биомаркери в областта на невро-онкологията е изключително актуален проблем. Настоящият дисертационен труд е насочен към проучване на ролята на генетични, епигенетични и инфекциозни фактори и техния потенциал като биомаркери при пациенти с глиоми.

В тази връзка ние избрахме да анализираме ролята на дерегулирани микроРНКи (miR-7, miR-10b, miR-21, miR-34a и miR-491) и измененията в броя копия (CNV) на критични за глиомагенезата гени. Заедно с това, бе извършен анализ за наличието на активна ЦМВ инфекция. В настоящата глава ще представим интерпретация на получените резултати и селектираните биомаркери, в контекста на съществуващата литература, както и потенциалните клинични приложения и бъдещи насоки за изследване.

7.1. Обсъждане на резултатите, получени при анализ на клиничните характеристики на изследваната кохорта от пациенти.

Данните за пациентите в настоящата дисертация бяха събирани в периода 2018 – 2024 г., което определя изследването като дългосрочно и дава ценна информация за промяната на някои показатели за разлика от краткосрочните проучвания.

Според последните световни данни, честотата на мозъчните тумори към 2022 г. е около 3.5 % от всички ракови заболявания, като в Европа се наблюдава повишаване на новите случаи, достигащи 5.6% на 100,000 население (1). В нашата кохорта, около 71%

от пациентите са с ВСГ, от които 61.8% са с най-агресивния мозъчен тумор – глиобластом. Наблюдаваната честота на пациентите е малко по-висока спрямо глобалната честота при глиобластомите от около 50%-60% (фиг. 7.1) (90,91).



Фигура 7.1. Разпределение в проценти (%) на туморите, засягащи ЦНС – световни данни.

От нашата извадка пациентите с диагноза олигодендроглиом са 7.9%, а с диагноза астроцитом - 30.3%. Данните са в съответствие със световните проучвания, които докладват между 5-10% честота при олигодендроглиомите и 25-30% при астроцитомите (9,91). Важно е да се отбележи, че пациентите с тези диагнози (дори и при по-ниска степен) често прогресират до ВСГ с агресивно поведение, което подчертава необходимостта от адекватен мониторинг и нови терапевтични стратегии.

В нашата кохорта само 25% от пациентите са живи към 2024 г., като от тях 68.4% са с НСГ. От пациентите с 4-та степен по СЗО само петима са живи (6.6%) за период от около 5 години, като от тях двама са с диагноза глиобластом с PNET (Primitive Neuroectodermal Tumors) компонента. Това показва, че тази подкатегория е с по-добра прогноза и при премахване на диагнозите със смесена компонента, остават само 3ма пациенти (3,95%), които имат 5-годишен период на преживяемост. Прогнозата за пациентите с диагноза глиобластом в нашата извадка е изключително лоша, но за съжаление съответства на световните данни, които докладват, че средната преживяемост

е между 8-12 месеца, като около 53% доживяват една година, а 5-годишната преживяемост е под 6% (91,92).

По отношение на пола, обобщените данни от нашето проучване показват, че жените са 1.2 пъти по-често засегнати от мъжете, като тази тенденция се запазва и кореспондира с последните доклади на „Националният Раков Регистър“. Нашите данни са в съответствие с последния световен доклад, който докладва 1.1 пъти по-висока честота при жените спрямо мъжете в САЩ (91), но в противовес на други изследвания, които показват, че мъжете са по-често засегнати от най-агресивната форма – глиобластом в сравнение с жените (91,93,94). Според последния бюлетин (N23) на Министерството на здравеопазването и Националния Център по Обществено здраве и анализи през 2022г., от злокачествени новообразувания на главния мозък са починали 272-ма мъже и 273-и жени, въпреки, че статистиката пет години назад, показва по-висока честота на заболяване и смърт при мъжете в сравнение с жените. Причини за тези различия могат да бъдат обяснени с по-високия процент на жените в изследваната кохорта, различни генетични фактори или фактори на средата.

В нашата извадка клинични показатели като възрастта на пациента корелират с по-дълга продължителност на живот (OS), преживяемост без рецидив (PFS), KPS и съответно вида – ВСГ или НСГ. Получените данни са в съответствие с други изследвания, които потвърждават, че по-младите пациенти често са с по-висок KPS и по – добра прогноза (10,91). Данните показват, че пациенти над 65 г. с диагноза глиобластом са с по-кратка продължителност на живот, като се счита, че това наблюдение често се свързва с наличието на придружаващи заболявания, липса на терапевтичен отговор и по-нисък KPS (95).

Инфилтративният модел на растеж и неясните граници силно ограничават възможностите за пълно хирургично отстраняване, което от своя страна обуславя и появата на честите рецидиви. Мета-анализ, публикуван през 2022 г., показва, че при пациенти с глиобластом около 6-9 месеца след лечението се наблюдава рецидив (90). Честотата на рецидивите, особено при глиобластом са сериозен проблем, тъй като при около 90% от пациентите в рамките на две години след лечението се появява рецидив на първичния тумор. Също така, честотата на рецидивите при НСГ е между 30-50% в рамките на 5 години след диагнозата в зависимост от степента, като до десет години 70% от НСГ прогресират до ВСГ (96). В нашата кохорта при 26.3% от пациенти се наблюдават рецидиви след първичната операция, като при някои от пациентите рецидивите са повече от два. Тези данни подчертават острата нужда за по-добри и нови терапевтични схеми, както и за ефективен мониторинг за рецидиви при пациентите с глиоми.

При многофакторния модел на Кокс забелязахме зависимост между наличието на артериална хипертония (АХ) и PFS (HR = 3.144, p = 0.019). Според нашите данни, пациентите с артериална хипертония имат 3 пъти по-висок риск от прогресия и съответно по-кратки PFS. Възможно е тази зависимост да се дължи на високата честота на АХ сред българското население, както и на преобладаващия дял пациенти в по-напреднала възраст и с ВСГ. Данните за връзката между АХ и прогресията на глиоми са ограничени, но има наблюдения, че хипертонията, развита по време на лечение с Бевацизумаб, е свързана с по-добра преживяемост при пациенти с глиобластом. Предполага се, че АХ и повишеното кръвно налягане могат да инхибират образуването на нови кръвоносни съдове, което влияе върху туморната микросреда и ангиогенезата (97). Във всички случаи, са необходими допълнителни изследвания в по-големи извадки, за да разберем връзката между АХ и глиомагенезата.

7.2. Обсъждане на резултатите, получени при експресионен анализ на микроРНК в изследваната кохорта от пациенти

МикроРНКите са тъканно-специфични и нормалната им експресия е засегната при различни видове рак (98,99). В невро-онкологията микроРНКите показват биомаркерен потенциал за разграничаване на нормална мозъчна тъкан от туморна тъкан (99), различни степени мозъчни тумори и разграничаване на първични от вторични мозъчни тумори (метастази) (48,100–102). Първоначалните проучвания върху ролята на микроРНките като биомаркери с потенциално клинично приложение се фокусираха върху подбора на една конкретна микроРНК. С годините натрупаните знания за сложните регулаторни мрежи, в които участват тези малки молекули, показаха, че селекцията на комбиниран микроРНК профил/подпис/сигнатура е по-ефективната стратегия за селекция на биомаркери с по-добри показатели като чувствителност и специфичност. Предвид тези данни, нашата идея беше да селектираме микроРНК профил, който освен да притежава добър биомаркерен потенциал, да бъде **достъпен и клинично приложим**.

Изборът на екзогенна контрола или референтен ген със стабилна експресия, който коректно да компенсира вариациите в нивата на експресия на микроРНК, е критичен етап в процеса на селектиране на биомаркери. Референтният ген трябва да има стабилна експресия във всички проби, за да нормализира вариациите, свързани с екстракцията на РНК, обратната транскрипция или ефективността на амплификацията. Смята се, че нормализирането е най-точно, ако се използват референтни гени от същия клас РНК като изследваните (103). В голям брой изследвания, експресията на микроРНките се

нормализира спрямо малки ядрени РНКи, като U6, U48, U44 и др., които обаче може да имат различна експресия в сравнение с микроРНК в различните тъкани. Тъй като не са от същия клас РНКи, това може да доведе до различна ефективност при екстракцията, обратната транскрипция и PCR амплификацията. Различни автори демонстрират, че заедно с микроРНК, малките ядрени РНК също са със силно променена експресия при редица заболявания (104). Множество проучвания показват, че най-добрият избор за референтна контрола при анализ на относителното ниво на експресия на микроРНКите е или микроРНК, или средната геометрична стойност на няколко стабилно експресирани микроРНК при по-големи извадки и повече изследвани микроРНКи (105).

Нивата на изследваните микроРНК нормализирахме спрямо най-стабилно експресираната микроРНК, спазвайки препоръките на редица проучвания. По този начин намаляваме вероятността от разминаване на резултатите при повторение на експериментите и използване на други стабилно експресирани микроРНКи (103,106).

Данните от нашите анализи избрахме да нормализираме, както спрямо пациентски „здрави“ контроли, така и спрямо комерсиална РНК контрола, изолирана от нормална мозъчна тъкан (Biochain,USA). Този подход цели да намали възможните отклонения, в резултат на патологични промени на молекулярно ниво, които наблюдавахме в съседните „нормално“ изглеждащи контролни проби. Нашите данни показват, че поради дифузната природа на глиомите е необходимо особено внимание, при интерпретацията на резултати, използващи съседна макроскопски „нормална“ тъкан за контрола, поради вероятността да попада в перитуморната мозъчна зона.

МикроРНК се класифицират като туморсупресорни и онкомикроРНК. ОнкомикроРНК потискат туморсупресорните гени и повишената им експресия се свързва със стимулиране на туморния растеж. Туморсупресорните микроРНКи потискат онкогените и съответно ограничават процеси, свързани с туморния растеж, метастазиране, ангиогенеза и др.

Различни микроРНК показват различни промени в експресията си при различни видове тумори и могат да служат като биомаркери за диагностика, прогноза и лечение на съответното заболяване.

7.2.1. miR-21

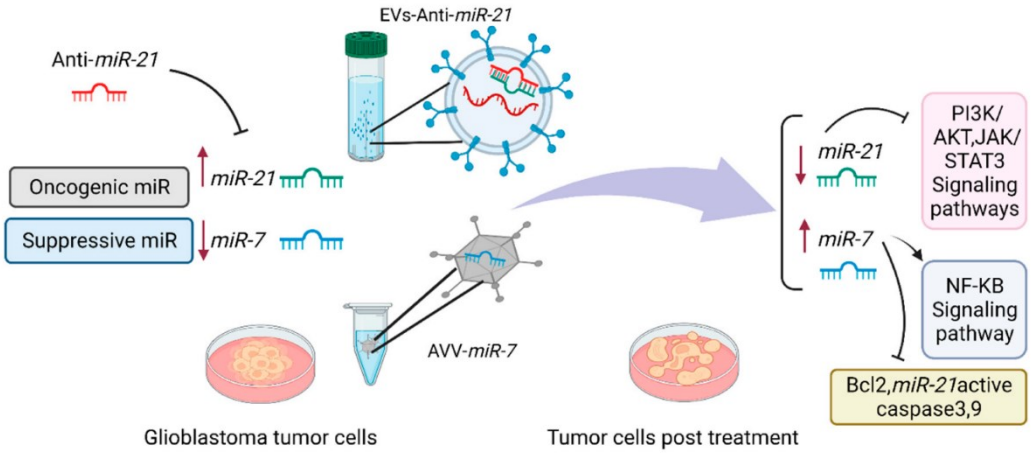
Една от ключовите микроРНК, участващи в регулацията на нормалното развитие на организмите, е miR-21. Нарушената й регулация е свързана с различни заболявания, включително сърдечно-съдови, инфекциозни и онкологични (107). Повишени нива на

miR-21 са установени при различни видове рак, където тя активира клетъчни механизми, допринасящи за онкогенезата (108–111).

В съответствие с литературните данни, в нашето проучване наблюдаваме значително повишение на miR-21 при ВСГ (p=7.08E-5) и НСГ (p=0.028) в сравнение с нормална мозъчна тъкан, което потвърждава биомаркерния потенциал на тази микроРНК (112,113). Проведените анализи показаха, че miR–21 показва отлични диагностични показатели за разграничаване между ВСГ и контроли (AUC = 0.90, p =1.8E-5), и между НСГ и контроли (AUC = 0.861, p =0.001). Високите ѝ нива корелират с по-висока степен по СЗО и по-нисък KPS, което подчертава значението ѝ като индикатор за по-лоша прогноза.

Нашите данни разкриват значими корелации между miR-21 и други микроРНКи, които играят роля в глиомагенезата. Наблюдаваме положителна корелация между miR-21 и miR-34a, както и с miR-10b, докато с miR-7 корелират отрицателно. Възможно е в отговор на повишените нива на miR-21 клетките да активират компенсаторни механизми, водещи до повишаване експресията на туморсупресорната miR-34a. Възможно е също така фактори като особености на туморната микросреда или проведена лъчетерапия да допринасят за повишената експресия на miR-34a (114).

Комбинацията от повишени нива на miR-21 и miR-10b вероятно играе ключова роля за по-агресивния фенотип при глиомите и метастатичен потенциал (109,115). Туморсупресорната miR-7 таргетира EGFR и потиска PI3K/Akt/mTOR и Raf/MEK/ERK сигналните пътища, като ролята ѝ е противоположна на miR-21, която активира тези сигнални пътища (116). Интересно е да се отбележи скорошно проучване, докладващо, че едновременната супресия на miR-21 и повишаване нивата на miR-7 (фиг.7.2) показва намаляване на пролиферацията, инвазията и миграцията при различни туморни клетки *in vitro*, докато приложението на тази комбинирана терапия при мишки с мозъчни тумори корелира с намалена туморогенеза и по-дълга преживяемост (117). Асоциацията между високите нива на miR-21 и ниските нива на miR-7, таргетиращи сходни сигнални каскади, както и фактът, че PI3K/Akt/mTOR пътят беше сред топ 10 на значимите биологични пътища от KEGG анализа, подчертават ключовата му роля в глиомагенезата и прогресията. Това допълнително подкрепя неговия потенциал като таргет за бъдещи терапии.



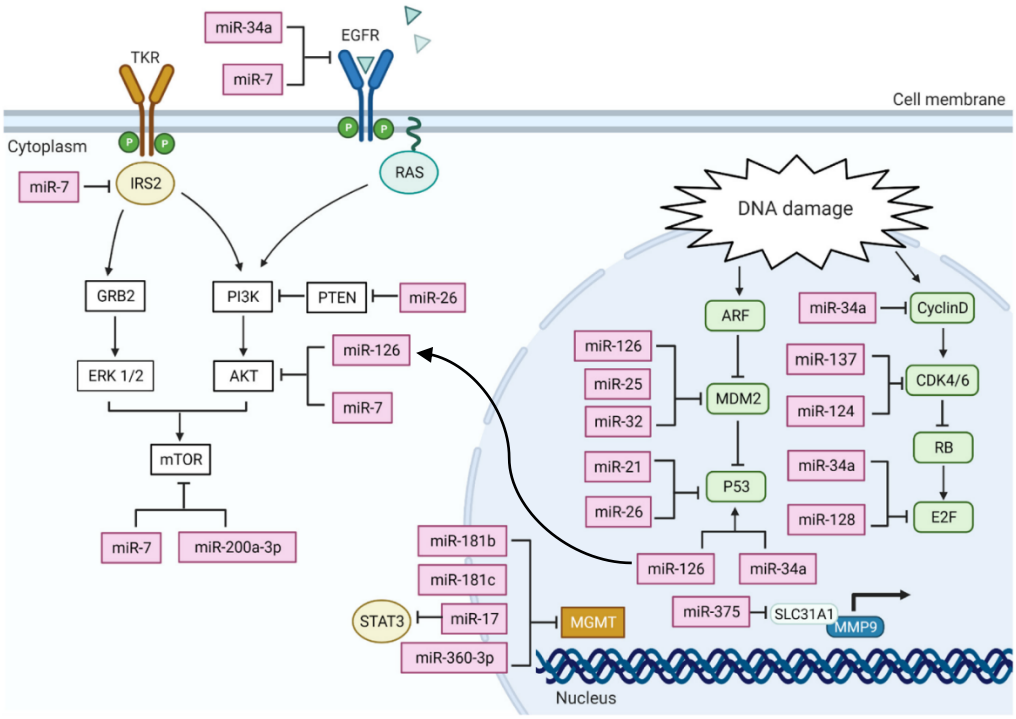
Фигура 7.2. Стратегиите за таргетиране на две ключови микроРНКи (miR-21 и miR-7) предлагат възстановяване на няколко засегнати сигнални каскади и инхибиране на растежа и развитието на глиобластомите. Възможни стратегии за пренос на микроРНКите включват липозоми, извънклетъчни везикули (EVs), аденовирусни (AVV) и др.

Анализите на преживяемостта в настоящото изследване показаха, че пациентите с високи нива на miR-21 имат значимо по-кратка OS и PFS в сравнение с тези с нормални нива на тази микроРНК (118). Нашите данни са в съответствие с докладите на други екипи, като в основата на тези наблюдения са част от регулаторните механизми, в които участва miR-21. Повишената й експресия при мозъчни тумори и активираните PI3K/Akt/mTOR и RAS/MAPK (фиг.7.3) каскади, водят до усилена ангиогенеза (119–122) и инхибиране на апоптозата (55,123). Също така, един от експериментално доказаните таргети на miR-21 е туморсупресорът PTEN, чието потискане води до повишена пролиферация, метастазиране и терапевтична резистентност (109,124,125). Инхибирането на miR-21 експериментално е свързано с намалена туморна пролиферация и повишена чувствителност към терапията (64,117,125,126).

Интересен е фактът, че висока експресия на miR-21 е наблюдавана в граничната некротична зона, което предполага нейната роля в инвазивността и васкуларизацията при злокачествените глиоми (122). Освен това, повишените нива на miR-21 в раковите клетки са свързани с повишена консумация на глюкоза, което е от съществено значение за техния интензивен метаболизъм и пролиферация (127). Това взаимодействие е част от сложна регулаторна мрежа, включваща активация на инсулиновия рецептор и последващо засилване на PI3K/Akt и MAPK сигналните каскади, което допълнително стимулира растежа на туморните клетки, протеиновия синтез и ангиогенезата (128,129). Интересното е, че фактори като липса на физическа активност и диети, богати на въглехидрати и преработени мазнини, могат да повишат експресията на miR-21, допринасяйки за прогресирането, както на диабет тип 2, така и на онкогенезата.

Регулирането на нивата на глюкозата и инсулина все повече се проучва и препоръчва като начин на превенция и допълваща терапевтична стратегия в онкологията, тъй като раковите клетки процъфтяват в хиперинсулинемични среди (130–132).

В обобщение, нашите резултати потвърждават ключовата роля на miR-21 в регулацията на механизми свързани с онкогенезата, както и нейния биомаркерен, и терапевтичен потенциал при глиоми и други видове рак.



Фигура 7.3. Често засегнати микроРНК, регулиращи TP53, RB и PI3K сигналните каскади. Символът (→) показва активиране, докато (⊢) - инхибиране на таргета. Повишената експресия на miR-7 води до инхибиране на EGFR и съответно на PI3K/AKT и mTOR пътищата. Повишената експресия на miR-21 инхибира p53 пътя и активира PI3K/AKT пътя. Повишената експресия на miR-34a води до инхибиране на EGFR, циклин D, E2F и активиране на p53 пътя. miR-26, кодирана от *MIR26A2* гена, инхибира PTEN (133)

7.2.2. miR-10b

Нашите резултати показват, че експресията на miR-10b е значително повишена както при ВСГ ($p = 2.74E-5$), така и при НСГ ($p = 0.0109$) спрямо нормалната мозъчна тъкан. Освен това откриваме корелация на miR-10b с възрастта на пациентите и със степента по СЗО. Известно е, че възрастта на пациентите е доказан прогностичен рисков фактор и повишаването на възрастта е свързано с по-кратка OS и по-висока степен по СЗО (91). Нашите данни са в съответствие с други проучвания, които потвърждават асоциацията между експресията на miR-10b, степента на тумора по СЗО (134) и негативната прогноза (135). Наблюдавана е положителна корелация между двете

онкомикроРНКи - miR-10b и miR-21, което предполага тяхното участие в сходни молекулни механизми на туморогенезата (115,136,137).

Интересно е наблюдението, че тази микроРНК се експресира само в туморните проби, докато при контролите и някои НСГ липсва експресия. В тази връзка, получените от нас резултати показаха отличен диагностичен потенциал за разграничаване между ВСГ и контроли (AUC = 0.957, p =1.05E-6), както между НСГ и контроли (AUC = 0.944, p =2.77E-5). Тези данни подкрепят онкогенната функция на miR10b и потенциалното ѝ приложение като специфичен невро-онкологичен биомаркер и терапевтичен таргет (138). В този контекст, група от учени демонстрират, че потискането на miR-10b намалява пролиферацията и растежа на глиомните клетки, без да засяга съседната нормална мозъчна тъкан, което допълнително потвърждава потенциала на терапевтичните стратегии, насочени към тази микроРНК (139). Анализът на преживяемостта показа, че пациентите с повишена експресия на miR-10b имат значително по-кратки OS и PFS в сравнение с пациентите с нормални нива на тази микроРНК. Този ефект вероятно се дължи на засегнати сигнални пътища, тъй като miR-10b таргетира туморсупресори като PTEN, CDKN2A, NF1, HOXD10, TP53 и други (115). Следователно повишената ѝ експресия води до супресия на таргетите ѝ, активиране на каскади свързани с туморна инвазия и миграция и като резултат по-агресивен ход на заболяването и по-кратка продължителност на живота. Редица доклади потвърждават, че miR-10b участва в развитието и прогресията на мозъчните тумори, активира EMT и промотира метастатичен фенотип (115,140,141). В резултат на тези механизми, високите нива на miR-10b се свързват с неблагоприятна прогноза. Възможно е глиомите с изключително висока експресия на miR-10b да имат повишен потенциал за миграция в съседната здрава тъкан, но този аспект изисква допълнително проучване (142).

Друг интересен факт е, че ЕБВ може да регулира нивата на miR-10b чрез активиране експресията на TWIST-1 и NF-kB, което показва вероятна връзка между вирусни инфекции и прогресията на глиоми (143).

Освен това, повишената експресия на miR-10b е свързана с терапевтична резистентност, тъй като активира AKT сигналния път и намалява апоптозата, индуцирана от лъчетерапията (144). Инхибиране на miR10b води до намаляване на растежа при глиоми *in vivo* (59). Нейната роля в инвазията и терапевтичната резистентност предполага, че miR-10b може да бъде ценна терапевтична мишена. Бъдещи изследвания, насочени към инхибирането на miR-10b, могат да доведат до разработване на нови терапевтични подходи за лечение на пациенти с глиоми.

Предвид тези данни, включването на miR-10b в селектирания от нас биомаркерен профил ще допринесе за повишаване на диагностичния и прогностичен потенциал.

7.2.3. miR-7

Като важна туморсупресорна микроРНК, miR-7 се наблюдава често с нарушена експресия при различни заболявания, включително и мозъчни тумори (107,116,145,146). В нашата извадка, наблюдаваме значително понижена експресия на miR-7, при сравнение между ВСГ и контроли, НСГ и контроли, и по-ниски нива при ВСГ спрямо НСГ. Допълнителните анализи показват, че miR–7 притежава отлични диагностични характеристики за разграничаване между ВСГ и контроли (AUC = 0.953, p <0.001), между НСГ и контроли (AUC = 0.919, p = 1.07E-4) и слаб биомаркерен потенциал за разграничаване между ВСГ и НСГ (AUC = 0.692, p =0.01). Нашите данни са в съответствие с други доклади, които също отчитат понижени нива на miR-7, което води до активиране на процеси като туморна пролиферация, миграция и инхибиране на апоптозата (117,146). miR-7 регулира директно EGFR (фиг.9.3), като по-ниските й нива водят до повишена активност на AKT сигналния път (116,147–149) и онкогенеза. При опити *in vivo*, възстановяването на нивата на miR-7 намалява туморния обем и повишава преживяемостта чрез супресията на EGFR/PI3K/AKT сигналния път (150).

Нашите данни разкриват значителна положителна корелация между miR-7 и туморсупресорната miR-491, което индикира силно намаляване на двете туморсупресорни микроРНКи. Както miR-7, така и miR-491 директно таргетират EGFR, ключов фактор за онкогенезата (116). Възможно е понижената експресия на двете микроРНКи да е резултат от сходни клетъчни механизми, промотиращи онкогенезата, подобно на епигенетичните промени, потискащи нивата на miR-7 (151). Допълнително откриваме и отрицателна корелация между нивата на miR-7 и степента по СЗО, което подчертава, че по-ниските й нива са свързани с по-агресивно туморно поведение и лоша прогноза (51,151). Тези факти допълнително се подкрепят и от наблюдаваната корелация между нивата на miR-7, KPS и OS, като по-ниските нива на miR-7 корелират с по-нисък KPS, като последният се оценява като предиктивен фактор за преживяемостта, както и качеството на живот на пациентите (152).

Анализът на преживяемостта показва, че пациентите с по-ниски нива на miR-7 (p = 0.048) имат по-кратка OS (16 месеца) спрямо тези с нормални нива (52.4 месеца). Вероятно повишените нива на EGFR и активирането на AKT сигналната каскада, допринасят за наблюдаваната зависимост. Експерименталното възстановяване на нивата

на miR-7 е обещаваща терапевтична стратегия, свързана с потискане на AKT пътя, намалена туморна пролиферация и повишена преживяемост (150). Посочените данни подчертават ролята на miR-7 като потенциален клиничен биомаркер и терапевтичен таргет.

7.2.4. miR-491

Един от **най-важните резултати** на настоящото изследване е, че експресията на **miR-491 е значително понижена при ВСГ в сравнение с НСГ** (p = 3.9E-4). Допълнително miR-491 е с потисната експресия, както при ВСГ в сравнение с контроли (p = 1.06E-5), така и при НСГ спрямо контроли (p = 0.037). Тези данни показват, че miR-491 е не само обещаващ диагностичен, но и **градиращ биомаркер за разграничаване между ВСГ и НСГ**. Доколкото ни е известно, това е първият доклад, подчертаващ потенциала на miR-491 като градиращ маркер с обещаващо клинично приложение в невро-онкологията. Другите ни данни са в съответствие с доклади, които отчитат понижена експресия на miR-491 в различни тумори, включително при първични и вторични мозъчни тумори (48,153–155).

Освен това, откриваме отрицателна корелация между нивата на miR-491 и възрастта на пациентите, както и корелация със степента по СЗО, лечението и KPS. Тези наблюдения показват, че понижените нива на miR-491 са характерни за по-агресивни глиоми, които типично се срещат при пациенти в напреднала възраст и с по-нисък KPS (91,152). Понижената експресия на miR-491 води до активация на сигнални каскади като PI3K/AKT, нарушавайки контрола върху клетъчната пролиферация, инвазия и миграция (153,156).

В допълнение, проведените анализи на оцеляването показват, че пациентите с ниски нива на miR-491 имат значително по-кратка обща преживяемост (15 месеца) в сравнение с пациентите с нормални нива (39 месеца) (p = 0.02). По отношение на периода без прогресия – PFS, пациентите с по-ниски нива на miR-491 са с по-кратък период без прогресия в сравнение с пациентите с нормални нива (p=0.013).

Описаните наблюдения са обусловени от функцията на експериментално доказаните таргети на miR-491, сред които са EGFR, CDK6 и Bcl-xL, които играят роля в неконтролируемата клетъчна пролиферация, инхибирането на апоптозата и инвазията (153). Освен това, miR-491 таргетира и TERT, който активира теломеразната активност и клетъчното делене (157). Супресията на miR-491 е свързана с активиране на метастатично поведение на туморите, което обяснява връзката между ниските нива на

miR-491 и по-агресивния ход на развитието на глиомите, както и по-лошата прогноза (153).

Интересно е да се отбележи, че намалената експресия на miR-491 е докладвана заедно с делеция на *CDKN2A* гена, често засегнат при глиобластоми. Двата гена са съседно разположени и може да се наблюдава коделеция на хромозома 9p21.3. Това води до едновременна делеция на двата продукта на гена, кодиращ miR-491 - miR-491-5p и miR-491-3p, което допълнително усилва пролиферацията, инвазията и обуславя лошата прогноза на пациентите (153). В нашата извадка обаче не откриваме корелация между нивата на miR-491 и делецията на *CDKN2A*, като провеждането на допълнителни изследвания биха дали повече яснота относно тази зависимост.

Нормализацията на експресията на miR-491 е свързана с потискане на пролиферацията, ЕМТ, инвазията и метастазирането чрез контрол на Wnt3a/*β*-catenin каскадата (156) и АКТ сигналния път (158).

Представените данни демонстрират потенциала на miR-491 като диагностичен и градиращ биомаркер, както и бъдещ терапевтичен таргет. Включването й в селектирания профил ще подпомогне по-прецизната диференциация между ВСГ и НСГ.

7.2.5. miR-34a

Друга важна туморсупресорна микроРНК - miR-34a, която често се наблюдава дерегулирана при различни заболявания, включително и глиални тумори (52,159–162). В настоящото проучване miR-34a показа слаб биомаркерен потенциал (AUC = 0.69, p =0.014) за разграничаване между ВСГ и НСГ.

Проведените анализи показаха положителна корелация между miR-34a и miR-491, което означава, че при намаляване на miR-34a се понижава и експресията на miR-491. Това може да се дължи на участието им в общи сигнални каскади, свързани с онкогенезата. Например както miR-34a, така и miR-491 се регулират от туморсупресорния протеин p53. И двете микроРНКи са мишени на p53 и участват в медиирания от p53 апоптотичен път (163). И двете микроРНКи играят роля в регулацията на клетъчния цикъл, таргетирайки CDK6, MYC и други фактори. И двете микроРНКи инхибират клетъчната инвазия и метастазиране, като miR-34a потиска клетъчната миграция, докато miR-491 таргетира EGFR и IGFBP2 и отново ограничава инвазивния потенциал на туморните клетки (160,163).

Пониженатa експресия на miR-34a показа слаба отрицателна корелация със степента по СЗО, което предполага, че дерегулацията на miR-34a допринася за

прогресията на глиомите. Въпреки това, в нашата извадка не открихме връзка между стойностите на експресията на miR-34a и OS, или PFS.

Част от получените от нас данни се разминават с докладите на други учени, които съобщават за значително понижена експресия на miR-34a при НСГ и ВСГ (161,162).
Тези разлики могат да се дължат на няколко фактора:

- различни методи на експресионен анализ - различните техники и платформи могат да водят до вариабилност в резултатите.
- различни референтни гени за нормализация - в нашите експерименти използвахме miR-877 като референтна контрола, докато други изследвания използват различни видове РНК, които могат да се различават по размер, експресия, ефективност на екстракция и обратна транскрипция.
- молекулярната хетерогенност на глиомите може да допринесе допълнително за наблюдаваните резултати.

Поради тези причини е необходимо получените резултати да бъдат потвърдени върху по-голяма извадка или валидирани в независимо проучване.

Селектираните от нас микроРНКи показват потенциал за клинично и терапевтично приложение, като някои от тях са обещаващи таргети за начални фази на клинични изпитвания.

7.3. Обсъждане на резултатите, получени при генетичните анализи в изследваната кохорта от пациенти.

Изследването на CNVs е от решаващо значение за характеризирането на глиомите, тъй като те водят до свръхекспресия или понижена експресия на редица гени в основата на глиомагенезата. Ролята на тези генетични аберации се подчертава и от факта, че в последните две класификации на туморите на ЦНС (2016 г. и 2021 г.), все повече CNVs се включват като препоръчвани маркери. Познаването на ключовите CNVs е фундаментално за селектирането на потенциални биомаркери за диагностика, стратификация и създаване на персонализирани подходи за лечение, което има за крайна цел подобряване продължителността и качеството на живот на пациентите с глиоми.

7.3.1. CDKN2A

Туморсупресорният ген - *CDKN2A,* разположен на хромозома 9p21, е най-често засегнатият ген с променен брой копия в изследваната кохорта от пациенти с глиоми.

Наблюдаваната честота на делеция (54.2%) съответства на световните данни, които докладват честота от около 57-60% (164) и заедно с *TP53,* са едни от най-често засегнатите гени при множество ракови заболявания (165).

CDKN2A кодира два ключови протеина - p16(INK4A) и p14(ARF), които са важни регулатори на p53 и RB сигналните пътища. p14ARF регулира нивата на MDM2, като предотвратява инактивирането на p53 чрез убиквитин-медиирана протеолиза или транскрипционно заглушаване. Същевременно, p16INK4a свързва CDK4 и CDK6, предотвратявайки фосфорилирането на RB протеина (фиг.7.4). Хомозиготната делеция на *CDKN2A* води до загуба на двата протеина, така се нарушава контрола на G1/S и G2/M прехода, което води до неконтролируем клетъчен растеж, пролиферация, онкогенеза и инхибиране на апоптозата (12,22).

Хомозиготната делеция на *CDKN2A* води до деградация на p53 туморсупресорния протеин, което е негативен маркер, свързан с по-кратка OS и по-кратка PFS (16,17,166). Нашите данни потвърждават тези данни - откриваме хомозиготна делеция при 27.8% от пациентите, предимно при ВСГ с диагноза глиобластом. Това показва, че хомозиготната делеция на този ген е маркер за агресивно туморно поведение и характеристика на глиоми от най-висока степен по СЗО. Хетерозиготната делеция на *CDKN2A* също се наблюдава предимно при ВСГ (14 спрямо 5 при НСГ). В съответствие със световните данни, откриваме асоциация между делецията на *CDKN2A* и статуса на оцеляване. В рамките на 5-годишния период на проследяване, всички пациенти с хомозиготна делеция на *CDKN2A* са починали. Също така, пациентите с делеция на *CDKN2A* показват значимо по-кратка обща преживяемост в сравнение с тези без делеция ($p = 0.011$). Така нашите данни напълно съответстват на препоръките от най-новата класификация, че наличието на хомозиготна делеция на *CDKN2A* при *IDH*-мутирали астроцитоми, определя поставянето на диагноза 4-та степен по СЗО (9).

Установено е, че нивата на продуктите на *CDKN2A* гена се регулират от експресията на различни микроРНКи, чиято нарушена експресия допълнително промотира клетъчната пролиферация, метастазиране и ангиогенеза (167). Интересен е фактът, че човешкият херпесен вирус 2 кодира микроРНК (H4-5p), която се свързва с 3′–UTR на *CDKN2A* и инхибира експресията му, при което се наблюдава намаляване на апоптозата.

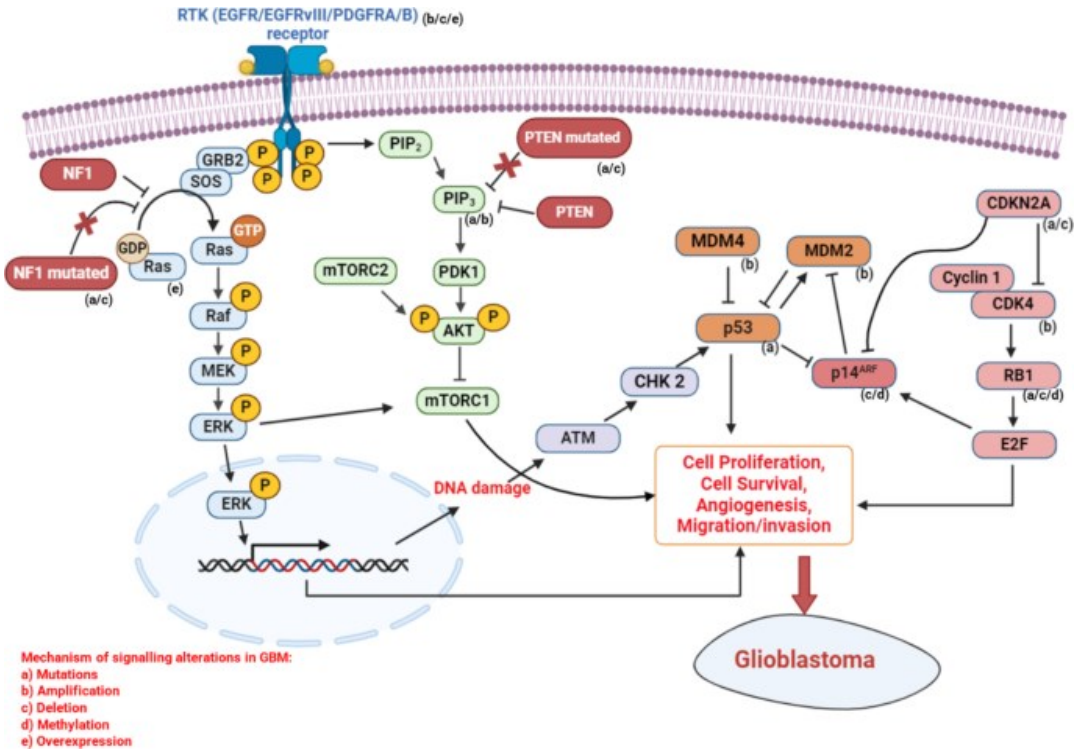
7.3.2. EGFR

EGFR, разположен на хромозома 7p11.2, е член на семейството на рецепторните тирозин кинази (RTK), заедно с PDGFR, VEGFR, FGFR и IGF-1R. Той играе ключова роля в активирането на митоген-активираната протеин киназа (MAPK), екстрацелуларно регулираните кинази (ERK) и фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K)/AKT сигналните каскади. Амплификацията на *EGFR* води до активиране на посочените каскади, което стимулира клетъчната пролиферация, оцеляването, ангиогенезата и метастазирането. Това явление често се наблюдава при различни видове тумори (54,168).

В настоящото изследване амплификацията на *EGFR* беше второто по честота CNV събитие, отчетено при 51.4% от пациентите. Тя се среща по-често при ВСГ и показва значима връзка със степента по СЗО ($p = 0.013$) и преживяемостта ($p = 0.002$). Нашите данни съответстват на последното, пето издание на класификацията на СЗО за тумори на ЦНС, според която амплификацията на *EGFR* е диагностичен биомаркер за глиобластом (9).

Освен амплификацията на *EGFR*, често се наблюдава и EGFRvIII вариант, образуван при делеция на екзони 2-7, водеща до постоянна активност на рецептора (21). Като резултат се наблюдава неконтролиран клетъчен растеж, повишена ангиогенеза и потискане на апоптозата - процеси, свързани с туморната агресивност и лошата прогноза (9,21).

При анализираните пациенти, *EGFR* амплификацията корелира с по-кратка OS в сравнение с тези без тази промяна ($p = 0.004$). Описаните резултати потвърждават наблюденията и на други автори, които посочват, че EGFR регулира множество процеси, като туморната пролиферация, инвазия, метастазирането, имуносупресивна микросреда и резистентност към терапия (13,21). Така например, *EGFR* амплификацията възпрепятства имунния отговор чрез привличане на имуносупресивни клетки в микросредата около тумора, което допълнително подпомага туморната инвазия (21,169). Наблюдаваната резистентност към химиотерапия и лъчетерапия при тумори с амплификация на *EGFR* е в основата на терапевтични стратегии, таргетиращи *EGFR* и регулираните от него сигнални каскади. Въпреки това, все още напредъкът на анти-EGFR терапиите остава предизвикателство (22,168).



Фигура 7.4. Най-често засегнатите гени със CNVs при глиоми (170).

7.3.3. PTEN

Един от важните туморсупресорни гени, често засегнат при различни видове рак, е *PTEN* (171). Той е разположен на хромозима 10q23 и играе ключова роля в инхибирането на PI3K/AKT пътя, водейки до арест на клетъчния цикъл и апоптоза (20).

В нашата кохорта честотата на делецията на *PTEN* е 30.6%, което съответства на данните от други изследвания (172). Наблюдаваме връзка между делецията на *PTEN* и степента по СЗО (p=0.04), както и с преживяемостта (p=0.027). Това събитие е свързано с лоша прогноза, тъй като делецията на *PTEN* се открива почти изцяло при пациенти с глиобластом и само при един пациент с НСГ. Почти всички от пациентите с делеция на *PTEN* са починали в рамките на 5-годишния период на проследяване, което потвърждава ролята му като негативен прогностичен маркер. Тези наблюдения могат да се обяснят със сигналните каскади, регулирани от *PTEN* и с вероятната делеция на близко разположени гени, кодиращи микроРНКи (miR-107, miR-146b-5p, miR-346, miR-1287–5p и др.) (54). Тези събития водят до свръхекспресия на EGFR и TERT, както и на други гени, свързани с глиомагенезата, което стимулира неконтролируемото клетъчно делене, инвазията и потискането на апоптозата (54). Интересно е да се отбележи, че нивата на PTEN се понижават при повишена експресия на miR-21 (57), както и загубата на PTEN е

асоциирана с повишени нива на miR-26a, което също допринася за развитието на глиомагенезата (173).

Също така, при няколко пациенти открихме комбинация от амплификация на *EGFR*, делеция на *CDKN2A* и *PTEN*, като тези пациенти показаха значително по-кратка OS (p=0.0036) в сравнение с останлите CNVs. Комбинацията от тези CNVs допринася за агресивния ход на заболяването и по-лошата прогноза за пациентите.

7.3.4. TP53

TP53 е туморсупресорен ген, разположен на хромозома 17p13.1. Промени в този ген водят до нарушаване на геномната стабилност, тъй като той регулира клетъчния цикъл, апоптозата и ДНК поправката. Това е един от най-често мутиралите гени при всички видове рак (13,174). В настоящото изследване откриваме делеция на този ген при 11.1 % от пациентите с глиоми. Известно е, че *TP53* е често мутирал при около 25% от първичните глиобластоми, което е свързано с повишена агресивност на тумора. Интересен е фактът, че при глиоми, промените в *TP53* корелират с понижена експресия на miR-34a, тъй като p53 директно регулира експресията на miR-34a, свързвайки се с неговия промотор и активирайки транскрипцията му. От друга страна, miR-34a повишава активността на p53 (52). Генетичните нарушения на *TP53* са свързани с лоша прогноза и по-висока степен на тумора (162). В нашата извадка не открихме връзка между делецията на *TP53* и понижената експресия на miR-34a, тъй като сред пациентите с делеция на *TP53*, имаше такива с нормални или дори повишени нива на miR-34a. Въпреки това, ГО анализът показа, че биологичните процеси, в които участват някои от таргетните гени, включват главно регулацията на G1/S прехода в клетъчния цикъл.

7.3.5. PDGFA

Разположен на хромозома 4q12, *PDGFRA* кодира рецепторна тирозин киназа, която се свързва с тромбоцитния растежен фактор (PDGF). Това взаимодействие активира вътреклетъчни сигнални пътища, контролиращи процеси като клетъчен растеж, диференциация и оцеляване. Засягането на *PDGFRA* води до постоянна активност на рецептора, отключвайки неконтролирана клетъчна пролиферация, което обуславя неговата онкогенна роля (175).

Нашите данни показаха, че амплификация на *PDGFRA* се открива при 11.1% от изследваните пациенти, което съответства на честотата в световен мащаб от около 10-17% (175). Проведените регресионни анализи показаха прогностична роля на *PDGFRA,* като амплификацията му е свързана с увеличен риск от смърт (HR = 2.179, p=0.041),

което подчертава ролята му в глиомагенезата, прогресията на заболяването и връзката му с по-лоша прогноза (14,176).

7.3.6. MDM2

MDM2 е разположен на хромозома 1q32 и кодира убиквитин-протеин лигаза, таргетираща p53, водейки до неговата деградация. В нормални клетки, съществува добре регулирана система за обратна връзка между нивата на p53 и MDM2: p53 активира MDM2, а MDM2, от своя страна, инхибира p53, като по този начин поддържа баланса на клетъчния цикъл. Допълнително, p14, кодиран от *CDKN2A,* има антагонистична функция на MDM2 и блокира инхибицията на p53.

В нашата извадка откриваме амплификация на *MDM2* при 6.9% от пациентите, което е в съответствие с докладваните честоти – от 3.5% при всички тумори и до 15% при глиоми и глиобластоми. *MDM2* изпълнява роля на онкоген и амплификацията му се асоциира с лоша прогноза при пациентите, тъй като промотира туморната прогресия (177). Въпреки това, не открихме статистически значима връзка между амплификацията на *MDM2* и показатели като OS и PFS. Амплификацията на *MDM2*, заедно с делеция на *CDKN2A* и *TP53*, са част от CNVs, засягащи p53 пътя – най-често компрометирания сигнален път при глиобластоми (14).

7.3.7. CDK4

CDK4 е разположен на хромозома 12q14.1 и кодира протеин, който изпълнява важна роля в регулацията на клетъчния цикъл. Той се свързва с циклин D и образува комплекса CDK4/циклин D1, контролиращ прехода от G1 към S-фаза. Протеинът p16, кодиран от *CDKN2A*, се свързва с CDK4**,** инхибира образуването на CDK4/циклин D1 комплекса и забавя прехода от G1 към S-фаза. CDK4 е част от RB пътя и промяната в нивата на CDK4, CDKN2A или RB водят до нарушаване на този път и активиране на клетъчната пролиферация, наблюдавано при различни тумори, включително глиоми (14,28).

В нашата извадка откриваме амплификация на *CDK4* гена при 5.6% от пациентите, което е малко по-ниско от докладваните около 11% амплификация при глиобластоми.
Сред изследваните проби, MLPA анализът разкри интересен случай на 39-годишен пациент, който е приет поради рецидив на предишно диагностициран астроцитом. Патологичното заключение след операцията е, вторичен глиобластом с компонента на ПНЕТ (примитивен невроектодермален тумор), при който се открива нетипична делеция

на *MDM2, CDK4* и *MIR26A2-1*, заедно с делеция и на туморсупресорните гени - *CDKN2A* и *PTEN.* Хистологично се отчита различен профил спрямо първия патологичен резултат, като патологът предполага, че смяна в морфологичната картина е възможно да се дължи на активиране на глиални-стволови клетки и трансдиференциация, което е рядко срещано в клиничната практика. В допълнение, той предполага връзка с патогенен вариант в един от екзоните на *TP53*, установен при предходно изследване. Не открихме в световната литература подобен случай и вероятно провеждането на допълнителни и по-цялостни молекулярно-генетични анализи би допринесло за яснота относно случая. Възможно е наблюдаваният разултат да е случайно събитие, поради геномна нестабилност и загуба на целия регион с тези близколокализирани гени (12q14-q15), или може да се окаже, че делецията на трите онкогена (*MDM2, CDK4* и *MIR26A2-1*) има протективен ефект и бъдещо клинично приложение, тъй като пациентът е в добро състояние повече от 5 години след операцията за рецидив.

7.3.8. NFKBIA

NFKBIA генът е разположен на хромозома 14q13.2 и кодира протеин- IkBα, който инхибира пътя на NF-κB. NF-kB е транскрипционен фактор, от семейството на Rel протеините. Той се поддържа неактивен в цитоплазмата чрез взаимодействие с инхибитора - IkBα. Фосфорилирането на IkBα води до инхибиране и разграждане, което предизвиква ядрена транслокация на NF-kB. В ядрото NF-kB регулира транскрипцията на гени, свързани с пролиферацията, оцеляването, инвазия, инхибирането на апоптозата и ангиогенезата. NF-kB се активира от различни типове кинази, част от STAT3, PI3K/Akt и MAPK пътищата. Няколко проучвания сочат връзка между EGFR и NF-kB, най-вече чрез активиране на PI3K/Akt/mTOR сигнализацията. Те наблюдават, че делецията на *NFKBIA* е взаимноизключващо се събитие с амплификацията на *EGFR* (178–180). Също така, авторите докладват честота на делецията на *NFKBIA* при около 20% от глиобластомите (179). Друго изследване, открива присъствието на делеции на *NFKBIA* в около 16% от изследваните първични глиоми и повишаване на честотата на това събите при последващи рецидиви (181). Нашите резултати показват, че делеция на *NFKBIA* се открива при 1.4% от пациентите**,** което е значително по-ниска честота от докладваната 16-20% при глиобластоми. Поради тази причина, не установихме други значими корелации с клинико-патологичните характеристики на пациентите. Възможни фактори за разминаване в честотата на *NFKBIA* делецията са генетичната хетерогенност, характерна за глиомите, с която може да се обясни вариацията в наблюдаваната честота

в нашата кохорта и отклонения от общата популация на глиомите; високата честота на амплификация на *EGFR* в нашата кохорта и взаимноизключващата се връзка с *NFKBIA* делецията, да е причина за наблюдаваната по-ниска честота; разлики в чувствителността и специфичността на използваните методи.

Делеции на *NFKBIA* се свързват с туморната агресивност, инхибиране на апоптозата и лоша прогноза при пациентите, поради постоянна активност на NF-κB (181,182). *NFKBIA* и регулирания от него път, са проучвана терапевтична стратегия при глиоми. Доказано е, че възстановяването на експресията на NFKBIA в туморни клетки намалява злокачествените характеристики и повишава чувствителността към химиотерапия (178,181).

7.3.9. MIR26A2

MIR26A2 се намира на хромозома 12 (12q14.1), кодира miR-26a-2 (miR-26a), участваща в регулирането на генната експресия чрез свързване към последователности в 3'-UTR на таргетните иРНК, включително и PTEN. При мишки с ВСГ, амплификацията на *MIR26A2* води до повишени нива на miR-26a, което от своя страна стимулира глиомагенезата чрез намаляване нивата на PTEN. Също така, амплификацията на *MIR26A2* е свързана със загуба на *PTEN*. Така повишените нива на mir-26a може да заместят загубата на хетерозиготност в PTEN и водят до активиране на PI3K/Akt пътя. От друга страна делецията на *PTEN* корелира с по-високи нива на miR-26a, доказващо взаимната връзка между двата гена. Смята се, че загубата на PTEN предшества амплификацията и повишения брой копия на *MIR26A2*. Това подчертава значението на *MIR26A2* в регулирането на глиомагенезата (173).

Друго проучване открива, че в екзозомите, секретирани от глиомни стволови клетки се съдържат високи нива на miR-26a. Това допринася за повишена пролиферация и ангиогенеза при глиоми чрез инхибиране на PTEN от miR-26a (183).

MIR26A2 често се амплифицира във ВСГ, особено при глиобластоми, докато в нашата извадка откриваме амплификация на *MIR26A2* в 11.1 % от пациентите. Амплификацията на *MIR26A2* корелира с амплификация на *CDK4* (173).

Възстановяването на експресията на PTEN или инхибирането на MIR26A2 може да помогне за потискане на туморния растеж и подобряване на резултатите за пациентите.

7.3.10. IDH1/2

Около 98.8% от мутациите в *IDH1/2* гените са $IDH1^{R132}$ или $IDH2^{R172}$, като най-често аргининът в позиция 132 (IDH1) е заместен с хистидин, докато при *IDH2* на позиции 140 или 172 аргининът е заместен с лизин или цистеин. Тези събития водят до намаляване на афинитета на IDH към изоцитрат и увеличаване на афинитета му към НАДФ. Така вместо α-кетоглутарат се синтезира 2-хидроксиглутарат, натрупват се свободни радикали и се нарушава клетъчният метаболизъм. В резултат е наблюдавано хиперметилиране на редица гени, поради инхибиране на ДНК деметилази и потискане на важни клетъчни процеси (184).

В нашата извадка честотата на мутациите в *IDH1* и *IDH2* гените е 19.74%, което обуславя т.нар. G-CIMP фенотип и представлява благоприятен прогностичен белег (18,22,185). Допълнително, наличието на тези мутации влияе върху метилирането на промотори, включително и на микроРНКи като miR-7, която е с понижена експресия поради промоторно хиперметилиране в ракови стволови клетки (51).

Нашите данни показаха, че мутация в *IDH1* корелира с KPS (p=0.021), OS (p = 0.031) и степента по СЗО (p = 0.002), което е в подкрепа на повечето световни данни (13,186). Въпреки наблюдаваната корелация със степента по СЗО, *IDH1* не показа диагностичен потенциал като индивидуален маркер за разграничаване на ВСГ от НСГ (p = 0.413). По отношение на прогностичната роля, открихме, че пациентите носители на мутация в *IDH1* живеят по-дълго в сравнение с тези без мутация в *IDH1* (p=0.026). За разлика от други проучвания, в нашата кохорта не откриваме прогностичен потенциал на *IDH1* по отношение на PFS (p = 0.83). Проведените регресионни анализи също потвърдиха, че наличието на *IDH1* мутация има протективно действие и е свързана с намален риск от смърт. При пациенти с мутация в *IDH1* гена се отчита по-нисък риск от смърт с 56% (HR= 0.443) в сравнение с пациентите без тази мутация. Наблюдаваните резултати са в съответствие с ролята на *IDH1* като прогностичен биомаркер, докладван в голям брой изследвания и утвърден в последните класификации на СЗО (9,22,89,187). Въпреки че наличието на мутации в *IDH* гените е маркер за по-нискостепенни глиоми (9), мутациите в *IDH1* се срещат в около 5-10% от първичните глиобластоми и достигат до 70-80% при вторичните глиобластоми, произхождащи от НСГ. За разлика от *IDH1*, честотата на *IDH2* мутациите е много по-ниска – около 1-3% при глиобластомите. В нашата извадка също наблюдавахме *IDH1* мутации при шест пациенти с глиобластом, като четирима от тях бяха с рецидив от предишен НСГ. Откриваме и пациенти с див тип

IDH, но с хистологична диагноза НСГ (напр. астроцитом, 2-ра степен по СЗО) и с OS над 5 години.

В изследваната кохорта липсва корелация между нивата на изследваните микроРНКи и присъствието на мутации в *IDH1* гена, за разлика от CNV при *EGFR* и *PTEN*.

Някои от разминаванията между нашите резултати и други доклади може да бъдат обяснени, както с туморната хетерогенност и различната чувствителност на използваните методи, така и с по-малката пациентска извадка.

Добавянето на нормален статус на ***IDH1*** (дори и с надгранична значимост p = 0.057) към комбинацията от ниски нива на **miR-491**, амплификация на ***EGFR*** и делеция на ***PTEN***, повишава диагностичната точност на селектирания молекулярен профил до **86.1% за отдиференциране между ВСГ и НСГ** (p=2.17E-4).

Посочените резултати подчертават необходимостта от активна колаборация между патолози и специалисти по молекулярна генетика, както и от все по-честото прилагане на интегрирания подход в клиничната практика.

7.4. Обсъждане на резултатите, получени при инфекциозния анализ за детекция на ЦМВ в изследваната кохорта от пациенти.

В нашето изследване открихме активна ЦМВ инфекция само при един пациент с рецидивирал глиобластом. Поради това, не идентифицирахме значими връзки с други клинико-патологични показатели. Останалите пациенти с рецидивирали глиоми бяха отрицателни, въпреки данните от доклади, които наблюдават ЦМВ реактивация след провеждане на лъчетерапия (188). Присъствието на ЦМВ в мозъчни тумори е обект на дебат през последните две десетилетия. Подобни на нашите резултати са докладвани и от други научни групи (79,189–191). В противовес на тези данни, някои автори съобщават за детекция на ЦМВ нуклеинови киселини и протеини в клетки от глиобластом, предполагащи потенциална роля на ЦМВ като фактор при глиомагенезата (72,73,78).

Разминаванията в резултатите могат да се дължат на използването на различни методики за диагностика и съответните им различни чувствителности. Мета-анализ обобщава чувствителността на различни методи и ЦМВ таргети, като съобщава, че IE протеинът показва най-силна връзка с ЦМВ инфекцията (OR = 140), следван от pp65 нуклеиновата киселина (OR = 18), pp65 протеин (OR = 3,1) и gB нуклеинова киселина (OR = 3,1) (192). В нашите анализи *pol* генът е използван като таргет за PCR

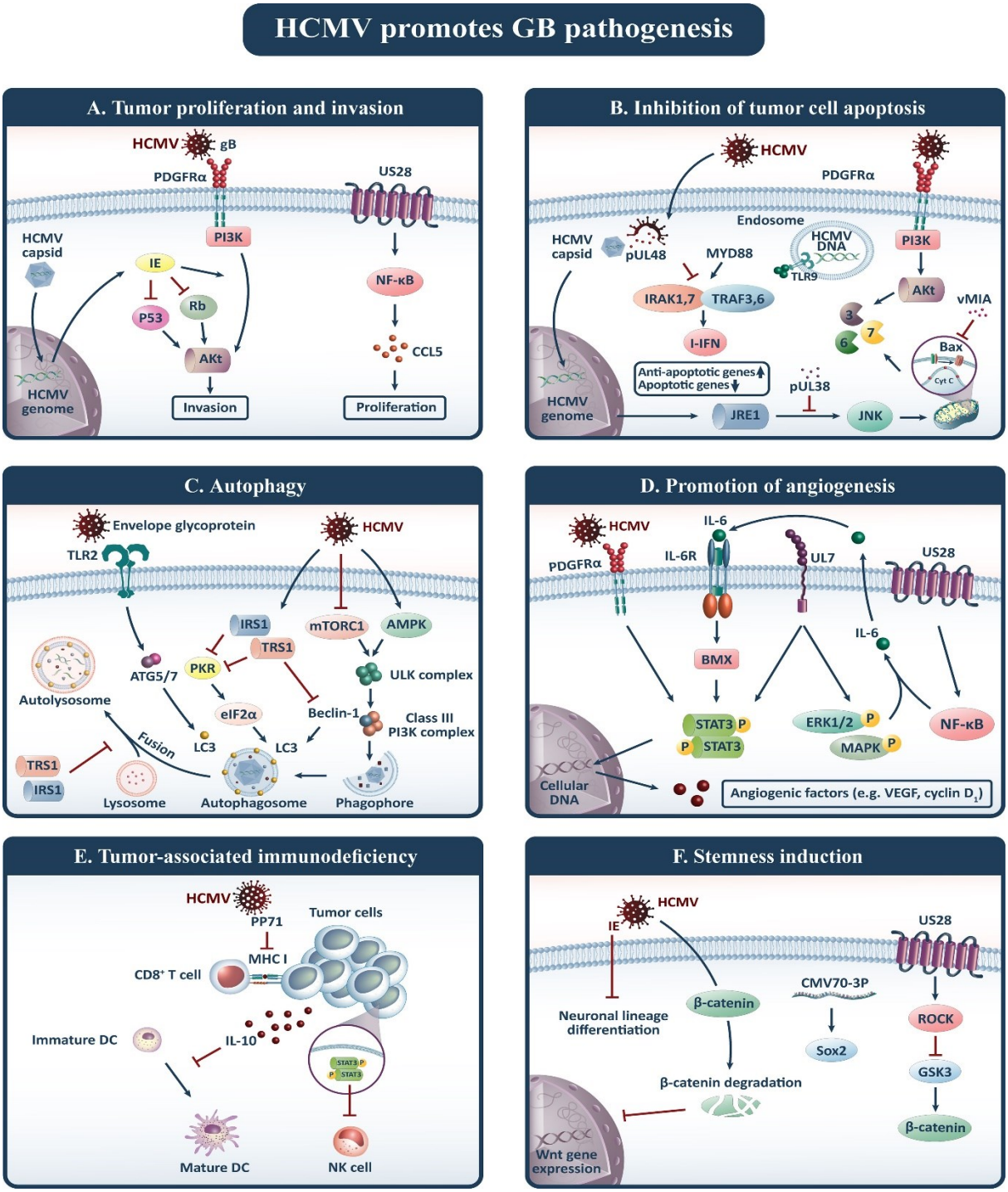
амплификация и детекция на ЦМВ инфекцията. Този ген кодира вирусната ДНК полимераза, необходима за вирусната репликация.

ЦМВ има сложен цикъл на репликация, включващ няколко фази - незабавна-ранна (IE), ранна (E) и късна (L). По време на активна инфекция, IE гени, като UL122/UL123, се експресират първи и регулират транскрипцията на E и L гени. E гените кодират важни за вирусната ДНК репликация протеини, като ДНК полимераза. Използваният в нашите анализи– *pol* ген се експресира след активиране на IE протеините. Гените (MIE), кодиращи IE протеините, са сред първите гени, които се експресират и кодират регулаторни протеини, активиращи експресията. По време на активната инфекция MIE генът се транскрибира в началото и кодира регулаторни протеини, които от своя страна активират транскрипцията на E и L гените, включително и *pol*. По време на латентната фаза вирусните гени се заглушават чрез епигенетични модификации и *pol* генът също е заглушен. Реактивация настъпва в отговор на имуносупресия или други стимули, което води отново до експресия на MIE гените и вирусна репликация. Възможно е наблюдаваната ниска честота на ЦМВ да се дължи на реална липса на вирусна репликация или на възможна по-ниска чувствителност на *pol* гена в сравнение с MIE гените, особено в случаи на нисък вирусен товар или много ранна фаза на вирусна инфекция (69,192). Последните събития се посочват като причина за липса на детекция на ЦМВ от различни групи (73,74).

От друга страна, при KEGG анализа откриваме, че вирусната карциногенеза и ЦМВ инфекция са статистически значимо асоциирани с изследваните от нас таргети на селектираните микроРНКи и CNVs. В подкрепа на тези наблюдения са докладваните обещаващи резултати от терапевтични проучвания, базирани на анти-ЦМВ стратегии при пациенти с глиоми (73,193).

Включването на допълнителни анализи за детекция на ЦМВ РНК, включително и вирусни микроРНК и протеини в бъдещи проекти би допринесло за валидиране или разширяване на наблюдаваните резултати, както и за по-цялостно разбиране на ролята на ЦМВ при глиалните тумори.

Вирусните микроРНК играят решаваща роля в модулирането, както на вирусната, така и на човешката генна експресия, като подпомагат избягването на имунния отговор и поддържат латентност. Те участват в блокирането на клетъчния цикъл на границата G1/S, инхибирането на апоптозата и заобикаляне на имунните механизми, допринасяйки за онкогенезата (фиг.7.5). Цитомегаловирусната микроРНК - UL112-3p е повишена при глиобластоми и нивата й корелират с размера на тумора, степента по СЗО и OS (194).

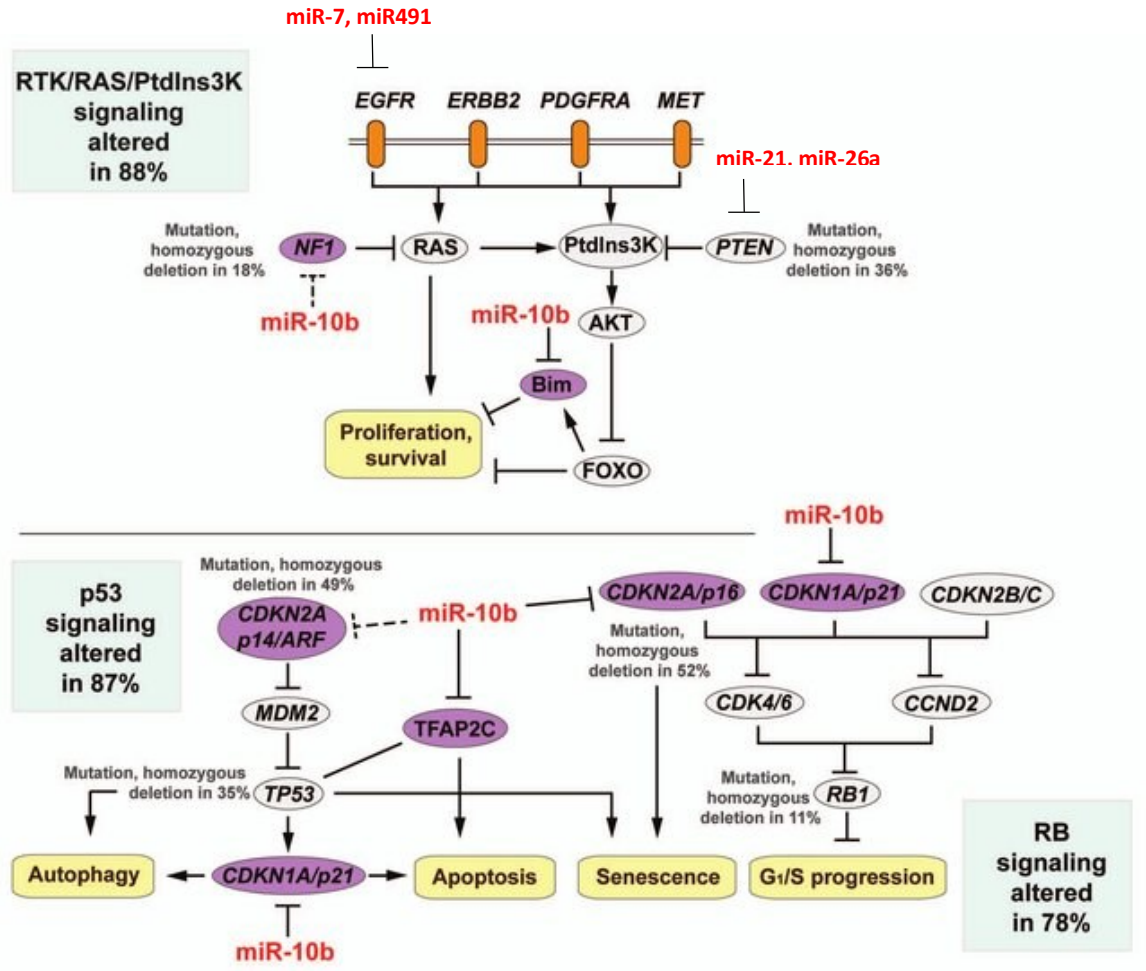


Фигура 7.5. ЦМВ инфекция и активиране на сигнални каскади, свързани с онкогенезата. **A.** Навлизането на ЦМВ в клетките води до активиране на PI3K/AKT пътя и супресия на RB, и TP53, което води до пролиферация и инвазия. **B.** Инхибиране на апоптозата. **C.** Автофагия **D.** Активиране на ангиогенезата. **E.** Тумор-асоциирана имуносупресия. **F.** Индуциране на свойства, подобни на стволовите клетки (195).

7.5. Обсъждане на резултатите, получени при комбинираните анализи на експресията на микроРНКи и CNVs.

Установено е, че CNVs и мутациите в *IDH* гените могат да влияят на експресията на микроРНКите и обратното. Вече описахме част от регулаторните каскади, свързващи

изследваните микроРНКи и гените с променен брой копия. На фигура 7.6 са показани трите най-често засегнати сигнални каскади при глиомите и връзката им с микроРНКите.



Фигура 7.6. Връзка между микроРНките и ключови гени, участващи в трите основни сигнални пътя, засегнати при глиоми (59).

Нашият анализ разкри значителни корелации, като например *EGFR* амплификацията, която корелира отрицателно с miR-7 (p=0,001) и miR-491 (p=0,035). Това предполага, че *EGFR* амплификацията е по-честа при пациенти с по-ниски нива на тези микроРНКи. Обратно, амплификацията на *EGFR* показва положителна корелация с miR-10b (p=0.029). Както вече беше обсъдено, miR-7 и miR-491 таргетират 3' UTR на EGFR иРНК, което води до намалена експресия на EGFR и потискане на EGFR/ PI3K/Akt сигналния път. Не е напълно ясно дали високите нива на EGFR потискат експресията на тези микроРНК и по какъв механизъм. Известно е, че заедно с амплификацията на *EGFR*, пациентите показват често и делеция на *CDKN2A*, която може да повлияе нивата на miR-7 и miR-491 вследствие делеция на кодиращите ги гени, разположени в близост до *CDKN2A*. Освен това, мутации в *TP53* гена могат да повлияят активността на Drosha - ключов ензим в биогенезата на микроРНКите, и съответно да променят нивата им (196).

Възможно е тези наблюдения да се дължат на епигенетични промени, подобно на промоторното метилиране на miR-7 при ракови стволови клетки (51).

Също така, откриваме корелация между делецията на *PTEN* и ниските нива на miR-7 (p=0.023) и miR-491 (p=0.006). При двамата пациенти с рецидиви на глиобластом, описани в нашето проучване, се наблюдава еволюция на генетичния профил с прогресията на заболяването. Първоначалната амплификация на *EGFR* и делеция на *CDKN2A*, последвана от поява на делеция на *PTEN* и амплификация на *PDGFRA* при рецидивите (табл. 7.1), подчертава адаптивните механизми на тумора в отговор на терапията и динамичния характер на генетичния профил. Нашите данни показват, че амплификацията на *EGFR* и делецията на *CDKN2A* са сред ранните генетични преустройства. Делецията на *PTEN* се открива, както при първични глиобластоми, така и като по-късно събитие при рецидивирали глиобластоми, вероятно като допълнителен механизъм за активиране на PI3K/AKT пътя. Амплификацията на *PDGFRA* е по-късно еволюционно събитие и може да бъде свързано с появата на рецидив. Многофакторният регресионен модел на Кокс също показа, че амплификацията на *PDGFRA* и делецията на *PTEN* са предиктори за по-кратък PFS. Разбирането на последователността и ролята на CNVs е от решаващо значение за разработването на таргетни терапии. Например, терапиите, насочени към пътищата на EGFR и PI3K/AKT, могат да бъдат по-ефективни, когато се прилагат рано в хода на заболяването, а наличието на допълнителни промени в *PTEN* и *PDGFRA* може да помогне за прогнозиране на по-агресивен ход на развитие и да насочи към адаптиране на лечението.

Допълнително, наблюдавахме повишаване на нивата на онкогенните miR-21 и miR-10b, съчетано с намаляване нивата на туморсупресорните miR-7, miR-491 и miR-34a, при всеки следващ рецидив (табл. 7.1). Наблюдаваните промени много точно отразяват по-агресивното поведение на глиобластомите и потвърждават потенциала на изследваните микроРНК като биомаркери за прогресия на заболяването.

Важно е да се подчертае, че делецията на *PTEN* и ниските нива на miR-7, и miR-491 имат синергичен ефект върху активацията на PI3K/AKT и MAPK сигналните пътища, което насърчава злокачествения потенциал на туморните клетки. Очевидно, PI3K/Akt пътят е ключов, тъй като получените резултати от експресионните, CNVs и KEGG анализи, показват, че този сигнален път е значимо застъпен и свързан както с онкогенезата, така и с онковирусните инфекции. Например, онкогенният вирус – ЕБВ повишава нивата на miR-10b и експресията на EGFR, с цел да активира PI3K/Akt пътя (115,143).

Таблица 7.1. Промяна на експресионните нива (представени като log_2FC) и CNVs при прогресия на заболяването. Данните от трима пациенти с рецидиви показват еволюцията на изследваните промени.

	Пациент №1 G8	Пациент №2 G15	Пациент №3 G46
Първа операция			
CNVs	норма	*EGFR* ампл. *CDKN2A* дел.	*EGFR* ампл. *CDKN2A* дел.
miR-7	-0.9	-4.7	-2.1
miR-10b	1.9	22.9	24.49
miR-21	0.4	5.8	2.7
miR-491	0.8	-2.8	-1.59
miR-34a	0.7	0.7	1.8
Втора операция			
CNVs	EGFR ampl.	*EGFR* ампл *CDKN2A* del *PTEN* дел. *PDGFRA* ампл.	*EGFR* ампл. *CDKN2A* дел. *PTEN* дел.
miR-7	-3.9	-5.8	-3.6
miR-10b	22.6	24.3	24.6
miR-21	6.4	5.9	2.6
miR-491	0.3	-4.5	-1.9
miR-34a	-0.2	-0.6	0.6
Трета операция			
CNVs			*EGFR* ампл. *CDKN2A* дел. *PTEN* дел.
miR-7			-6.4
miR-10b			25
miR-21			3.3
miR-491			-2.9
miR-34a			-0.7

В свързана регулаторна мрежа са нивата на p53 и miR-34a, които взаимно контролират експресиите си (162). От друга страна p53 сигналната каскада се контролира и от miR-10b, която е свръхекспресирана в глиоми и мозъчни метастази и се свързва с лоша прогноза (58,115,197).

Интересни резултати докладва проучване за връзката между *IDH1* R132H мутацията, нивата на микроРНК и IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor). Авторите откриват, че три микроРНК, сред които miR-7-5p, са с понижена експресия при наличието на *IDH1* p.R132H мутация. Това понижение е свързано с повишена експресия на IGF1R, който се открива при различни тумори и е свързан с интензивна клетъчна пролиферация, оцеляване и миграция (128). IGF1R е рецепторна тирозин киназа, която принадлежи към семейството на инсулиновите рецептори, активира се при свързване с инсулиноподобни растежни фактори (IGF) и играе роля в поддържането на ракови стволови клетки. Също така, активирането на IGF1R обуславя резистентност към стандартни антиракови терапии, което го прави потенциална терапевтична мишена.

Интересно е, че miR-7, miR-21, miR-491 и miR-34a участват в регулацията на глюкозния метаболизъм и на инсулиновата секреция при диабет тип 2 (198).

Както обсъдихме вече, мутациите в *IDH1/2* гените са свързани с високи нива на 2ХГ, повишено промоторно метилиране и понижена експресия на редица иРНК, включително и микроРНК (49). Високите нива на 2ХГ са свързани с ЕМТ, чрез дерегулиране на miR-200 семейството и ZEB1, като инхибирането на *IDH* мутациите води до предотвратяване на ЕМТ (199). Други проучвания докладват за циркулиращи микроРНКи, които корелират с наличието или липсата на мутации в *IDH* гените и показват потенциал за предоперативни диагностични биомаркери за разграничаване на различни степени глиоми (200,201).

Нашите анализи демонстрират, че делецията на *PTEN,* делеция на *CDKN2A,* напредналата възраст и нормален статус на *IDH1* са предиктори на по-кратка OS.

По отношение на PFS, значимите независими предиктори за по-кратък период преди прогресия са амплификация на *EGFR* и *PDGFRA,* както и анамнеза за артериална хипертония. Наблюдаваните резултати могат да се обяснят с функциите на EGFR и PDGFRA, активиращи сигнални каскади като PI3K/Akt/mTOR и Ras/Raf/MEK/ERK, стимулирайки неконтролиран туморен растеж, ангиогенеза и инвазия. Делецията на *PTEN*, който негативно регулира пътя на PI3K/Akt/mTOR, се свързва с по-дълъг PFS в нашата кохорта (HR = 0.320).

Интересно е, че нашето проучване идентифицира артериалната хипертония като независим предиктор за по-кратък PFS при пациенти с глиоми. Докато връзката между АХ и рака не е напълно изяснена, съществуват няколко хипотези. Нерегулираната АХ, включително и повишената пропускливост на кръвно-мозъчната бариера, може да създаде благоприятна микросреда за прогресия на глиомите. Освен това, хипертонията индуцира хронично възпаление, оксидативен стрес и повишени нива на растежни фактори и цитокини, които могат да стимулират туморния растеж и ангиогенезата (202). В заключение може да кажем, че нашият модел демонстрира подобрена дискриминационна точност от 76.8% (С-индекс = 0.768), което е по-високо като стойност в сравнение с някои предишни модели, използвани за прогнозиране на преживяемостта при пациенти с глиоми (203). В сравнение с други проучвания, нашият модел предлага по-прецизна стратификация на риска. Например, доклади, базирани на образна диагностика и CNS5, са с С-индекс от 0.75, или прогнозиране на преживяемостта при възрастни пациенти с ВСГ с С-индекс от 0.701. В допълнение, систематичен анализ на радиомични модели, базирани на машинно обучение, докладва диагностична точност

между 78% и 96%, като в бъдещи проучвания нашият модел има потенциал да бъде допълнен с тези иновативни подходи за още по-прецизни прогнози.

Включването на нови биомаркери като miR-491 и miR-7, които показват корелация с подобрена преживяемост, дава възможност за допълнително усъвършенстване на прогнозните алгоритми. Освен това, идентифицирането на артериалната хипертония като независим предиктор за по-кратък PFS е ново откритие, което разширява разбирането за влиянието на системни фактори върху прогресията на глиомите.

Необходими са допълнителни изследвания за потвърждаване на тези резултати и изясняване на точните механизми на глиомагенезата, които могат да разкрият потенциални терапевтични таргети.

7.6. Настоящи и бъдещи терапии за лечение на глиоми

До началото на 2025 г. одобрените от Администрацията по храните и лекарствата (FDA) (www.fda.com) терапии включват Темозоломид, Кармустин, Ломустин, Бевацизумаб и TTF (tumour-treating fields) за пациенти с ВСГ, както и Ворасидениб, и Дабрафениб с Траметиниб за НСГ (204).

Три от одобрените терапевтични препарати са алкилиращи агенти (Темозоломид - TMZ, Кармустин и Ломустин), които увреждат ДНК и инхибират растежа и деленето на раковите клетки.

Бевацизумаб (Avastin) е моноклонално антитяло, насочено срещу VEGF-A, с цел инхибиране на ангиогенезата. При пациенти с рецидивирал глиобластом, бевацизумаб може да се включи като допълнителна терапия към стандартната химиотерапия и лъчетерапия. Ефектите на тази терапия се свързват с временно повлияване на някои от неврологичните симптоми, но не променят значително OS (205).

През 2015 г. FDA одобрява т.нар. полета за лечение на тумори - TTF (tumour-treating fields) за лечение на новодиагностициран глиобластом. Комбинираната терапия с TMZ, лъчелечение и TTF води до удължаване на PFS, въпреки че промяната в общата преживяемост е минимална. Този метод прилага електрически полета с ниска интензивност (1–3 V/cm) и средночестотни импулси, които нарушават клетъчното делене (204). TTF все още не се използват масово поради високата цена и някои неудобства за пациентите.

През 2023 г. FDA одобри комбинацията от Дабрафениб с Траметиниб за педатрични пациенти с глиоми, носещи мутацията BRAF V600E, която води до конститутивна активация на МЕК/MAPK/ERK пътя.

През август 2024 г. беше одобрен Ворасидениб (Voranigo) за възрастни и деца над 12 г. с астроцитом 2-ра степен по СЗО или с олигодендроглиом с *IDH* мутация. Ворасидениб значително забавя прогресията на НСГ. Също така, отново през 2024 г. е одобрен Товорафениб за педиатрични пациенти с рецидивиращ или рефрактерен НСГ и BRAF фузия или BRAF V600 мутация (www.fda.com).

Въпреки приложението на най-новите терапии, одобрени от FDA, лечението на злокачествените глиоми, показва минимално подобрение в OS и PFS. Поради тази причина разработването на нови терапевтични стратегии остава изключително актуален проблем.

7.6.1. МикроРНК-базирани терапии

Освен в диагностичен и прогностичен аспект, микроРНКите са широко изследвани и като терапевтични таргети. Редица изследвания доказват, че възстановяването на нивата на микроРНК е потенциално ефективен подход за персонализирана терапия при пациенти с ракови заболявания (206). Също така, нарушената експресия на микроРНКите е свързана с присъствието на лъче– и химиотерапевтична резистентност. Други учени докладват, че някои микроРНКи повишават чувствителността на тумора към определена терапия и подчертават потенциала им за повишаване на терапевтичната ефективност (66,207–210).

И двете онкомикроРНКи в нашето изследване - miR10b и miR-21, повишават пролиферацията и инвазивността при глиомите, като инхибират туморсупресорни гени (115,136,137). В тази връзка, потискането на експресията на miR-21 води до намаляване на активността на EGFR и AKT сигналните пътища (125), възстановяване на p53 регулираната апоптоза, възстановяване функцията на PTEN, както и до повишена преживяемост (64,137). В други проучвания, едновременната инхибиция на miR-21 и C-X-C Chemokine Receptor 4 (CXCR4) в злокачествени глиоми *in vivo* и *in vitro* потиска AKT и Raf сигналните каскади и намалява туморната пролиферация, инвазивност и миграция (211).

Повишената експресия на miR10b и miR-21 е свързана с терапевтична резистентност, както при лъчетерапия, така и при химиотерапия (123,144,212). Инхибирането на miR-21 с антисенс олигонуклеотиди (ASO) е показало по-високи нива на апоптоза, както и по-добър отговор към темозоломид и лъчетерапия (123). Интересно е, че според друг доклад miR-21 може да стратифицира пациентите според времето до рецидив след терапия с темозоломид (213). Следователно, заглушаването на miR-21

може да повиши ефективността на TMZ и в бъдеще да се използва като адювантно лечение при пациенти с терапевтична резистентност.

Високите нива на miR-10b при глиобластом са свързани с резистентност към ефективността на лъчетерапията, поради потискане на апоптозата и активиране на AKT пътя (144). Инхибирането на експресията на miR-10b корелира с подобрен отговор към неоадювантна терапия и повишена преживяемост (115). Комбинираното потискане на miR-21 и miR-10b, преди терапията с темозоломид е показало инхибиране на клетъчния цикъл и растежа на клетъчни култури от глиобластом (214).

Понижената експресия на miR-7, наблюдавана в нашето проучване, се свързва с резистентност към лечение с темозоломид (215). При възстановяване нивата на miR-7 в глиобластом се наблюдава потискане на онкогенния EGFR/PI3K/AKT сигнален път (150). Екип от учени установява, че miR-7 намалява резистентността към BRAF инхибитори чрез таргетиране на EGFR, IGF-1R, CRAF и потискане на MAPK и PI3K/Akt сигналните пътища. Използвайки олигонуклеотиди, подобни на miR-7, авторите наблюдават инхибиране на туморния растеж и подчертават ролята на miR-7 като потенциален терапевтичен агент при BRAF-резистентен меланом (216). Някои автори откриват връзка между нивата на miR-7 и използването на метформин за контрол на диабет. Установено е, че метформинът понижава нивата на miR-21 и възстановява нормалната експресия на miR-7, като учените наблюдават инхибиране на NF-kB, MAPK/Erk и AKT/mTOR пътищата, както и раковия растеж (217,218).

Разработването на терапия, базирана на miR-34a (табл. 7.2), е сред първите клинични проучвания, използващи микроРНК за лечение на солидни тумори (219).

Терапевтичните подходи, базирани на микроРНКи изискват допълнителни проучвания, за да се определи тяхната безопасност и ефикасност. Някои от лимитиращите фактори за терапевтична употреба на микроРНКите са способността им да таргетират множество гени и потенциален off-target (нецелеви) ефекти; избор на ефективен модел за преноса им до таргетното място, който да ги защитава от деградация от нуклеази и да не предизвиква силна имунна реакция. В тази връзка, наночастици, натоварени с микроРНКи, синтезирани екзозоми, вирусни вектори или плазмиди са проучвани като клетъчно-специфични методи за пренос на тези молекули, с обещаващо терапевтично приложение (220–222). Разбирането в детайли на сложните взаимодействия между микроРНКите и техните таргети би било изключително ценно за разработването на персонализирани стратегии за лечение.

В таблица 7.2. са показани микроРНК-базирани терапии, които са в различни фази на клинични проучвания.

Таблица 7.2. МикроРНК-базирани модели за лечение, в различни фази на клинични проучвания

miRNA	Фаза на клинично изпитване	Име на лекарство	Заболяване	Производител
miR-92a	I	MRG-110	Контрол на исхемия и ангиогенеза	miRagen Therap. Inc.
miR-155	I	MRG-106	Кожен Т-клетъчен лимфом	miRagen Therap., Inc.
miR-103, miR-107	II	RG-125	Неалкохолна стеатоза при диабет тип 2	AstraZeneca
miR-29	II	MRG-201	Лечение на фиброза (белодробна)	miRagen Therap., Inc.
miR-21	II	Lademirsen	Превенция на нефропатия при с-м на Алпорт	Genzyme
miR-34a	I	MRX34	Карциноми	miRNATherapeutics
miR-17	I	RGLS4326	Поликистоза на бъбреците	Regulus Therapeutics
miR-122	II	Miravirsen SPC3649	Хепатит С вирус	SantarisPharma

Освен посочените в списъка още няколко компании активно разработват микроРНК-базирани терапии срещу различни заболявания, включително рак:

- ♥ Sirnaomics - рак, сърдечно-съдови заболявания и фиброза
- ♥ TransCode Therapeutics - терапии за лечение на рак, включително анти-miR-10b
- ♥ Ceria Therapeutics - възпалителни състояния
- ♥ Biorchestra - различни заболявания

Тези компании са на различни етапи на изследване и развитие, но постигнатите резултати досега, подчертават потенциала на тези терапии в бъдеще.

В обобщение може да кажем, че в бъдеще терапии, базирани на микроРНКи, имат потенциал да бъдат комбинирани със стандартната терапия и да допринесат за подобрена ефективност и качеството на живот на пациентите с мозъчни тумори.

7.6.2. Терапии, свързани със статуса на изследваните гени

Генетичните промени, изследвани в настоящия дисертационен труд, са сред най-новите терапевтични таргети, на които се възлагат изключителни надежди за подобряване на ефекта от лечението и качеството на живот на пациентите с глиоми.

Важно е да се спомене, че молекулярното изследване трябва да се извърши върху най-новата туморна проба, тъй като профилите се променят с времето (9,12,223).

Тъй като *EGFR* е често засегнат ген при тези тумори, активно се проучват стратегии с използване на тирозин киназни инхибитори (TKIs), които да компенсират негативните ефекти на тези изменения. Въпреки това, изпитванията на няколко анти-EGFR TKIs, като Гефитиниб, Ерлотиниб и Афатиниб, както и моноклонални антитела – Цетуксимаб, са проведени при пациенти с глиобластом, но резултатите не са показали значителни разлики в OS и PFS в сравнение с конвенционалната терапия. Активно се проучва като таргет и EGFRvIII фузионният вариант, но засега клиничната ефективност на този тип терапия остава ограничена.

Друг таргет и терапевтична стратегия при лечението на рак е *PDGFRA*. Активността на PDGFRA се инхибира от медикаменти като Иматиниб, Авапритиниб и Креноланиб. Тези лекарства са особено ефективни при лечение на стомашни тумори с *PDGFRA* мутации. В момента се провеждат клинични изпитвания за оценка на ефикасността на тези инхибитори при други видове рак, включително и глиоми (224).

Делецията на *PTEN* и амплификацията на *EGFR* водят до активация на PI3K/AKT/mTOR пътя и терапии, таргетиращи тази каскада с mTOR инхибитори, са също в процес на проучвания (225,226).

Друга терапевтична стратегия е таргетирането на MDM2-p53 връзката, като няколко инхибитора на MDM2, включващи Навтемадлин (navtemadlin), Идасанутлин (idasanutlin) и др. са в процес на клинични проучвания. Целта на тази терапия е да възстанови p53, като го предпази от деградация. Друг MDM2 инхибитор - nutlin-3 също цели възстановяване функцията на p53 при тумори без генетични изменения в TP53.

Инхибитори на *IDH1*, като Ивосидениб (ivosidenib) и Ворасидениб (vorasidenib), показват значително забавяне на прогресията на заболяването при НСГ с мутация в *IDH*, като комбинации с други схеми на лечение също са в процес на изследване.

Редица терапии са одобрени при други видове рак, но са в процес на изпитване при глиоми. На таблица 7.3 са показани някои от таргетните терапии и фазите на клинични изпитвания, в които се намират.

Таблица 7.3. Таргетни терапии в различни фази на клинични проучвания

Терапевтичен таргет	Фаза на клинично изпитване	Терапия	Заболяване	Производител
IDH1	I	Ivosidenib (Tibsovo) + Nivolumab. Ivosidenib е одобрен за AML	IDH1 мутирал глиом	Agios Pharmaceuticals
IDH1/2	Одобрен	Vorasidenib	IDH1/2-мутирал астроцитом 2-ра степен по СЗО или олигодендроглиом	Servier Pharmaceuticals LLC
CART-EGFR-IL13Ra2	I	Химерни антигенни рецепторни Т клетки (CAR-T), срещу EGFR и IL13Ra2	IDH див тип рецидивирал глиобластом с амплификация на *EGFR*	University of Pennsylvania, USA
EGFR	II	Cetuximab	Глиобластом с амплификация на *EGFR*	Eli Lilly
EGFRvIII	III	Rindopepimut (CDX-110) + Temozolomide	Глиобластом	Celldex Therapeutics
EGFR	II	Dacomitinib Втора генерация TKIs, одобрен за NSCLC	Глиобластом с *EGFR* амплификация или мутация	Pfizer Inc.
PI3K/mTOR	II	Paxalisib (GDC-0084)	Глиобластом	Kazia Therapeutics
mTOR	II	Everolimus	НСГ	Новартис
CDK4/6 (CDKN2A del)	II	Abemaciclib	Рецидивирал глиобластом	Eli Lilly
PDGFRA	II	Crenolanib	Глиобластом	AROG Pharmaceuticals

Обещаващ подход за лечение на мозъчни тумори е CAR-T (chimeric antigen receptor) терапията, при която Т-лимфоцитите на пациента се модифицират, за да разпознават и унищожават туморните клетки. Въпреки успехите ѝ при някои левкемии и лимфоми, при глиобластом приложението ѝ все още е в процес на моделиране, поради

туморната хетерогенност. Проучванията върху HER2, EGFRvIII и IL13Rα2 CAR-T показват частична туморна регресия, но ограничена ефективност поради загуба на таргетната промяна при рецидив. Поради това, нови стратегии за комбинация на CAR-T с имунотерапия или повече от един таргет се проучват за повишаване ефективността на терапията (227).

Използването на CAR-NK терапевтични стратегии, базирани на NK клетки, показват потенциал да превъзмогнат проблемите с хетерогенността при CAR-T терапията, тъй като не изискват специфични туморно-асоциирани антигени. NK клетките могат да се насочат към раковите клетки с намалена експресия на MHC-I, повишавайки антитуморния имунитет, като същевременно запазват здравите клетки. Така този нов терапевтичен подход в комбинация с други лечения се проучва за бъдещи терапии при пациенти с глиоми (228).

Ваксината SurVaxM, която се състои от синтетични пептидни антигени, насочени към протеина сървивин, експресиран от глиобластомите, се проучва, за да се определи дали добавянето й към стандартната химиотерапия е по-ефективно от лечението само с TMZ при пациенти с новодиагностициран глиобластоми. Резултатите до сега показват, че шест месеца след диагностицирането, 60% от всички участници са без прогресия, средното време без прогресия е 11,4 месеца, а средната обща преживяемост (OS) е 25,9 месеца след първата доза SurVaxM (227).

Скорошни проучвания включват и PARP (поли АДФ-рибоза полимераза) инхибитори, като например приложението на Нирапариб (Niraparib), достигнал фаза III на клинично изпитване и оценка на ефикасността му при новодиагностицирани глиобластоми. PARP инхибиторите действат на PARP-1 и PARP-2 ензимите, които са отговорни за поправката на ДНК и предотвратяване на туморогенезата. Приложението на Нирапариб води до натрупване на ДНК увреждания, което в крайна сметка предизвиква апоптоза на раковите клетки. За сега, Нирапариб е одобрен за лечение на други видове рак (229).

Друго проучване, достигнало фаза II, цели да определи, дали добавянето на метформин към стандартната химиолъчетерапия при пациенти с новодиагностициран глиобластом, може да подобри резултатите. Целта е да се определи дали метформинът като инхибитор на комплекс I в митохондриите и митохондриалния метаболизъм ще потисне растежа на тумора. (227).

Въпреки редица проведени клинични проучвания, таргетиращи различни молекулни промени, повечето от терапиите за глиобластом са спрени поради липсата на ефикасност. Няколко са възможните причини за неуспехите:

- наблюдаваната висока интратуморна и интертуморна хетерогенност, която често води до резистентност, чрез активиране на компенсаторни сигнални каскади, които да заобиколят конкретния инхибиран таргет. Например при инхибиране на EGFR, глиобластомните клетки могат да активират други тирозин кинази, които от своя страна да активират PI3K/AKT/mTOR пътя
- ограничена пенетрантност през кръвно-мозъчната бариера и недостатъчна концентрация за ефективно инхибиране в тумора
- честите странични реакции, които изискват по-персонализиран подход

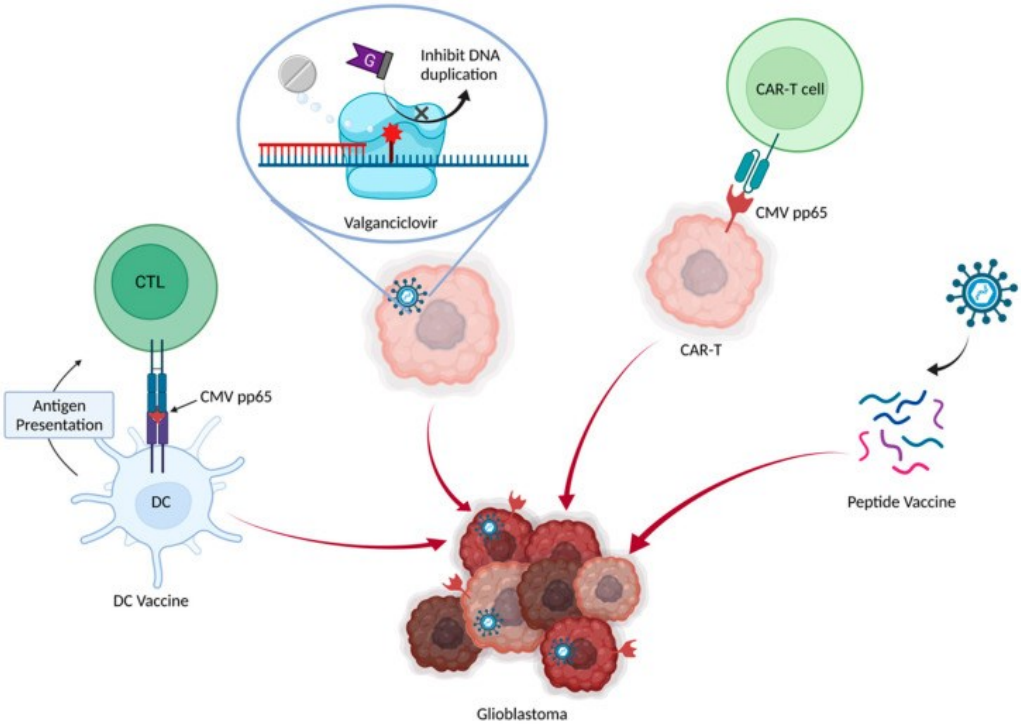
Поради тези причини все повече изследвания и клинични изпитвания насочват ресурсите си към комбинирани терапии, с цел мултигенно повлияване и преодоляване на резистентността.

7.6.3. ЦМВ-базирани терапии

Терапии, свързани с таргетиране на ЦМВ при глиомите са обект на изследвания. **Валганцикловир** инхибира ЦМВ репликация и показва потенциални ползи за оцеляване при пациенти с глиобластом. (84).

Проучват се имунотерапии, насочващи имунния отговор към ЦМВ асоциирани туморни клетки (82). Например, имунна терапия базирана на **pp65** (ЦМВ протеин) като специфична цел за туморните клетки. Важно е да се споменат резултатите на клинично проучване, което тества автоложни дендритни клетки, насочени към pp65 и цитотоксични ЦМВ-специфични Т клетки в комбинация със стандартна терапия при новодиагностицирани пациенти с глиобластом. Резултатите на това проучване са изключително обещаващи, тъй като наблюдават забележително повишена OS от 41,1 месеца и PFS от 25.3 месеца, както и няколко дългосрочно оцелели пациенти (до 64 месеца) (82,83).

Най-често се проучват четири основни метода за лечение (фиг.7.7).



Фигура 7.7. Анти-ЦМВ терапевтични стратегии за лечение на глиоми (230).

Допълнително, CAR-T клетките могат да бъдат проектирани да се насочват към pp65 антигена, директно убивайки тумора. Разработват се и пептидни ваксини базирани на ЦМВ. Терапии базирани на ЦМВ биха довели до селективно таргетиране и по-ефективно инхибиране на глиомните клетки (193).

7.7. Силни и слаби страни на настоящето проучване

Настоящето проучване е особено ценно, тъй като проследява пациентите в сравнително дълъг период от 5 години (при някои пациенти - 6 г.) и предоставя важна информация за клинични показатели като OS и PFS.

Проучването предлага интегриран подход за профилиране на глиомите, съчетавайки епигенетични изменения, като нива на микроРНКи, промени в броя копия на гени, участващи в глиомагенезата и оценява ролята на ЦМВ инфекция сред български пациенти с глиоми, което е в съответствие с най-новите тенденции за по-цялостни и интегрирани диагностични и терапевтични стратегии при раковите заболявания. Селектираните от нас диагностичен и прогностичен профил позволява лесна клинична имплементация поради рестриктивния набор от микроРНКи и гени.

Някои от ограниченията на настоящето проучване включват неголям размер на извадката, особено за НСГ, както и на пациентските контроли. Поради тези причини, планираме получените данни да бъдат валидирани в бъдещи проучвания с по-голяма пациентска кохорта. Въпреки посочените по-горе ограничения, ефектът им върху коректността на обобщените резултати е минимизиран, поради надеждността на използваните статистически анализи и естеството на непараметричните тестове.

Допълнително в настоящото изследване липсват данни за някои от одобрените от СЗО генетични маркери, които планираме да бъдат обхванати при последващи проекти и изследвания.

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд проведохме **интегриран анализ, включващ експресионно профилиране на микроРНК, анализ на измененията в броя копия (CNVs) на ключови онкогени и туморсупресорни гени при глиомагенезата, както и изследване на цитомегаловирусна активна инфекция** при български пациенти с глиоми.

Резултатите от проведеното мултидисциплинарно изследване разкриват значителен **биомаркерен потенциал на селектирания микроРНК профил (miR-7, miR-10b, miR-21 и miR-491)** в комбинация със CNVs на ***EGFR, PTEN, CDKN2A*** при пациенти с глиоми. **Важно откритие е индивидуалният потенциал на miR-7 и miR-491 като биомаркери за разграничаване между високо- и нискостепенни глиоми**, което може да намери приложение в клиничната практика след валидирането им. Допълнително показахме, че е необходимо да се подходи с особено внимание, когато се използва близко разположена и макроскопски „нормално“, изглеждаща мозъчна тъкан за контрола, поради вероятността й да попада в перитуморната мозъчна зона.

Получените данни показват, че нашият **молекулярен подпис може да допълни конвенционалните методи** за диагностика и стратификация на пациентите, особено в **случаи с гранична или подценена диагноза**, тъй като предложените модели демонстрират подобрена дискриминационна точност и по-прецизна стратификация в сравнение с някои предишни модели, използвани за прогнозиране на преживяемостта при пациенти с глиоми.

Изследването не установи връзка между ЦМВ инфекция и глиомите в българската кохорта. Допълнителни проучвания с по-голяма извадка и алтернативни диагностични методи ще позволят по-прецизна оценка на тези наблюдения, докладвани от други научни групи.

Нашите резултати подчертават значението на дерегулираните микроРНК и подкрепят използването на комбинирани молекулярни и клинични предиктори за по-прецизна диагностика и прогнозиране, което показва правилната посока на научните ни интереси. В бъдеще интегрирането на нашия модел с радиомични подходи и изкуствен интелект би могло да подобри още повече диагностичната и прогностичната точност, отваряйки нови перспективи за персонализирана медицина при пациенти с глиоми.

Вярваме, че прецизната и достъпна диагностика, комбинирана с молекулярно насочени терапевтични стратегии, ще подобри качеството на живот на пациентите с това изключително тежко заболяване.

9. ИЗВОДИ

1. Всички изследвани микроРНКи са с нарушена експресия при глиоми в сравнение с контролни групи, като miR-7, miR-21, miR-491, miR-10b демонстрират най-добра способност за разграничаване на ВСГ или НСГ от контроли.
2. miR-491, miR-7 и miR-34a притежават диагностичен биомаркерен потенциал за разграничаване между ВСГ от НСГ.
3. miR-7, miR-491, miR-21 и miR-10b притежават прогностичен биомаркерен потенциал по отношение на общата преживяемост (OS), докато miR-10b, miR-21 и miR-491 притежават прогностичен биомаркерен потенциал по отношение на преживяемостта без прогресия (PFS).
4. Изследваните глиоми на български пациенти са най-често засегнати от CNVs, включващи делеция на *CDKN2A*, амплификация на *EGFR* и делеция на *PTEN*.
5. В изследваната кохорта, ЦМВ инфекцията не играе водеща роля като онкогенен фактор в глиомагенезата и прогресията на заболяването.
6. Комбинацията от ниски нива на miR-491, амплификация на *EGFR*, делеция на *PTEN* и див тип *IDH1* има диагностичен потенциал за разграничаване между ВСГ и НСГ с точност 86.1%.
7. Комбинацията от делеция на *CDKN2A* и *PTEN*, напредналата възраст и див тип *IDH1* има прогностична роля и е значимо свързана с по-кратка OS
8. Комбинацията от амплификация на *EGFR* и *PDGFRA*, наличието на артериална хипертония и делеция на *PTEN*, показва връзка с по-кратки периоди на PFS.
9. Предложихме диагностични и прогностични алгоритми с цел подпомагане на стратифицирането и проследяването на пациентите.
10. Когато се използва за контрола близко разположена, макроскопски „нормално“ изглеждаща мозъчна тъкан трябва да се подхожда с особено внимание.
11. Получените данни освен като адювантни биомаркери в клиничната практика могат да послужат и като основа за бъдещи таргетни терапии при пациенти с глиоми.

10. ПРИНОСИ

10.1. Научно-теоретични

1. За първи път българските пациенти с глиоми бяха анализирани с интегративен подход, комбиниращ експресионен анализ на микроРНКи, анализ на CNVs и ЦМВ инфекциозен статус, като получените резултати биха повишили прецизността на класификацията и стратификацията на глиомите.
2. За първи път в световната литература беше докладван градиращият биомаркерен потенциал на miR-491 за разграничаване между ВСГ и НСГ (48). miR-491 показва по-висока чувствителност и специфичност от *IDH1* в изследваната кохорта от български пациенти.
3. За първи път сред български пациенти с глиоми се докладва диагностично и прогностично - специфичен микроРНКов профил (miR-7, miR-10b, miR-21 и miR-491).
4. Показахме, че трябва да се подходи с особено внимание, когато се използва съседна на туморната тъкан като „нормална“ контрола, тъй като може да попада в перитуморната мозъчна зона и да повлияе на резултатите.

10.2. Научно-приложни приноси

1. Предложихме диагностичен и прогностичен алгоритъм за класификация, комбиниращ генетични и епигенетични данни, който може да доведе до по-персонализиран подход за мониторинг и лечение.
2. Създадохме тъканна банка от над 90 туморни проби от пациенти с различни степени глиоми, както и банки с изолирани от пробите ДНКи и РНКи, които биха били изключително ценни при последващи изследвания.
3. Селектираните профили от генетични и транскриптомни маркери позволява лесна клинична имплементация поради рестриктивния набор от таргети.

11. Публикации, участия, научни проекти и награди във връзка с дисертацията

11.1. Публикации

1. **Nikolova E,** *et al.* miRNAs and related genetic biomarkers according to the WHO glioma classification: From diagnosis to future therapeutic targets. *Noncoding RNA Res*. 2023;9(1):141-152**. IF - 5.9.**

Забелязани цитирания: 14

2. **Nikolova, E.,** Georgiev, C., *et al.* Diagnostic, grading and prognostic role of a restricted miRNAs signature in primary and metastatic brain tumours. Discussion on their therapeutic perspectives. *Mol Genet Genomics.* 2022. 297(2), 357–371. **IF - 3.1**.

Забелязани цитирания: 5

3. **Nikolova E,** Dimova P, Minkin K, Todorov T, Mitev V, Todorova A. Human cytomegalovirus DNA detection in a recurrent glioblastoma multiforme tumour, but not in whole blood: a case report and discussion about the HCMV latency and therapy perspectives. J Neurovirol. 2020 Dec;26(6):984-987. **IF – 2.643**.

Забелязани цитирания: 1

11.2. Участия в научни конгреси и семинари

1. **Nikolova E**, *et al*.CNVs in critical cell-signalling genes with potential targeted therapeutic application. Molecular Analysis for Personalised Therapy Congress,2019.UK. Annals of Oncology,30,7, vii33.
2. **Nikolova E**, *et al*. Prevalence of human cytomegalovirus infection among Bulgarian patients with brain tumours, EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE, 2019, Sweden
3. **Nikolova E**, *et al*. Role of miRNAs in Glioblastoma multiforme, IIIrd PhD symposium, Molecular biology – From molecule to cell and back, IMB, BAS, 2019, Sofia, Bulgaria
4. **Nikolova E**, *et al*. HCMV infection and genetic aberrations in tumour suppressor genes and oncogenes among Bulgarian patients with Glioblastoma multiforme, ESMO Preceptorship on Brain Tumours, 2018, Athens, Greece
5. **Nikolova E**, *et al*. Molecular alterations in Bulgarian patients with Glioblastoma multiforme, *EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2018,* Milan, Italy

6. **Nikolova E**, *et al* . Implementation of next generation sequencing (NGS) for analyzing deregulated microRNAs in neuro-oncology, *Workshop "Next generation diagnostics*", 2018, Skopje, FYR Macedonia

7. **Nikolova E**, *et al*. Molecular diagnostic approach in neuro-oncology. 12th Balkan Congress of Human Genetics, 2017, Plovdiv, Bulgaria

11.3. Участия в проекти

1. Водещ изследовател-Договор №Д-118/2018, Млад Изследовател' 2018, МУ-София

„**Оптимизиране на молекулярно-генетични методи за идентификация на специфични микроРНКи в невро-онкологията и оценка ролята на вирусната компонента**"

2. Водещ изследовател - Договор № Д-127/2019, Млад Изследовател' 2019, МУ-София

„**Мултидисциплинарен анализ при български пациенти с мозъчни тумори. Връзка между вирусни етиологични агенти, генетични и епигенетични фактори**"

11.4. Награда

Най-успешна научна разработка в област Медицина - конкурс „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ-2019", МУ-София

Библиография:

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–63.

2. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. CA Cancer J Clin. 2024;74(1):12–49.

3. Ostrom QT, Shoaf ML, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Wen PY, et al. National-level overall survival patterns for molecularly-defined diffuse glioma types in the United States. Neuro Oncol. 2023;25(4):799–807.

4. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. Neuro Oncol. 2021;23(12 Suppl 2):iii1–105.

5. Brenner A V., Sugiyama H, Preston DL, Sakata R, French B, Sadakane A, et al. Radiation risk of central nervous system tumors in the Life Span Study of atomic bomb survivors, 1958–2009. Eur J Epidemiol. 2020;35(6):591–600.

6. Rice T, Lachance DH, Molinaro AM, Eckel-Passow JE, Walsh KM, Barnholtz-Sloan J, et al. Understanding inherited genetic risk of adult glioma - a review. Neuro-oncology Pract. 2016;3(1):10–6.

7. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. Nat Rev Clin Oncol. 2021;18(3):170–86.

8. Peeters MCM, Dirven L, Koekkoek JAF, Gortmaker EG, Fritz L, Vos MJ, et al. Prediagnostic symptoms and signs of adult glioma: the patients' view. J Neurooncol. 2020;146(2):293–301.

9. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro Oncol. 2021;23(8):1231–51.

10. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. Neuro Oncol. 2017;19(5):v1–88.

11. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figrarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. Acta Neuropathol. 2020;139(3):603–8.

12. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. Brain Pathol. 2020;30(4):844–56.

13. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino M del C, Otero A, Lopes MC, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. Am J Pathol. 2015;185(7):1820–33.

14. Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. Biomed Res Int. 2017;2017:8013575.

15. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. Acta Neuropathol. 2018;136(1):153–66.

16. Appay R, Dehais C, Maurage C-A, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. Neuro Oncol. 2019;21(12):1519–28.

17. Huang LE. Impact of CDKN2A/B Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. Biomedicines. 2022;10(2).

18. Tesileanu CMS, Dirven L, Wijnenga MMJ, Koekkoek JAF, Vincent AJPE, Dubbink HJ, et al. Survival

of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. Neuro Oncol. 2020;22(4):515–23.

19. Ozawa T, Riester M, Cheng Y-K, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, et al. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. Cancer Cell. 2014;26(2):288–300.

20. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. Cancer Biol Ther. 2008;7(9):1321–5.

21. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan Q-W, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. Oncogene. 2018;37(12):1561–75.

22. Śledzińska P, Bebyn MG, Furtak J, Kowalewski J, Lewandowska MA. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. Int J Mol Sci. 2021;22(19).

23. Colebatch AJ, Dobrovic A, Cooper WA. TERT gene: its function and dysregulation in cancer. J Clin Pathol. 2019;72(4):281 LP – 284.

24. Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. Oncotarget. 2014;5(6):1515–25.

25. Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, et al. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. Oncotarget. 2016;7(8):8712–25.

26. Wick W, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. Neurology. 2013;81(17):1515–22.

27. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. Am J Pathol. 2007;170(5):1445–53.

28. Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, et al. Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas. Neuro Oncol. 2018;20(1):66–77.

29. Zhu H, Acquaviva J, Ramachandran P, Boskovitz A, Woolfenden S, Pfannl R, et al. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. Proc Natl Acad Sci. 2009;106(8):2712–6.

30. Noor H, Briggs NE, McDonald KL, Holst J, Vittorio O. TP53 Mutation Is a Prognostic Factor in Lower Grade Glioma and May Influence Chemotherapy Efficacy. Cancers (Basel). 2021;13(21).

31. Millesi M, Kiesel B, Wöhrer A, Mercea PA, Bissolo M, Roetzer T, et al. Is Intraoperative Pathology Needed if 5-Aminolevulinic-Acid-Induced Tissue Fluorescence Is Found in Stereotactic Brain Tumor Biopsy? Neurosurgery. 2020;86(3):366–73.

32. GOODMAN LS, WINTROBE MM. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. J Am Med Assoc. 1946;132:126–32.

33. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987–96.

34. Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, et al. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. Expert Opin Ther Targets. 2009;13(6):701–18.

35. Toyonaga T, Yamaguchi S, Hirata K, Kobayashi K, Manabe O, Watanabe S, et al. Hypoxic glucose metabolism in glioblastoma as a potential prognostic factor. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44(4):611–9.

36. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma. JAMA. 2017;318(23):2306.

37. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509–24.

38. van Rooij E. The art of microRNA research. Circ Res. 2011;108(2):219–34.

39. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell. 2009;136(2):215–33.

40. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597–610.

41. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402.

42. Grey F, Tirabassi R, Meyers H, Wu G, McWeeney S, Hook L, et al. A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. PLoS Pathog. 2010;6(6):e1000967–e1000967.

43. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. Nature. 2009/06/17. 2009;460(7254):479–86.

44. Pichler M, Calin GA. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. Br J Cancer. 2015;113(4):569–73.

45. Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA. SnapShot: Unconventional miRNA Functions. Cell. 2018;174(4):1038-1038.e1.

46. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci. 2010;101(11):2309–15.

47. Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. Cancer Sci. 2011;102(12):2186–90.

48. Nikolova E, Georgiev C, Laleva L, Milev M, Spiriev T, Stoyanov S, et al. Diagnostic, grading and prognostic role of a restricted miRNAs signature in primary and metastatic brain tumours. Discussion on their therapeutic perspectives. Mol Genet Genomics. 2022;297(2):357–71.

49. Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. J Cancer. 2016;7(10):1233–41.

50. Jia L, Lei B, Gao H, Jia L, Luo D, Han J, et al. miR-130b suppresses the invasion and migration of prostate cancer via inhibiting DLL1 and regulating the PI3K/Akt pathways. Exp Ther Med. 2022;23(1):98.

51. Korać P, Antica M, Matulić M. MiR-7 in Cancer Development. Biomedicines. 2021;9(3):325.

52. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(39):15472–7.

53. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. Mol Cell Biol. 2008;28(17):5369–80.

54. Wolter M, Werner T, Malzkorn B, Reifenberger G. Role of microRNAs Located on Chromosome Arm 10q in Malignant Gliomas. Brain Pathol. 2016;26(3):344–58.

55. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. Cancer Res. 2005;65(14):6029–33.

56. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C-G, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys Res Commun. 2005;334(4):1351–8.

57. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology. 2007;133(2):647–58.

58. Ma C, Wei F, Xia H, Liu H, Dong X, Zhang Y, et al. MicroRNA-10b mediates TGF-β1-regulated glioblastoma proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition. Int J Oncol. 2017;50(5):1739–48.

59. Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, et al. Human Glioma Growth Is

Controlled by MicroRNA-10b. Cancer Res. 2011;71(10):3563–72.

60. Santangelo A, Imbrucè P, Gardenghi B, Belli L, Agushi R, Tamanini A, et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. J Neurooncol. 2018;136(1):51–62.

61. Liu Q, Zou R, Zhou R, Gong C, Wang Z, Cai T, et al. miR-155 Regulates Glioma Cells Invasion and Chemosensitivity by p38 Isforms In Vitro. J Cell Biochem. 2015;116(7):1213–21.

62. Petrescu GED, Sabo AA, Torsin LI, Calin GA, Dragomir MP. MicroRNA based theranostics for brain cancer: basic principles. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):231.

63. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature. 2008;452(7189):896–9.

64. Lee TJ, Yoo JY, Shu D, Li H, Zhang J, Yu J-G, et al. RNA Nanoparticle-Based Targeted Therapy for Glioblastoma through Inhibition of Oncogenic miR-21. Mol Ther. 2017;25(7):1544–55.

65. Nadaradjane A, Briand J, Bougras-Cartron G, Disdero V, Vallette FM, Frenel J-S, et al. miR-370-3p Is a Therapeutic Tool in Anti-glioblastoma Therapy but Is Not an Intratumoral or Cell-free Circulating Biomarker. Mol Ther Nucleic Acids. 2018;13:642–50.

66. Nie E, Jin X, Wu W, Yu T, Zhou X, Shi Z, et al. MiR-198 enhances temozolomide sensitivity in glioblastoma by targeting MGMT. J Neurooncol. 2017;133(1):59–68.

67. Chen Y, Li R, Pan M, Shi Z, Yan W, Liu N, et al. MiR-181b modulates chemosensitivity of glioblastoma multiforme cells to temozolomide by targeting the epidermal growth factor receptor. J Neurooncol. 2017;133(3):477–85.

68. Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. Nat Rev Cancer. 2018;18(1):19–32.

69. Athanasiou E, Gargalionis AN, Boufidou F, Tsakris A. The Association of Human Herpesviruses with Malignant Brain Tumor Pathology and Therapy: Two Sides of a Coin. Int J Mol Sci. 2021;22(5).

70. Ortiz DA. The roles of human cytomegalovirus tegument proteins pUL48 and pUL103 during lytic infection. In 2015.

71. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, et al. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. J Virol. 2015;89(15):7673–95.

72. Cobbs C. Cytomegalovirus is a tumor-associated virus: armed and dangerous. Curr Opin Virol. 2019;39:49–59.

73. Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, et al. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. Neuro Oncol. 2012;14(3):246–55.

74. Mitchell DA, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. Neuro Oncol. 2008;10(1):10–8.

75. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. Neoplasia. 2009;11(1):1–9.

76. Kofman A, Marcinkiewicz L, Dupart E, Lyshchev A, Martynov B, Ryndin A, et al. The roles of viruses in brain tumor initiation and oncomodulation. J Neurooncol. 2011;105(3):451–66.

77. Herbein G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis. Viruses. 2018;10(8).

78. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res. 2002;62(12):3347–50.

79. Yuan Z, Ye X, Zhu L, Zhang N, An Z, Zheng WJ. Virome assembly and annotation in brain tissue based on next-generation sequencing. Cancer Med. 2020;9(18):6776–90.

80. Taher C, Frisk G, Fuentes S, Religa P, Costa H, Assinger A, et al. High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers. Transl Oncol. 2014;7(6):732–40.

81. Nehme Z, Pasquereau S, Haidar Ahmad S, Coaquette A, Molimard C, Monnien F, et al. Polyploid giant cancer cells, stemness and epithelial-mesenchymal plasticity elicited by human cytomegalovirus. Oncogene. 2021;40(17):3030–46.

82. Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD, Huang M-N, Sanchez-Perez L, Nair SK, et al. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. Nature. 2015;519(7543):366–9.

83. Schuessler A, Smith C, Beagley L, Boyle GM, Rehan S, Matthews K, et al. Autologous T-cell Therapy for Cytomegalovirus as a Consolidative Treatment for Recurrent Glioblastoma. Cancer Res. 2014;74(13):3466–76.

84. Stragliotto G, Pantalone MR, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Valganciclovir as Add-On to Standard Therapy in Secondary Glioblastoma. Microorganisms. 2020;8(10).

85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402–8.

86. Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. Nucleic Acids Res. 1994;22(20):4354–5.

87. Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. Biostatistics. 2000;1(2):123–40.

88. Xie F, Wang J, Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. Funct Integr Genomics. 2023;23(2):125.

89. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803–20.

90. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. Neuro Oncol. 2022;24(Supplement_5):v1–95.

91. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. Neuro Oncol. 2023;25(Supplement_4):iv1–99.

92. Marenco-Hillembrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, et al. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. J Neurooncol. 2020;147(2):297–307.

93. Claus EB, Cannataro VL, Gaffney SG, Townsend JP. Environmental and sex-specific molecular signatures of glioma causation. Neuro Oncol. 2022;24(1):29–36.

94. van′t Hek R, Ortiz-Herrera JL, Salazar-Pigeon A, Ramirez-Loera C, Cacho-Díaz B, Wegman-Ostrosky T. Age and sex disparities in Latin-American adults with gliomas: a systematic review and meta-analysis. J Neurooncol. 2023;164(3):535–43.

95. Straube C, Kessel KA, Antoni S, Gempt J, Meyer B, Schlegel J, et al. A balanced score to predict survival of elderly patients newly diagnosed with glioblastoma. Radiat Oncol. 2020;15(1):97.

96. Jooma R, Waqas M, Khan I. Diffuse low-grade glioma – Changing concepts in diagnosis and management: A review. Asian J Neurosurg. 2019;14(2):356.

97. Scheer KG, Ebert LM, Samuel MS, Bonder CS, Gomez GA. Bevacizumab-Induced Hypertension in Glioblastoma Patients and Its Potential as a Modulator of Treatment Response. Hypertension. 2023;80(8):1590–7.

98. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006;6(11):857–66.

99. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way. Cell. 2009;136(4):586–91.

100. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. Neuro Oncol. 2012;14(6):689–700.

101. Kim T-M, Huang W, Park R, Park PJ, Johnson MD. A Developmental Taxonomy of Glioblastoma Defined and Maintained by MicroRNAs. Cancer Res. 2011;71(9):3387–99.

102. Nass D, Rosenwald S, Meiri E, Gilad S, Tabibian-Keissar H, Schlosberg A, et al. MiR-92b and miR-9/9* Are Specifically Expressed in Brain Primary Tumors and Can Be Used to Differentiate Primary from Metastatic Brain Tumors. Brain Pathol. 2009;19(3):375–83.

103. Veryaskina YA, Titov SE, Ivanov MK, Ruzankin PS, Tarasenko AS, Shevchenko SP, et al. Selection of reference genes for quantitative analysis of microRNA expression in three different types of cancer. Woloschak GE, editor. PLoS One. 2022;17(2):e0254304.

104. LOU G, MA N, XU Y, JIANG L, YANG J, WANG C, et al. Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification. Int J Mol Med. 2015;36(5):1400–8.

105. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3(7):research0034.1.

106. Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, Ganapathy S, Camosy C, Chen Y, et al. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. Oncogene. 2010;29(35):4971–9.

107. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biol. 2011;8(5):706–13.

108. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. J Cell Mol Med. 2008;13(1):39–53.

109. Liu Z-L, Wang H, Liu J, Wang Z-X. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. Mol Cell Biochem. 2013;372(1–2):35–45.

110. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, et al. Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. JNCI J Natl Cancer Inst. 2013;105(12):849–59.

111. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Saccà M, et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial–mesenchymal transition. Oncogene. 2013;32(14):1843–53.

112. Zhi F, Chen X, Wang S, Xia X, Shi Y, Guan W, et al. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. Eur J Cancer. 2010;46(9):1640–9.

113. Conti A, Aguennouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, et al. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. J Neurooncol. 2009;93(3):325–32.

114. Sasaki A, Udaka Y, Tsunoda Y, Yamamoto G, Tsuji M, Oyamada H, et al. Analysis of p53 and miRNA expression after irradiation of glioblastoma cell lines. Anticancer Res. 2012;32(11):4709–13.

115. Sheedy P, Medarova Z. The fundamental role of miR-10b in metastatic cancer. Am J Cancer Res. 2018;8(9):1674–88.

116. LIU Z, JIANG Z, HUANG J, HUANG S, LI Y, YU S, et al. miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. Int J Oncol. 2014;44(5):1571–80.

117. Bhere D, Arghiani N, Lechtich ER, Yao Y, Alsaab S, Bei F, et al. Simultaneous downregulation of miR-21 and upregulation of miR-7 has anti-tumor efficacy. Sci Rep. 2020;10(1):1779.

118. Mahinfar P, Mansoori B, Rostamzadeh D, Baradaran B, Cho WC, Mansoori B. The Role of microRNAs in Multidrug Resistance of Glioblastoma. Cancers (Basel). 2022;14(13):3217.

119. Melnik BC. MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? J Transl Med. 2015;13(1):202.

120. Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, et al. Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21. Cancer Cell. 2010;18(3):282–93.

121. Sun X, Ma X, Wang J, Zhao Y, Wang Y, Bihl JC, et al. Glioma stem cells-derived exosomes promote the angiogenic ability of endothelial cells through miR-21/VEGF signal. Oncotarget. 2017;8(22):36137–48.

122. Hermansen SK, Nielsen BS, Aaberg-Jessen C, Kristensen BW. miR-21 Is Linked to Glioma Angiogenesis. J Histochem Cytochem. 2016;64(2):138–48.

123. Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. Brain Res. 2010;1352:255–64.

124. Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA, Eng C. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome. Am J Hum Genet. 2008;82(5):1141–9.

125. Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan X-B, Han L, Wang G-X, et al. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. BMC Cancer. 2010;10(1):27.

126. Wang Y-Y, Sun G, Luo H, Wang X-F, Lan F-M, Yue X, et al. MiR-21 modulates hTERT through a STAT3-dependent manner on glioblastoma cell growth. CNS Neurosci Ther. 2012;18(9):722–8.

127. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci. 2016;41(3):211–8.

128. Zhang L, Qi M, Feng T, Hu J, Wang L, Li X, et al. IDH1R132H Promotes Malignant Transformation of Benign Prostatic Epithelium by Dysregulating MicroRNAs: Involvement of IGF1R-AKT/STAT3 Signaling Pathway. Neoplasia. 2018;20(2):207–17.

129. Liu R, Liu C, He X, Sun P, Zhang B, Yang H, et al. MicroRNA-21 promotes pancreatic β cell function through modulating glucose uptake. Nat Commun. 2022;13(1):3545.

130. Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. Insulin, insulin receptors, and cancer. J Endocrinol Invest. 2016;39(12):1365–76.

131. Perry RJ, Shulman GI. Mechanistic Links between Obesity, Insulin, and Cancer. Trends in Cancer. 2020;6(2):75–8.

132. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. Metabolism. 2019;92:121–35.

133. Sati ISEE, Parhar I. MicroRNAs Regulate Cell Cycle and Cell Death Pathways in Glioblastoma. Int J Mol Sci. 2021;22(24):13550.

134. Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. Int J Cancer. 2009;125(6):1407–13.

135. Zhang X, Cheng J, Fu L, Li Q. Overexpression of tissue microRNA10b may help predict glioma prognosis. J Clin Neurosci. 2016;29:59–63.

136. Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, Läuter J, Rosolowski M, Tomm JM, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. Oncogene. 2011;30(26):2975–85.

137. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 Targets a Network of Key Tumor-Suppressive Pathways in Glioblastoma Cells. Cancer Res. 2008;68(19):8164–72.

138. Yoo B, Kavishwar A, Ross A, Wang P, Tabassum DP, Polyak K, et al. Combining miR-10b–Targeted Nanotherapy with Low-Dose Doxorubicin Elicits Durable Regressions of Metastatic Breast Cancer. Cancer Res. 2015;75(20):4407–15.

139. Teplyuk NM, Uhlmann EJ, Gabriely G, Volfovsky N, Wang Y, Teng J, et al. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. EMBO Mol Med. 2016;8(3):268–87.

140. Bai M, Zhang H, Si L, Yu N, Zeng A, Zhao R. Upr1. Bai M, Zhang H, Si L, Yu N, Zeng A, Zhao R. Upregulation of Serum miR-10b Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Melanoma. J Cancer. 2017;8(13):2487–91. egulation of Serum miR-10b Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Melano. J Cancer. 2017;8(13):2487–91.

141. Heidary MF, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Nourani MR, Ranjbar R, Mirnejad R, et al. Overexpression of Metastatic Related MicroRNAs, Mir-335 and Mir-10b, by Staphylococcal Enterotoxin B in the Metastatic Breast Cancer Cell Line. Adv Pharm Bull. 2015;5(2):255–9.

142. Zhang Y, Wang L-J, Yang H-Q, Wang R, Wu H-J. MicroRNA-10b expression predicts long-term survival in patients with solid tumor. J Cell Physiol. 2019;234(2):1248–56.

143. Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). Semin Cancer Biol. 2012;22(2):144–53.

144. Zhen L, Li J, Zhang M, Yang K. MiR-10b decreases sensitivity of glioblastoma cells to radiation by targeting AKT. J Biol Res. 2016;23(1):14.

145. Wan S, Wang J, Wang J, Wu J, Song J, Zhang C-Y, et al. Increased serum miR-7 is a promising biomarker for type 2 diabetes mellitus and its microvascular complications. Diabetes Res Clin Pract. 2017;130:171–9.

146. Xiao H. MiR-7-5p suppresses tumor metastasis of non-small cell lung cancer by targeting NOVA2. Cell Mol Biol Lett. 2019;24(1):60.

147. Chang Y-L, Zhou P-J, Wei L, Li W, Ji Z, Fang Y-X, et al. MicroRNA-7 inhibits the stemness of prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway. Oncotarget. 2015;6(27):24017–31.

148. Fang Y, Xue J-L, Shen Q, Chen J, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2012;55(6):1852–62.

149. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, et al. microRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. Cancer Res. 2008;68(10):3566–72.

150. Bhere D, Tamura K, Wakimoto H, Choi SH, Purow B, Debatisse J, et al. microRNA-7 upregulates death receptor 5 and primes resistant brain tumors to caspase-mediated apoptosis. Neuro Oncol. 2018;20(2):215–24.

151. Mirzaei Z, Barati T, Ebrahimi A, Derakhshan SM, Khaniani MS. The role of mir-7-5p in cancer: function, prognosis, diagnosis, and therapeutic implications. Mol Biol Rep. 2025;52(1):12.

152. Gunawan PY, Islam AA, July J, Patellongi I, Nasrum M, Aninditha T. Karnofsky Performance Scale and Neurological Assessment of Neuro-Oncology Scale as Early Predictor in Glioma. Asian Pac J Cancer Prev. 2020;21(11):3387–92.

153. Li X, Liu Y, Granberg KJ, Wang Q, Moore LM, Ji P, et al. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. Oncogene. 2015;34(13):1619–28.

154. Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuière M, Vigneron N, Brotin E, Lecerf C, et al. miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. Cell Death Dis. 2014;5(10):e1445–e1445.

155. Zhou Y, Li Y, Ye J, Jiang R, Yan H, Yang X, et al. MicroRNA-491 is involved in metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibitions of matrix metalloproteinase and epithelial to mesenchymal transition. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver. 2013;33(8):1271–80.

156. Meng Y, Shang F-R, Zhu Y-L. MiR-491 functions as a tumor suppressor through Wnt3a/β-catenin signaling in the development of glioma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(24):10899–907.

157. Hrdličková R, Nehyba J, Bargmann W, Bose HRJ. Multiple tumor suppressor microRNAs regulate telomerase and TCF7, an important transcriptional regulator of the Wnt pathway. PLoS One. 2014;9(2):e86990.

158. Guo J, Luo C, Yang Y, Dong J, Guo Z, Yang J, et al. MiR-491-5p, as a Tumor Suppressor, Prevents Migration and Invasion of Breast Cancer by Targeting ZNF-703 to Regulate AKT/mTOR Pathway. Cancer Manag Res. 2021;Volume 13:403–13.

159. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, et al. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. Oncogene. 2013;32(9):1155–63.

160. Lopez CM, Yu PY, Zhang X, Yilmaz AS, London CA, Fenger JM. MiR-34a regulates the invasive capacity of canine osteosarcoma cell lines. Thamm DH, editor. PLoS One. 2018;13(1):e0190086.

161. Genovese G, Ergun A, Shukla SA, Campos B, Hanna J, Ghosh P, et al. microRNA Regulatory Network Inference Identifies miR-34a as a Novel Regulator of TGF-β Signaling in Glioblastoma. Cancer Discov. 2012;2(8):736–49.

162. Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. J Neurooncol. 2013;113(2):221–8.

163. Li W (Jess), Wang Y, Liu R, Kasinski AL, Shen H, Slack FJ, et al. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. Front Cell Dev Biol. 2021;9.

164. Lu VM, O'Connor KP, Shah AH, Eichberg DG, Luther EM, Komotar RJ, et al. The prognostic significance of CDKN2A homozygous deletion in IDH-mutant lower-grade glioma and glioblastoma: a systematic review of the contemporary literature. J Neurooncol. 2020;148(2):221–9.

165. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell. 2018;173(2):371-385.e18.

166. Lu VM, O'Connor KP, Shah AH, Eichberg DG, Luther EM, Komotar RJ, et al. The prognostic significance of CDKN2A homozygous deletion in IDH-mutant lower-grade glioma and glioblastoma: a systematic review of the contemporary literature. J Neurooncol. 2020;148(2):221–9.

167. Khafaei M, Rezaie E, Mohammadi A, Shahnazi Gerdehsang P, Ghavidel S, Kadkhoda S, et al. miR-9: From function to therapeutic potential in cancer. J Cell Physiol. 2019;234(9):14651–65.

168. Roskoski RJ. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. Pharmacol Res. 2019;139:395–411.

169. Zhao K, Wang Q, Wang Y, Huang K, Yang C, Li Y, et al. EGFR/c-myc axis regulates TGFβ/Hippo/Notch pathway via epigenetic silencing miR-524 in gliomas. Cancer Lett. 2017;406:12–21.

170. Dakal TC, Kakde GS, Maurya PK. Genomic, epigenomic and transcriptomic landscape of glioblastoma. Metab Brain Dis. 2024;39(8):1591–611.

171. Zheng L, Liang H, Zhang Q, Shen Z, Sun Y, Zhao X, et al. circPTEN1, a circular RNA generated from

PTEN, suppresses cancer progression through inhibition of TGF-β/Smad signaling. Mol Cancer. 2022;21(1):41.

172. Yang J-M, Schiapparelli P, Nguyen H-N, Igarashi A, Zhang Q, Abbadi S, et al. Characterization of PTEN mutations in brain cancer reveals that pten mono-ubiquitination promotes protein stability and nuclear localization. Oncogene. 2017;36(26):3673–85.

173. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. Genes Dev. 2009;23(11):1327–37.

174. Binayke A, Mishra S, Suman P, Das S, Chander H. Awakening the "guardian of genome": reactivation of mutant p53. Cancer Chemother Pharmacol. 2019;83(1):1–15.

175. Guérit E, Arts F, Dachy G, Boulouadnine B, Demoulin J-B. PDGF receptor mutations in human diseases. Cell Mol Life Sci. 2021;78(8):3867–81.

176. Verhaak RGW, 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;17(1):98–110.

177. Pellot Ortiz KI, Rechberger JS, Nonnenbroich LF, Daniels DJ, Sarkaria JN. MDM2 Inhibition in the Treatment of Glioblastoma: From Concept to Clinical Investigation. Biomedicines. 2023;11(7):1879.

178. Kinker GS, Thomas AM, Carvalho VJ, Lima FP, Fujita A. Deletion and low expression of NFKBIA are associated with poor prognosis in lower-grade glioma patients. Sci Rep. 2016;6(1):24160.

179. Yang W, Xia Y, Cao Y, Zheng Y, Bu W, Zhang L, et al. EGFR-Induced and PKCε Monoubiquitylation-Dependent NF-κB Activation Upregulates PKM2 Expression and Promotes Tumorigenesis. Mol Cell. 2012;48(5):771–84.

180. Viatour P, Merville M-P, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci. 2005;30(1):43–52.

181. Bredel M, Espinosa L, Kim H, Scholtens DM, McElroy JP, Rajbhandari R, et al. Haploinsufficiency of NFKBIA reshapes the epigenome antipodal to the IDH mutation and imparts disease fate in diffuse gliomas. Cell Reports Med. 2023;4(6):101082.

182. Bredel M, Scholtens DM, Yadav AK, Alvarez AA, Renfrow JJ, Chandler JP, et al. NFKBIA Deletion in Glioblastomas. N Engl J Med. 2011;364(7):627–37.

183. Wang Z-F, Liao F, Wu H, Dai J. Glioma stem cells-derived exosomal miR-26a promotes angiogenesis of microvessel endothelial cells in glioma. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):201.

184. Ju H-Q, Lin J-F, Tian T, Xie D, Xu R-H. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):231.

185. Li T, Cox CD, Ozer BH, Nguyen NT, Nguyen HN, Lai TJ, et al. D-2-Hydroxyglutarate Is Necessary and Sufficient for Isocitrate Dehydrogenase 1 Mutant-Induced MIR148A Promoter Methylation. Mol Cancer Res. 2018;16(6):947–60.

186. Claus EB, Walsh KM, Wiencke JK, Molinaro AM, Wiemels JL, Schildkraut JM, et al. Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information. Neurosurg Focus. 2015;38(1):E6.

187. Alexander BM, Mehta MP. Role of isocitrate dehydrogenase in glioma. Expert Rev Neurother. 2011;11(10):1399–409.

188. Goerig NL, Frey B, Korn K, Fleckenstein B, Überla K, Schmidt MA, et al. Frequent occurrence of therapeutically reversible CMV-associated encephalopathy during radiotherapy of the brain. Neuro Oncol. 2016;18(12):1664–72.

189. Tang K, Hellstrand K, Larsson E. Absence of cytomegalovirus in high-coverage DNA sequencing of

human glioblastoma multiforme. Int J Cancer. 2015;136(4):977–81.

190. Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, et al. Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma. Mod Pathol. 2014;27(7):922–9.

191. Habibi Z, Hajizadeh M, Nozarian Z, Safavi M, Monajemzadeh M, Meybodi KT, et al. Cytomegalovirus DNA in non-glioblastoma multiforme brain tumors of infants. Child's Nerv Syst. 2021;37(5):1581–6.

192. Farias KPRA, Moreli ML, Floriano VG, da Costa VG. Evidence based on a meta-analysis of human cytomegalovirus infection in glioma. Arch Virol. 2019;164(5):1249–57.

193. Mercado NB, Real JN, Kaiserman J, Panagioti E, Cook CH, Lawler SE. Clinical implications of cytomegalovirus in glioblastoma progression and therapy. npj Precis Oncol. 2024;8(1):213.

194. Liang Q, Wang K, Wang B, Cai Q. HCMV-encoded miR-UL112-3p promotes glioblastoma progression via tumour suppressor candidate 3. Sci Rep. 2017;7(1):44705.

195. Daei Sorkhabi A, Sarkesh A, Saeedi H, Marofi F, Ghaebi M, Silvestris N, et al. The Basis and Advances in Clinical Application of Cytomegalovirus-Specific Cytotoxic T Cell Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. Front Oncol. 2022;12.

196. Sargolzaei J, Etemadi T, Alyasin A. The P53/microRNA network: A potential tumor suppressor with a role in anticancer therapy. Pharmacol Res. 2020;160:105179.

197. Sun L, Yan W, Wang Y, Sun G, Luo H, Zhang J, et al. MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10. Brain Res. 2011;1389:9–18.

198. Sidorkiewicz I, Niemira M, Maliszewska K, Erol A, Bielska A, Szalkowska A, et al. Circulating miRNAs as a Predictive Biomarker of the Progression from Prediabetes to Diabetes: Outcomes of a 5-Year Prospective Observational Study. J Clin Med. 2020;9(7):2184.

199. Grassian AR, Lin F, Barrett R, Liu Y, Jiang W, Korpal M, et al. Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations promote a reversible ZEB1/microRNA (miR)-200-dependent epithelial-mesenchymal transition (EMT). J Biol Chem. 2012;287(50):42180–94.

200. Ebrahimkhani S, Vafaee F, Hallal S, Wei H, Lee MYT, Young PE, et al. Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis. NPJ Precis Oncol. 2018;2:28.

201. Díaz Méndez AB, Sacconi A, Tremante E, Lulli V, Caprara V, Rosanò L, et al. A diagnostic circulating miRNA signature as orchestrator of cell invasion via TKS4/TKS5/EFHD2 modulation in human gliomas. J Exp Clin Cancer Res. 2023;42(1):66.

202. Waki H, Gouraud SS, Maeda M, Raizada MK, Paton JFR. Contributions of vascular inflammation in the brainstem for neurogenic hypertension. Respir Physiol Neurobiol. 2011;178(3):422–8.

203. Zhang H, Jiang X, Ren F, Gu Q, Yao J, Wang X, et al. Development and external validation of dual online tools for prognostic assessment in elderly patients with high-grade glioma: a comprehensive study using SEER and Chinese cohorts. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14.

204. Fisher JP, Adamson DC. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. Biomedicines. 2021;9(3):324.

205. Fu M, Zhou Z, Huang X, Chen Z, Zhang L, Zhang J, et al. Use of Bevacizumab in recurrent glioblastoma: a scoping review and evidence map. BMC Cancer. 2023;23(1):544.

206. Salarinia R, Sahebkar A, Peyvandi M, Mirzaei HR, Jaafari MR, Riahi MM, et al. Epi-Drugs and Epi-miRs: Moving Beyond Current Cancer Therapies. Curr Cancer Drug Targets. 2016;16(9):773–88.

207. Balachandran AA, Larcher LM, Chen S, Veedu RN. Therapeutically Significant MicroRNAs in Primary and Metastatic Brain Malignancies. Cancers (Basel). 2020;12(9).

208. Li Q, Chang Y, Mu L, Song Y. MicroRNA-9 enhances chemotherapy sensitivity of glioma to TMZ by

suppressing TOPO II via the NF-κB signaling pathway. Oncol Lett. 2019;17(6):4819–26.

209. Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. Neoplasma. 2010;57(3):264–9.

210. Gu J, Mu N, Jia B, Guo Q, Pan L, Zhu M, et al. Targeting radiation-tolerant persister cells as a strategy for inhibiting radioresistance and recurrence in glioblastoma. Neuro Oncol. 2022;24(7):1056–70.

211. Liu F, Yang B. Double-Targeted Knockdown of miR-21 and CXCR4 Inhibits Malignant Glioma Progression by Suppression of the PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK Pathways. De Bonis P, editor. Biomed Res Int. 2020;2020:1–17.

212. Wang G-B, Liu J-H, Hu J, Xue K. MiR-21 enhanced glioma cells resistance to carmustine via decreasing Spry2 expression. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21(22):5065–71.

213. Niyazi M, Zehentmayr F, Niemöller OM, Eigenbrod S, Kretzschmar H, Schulze-Osthoff K, et al. MiRNA expression patterns predict survival in glioblastoma. Radiat Oncol. 2011;6(1):153.

214. Ananta JS, Paulmurugan R, Massoud TF. Tailored Nanoparticle Codelivery of antimiR-21 and antimiR-10b Augments Glioblastoma Cell Kill by Temozolomide: Toward a "Personalized" Anti-microRNA Therapy. Mol Pharm. 2016;13(9):3164–75.

215. Jia B, Liu W, Gu J, Wang J, Lv W, Zhang W, et al. MiR-7-5p suppresses stemness and enhances temozolomide sensitivity of drug-resistant glioblastoma cells by targeting Yin Yang 1. Exp Cell Res. 2019;375(1):73–81.

216. Sun X, Li J, Sun Y, Zhang Y, Dong L, Shen C, et al. miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. Oncotarget. 2016;7(33):53558–70.

217. Dong J, Peng H, Yang X, Wu W, Zhao Y, Chen D, et al. Metformin mediated microRNA-7 upregulation inhibits growth, migration, and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells. Anticancer Drugs. 2020;31(4):345–52.

218. Pulito C, Mori F, Sacconi A, Goeman F, Ferraiuolo M, Pasanisi P, et al. Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities. Cell Discov. 2017;3(1):17022.

219. Hong DS, Kang Y-K, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. Br J Cancer. 2020;122(11):1630–7.

220. Sela H, Cohen H, Elia P, Zach R, Karpas Z, Zeiri Y. Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). J Nanobiotechnology. 2015;13:71.

221. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Yung WKA, Sawaya R, Weinberg JS, et al. Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2018;36(14):1419–27.

222. Qi Y, Jin C, Qiu W, Zhao R, Wang S, Li B, et al. The dual role of glioma exosomal microRNAs: glioma eliminates tumor suppressor miR-1298-5p via exosomes to promote immunosuppressive effects of MDSCs. Cell Death Dis. 2022;13(5):426.

223. Kim YZ, Kim C-Y, Lim DH. The Overview of Practical Guidelines for Gliomas by KSNO, NCCN, and EANO. Brain tumor Res Treat. 2022;10(2):83–93.

224. Sun Y, Yue L, Xu P, Hu W. An overview of agents and treatments for PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors. Front Oncol. 2022;12.

225. Babak S, Mason WP. mTOR inhibition in glioblastoma: requiem for a dream? Neuro Oncol. 2018;20(5):584–5.

226. Singh S, Barik D, Lawrie K, Mohapatra I, Prasad S, Naqvi AR, et al. Unveiling Novel Avenues in mTOR-Targeted Therapeutics: Advancements in Glioblastoma Treatment. Int J Mol Sci. 2023;24(19):14960.

227. Rusak A, Wiatrak B, Krawczyńska K, Górnicki T, Zagórski K, Zadka Ł, et al. Starting points for the development of new targeted therapies for glioblastoma multiforme. Transl Oncol. 2025;51:102187.

228. Burger MC, Forster M-T, Romanski A, Straßheimer F, Macas J, Zeiner PS, et al. Intracranial injection of natural killer cells engineered with a HER2-targeted chimeric antigen receptor in patients with recurrent glioblastoma. Neuro Oncol. 2023;25(11):2058–71.

229. Cella E, Bosio A, Persico P, Caccese M, Padovan M, Losurdo A, et al. PARP inhibitors in gliomas: Mechanisms of action, current trends and future perspectives. Cancer Treat Rev. 2024;131:102850.

230. Zhao Y, Yang J, Liu Y, Fan J, Yang H. HSV-2-encoded miRNA-H4 Regulates Cell Cycle Progression and Act-D-induced Apoptosis in HeLa Cells by Targeting CDKL2 and CDKN2A. Virol Sin. 2019;34(3):278–86.

231. Liu P, Xia P, Fu Q, Liu C, Luo Q, Cheng L, et al. miR-199a-5p inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by regulating CDC25A to induce cell cycle arrest. Biochem Biophys Res Commun. 2021;571:96–103.

Електрони източници:

1. https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology

2. https://www.sbaloncology.bg

3. https://www.ivybraintumorcenter.org

4. https://www.mrcholland.com

5. https://www.mirbase.org

6. https://www.fda.gov