

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar M. Stepanović

**POVEZANOST MIKRO RNK SA KLINIČKIM  
PARAMETRIMA I ODGOVOROM NA RADIOTERAPIJU  
KOMBINOVANU SA TEMOZOLOMIDOM KOD  
BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Aleksandar M. Stepanović

**ASSOCIATION BETWEEN microRNAs AND CLINICAL  
PARAMETERS AND RESPONSE TO RADIOTHERAPY  
COMBINED WITH TEMOZOLOMIDE IN PATIENTS WITH  
GLIOBLASTOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

## **MENTORI:**

- 1. Prof. dr sc. med. Marina Nikitović**, vanredni profesor, šef katedre predmeta Klinička onkologija sa radioterapijom, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2. VNS dr sc. Nina Petrović**, viši naučni saradnik, molekularni biolog, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

- 1. Prof. dr sc. med. Danica Grujičić**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2. Prof. dr sc. med. Marija Plješa Ercegovac**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 3. Prof. dr sc. med. Duško Kozić**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Na prvom mestu zahvaljujem se svojim mentorima:*

**Prof. dr Marini Nikitović**, na sveobuhvatnom mentorstvu, prvo kliničkom, a potom i naučnom mentorstvu, iz koje se kod mene rodila želja za učenjem, istraživanjem i napredovanjem na svakom polju. Što se tiče same doktorske disertacije, zahvaljujem se profesorki na razvijanju ideje i teme disertacije, preko organizacije i svih stručnih i naučnih saveta i napora tokom izrade, kako bi ova disertacija u najboljem svetlu opravdala svoj naučni i klinički značaj. I na kraju, zahvaljujem se profesorki što je okupila tim koji predstavlja najbolji spoj „klinike“ i nauke, a ja sam ponosan što sam deo tog tima.

**Višem naučnom saradniku dr. sc. Nini Petrović**, na učestvovanju u kreiranju teme disertacije i istraživanju mikro RNK kod glioblastoma, kao i na svim savetima i naporima, odnosno svim satima, danima, mesecima i godinama koje smo zajedno proveli i radili, u cilju da ova disertacija i naši naučni radovi predstavljaju nas u najboljem mogućem svetlu. Naravno, nastavljamo dalje...jer tim koji pobeđuje ne treba menjati.

*Takođe, zahvaljujem se:*

*Članovima komisije na pozitivnoj oceni doktorske disertacije.*

*Naučnom savetniku dr sc. Tatjani P. Stanojković*, što je od samog početka bila uključena u razvijanje ove disertacije i što nam je delila savete iz svog ogromnog naučnog iskustva, te želje da se nastavi naša buduća saradnja.

*Docentu dr Zoranu Bukumiriću na pomoći prilikom obrade statističkih podataka ove disertacije.*

*Svim medicinskim sestrama - tehničarima sa odeljenja CNS i sestrom Snežom na čelu, tj. kao glavnoj medicinskoj sestri odeljenja, kao i medicinskim sestrama - tehničarima iz DBRT na pomoći u tehničkom prikupljanju uzoraka krvi.*

*Laboratorijskim tehničarima i osoblju eksperimentalne onkologije koji su učestvovali na tehničkoj obradi uzoraka.*

*Svim pacijentima koji su učestvovali u ovom istraživanju, jer samo našim zajedničkim snagama možemo da doprinesemo da se ova bolest što više istraži i samim time napreduje u lečenju.*

*Svim svojim kliničkim mentorima sa radioterapije, koji su me podržavali u napredovanju od samog početka bavljenja radioterapijom.*

*Svim mojim prijateljima i kolegama koji su me podržavali u stručnom i naučnom radu: Jelena, Branko, Katarina, Bojana, kumovi... Zahvalan sam što vas imam toliko za bar pola ove stranice, te ne mogu da vas spomenem sve ovde, a znam da nećete zameriti.*

*Mojoj porodici, a prevashodno mojoj majci na podržavanju i istrajavanju svih ovih godina.*

*I na kraju, kad je bilo najteže, onima koji su mogli da mi skrenu misli sa svega, a to su Andrea, Tea i Uroš*

**Zahvalnost dugujem i svim koautorima radova, koji su objavljeni kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, jer su učestvovali u:**

1. Kreiranju ideje i koncepta teze: *prof. dr Marina Nikitović, dr sc. Nina Petrović-viši naučni saradnik*
2. Prikupljanju podataka: *klinički asist. dr sc. med Rosanda Ilić, dr Snežana Milošević*
3. Formalnoj i statističkoj analizi: *doc. dr Zoran Bukumirić, dr sc. Tatjana P. Stanojković-naučni savetnik, doc. dr Tatjana Arsenijević, dr sc. Nina Petrović*
4. Istraživanju: *dr sc. Nina Petrović, prof. dr Marina Nikitović*
5. Metodologiji: *dr sc. Nina Petrović, prof. dr Marina Nikitović, Ivana Srbliak-istraživač saradnik*
6. Superviziji: *prof. dr Marina Nikitović, dr sc. Nina Petrović, prof. dr Danica Grujičić*
7. Pisanju – originalni nacrt: *prof. dr Marina Nikitović, dr sc. Nina Petrović*
8. Pisanju- recenzija i uređivanje: *prof. dr Marina Nikitović, dr sc. Nina Petrović, prof. dr Danica Grujičić, dr sc. Tatjana P. Stanojković, klinički asist. dr sc. med Rosanda Ilić, dr Snežana Milošević.*

# POVEZANOST MIKRO RNK SA KLINIČKIM PARAMETRIMA I ODGOVOROM NA RADIOTERAPIJU KOMBINOVANU SA TEMOZOLOMIDOM KOD BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM

## Sažetak

**Cilj:** Ciljevi ovog istraživanja bili su da se ispita povezanost mikro RNK-10b/21/34a sa kliničkim parametrima i odgovorom na radioterapiju kombinovanu sa temozolomidom kod bolesnika sa glioblastomom.

**Materijal i metode:** U istraživanje su bila uključena 43 pacijenta sa glioblastomom lečenih po Stupovom protokolu. Istraživan je nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a u tri vremenske tačke. Analizirane su demografske karakteristike pacijenata, kliničko-prognostički faktori, akutna toksičnost, preživljavanje bez progresije bolesti (PFS), ukupno preživljavanje (OS) i njihova povezanost sa nivoima ekspresije mikro RNK-10b/21/34a.

**Rezultati:** Medijana PFS kod naših pacijenata bila je 10 meseci, a medijana OS bila je 15 meseci. 51.2% pacijenata je imalo akutnu toksičnost. 77.3% pacijenata je toksičnost imalo nakon 30. frakcije RT. Pacijenti sa toksičnošću pretežno su bili distribuirani u grupi pacijenata koji su imali glioblastom, NOS. Viši nivoi ekspresije miR-10b i miR-21 pretežno su povezani sa većim gradusom toksičnosti. Nivoi ekspresije miR-34a bili su značajno povišeni na 15. i 30. frakciji zračne terapije, u odnosu na početne vrednosti. Tumori manji od 4 cm su imali višu ekspresiju miR-10b i miR-21 u tački pre početka RT sa TMZ. Duži PFS utvrđen je za vrednosti ekspresije iznad medijane za miR-21 i miR-34a. Duži OS imali su pacijenti sa vrednostima ekspresije miR-10b iznad medijane.

**Zaključak:** Ovo istraživanje je pokazalo da se mikro RNK-10b/21/34a menjaju tokom hemio-radioterapije i da su povezane sa akutnom toksičnošću. Ovaj koncept je jedinstven i sugerise da se dinamične promene poput varijacija nivoa ekspresije mikro RNK, mogu koristiti kao parametri za predikciju radiosenzitivnosti, odgovora na RT i predikciju akutne toksičnosti.

**Ključne reči:** glioblastom, radioterapija, temozolomid, mikro RNK, toksičnost

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Radijaciona onkologija/Molekularna biologija

**UDK broj:** \_\_\_\_\_

# ASSOCIATION BETWEEN MICRO RNAS AND CLINICAL PARAMETERS AND RESPONSE TO RADIOTHERAPY COMBINED WITH TEMOZOLOMIDE IN PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA

## Abstract

**Aims:** The objectives of this research were to investigate the associations between microRNA-10b/21/34a and clinical parameters and response to radiotherapy combined with a temozolomide in patients with glioblastoma.

**Methods:** This study included 43 patients with glioblastoma, treated according to Stupp's regimen. The levels of expression of microRNA-10b/21/34a were measured in the three-time points, at a baseline, at 15th and 30th fraction of radiotherapy (RT). Demographic characteristics of patients, clinical-prognostic factors, acute toxicity, progression-free survival (PFS), overall survival (OS), and correlation with the levels of expression microRNA-10b/21/34a were analyzed.

**Results:** The median PFS in our cohort was 10 months, and the median OS was 15 months. 51.2% of patients had acute toxicity. 77.3% of the patients with toxicity had toxicity after 30<sup>th</sup> fraction of radiotherapy. Patients with toxicity were predominantly distributed in the group glioblastoma, NOS subtype. Higher expression levels of microRNA-10b and microRNA-21 are predominantly associated with a higher grade of toxicity. The expression levels of miR-34a were significantly elevated at the 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> fraction of RT, in comparison to baseline levels. Patients with tumor size less than 4 cm had higher expression levels of miR-10b and miR-21 at the baseline. The longer PFS was noticed in patients with expression values above the median value of microRNA-21 and microRNA-34a. Patients with microRNA-10b expression values higher than the median had better OS.

**Conclusions:** This research showed microRNA-10b/21/34a change over treatment and that they are associated with acute toxicity. This concept is unique and suggests that dynamic changes such as variations of microRNA expression levels can be used as parameters for radiosensitivity, response to RT, and prediction of acute toxicity.

**Key words:** glioblastoma, radiotherapy, temozolomide, microRNA, toxicity

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Radiation Oncology/Molecular biology

**UDK number:** \_\_\_\_\_

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiologija .....	1
1.2. Klasifikacija i patologija glioblastoma .....	1
1.2.1. Klasifikacija glioblastoma SZO 2016. godine .....	2
1.2.2. Klasifikacija glioblastoma SZO 2021. godine .....	2
1.3. Etiologija i patogeneza glioblastoma .....	3
1.3.1. Etiologija .....	3
1.3.2. Najčešći hereditarni sindromi povezani sa nastankom glioblastoma .....	4
1.3.3. Patogeneza glioblastoma .....	5
1.3.4. Hipoteza o matičnoj ćeliji glioma .....	10
1.4. Klinička slika glioblastoma .....	12
1.5. Radiološka dijagnostika glioblastoma .....	14
1.6. Lečenje glioblastoma .....	16
1.6.1. Hirurško lečenje glioblastoma .....	16
1.6.2. Radioterapija .....	18
1.6.3. Sistemsko lečenje glioblastoma .....	34
1.7. Mikro RNK .....	36
1.7.1. Mikro RNK u ćelijskim i fiziološkim procesima .....	36
1.7.2. Mikro RNK u patološkim stanjima i malignim bolestima .....	37
1.7.3. Mikro RNK kod glioblastoma .....	38
1.7.4. Mikro RNK, jonizujuće zračenje i radioterapija .....	40
1.8. Toksičnost terapije kod tumora mozga .....	41
1.8.1. Toksičnost radioterapije .....	41
1.8.2. Toksičnost hemioterapije kod tumora mozga .....	44
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	45
3. MATERIJAL I METODE .....	46
3.1. Pacijenti .....	46
3.2. Planiranje zračne terapije .....	47
3.3. Primena hemioterapije .....	50
3.4. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	51
3.5. Izolovanje mikro RNK .....	51
3.6. Statistička analiza .....	51
3.7. Bioinformatička analiza .....	52



4. REZULTATI.....	53
4.1. Demografski podaci i kliničko-patološke karakteristike pacijenata .....	53
4.2. Ispitivanje toksičnosti .....	55
4.3 Povezanost između promene nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa kliničko-prognostičkim faktorima i ishodom bolesti .....	70
4.3.1. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa veličinom tumora .....	70
4.3.2. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa lokalizacijom tumora i patohistološkim tipom tumora .....	71
4.3.3. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa <i>IDH1</i> mutacionim statusom .....	72
4.3.4. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa preživljavanjem bez progresije bolesti (PFS) i ukupnim preživljavanjem (OS).....	73
4.4. Ispitivanje razlike u nivou ekspresije miR-10b/21/34a između pacijenata i zdravih kontrola.....	83
5. DISKUSIJA.....	84
6. ZAKLJUČCI.....	102
7. LITERATURA.....	104

# 1. UVOD

## 1.1. Epidemiologija

Zloćudni tumori mozga čine oko 1 - 2% od svih zloćudnih (malignih) tumora kod čoveka (1). U periodu od 2003. do 2007. godine, ukupna učestalost malignih tumora mozga na 100 000 osoba u Sjedinjenim Američkim Državama je bila 5,74 (2). U odnosu na druge regione, incidencija tumora mozga je bila najniža u jugoistočnoj Aziji, dok je najviša bila u severnoj Evropi i Kanadi (2).

Prema podacima Instituta za javno zdravlje "Batut" za 2019. godinu, u odnosu na lokalizaciju i obolevanje od raka prema polu, tumori mozga se nalaze na osmom mestu kod muškaraca i na desetom mestu kod žena. Po mortalitetu od malignih bolesti, tumori mozga se nalaze na osmom mestu kod muškaraca (3.1%), dok se kod žena nalaze na desetom mestu (2.7%) (3). Godišnja uzrasno-standardizovana stopa incidence primarnih malignih tumora mozga je ~ 3,9 na 100 000 za muškarce i 3,0 na 100 000 za žene, dok je uzrasno-standardizovana stopa mortaliteta 3,2 na 100 000 za muškarce i 2,4 na 100 000 za žene (4).

Glioblastom (GB) je najčešći primarni zloćudni tumor mozga kod odraslih pacijenata (5). U periodu od 2013 - 2017. godine, u Americi, najčešći primarni maligni tumor mozga bio je glioblastom, obuhvatajući 48.6% od svih dijagnostikovanih malignih tumora mozga (5). Glioblastom se češće javlja kod osoba muškog pola sa odnosom 1,5 : 1 u odnosu na ženski pol (6). Najveći pik pojavljivanja registrovan je kod bolesnika između 75 - 84. godine života, dok incidenca opada nakon 85. godine života (7). Glioblastom je nešto češći kod belaca u odnosu na druge rase (6).

## 1.2. Klasifikacija i patologija glioblastoma

Znanje o tumorima mozga se svakodnevno proširuje, zbog čega se i klasifikacija tumora centralnog nervnog sistema (CNS) blagovremeno menja i dopunjuje. U klasifikaciji tumora centralnog nervnog sistema Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. godine, po prvi put su uključeni molekularni parametri koji su zajedno sa patohistološkim karakteristikama preciznije definisali entitete tumora CNS.

Do klasifikacije iz 2016. godine, glioblastom se prethodno označavao kao multiformni glioblastom (eng. *glioblastoma multiforme*), a upravo izraz "multiforme" odnosio se na heterogenost tumora. Glioblastom predstavlja jedan od tumora iz grupe difuznih glioma, čija je karakteristika infiltracija okolnog moždanog tkiva. Histološki, glioblastom se karakteriše hipercelularnošću, jedarnom atipijom, intravaskularnim trombima, mikrovaskularnom proliferacijom i nekrozom sa ili bez formiranja pseudopalisada (8). Fokusi nekroze su među najkarakterističnim patohistološkim obeležjima glioblastoma.

### 1.2.1. Klasifikacija glioblastoma SZO 2016. godine

Po klasifikaciji SZO iz 2016. godine, glioblastomi gradusa IV se dele na: 1) izocitrat dehidrogenaza (*IDH*)-*wild type* glioblastome, 2) *IDH*-mutirane glioblastome i 3) glioblastoma, NOS (*not other specified*). Glioblastomi *IDH-wild type* čine oko 90% glioblastoma i najčešće su u pitanju *de novo* odnosno primarni glioblastomi koji se javljaju kod osoba preko 55 godina života. Glioblastomi *IDH*-mutanti, obuhvataju oko 10% glioblastoma i to su uglavnom sekundarni glioblastomi, nastali progresijom iz prethodno niskogradusnih glioma, te su češći kod mlađih osoba. Glioblastomi NOS (eng. *Not Other Specified* - NOS), predstavljaju glioblastome kod kojih nije učinjena provera *IDH* mutacionog statusa, odnosno *IDH* status se nije mogao jasno potvrditi (nekonkluzivan nalaz) (9,10).

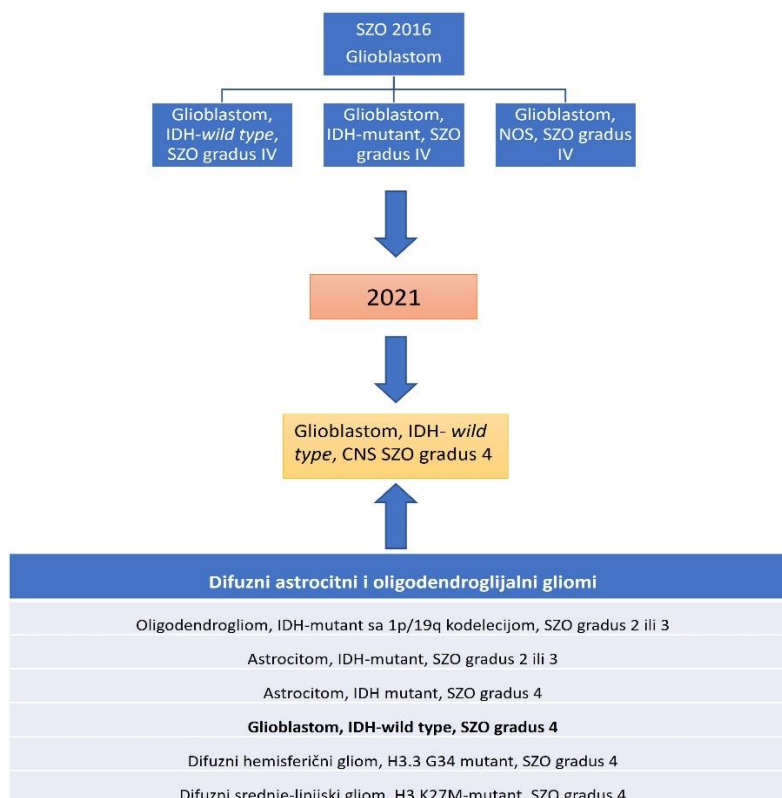
Varijanta glioblastoma nazvana epiteloidni glioblastom je pridodata među glioblastome *IDH-wild type*, koje čine krupnoćelijski glioblastom i gliosarkom, dok je glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom dodat kao obrazac glioblastoma (9). Sitnoćelijski glioblastom/astroцитom i *granular cell* glioblastom/astroцитom i dalje su prepoznati kao obrasci glioblastoma (9).

### 1.2.2. Klasifikacija glioblastoma SZO 2021. godine

Tokom 2021. godine objavljeno je peto izdanje klasifikacije tumora centralnog nervnog sistema Svetske Zdravstvene Organizacije (11). U novoj klasifikaciji tumora CNS, svi difuzni astroцитni tumori, *IDH*-mutirani, sada se smatraju jednim tipom tumora tj. astroцитomom, *IDH*-mutantom, koji se potom gradira kao CNS SZO gradus 2, 3 ili 4 (u novoj klasifikaciji tumora CNS, gradiranje se vrši arapskim brojevima). Postojanje homozigotne delecije gena ihibitora ciklin zavisne kinaze 2A/B (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor* – CDKN; *CDKN2A/B*) utiče na to da se tumor gradira kao CNS SZO gradus 4, bez obzira na izostanak patohistoloških parametara poput mikrovaskularne proliferacije ili nekroze (11,12).

Ukoliko se utvrdi prisustvo jednog od tri genetička parametra kao što su mutacija u regionu promotora gena koji kodira za reverzna transkriptaza telomerazu (eng. *Telomerase reverse transcriptase* - TERT), povećan broj gena za epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor* - EGFR) ili kombinovana trizomija hromozoma 7 sa monozomijom hromozoma 10, tumor se gradira kao gradus 4. Ukoliko se utvrdi prisustvo samo jednog od prethodno navedenih parametara ili prisustvo mikrovaskularne proliferacije ili nekroze kod *IDH-wild type* difuznog ili astroцитnog glioma kod odraslih osoba, može se postaviti dijagnoza glioblastoma, *IDH-wild type* (11,12). U odnosu na četvrto izdanje klasifikacije tumora CNS, može se zaključiti da po novoj klasifikaciji tumora CNS iz 2021. godine više ne postoji entitet glioblastom *IDH*-mutant, već isključivo entitet glioblastom, *IDH-wild type*. Međutim, entitet koji na neki način zamenjuje glioblastom, *IDH*-mutant predstavlja astroцитom, *IDH*-mutant, SZO gradus 4 (11).

Shema klasifikacije glioblastoma prema SZO iz 2016. godine je predstavljena na **slici 1**, kao i sažeta klasifikacija difuznih astroцитnih oligodendroglijalnih glioma iz 2021. godine.



**Slika 1.** Klasifikacija glioblastoma iz 2016. i 2021. godine; klasifikacija difuznih astrocitnih oligodendroglijalnih glioma iz 2021. godine

### 1.3. Etiologija i patogeneza glioblastoma

#### 1.3.1. Etiologija

Iako etiopatogeneza glioblastoma nije u potpunosti razjašnjena, u literaturi je do sada predstavljeno nekoliko mogućih faktora rizika koji se mogu dovesti u vezi sa razvijanjem tumora mozga.

Veza između izloženosti hemijskim faktorima, pesticidima, vinil-hloridu i formaldehidu sa jedne strane i rizika za razvoj tumora mozga kod čoveka sa druge strane, nije u potpunosti razjašnjena i ostaje kontroverzna. Slično je i sa podacima o povezanosti upotrebe mobilnih telefona i razvoja tumora mozga. U nekim studijama su predstavljeni podaci o povećanoj incidenci akustičnih neurinoma i glioma kod osoba koji su koristili mobilni telefon minimum 10 godina sa pretežno unilateralnom dispozicijom (13). Tokom poslednjih 5 godina postoje podaci iz meta analiza koji govore o nešto višem riziku za razvoj glijalnih tumora tokom dugotrajne upotrebe mobilnih telefona (14).

Do sada nije dokazano da izloženost stambenom elektromagnetnom polju i jonizujućem zračenju upotrebljenom u dijagnostičke svrhe, može izazvati nastajanje glioma (15). Međutim, primena zračne terapije u terapijske svrhe je dokazani faktor rizika za nastanak tumora mozga, uključujući gliome (16). Primena kranijalne zračne terapije u detinjstvu povećava rizik za razvoj nastanak tumora mozga. Najveći rizik za razvoj glioma imaju deca do 5 godina života kod kojih je sprovedena zračna terapija glave (17). Deca koja su lečena od akutne limfoblastne leukemije (ALL) u detinjstvu i kod kojih je sprovedena

zračna terapija glave su u riziku za razvoj sekundarnih tumora mozga. Faktori rizika za razvoj sekundarnih tumora mozga su CNS leukemija, tretman na eng. "Total X therapy" i primena zračenja glave (18). Starost manja od 6 godina kod dece bila je povezana sa povećanim rizikom od razvoja visokogradusnih glioma (18).

Tokom poslednjih nekoliko godina postavlja se hipoteza o povezanosti pojedinih virusnih infekcija sa razvojem glioma. Jedan od razloga za to ogleda se u tome da su pojedini virusi uključeni u patogenezu kancera različitih regija u organizmu, bilo kao mogući direktni uzročnici, bilo da su kofaktori u onkogenezi. Virus koji se najviše povezuje sa nastankom različitih tumora su Epstein Bar virus (EBV), Humani herpes virus tip 8 (HHV8), Humani papiloma virusi (HPV), Hepatitis B i C virusi (HBV, HCV), Humani T-limfotropni retrovirus tip 1 (HTLV-1), humani virus imunodeficijencije (HIV) (19).

U nekoliko naučnih radova postavljena je hipoteza o tome da pojedini virusi mogu biti etiološki faktori u razvoju glioma. Međutim, čvrstih dokaza za tu tvrdnju i dalje nema. Tokom 2002.godine Cobbs i saradnici su u svom istraživanju naveli da su identifikovali genske produkte citomegalovirusa (CMV) u 27 uzoraka glioma. Međutim, drugi istraživači nisu potvrdili ove navode (20), zbog čega uloga CMV u nastanku glioma ostaje kontroverzna.

EBV je takođe predmet istraživanja kao mogući okidač ili kofaktor u patogenezi glioblastoma. Kako se EBV dovodi u vezu sa nastankom nazofaringealnog karcinoma, ali i pojedinih stanja i poremećaja CNS poput encefalitisa (21), postavljena je hipoteza o ulozi EBV u razvoju glioma. U prilog tome govore i podaci da se u astrocitima može identifikovati receptor za EBV (22). Međutim, Strong i saradnici nisu našli jasnu povezanost između ovog virusa i nastanka visokogradusnih glioma (20).

### 1.3.2. Najčešći hereditarni sindromi povezani sa nastankom glioblastoma

Neurofibromatoza (NF) tip 1 ili von Recklinghausenova bolest je jedan od najčešćih neurogenetskih, autozomno dominantnih poremećaja sa učestalošću od 1/3000 novorođenih (23). Ukupni rizik od nastanka kancera je 2,7 puta veći kod pacijenata sa NF1 nego u opštoj populaciji (23). Ovaj genetski poremećaj nastaje mutacijom u tumor supresorskom genu *NF1* koji se nalazi na 17q11.2 hromozomu. *NF1* gen kodira neurofibromin koji učestvuje u više signalnih puteva, a jedna od uloga koju ima je i utišavanje aktivne forme RAS. Tumori nervnog sistema povezani sa NF1 uključuju neurofibrome i gliome (24).

Neurofibromatoza tip 2 je genetski autozomno dominantni poremećaj sa incidencom od 1 u 25 000 novorođenih (25). Slično kao i za *NF1* gen, *NF2* gen je tumor supresorski gen koji se nalazi na hromozomu 22q12. *NF2* gen kodira protein merlin koji je uključen u ćelijsku proliferaciju ćelija preko PAK/Rac signalnog puta (26). NF2 se karakteriše predispozicijom za razvoj tumora nervnog sistema poput švanoma, meningeoma, glioma, ependimoma, ali takođe i pojavu periferne neuropatije, očnih lezija i tumora kože (25).

Li Fraumenov sindrom je redak autozomno dominantni genetski poremećaj koji se karakteriše predispozicijom za nastanak različitih kancera, najpre karcinoma dojke, sarkoma, leukemija, adrenokortikalnog karcinoma i tumora mozga (24). Od tumora mozga najčešće se javljaju astrocitni tumori, mada se i drugi tumori poput meduloblastoma mogu pojaviti (24). Li-Fraumenov sindrom nastaje kao posledica germinativnih *missense* mutacija u očuvanim domenima gena *p53* u oko 70% pogođenih porodica (27).

Turkotov sindrom je autozomno recesivni genetski poremećaj koji se karakteriše pojavom primarnih tumora centralnog nervnog sistema i višestrukih kolorektalnih adenoma ili kolorektalnog karcinoma (28). Klinička prezentacija Turkotovog sindroma manifestuje se tokom prve ili druge decenije života (28). Turkotov sindrom se može podeliti u 2 kategorije, tip 1 i tip 2. Kod Turkotovog sindroma tip 1 se nalaze pacijenti sa glioblastomom bez familijarne adenomatozne polipoze, ali često sa udruženim naslednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom (eng. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-NHPCC*), dok se pacijenti sa meduloblastomom i familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP) svrstavaju u Turkotov sindrom tip 2 (29). Turkotov sindrom može nastati zbog mutacija u *MMR* (tip I, povezan sa HNPCC) ili *APC* genu (tip II, povezan sa FAP) (30,31).

### 1.3.3. Patogeneza glioblastoma

Mehanizam nastanka glioblastoma je kompleksan i nedovoljno jasan. Poslednjih nekoliko godina velika pažnja se pridaje identifikaciji markera koji mogu razjasniti nastanak tumora, njegovo agresivno biološko ponašanje, a samim tim dati smernicu koja bi mogla uticati na režim lečenja.

Primarni i sekundarni glioblastomi nose nekoliko tipičnih genetskih promena u ključnim genima koji regulišu faktore rasta, regulišu ćelijski ciklus, popravak dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), preživljavanje i migraciju ćelija, s odgovarajućom ushodnom ili nishodnom regulacijom signalnih puteva.

Istraživanja su pokazala da postoji mnogo signalnih puteva koji mogu biti uključeni u patogenezu glioblastoma. Među njima, najznačajniji su signalni put p53, retinoblastom (RB) signalni put, „*Notch*“ signalni put, signalni put vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), signalni put ceramida, signalni put faktora rasta izvedenih iz trombocita (PDGF), signalni put EGFR, signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K), protein kinaze B i mete rapamicina kod sisara (mTOR) (PI3K/AKT/mTOR), kao i fosfataza i tenzin homog (PTEN) signalni put.

Gen *p53* je najčešći mutirani tumor supresorski gen kod čoveka i njegova glavna funkcija je održavanje ćelijske homeostaze, odnosno predstavlja glavni ćelijski odgovor na različite signale stresa (32). Ohgaki i saradnici su pokazali da se mutacija *p53* gena nalazi u 28% primarnih glioblastoma i u 65% sekundarnih glioblastoma (33). Kod sekundarnih glioblastoma, 57% mutacija *TP53* su na kodonima 248 i 273, dok su kod primarnih glioblastoma mutacije ujednačenije distribuirane (33). Kod oko 10% mutacija *TP53* nema proizvodnje proteina, dok preostali deo mutacija predstavljaju misens mutacije koje proizvode neispravan protein (34). Kao odgovor na stres, p53 podleže posttranslacionim modifikacijama, promoviše transkripciju gena uključenih u specifične ćelijske odgovore u skladu sa tipom stresa čime kontroliše sudbinu ćelije (35). Signalni put p53 je često deregulisan u gliomima. Najčešću deregulaciju komponente p53 signalnog puta predstavlja homozigotna delecija *CDKN2A/ARF* lokusa (36,37).

Gen *retinoblastoma (RB)* predstavlja tumor supresorski gen i prvi put je identifikovan u malignom tumoru retine poznatom kao retinoblastom (38). *RB* gen kodira nuklearni protein RB (pRB) koji deluje kao kontrolna tačka ćelijskog ciklusa u G1 fazi, blokira ulazak u S-fazu i rast ćelije, promovišući terminalnu diferencijaciju (39). Ovaj put ima centralnu ulogu u regulaciji ćelijske proliferacije, slično kao i p53 signalni put. Rb signalni put sastoji se od pet porodica proteina CDKN, ciklini d-tipa, ciklin zavisne protein kinaze, RB porodica džepnih proteina, kao i E2F familija transkripcionih faktora (40). U jednoj studiji je pokazano da je Rb signalni put izmenjen u 78% uzoraka primarnih glioblastoma (41).

U Notch signalnom putu postoje 4 receptora: Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, kao i 5 liganada (42). Notch signalizacija je uključena u različite ćelijske procese poput ćelijske diferencijacije, proliferacije i apoptoze, a deregulacija *Notch* gena ili njegove kaskade signalizacije može dovesti do nastanka tumora (43). Aberantna ekspresija odgovarajućih Notch receptora i liganada uočena je i kod glioma. Visoka ekspresija određenih komponenti Notch signalnog puta je u korelaciji sa lošijom prognozom kod visokogradusnih glioma (44,45). Takođe, uočena je veza između nivoa ekspresije Notch receptora i radiorezistentnosti kod glioma (46).

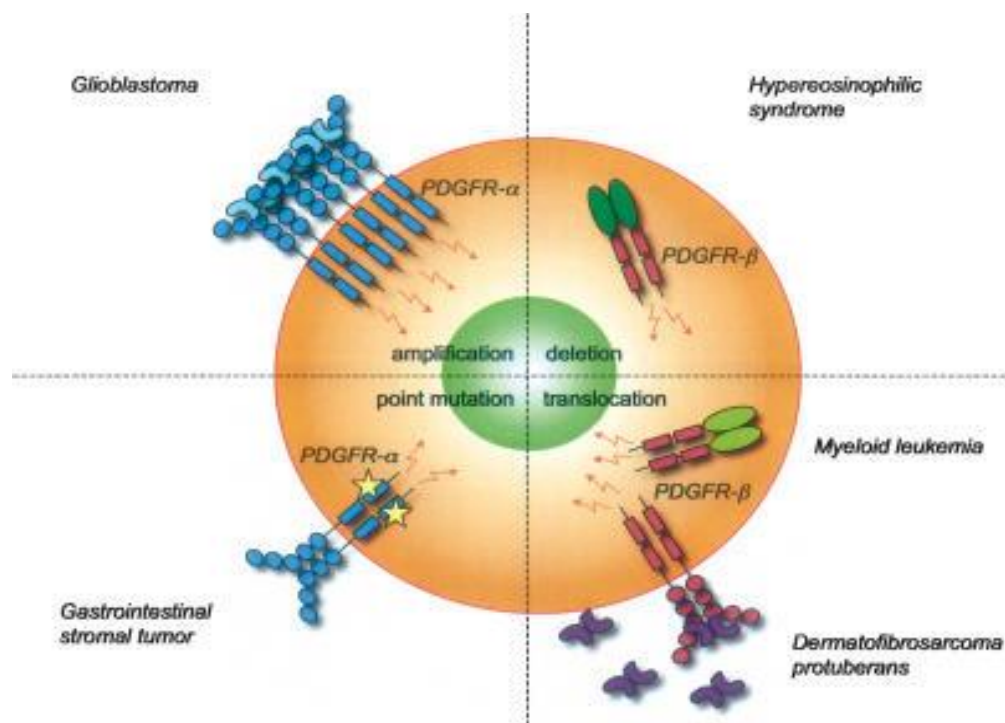
Među faktorima rasta koji su prekomerno eksprimirani u glioblastomima jeste vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (47). Pokazalo se da su VEGF i njemu srodni receptori najvažniji faktori uključeni u angiogenezu glioblastoma. VEGF luče endotelne ćelije, a hipoksija može podstaći lučenje VEGF preko signalnog puta hipoksijom inducirano faktora (HIF) (48).

*EGFR* gen je amplifikovan u približno 36% primarnih i oko 8% sekundarnih glioblastoma (33). Normalna funkcija *EGFR* gena podrazumeva promovisanje ćelijske proliferacije, invazije i angiogeneze, a u slučaju mutacije *EGFR* i povećanja funkcije ovog gena može doći do proliferacije tumorskih ćelija i promocije njihove invazivnosti (49,50). EGFR (takođe poznat kao HER1 ili ErbB1) je receptor koji pripada ErbB porodici receptora tirozin kinaze. Kod određenog broja glioblastoma postoji jedinstvena mutacija koja generiše mutantni protein epidermalnog faktora rasta receptora, varijantu III (*EGFRvIII*) (51). Delecija egzona 2 - 7 indukuje deleciju ekstracelularnog domena EGFR vIII proteina što ga čini nedostupnim za ekstracelularne ligande (51).

Ceramid deluje kao centralni molekul puta metabolizma sfingolipida. Sfingolipidi kao što su sfingozin-1-fosfat i ceramid imaju značajne efekte na ćelije glioblastoma, pri čemu ceramid izaziva ćelijsku smrt, a sfingozin-1-fosfat dovodi do ćelijske proliferacije i invazije (52). Pokazano je da su gangliozidi, uključujući gangliozid D2 (GD2) i gangliozid D3 (GD3), visoko eksprimirani u matičnim ćelijama glioblastoma i da je njihova aberantna ekspresija uključena u promociju rasta i preživljavanja tumora.

PI3K/Akt/mTOR signalni put je uključen u brojne ćelijske procese kao što su metabolizam ćelije, rast ćelije i pokretljivost (53). PKB / AKT se aktivira u ćelijama koje su izložene raznim stimulusima kao što su hormoni, faktori rasta i ekstraćelijske matriksne komponente (54). Delecija *PTEN* gena zbog mutacije ili gubitka heterozigotnosti na dužem kraku hromozoma 10 (10q) posledično dovodi do ushodne regulacije AKT/mTOR signalnog puta, što podstiče preživljavanje, proliferaciju i invaziju ćelija glioma (49,55). Fosfo-PI3K, fosfo-Akt i fosfo- p70<sup>s6k</sup> nivoi su obrnuto povezani sa nivoom ekspresije kaspaze 3 (eng. *cleaved caspase 3*), što je marker ćelijske smrti po tipu apoptoze. Navedeno sugeruje da članovi PI3K-a mogu da deluju kroz supresiju apoptoze, što bi mogao biti mehanizam kojom PI3K put može promovisati otpornost na radioterapiju kod glioblastoma (56).

PDGF signalni put je uključen u razvoj normalnog tkiva, pa samim tim, disfunkcija PDGF signalnog puta može doprineti nastanku malignih i drugih bolesti (57). Kod astrocitnih tumora, često postoji prekomerna ekspresija PDGF liganda i receptora. Pokazalo se da glioblastom eksprimira sve PDGF ligande i dva ćelijska površinska receptora, PDGFR-a i PDGFR-b (58). Autokrini aktivacija PDGF signalnih puteva uključena je u nastanak pojedinih glioma, sarkoma i leukemija (59). Amplifikacija *PDGFR-a* gena se često nalazi kod glioblastoma (**slika 2**) (59).



**Slika 2.** Genetski uzroci PDGF/PDGFR deregulacije. Kod glioblastoma se često nalazi amplifikacija gena *PDGFR- $\alpha$*  (59)

*Izvor: Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev. 2008;22(10):1276–312.*

Citoskelet ćelije ima bitnu ulogu u održavanju oblika i veličine ćelije. Mnogi procesi poput ćelijske proliferacije i migracije ćelija su povezani sa citoskeletom ćelija. Prilikom maligne transformacije target glijalnih ćelija, zapažene su opsežne promene u svim elementima citoskeleta (60). *Kortaktin* gen (*CTTN*), koji predstavlja faktor nukleatora aktina, prekomerno je eksprimiran kod glioblastoma, što dovodi do povećane infiltrativne sposobnosti tumora (61). Elektroneutralni  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -kotrporter 1 reguliše migraciju ćelija glioblastoma procesom modulacije citoskeleta kroz više meta, uključujući F-aktin regulaciju preko aktivnosti aktin regulatornog proteina Kofilina-1 i Ro GTPaza (eng. *RhoGTPase*) (62).

Maligna transformacija ćelija porekla astrocita predstavlja rezultat sekvencijalne akumulacije genetičkih alteracija kao i abnormalne regulacije signalnih puteva. Primarni glioblastomi se karakterišu amplifikacijom i mutacijom *EGFR*, gubitkom heterozigotnosti hromozoma 10q, delecijom homologa fosfataze i tenzina (*PTEN*) na hromozomu 10, kao i delecijom p16.

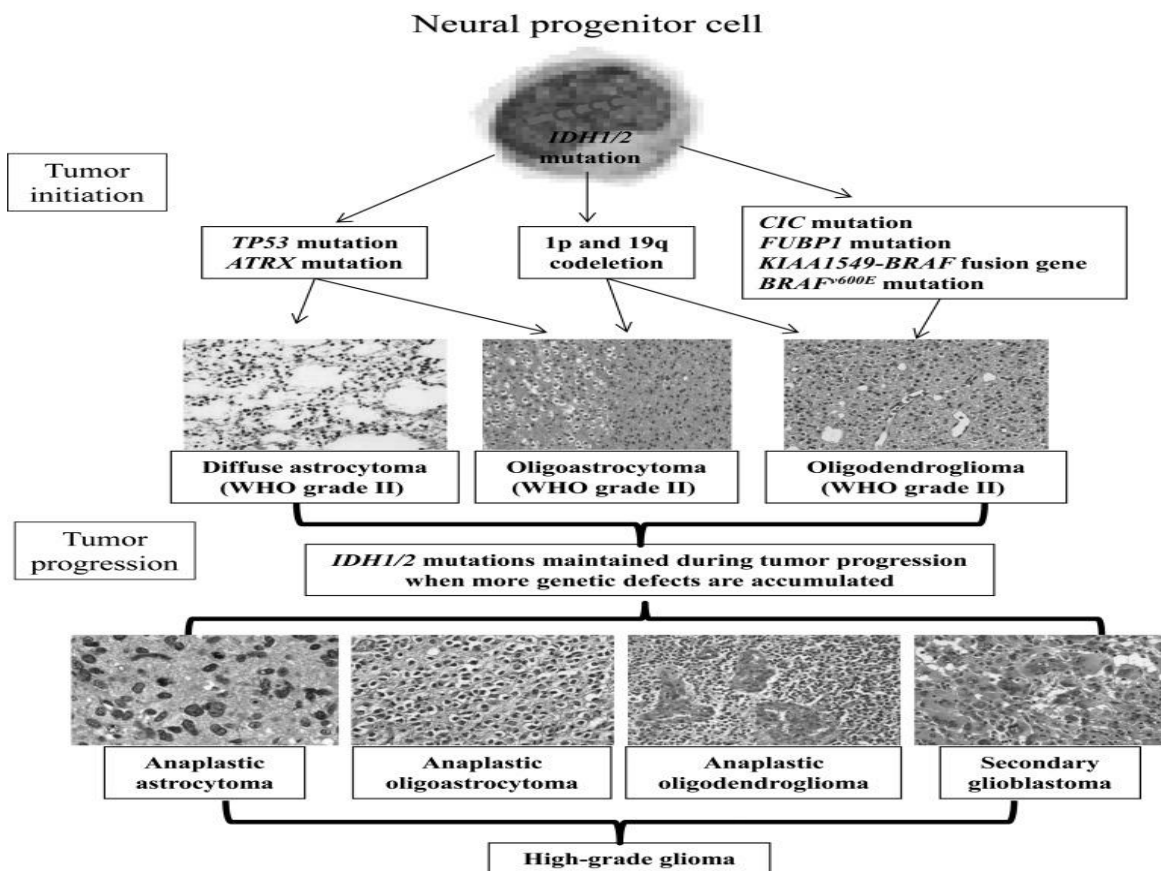
Kod sekundarnih glioblastoma uočene su mutacije u *p53* tumor supresorskom genu, prekomerna ekspresija receptora faktora rasta izvedenih iz trombocita (PDGF), izmene u signalnim putevima retinoblastoma (Rb) i p16, kao i gubitak heterozigotnosti hromozoma 10q (63–65).

Utvrđeno je da je signalni put RTK/Ras/PI3K izmenjen u 86% i da je pRB signalni put zahvaćen u 77 proučavanih slučajeva glioblastoma (66).



## IDH mutacija

Enzimi izocitrat dehidrogenaze (IDH) su esencijalni enzimi koji učestvuju u ključnim metaboličkim procesima (67). IDH su ključni enzimi u Krebsovom ciklusu, koji katalizuju oksidativnu karboksilaciju izocitrata u  $\alpha$ -ketoglutarat i redukuju nikotinamid adenin dinukleotid tj. NAD<sup>+</sup> (ili nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, tj. NADP<sup>+</sup>) u NADH (ili NADPH) (68). Kada je *IDH* gen mutiran, konverzija izocitrata u  $\alpha$ -ketoglutarat pokreće sintezu 2-hidroksiglutarata, koji deluje kao inhibitor  $\alpha$ -ketoglutarat zavisne demetilaze, što dovodi do hipermetilacije (69,70). Postoje 3 izoforme enzima IDH i to su IDH1, IDH2 i IDH3. Mutacije u *IDH1* i *IDH2* genima se često nalaze u humanim malignitetima. Oko 90% *IDH1* mutacija uključuje egzon 4 na kodonu 132 zamenjujući arginin sa histidinom (R132H). *IDH1* i *IDH2* mutacije mogu biti primarni procesi kod gliomogeneze (71). S druge strane, iako *IDH* mutacije mogu biti najraniji koraci u genezi glioma, velika je verovatnoća da su drugi istovremeni ili naknadni molekularni događaji potrebni za dalju progresiju tumora, prevashodno prilikom transformacije niskogradusnih glioma u visokogradusne gliome (slika 3) (72).



**Slika 3.** Veza između *IDH* mutacija i drugih genetskih promena u gliomu. Vremenska linija predstavlja razvoj glioma od ranijih događaja (gore) do kasnijih događaja (dole)

Izvor: Zhang C, Moore LM, Li X, Yung WKA, Zhang W. *IDH1/2* mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncol.* 2013;15(9):1114–26 (72)

Kod sekundarnih glioblastoma upravo je R132H *IDH1* mutacija najčešća (73). Kod glioma, *IDH* mutacije se nalaze u preko 80% niskogradusnih glioma SZO gradus II i gradus III, ali se mogu naći i kod SZO gradus IV sekundarnih glioblastoma (74,75). Studija Sanson M i saradnika, ukazala je na to da je mutacija *IDH1* kodona 132 usko povezana sa genomskim profilom tumora i predstavlja važan prognostički marker u gliomima gradusa II - IV (76). Prisustvo *IDH* mutacije kod glioblastoma je povezano sa boljim ukupnim preživljavanjem i dužim periodom bez progresije (77,78).

Tokom 2016. godine SZO je objavila četvrtu klasifikaciju tumora CNS, a upravo je *IDH* status (mutiran ili *wild type*) uticao na podelu glioblastoma na *IDH*-mutante i *IDH-wild type* glioblastome (treća varijanta, Glioblastom NOS, podrazumeva nekonkluzivan nalaz ili kada se zbog bilo kojih razloga testiranje na *IDH* status nije moglo učiniti). U petoj klasifikaciji tumora CNS, koja je objavljena krajem 2021. godine, u odnosu na *IDH* status, ali i druge parametre, izbrisan je entitet glioblastom, *IDH*-mutant. Odsustvo *IDH* mutacije, uz prisustvo drugih obeležja za glioblastom, određuje naziv tumora glioblastom, *IDH-wild type*, SZO gradus 4.

## **MGMT metilacija**

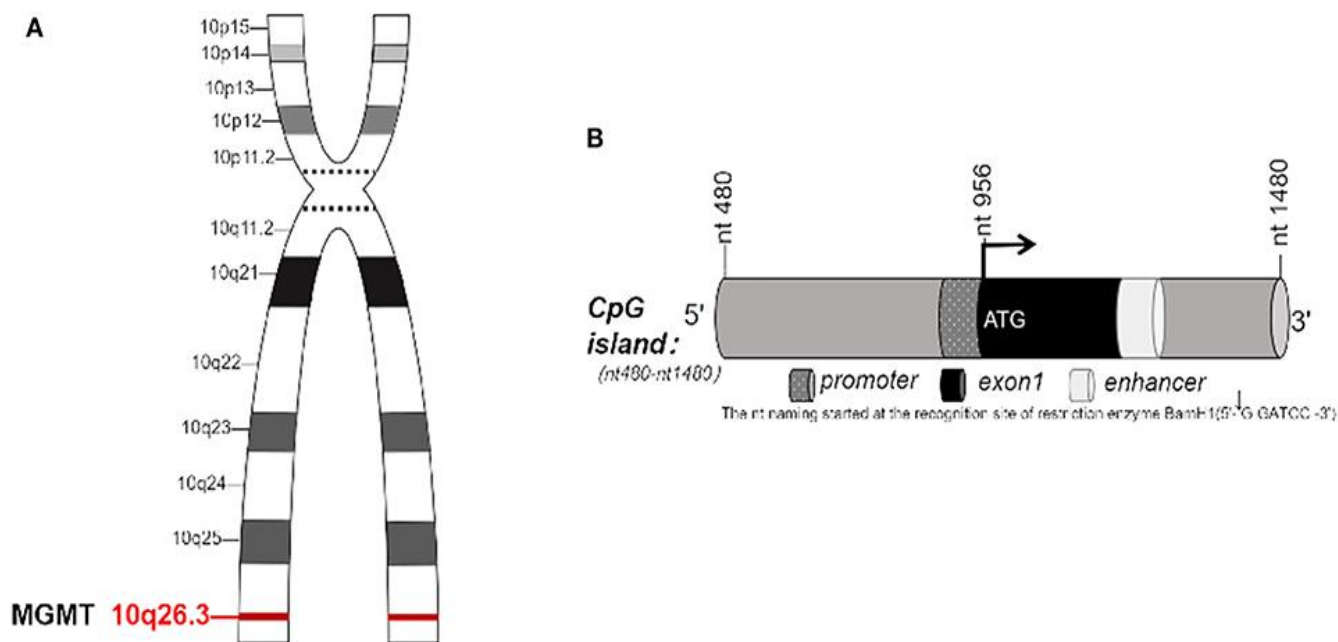
Gen *O6-metilguanin-DNK-metiltransferaza (MGMT)* se nalazi na hromozomu 10 (10q26) (slika 4) (79). Sastoji se od 5 egzona i 4 introna i veličine je veće od 300 kb (80). *MGMT* gen kodira istoimeni protein MGMT, dužine 207 aminokiselina (81).

Alkilacija DNK na O<sup>6</sup> poziciji guanina je jedan od ključnih događaja koji dovode do mutacije, kancera i ćelijske smrti. MGMT protein je protein uključen u popravku DNK oštećenja i odgovoran je za uklanjanje alkilacionih adukata iz O<sup>6</sup> pozicije guanina u DNK (82).

Epigenetičko utišavanje MGMT gena metilacijom promotora povezano je sa gubitkom MGMT ekspresije, čime se smanjuje stepen popravke DNK oštećenja. Ako je promotor *MGMT* gena metilovan, ćelije glioblastoma imaju manju verovatnoću popravke oštećenja alkilirajućim agensom a samim tim, tumor je osetljiviji na terapiju alkilirajućim agensima (83).

Hipermetilacija promotora *MGMT* gena, osim što služi kao prediktivni faktor za odgovor na hemioterapiju alkilirajućim agensima, povezana je i sa boljom prognozom, odnosno služi i kao prognostički faktor kod pacijenata sa glioblastomom (84).

MGMT metilacija je često udružena sa drugim povoljnim prognostičkim parametrima kod drugih glioma, izuzev primarnih glioblastoma. Tako, na primer, kod difuznih infiltrativnih astrocitnih tumora (osim kod primarnog glioblastoma) MGMT metilacija se često nalazi sa *IDH* mutacijom (76). Kod oligodendroglijalnih tumora, MGMT metilacija često postoji zajedno sa 1p/19q kodelecijom (85).



**Slika 4.** Lokacija MGMT gena na hromozomu 10q26.

*Izvor: Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. Front Oncol. 2020;9:1547. (79)*

### 1.3.4. Hipoteza o matičnoj ćeliji glioma

Tokom poslednjih godina, istraživanja su usmerena ka otkrivanju tzv. matičnih ćelija kancera (eng. *cancer stem cells - CSCs*). Prema hipotezi, matične ćelija kancera (koje se ponekad označavaju i kao eng. *cancer initiating cells* ili *tumour initiating cells*) imaju sposobnost samoobnavljanja i ubrzanja tumorskog rasta (86).

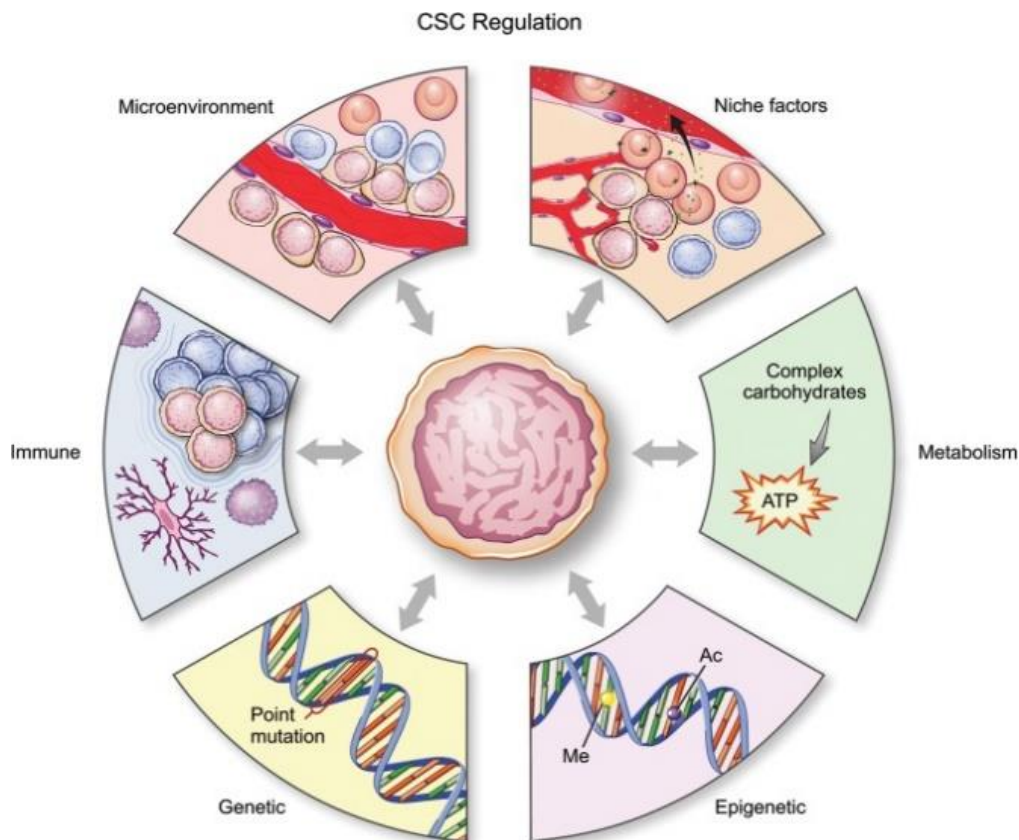
Brojni istraživači su postavili hipotezu o postojanju matičnih ćelija kancera, nakon višegodišnjeg posmatranja brzog relapsa bolesti pojedinih tumora, metastaziranja tumora, rezistentnosti na odgovarajuću terapiju, odnosno slabiji odgovor na datu terapiju. Kako za druge tumore, postavljena je hipoteza i o postojanju matičnih ćelija tumora mozga.

Singh i saradnici su izolovali iz tumora mozga kod čoveka ćelijsku subpopulaciju CD133<sup>+</sup> koja je *in vitro* imala karakteristike matičnih ćelija (87). Ubrizgavanjem CD133<sup>+</sup> ćelija u mozak miša doveo je do nastanka tumora sa istim fenotipom kao kod originalnog tumora mozga kod čoveka, dok ubrizgavanje CD133<sup>-</sup> ćelija nije dovelo do nastanka tumora (87). Molekul CD133 koji se naziva još i prominin 1 (PROM-1) je predstavljen kao potencijalni marker u izolaciji matičnih ćelija i drugih solidnih tumora poput kancera prostate (CD44<sup>+</sup>/α2β1<sup>hi</sup>/CD133<sup>+</sup>) (88).

Rezultati istraživanja Bao i saradnika sugerisali su na to da ćelijska populacija glioma kod kojih se eksprimira molekul CD133<sup>+</sup> može biti potencijalni uzrok radiorezistencije glioma nakon primenjene zračne terapije. Naime, istraživači su primetili da se iz direktnih uzoraka humanog glioblastoma, ali i ljudskih ksenograftova glioma, nakon primenjenog zračenja efektivnije aktiviraju mehanizmi popravke DNK, nego kod ćelijske populacije koja ne eksprimira molekul CD133<sup>+</sup> (89).

Iako ima dosta kontradikcija oko postojanja matičnih ćelija kancera, tako i glioma, savremena istraživanja su usmerena ka tome da se ova hipoteza potvrdi ili odbaci. Potrebna su dodatna ispitivanja, osim ekspresije pojedinih markera, kako bi se nedvosmisleno diferencirala matična ćelija tumora od nematičnih ćelija tumora. Smatra se da se regulacija matičnih ćelija glioma ostvaruje preko šest glavnih mehanizama koji uključuju faktore poput genetskih, epigenetičkih, metaboličkih, ali i eng. *niche* faktora, mikrookruženja ćelije i imunog sistema domaćina (**slika 5**) (90).

Izolovanje i jasno definisanje matične ćelije glioma moglo bi uticati na otkrivanje i razvijanje odgovarajućih lekova čime bi se potencijalno prevazišla rezistentnost glioma najvišeg gradusa na datu terapiju. Pojedina istraživanja su pokazala da koštani morfogenetski proteini, prevashodno BMP4, smanjuju proliferaciju CD133+ ćelija *in vitro* i zaustavljaju rast tumora *in vivo* kod mišjeg modela sa ksenograftom humanog glioblastoma (91). Naime, BMP proteini preko svojih srodnih receptora aktiviraju Smad signalni put što kao rezultat ima smanjenu proliferaciju ćelija, ali i povišenu ekspresiju neuralnih markera (91).



**Slika 5.** Regulacija matičnih ćelija glioma.

*Izvor: Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 2015;29(12):1203–17. (90)*

## 1.4. Klinička slika glioblastoma

Glioblastom je najčešće lokalizovan u hemisferama velikog mozga. Oko 95% ovih tumora je lokalizovano supratentorijalno, dok se infratentorijalno (u moždanom stablu i malom mozgu) i u kičmenoj moždini, glioblastom dijagnostikuje u svega nekoliko procenata (92). U zavisnosti od dela mozga u kome se tumor nalazi i simptomi mogu da se razlikuju. Takođe, lokalizacija glioma može da utiče i na prognozu bolesti. Najčešće, gliomi se dijagnostikuju u čeonom i slepoočnom lobusu mozga i nešto češći su u desnoj hemisferi (93).

Neurološka simptomatologija najčešće nastaje zbog tumorske invazije moždanog parenhima, kompresivnog efekta na mozak i endokranijalne strukture, opstrukcije likvorskog sistema i hernijacije mozga. Invazija moždanog parenhima i kompresija na mozak dovode do pojave simptoma shodno lokalizaciji na kojoj se tumor nalazi. Samim tim, simptomi mogu biti motorni ili senzorni deficit, otežan i/ili nerazumljiv govor, poremećaj ravnoteže, nestabilan hod, epileptični napadi, poremećaj vida najčešće poput duplih slika ili ispada u vidnom polju, poremećaj koncentracije, poremećaj mirisa, promene u ponašanju. Ukoliko dođe do opstrukcije toka likvorskog sistema ili hernijacije, simptomi se manifestuju u vidu glavobolje, mučnine, povraćanja i poremećaja stanja svesti (94). Kod dugotrajnog povećanja intrakranijalnog pritiska može se javiti i edem papile optičkog nerva koji je najčešće obostran (95). Staza papile očnog živca se više zapaža kod infratentorijalnih tumora. Kod više od polovine pacijenata simptomi se razvijaju brzo, odnosno između 3 i 6 meseci pre postavljanja dijagnoze. Ponekad se manifestuje više simptoma i to najčešće ukoliko je tumor multicentričnog rasta, odnosno kada se nalazi u više lobusa. U terminalnom stadijumu često dolazi do poremećaja stanja svesti, od somnolencije do kome.

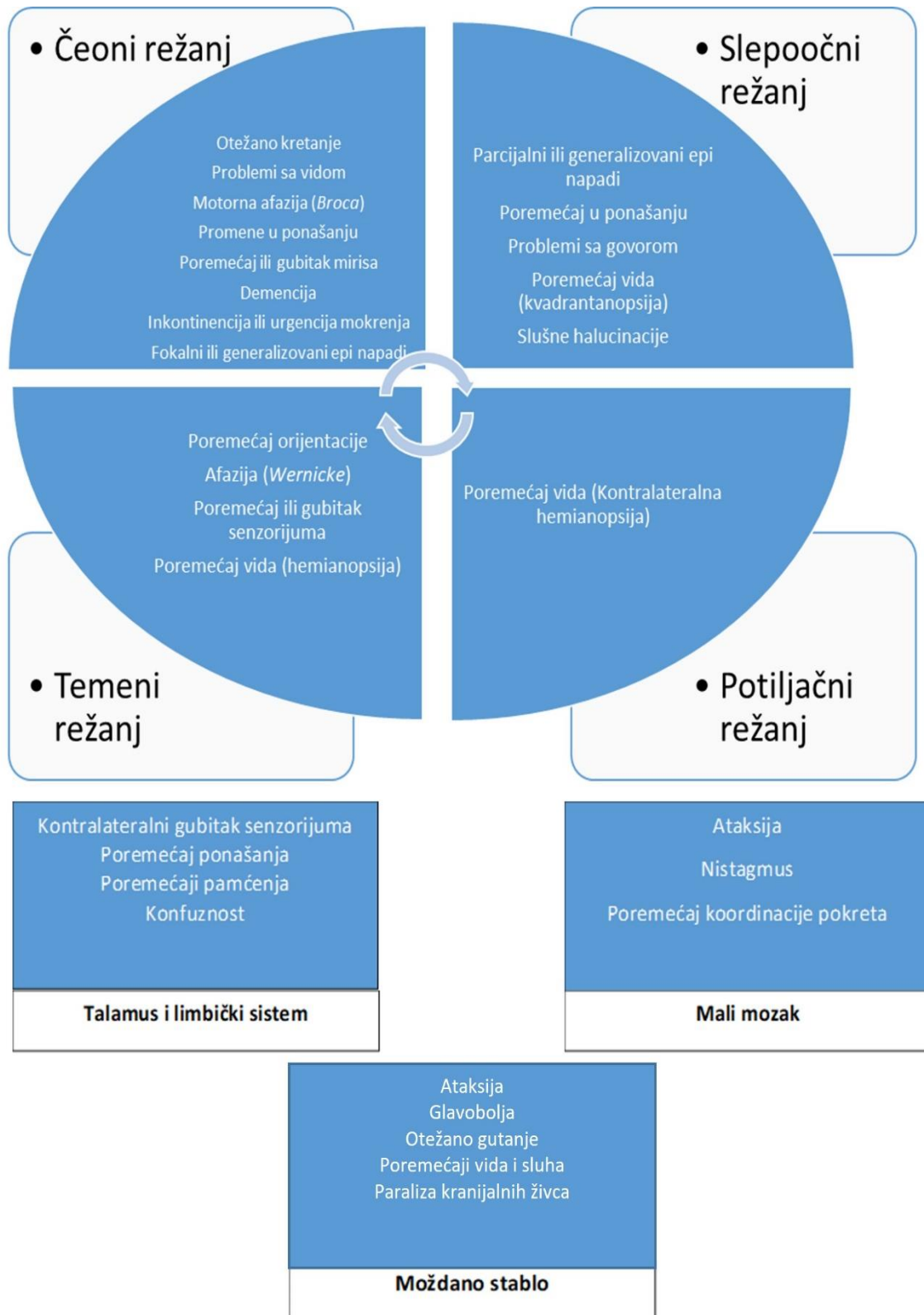
Autonomni poremećaji uglavnom nastaju ukoliko se tumor nalazi u moždanom stablu ili ukoliko je tumor u blizini moždanog stabla i infiltrira ga ili vrši kompresiju na njega. U tom slučaju, mogu se javiti bradikardija i zastoj srčanog rada, hipertenzija, respiratorni poremećaji, poremećaji metabolizma, poremećaj akta gutanja. Ukoliko se tumor nalazi u regiji hipotalamusa ili hipofize, može se javiti i endokrinološki disbalans. Kada je tumor multicentričan, odnosno kada se nalazi u nekoliko različitih lobusa mozga, može postojati više različitih simptoma istovremeno ili se ti simptomi naknadno pojavljuju zbog dalje progresije bolesti. Najčešći simptomi u zavisnosti od lokalizacije tumora u mozgu predstavljeni su na **slici 6**.

Kako se glioblastom može javiti i u kičmenoj moždini, najpre kao intramedularni tumor, simptomi su posledica neurološkog deficita u zavisnosti od zahvaćenog dela kičmene moždine, a najčešći su bol u leđima, radikularni bol, parestezije, motorna slabost, otežano kretanje do nastanka paraplegije, gubitak ili nekontrolisanje sfinktera.

Glioblastomi imaju osobine da često recidiviraju, da su multifokalni i multicentrični, da se šire kroz belu masu centralnog nervnog sistema, kortikospinalni trakt i korpus kalozum, uz zahvatanje kontralateralne hemisfere. Multicentričnost glijalnih tumora se odnosi na postojanje više tumora (fokusa) u mozgu kod kojih nema jasne makroskopske ili mikroskopske veze između njih kao ni jasan put širenja tumora, dok se multifokalnost tumora odnosi na postojanje više tumora kod kojih postoji mikroskopsko širenje od primarnog fokusa tumora (96).

Glioblastome karakteriše infiltrativni rast, zbog čega se tumorska masa teško može razdvojiti od normalnog moždanog parenhima. Veoma retko metastaziraju izvan granica centralnog nervnog sistema (97). Do sada opisane ekstrakranijalne metastaze glioblastoma su u slezini, pleuri, plućima, parotidnoj

žlezdi, koži, limfnim čvorovima, jetri, kostima, pankreasu, peritoneumu, mezenterijumu i tankom crevu (98,99).



**Slika 6.** Najčešći simptomi tumora mozga shodno lokalizaciji u kojima se nalaze

## 1.5. Radiološka dijagnostika glioblastoma

Na tumor mozga najpre treba posumnjati na osnovu kliničkog pregleda, detaljne anamneze i ispoljene kliničke slike. Konvencionalna radiografska dijagnostika tumora mozga danas se sprovodi kompjuterizovanom tomografijom (CT) endokranijuma i magnetnom rezonancijom (MR) endokranijuma, na osnovu koje se dobijaju najpre strukturne informacije o samom tumoru i okolnom tkivu (100). Većina tumora se prebojava intravenski datim kontrastom, zbog čega je poželjno aplikovati kontrast kod sumnje na intrakranijalni tumorski proces. Kod CT pregleda aplikuje se jodni kontrast, a kod MR pregleda gadolinijum.

Radi bolje vizuelizacije tumora i demarkacije od okolnog peritumorskog edema, kod pacijenata koji nemaju dokazanu alergiju na jodni kontrast, prilikom CT pregleda endokranijuma, intravenski se aplikuje jodni kontrast. Na postkontrastnom CT pregledu endokranijuma, glioblastom se najčešće prikazuje u vidu ekspanzivne lezije sa nepravilnim, zadebljalim, hiperdenznim ivicama sa prstenastim prebojavanjem, koje okružuju nepravilni hipodenzni centar lezije, koji najpre odgovara centru tumora sa izraženom nekrozom (101). S obzirom da je kod glioblastoma izražena vaskularizacija, u samom tumoru se ponekada može zapaziti i hemoragija.

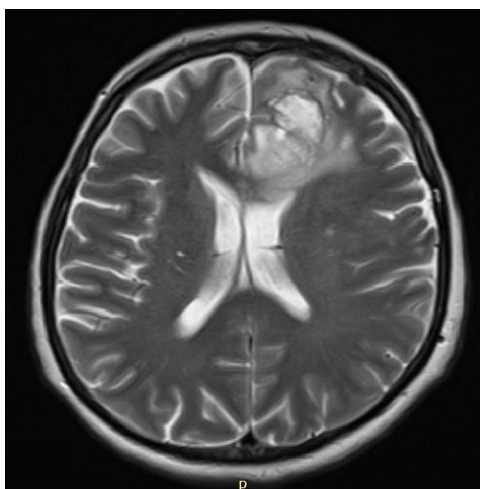
Konvencionalna magnetna rezonancija endokranijuma smatra se metodom izbora u radiografskoj morfološkoj dijagnostici tumora mozga, a samim tim i glioblastoma (**slika 7**). Danas se u najvećem broju slučajeva MR endokranijuma koristi u planiranju operativnog lečenja, ali i tokom planiranja zračne terapije i potom posterapijskog praćenja. Osnovne informacije o tumoru i njegovom okruženju kod konvencionalne MR endokranijuma pružaju nativna *T1-weighted (TIW)* sekvenca, postkontrastna *TIW* sekvenca, *T2-weighted (T2W)* sekvenca i *T2-fluid-attenuated inversion recovery (T2-FLAIR)* sekvenca (102).

U zavisnosti od izgleda tumora u odnosu na moždano tkivo, tumor može biti hipointezan (najčešće kod niskogradusnih astrocitoma), hiperintezan (glioblastomi), izointezan (neurocitomi) ili mešovitog intenziteta signala na T1 sekvenci, dok se na T2 sekvenci tačno može razlikovati dodatna zona edema oko samog tumora.

Na konvencionalnoj MR endokranijuma, glioblastom se na T1 sekvenci prikazuje u vidu hipointenzne do izointenzne lezije, dok se nakon aplikacije gadolinijumskog kontrasta, na postkontrastnoj T1 sekvenci prikazuje kao lezija sa perifernim i nepravilnim, prstenastim postkontrastnim pojačanjem signala koje okružuje hipointenzni, nekrotični deo tumora. Na T2 i *T2-FLAIR* sekvenci prikazuje kao hiperintezna lezija okružena edemom (103). Prstenasto, nepravilno pojačanje intenziteta signala na postkontrastnoj T1 sekvenci ili centralni hiperintenzitet signala na T2 sekvenci, iako su vrlo česti kod glioblastoma, nisu patognomonični nalazi za glioblastom. Sličnu MR sliku mogu dati i toksoplazmoza, neurocisticerkoza, tuberkuloza, tumefaktivna multipla skleroza, primarni CNS limfom, metastaze ekstrakranijalnih tumora, absces mozga, što ponekada predstavlja diferencijalno dijagnostičku radiološku dilemu (103).

Tumor koji zahvata korpus kalozum i invadira obe velikomoždane hemisphere ima karakterističan izgled na MR koji se opisuje kao „*butterfly glioma*“, odnosno kako je najčešće u pitanju glioblastom, tada se označava kao eng. „*butterfly glioblastoma*“ (104).





**Slika 7.** Postkontrastno pojačanje intenziteta signala na T2 sekvenci u levom čeonom režnju mozga, koje po MR karakteristikama najpre odgovara glioblastomu (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

Strukturni odnosno anatomske detalji tumora mozga i njegove okoline procenjuju se konvencionalnom magnetnom rezonancijom. Međutim, savremene i dopunske MR tehnologije mogu dodatno uticati na precizniju dijagnozu samog tumora (a samim tim i lečenje), ukazujući na njegov metabolički profil, fiziološke i molekularne karakteristike.

Primena magnetno rezonantne spektroskopije (MRS) omogućava da se na osnovu biohemijskog profila tumora mozga ukaže na prirodu tumora i stepen njegovog maligniteta. Metabolit N-acetil aspartat (NAA) predstavlja surogat neuronskog integriteta, holin je marker za metabolizam fosfolipidne membrane, kreatin je marker za energetske metabolizam, laktati su produkti anaerobnog metabolizma i povišeni su kod nekroze i hipoksije, dok su lipidi markeri za ćelijsku nekrozu (103). Kako je gradus tumora veći, tako je koncentracija N-acetilaspargata (NAA) i kreatina niža, a holina, lipida i laktata viša (105). Ispituju se i upoređuju metabolički odnosi (eng. *ratio*) između navedenih metabolita.

Difuzioni tenzorski imidžing (DTI) služi za ispitivanje strukture bele moždane mase. Ova neinvazivna metoda bazira se na korišćenju MR tehnologije koja prati slobodno kretanje molekula vode (106). Merenjem difuzivnosti molekula vode, kreira se mapa aksonske mreže u mozgu. Navedeno najpre ima za cilj identifikaciju i praćenje puteva u beloj moždanoj masi, i često se koristi pri planiranju i izvođenju neurohirurških operacija (106).

Funkcionalna MR (fMR) je savremena MR tehnika kojom se identifikuju elokventne zone korteksa mozga, što je od posebnog značaja za preoperativnu pripremu i neurohiruršku intervenciju. fMR je zasnovana na mehanizmu prepoznavanja povećanog nivoa kiseonika u krvi, odnosno lokalnom tkivnom protoku krvi u određenim područjima mozga koji se aktiviraju zadatkom koji se traži da pacijent uradi, poput govora, odgovarajućih pokreta ekstremiteta i slično (eng. *task - based fMRI*) (106).

Magnetno-rezonantna perfuzija mozga se često koristi za vizuelizaciju agresivnosti i malignosti odnosno gradusa glioma (107). MR perfuzija omogućava otkrivanje angiogeneze kod glijalnih tumora. Tumorski krvni sudovi mogu dovesti do hemodinamskih promena u mozgu, što se kod visokogradusnih astrocitoma ogleda najčešće u vidu povećanog relativnog cerebralnog protoka krvi (rCBV) (107). Takođe, može poslužiti u diferencijalno dijagnostičke svrhe. Na primer, visokogradusni gliomi pokazuju relativno povišen rCBV u peritumorskom T2 regionu povišenog intenziteta signala, za razliku od metastaza u mozgu, kao i primarnog CNS limfoma koji pokazuje niži rCBV (106).



Pozitronska emisiona tomografija (PET) nije u širokoj primeni, ali može da ukaže na biološku prirodu procesa. PET predstavlja metodu nuklearne medicine koja se poslednjih nekoliko godina nešto češće koristi, najpre zbog poboljšane dostupnosti radioaktivno obeleženih aminokiselina. Pored F-2-fluoro-2-deoksi-D-glukoze ( $^{18}\text{F}$ -FDG), koriste se i radioaktivno obeležena aminokiselina  $^{11}\text{C}$ -metilmetionin ( $^{11}\text{C}$ -MET), O-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoroetil)-L-tirozin ( $^{18}\text{F}$ -FET) i 3,4-dihidroksi-6-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro-L-fenilalanin ( $^{18}\text{F}$ -FDOPA), ali se istražuju i novi biomarkeri za PET/CT kod glioblastoma (108).

Arteriografija u određenim slučajevima može da bude korisna kako bi se videli odnos tumora i magistralnih krvnih sudova mozga, patološka vaskularizacija ili suženje krvnog suda usled rasta tumora.

## 1.6. Lečenje glioblastoma

Standardno primarno lečenje glioblastoma podrazumeva 3 modaliteta lečenja: hirurško lečenje, zračnu terapiju (radioterapiju) i hemioterapiju. Svaki modalitet od ova 3 načina lečenja ima svoje specifičnosti. U određenim slučajevima, može/mora se izostaviti neki od navedenih modaliteta, a ponekad i sva tri. U tom slučaju, lečenje se sprovodi samo simptomatsko-suportivnom terapijom (eng. *best supportive care*). Na izbor modaliteta lečenja mogu uticati određeni faktori kao što su lokalizacija tumora u mozgu, komorbiditeti, opšte stanje i starosna dob, motivacija i želja pacijenta za lečenjem.

### 1.6.1. Hirurško lečenje glioblastoma

U lečenju difuznih glioma, pa tako i glioblastoma, hirurško lečenje u najvećem broju slučajeva predstavlja neizostavan, odnosno, prvi modalitet lečenja. Hirurško lečenje, pre svega, omogućava patohistološku verifikaciju bolesti i citoredukciju tumora tj. eliminaciju dela ili cele tumorske mase što je najčešće praćeno smanjenjem intenziteta simptoma koji su prouzrokovani tumorskom masom u mozgu (109).

Debata o stepenu neurohirurške resekcije glioblastoma i dalje postoji, pre svega o evaluaciji dokaza o ukupnom preživljavanju ovih pacijenata, postoperativnog morbiditeta i kvalitetu života nakon operativnog lečenja (110).

Pojedine studije su pokazale da je agresivnija hirurška resekcija povezana sa boljim ukupnim preživljavanjem kod pacijenata sa novodijagnostikovanim glioblastomom (111). Međutim, kako se glioblastom može lokalizovati u kritičnim zonama mozga i elokventnim strukturama, kao i infiltrativna sposobnost samog tumora i njegova multifokalnost i muticentričnost, to može direktno i usloviti stepen hirurške resekcije. Smatra se da maksimalnu sigurnu resekciju treba sprovesti ako prednosti same operacije i očekivani ishod nadmašuju rizike same intervencije. Shodno tome, definicija maksimalne sigurne resekcije postaje individualna za svakog pacijenta. Svrha resekcije je da se ukloni što veći deo tumora radi ublažavanja simptoma, uz istovremeno dobijanje adekvatnog i dovoljnog uzorka tumora mozga za patohistološku analizu i potvrdu bolesti (dokazi klase I) (112). Kako se navodi od strane evropskog udruženja za neuroonkologiju, (eng. *European Association of Neuro-Oncology - EANO*) terapijski cilj hirurškog lečenja kod difuznih glioma jeste bezbedno odstranjivanje što većeg dela tumora koristeći mikrohirurške tehnike, ali bez kompromitacije neurološke funkcije. Stepem resekcije glioma je prognostički faktor kod glioma (113). Međutim, u savremenom hirurškom pristupu, sprečavanje novog, trajnog neurološkog deficita ima veći prioritet od stepena resekcije (113).

Karschnia i saradnici su evaluirali pojmove stepena resekcije kod supratentorijalnih glioblastoma (114). Supramaksimalna hirurška resekcija podrazumeva resekciju izvan granica postkontrastnog pojačanja na imidžingu (klasa dokaza III). Kompletna resekcija tumora podrazumeva uklanjanje celog (100%) tumora koji se postkontrastno prebojava na imidžingu (klasa dokaza IIB). Skoro potpuna (eng. *near total*) resekcija tumora podrazumeva uklanjanje jednako ili više od 95% tumora koji se postkontrastno prebojava uz zaostajanje jednako ili manje od 1 cm<sup>3</sup> rezidualnog tumora koji se postkontrastno prebojava (klasa dokaza IV). Subtotalnu resekciju karakteriše uklanjanje jednako ili više od 80% tumora koji se postkontrastno prebojava uz zaostajanje jednako ili manje od 5 cm<sup>3</sup> rezidualnog tumora koji se postkontrastno prebojava na imidžingu. Parcijalna resekcija tumora možemo definisati kao uklanjanje 1-79% tumora koji se postkontrastno prebojava na imidžingu uz zaostajanje više od 5 cm<sup>3</sup> rezidualne tumorske mase koja se postkontrastno prebojava na imidžingu, a najpre zbog smanjenja “*mass*” efekta i pridruženih simptoma (klasa dokaza IV-ekspertska mišljenje). Biopsijom tumora možemo nazvati neurohiruršku procedure kod koje nema redukcije tumorske mase, a uzorak se uzima radi patohistološke verifikacije bolesti (klasa IV-ekspertska mišljenje) (114). Radi evaluacije stepena resekcije, poželjno je uraditi postoperativnu MR do 72 sata nakon operativnog zahvata (114).

Na adekvatan izbor neurohirurške procedure utiču faktori vezani za pacijenta (opšte stanje i *Eastern Cooperative Oncology Group* - ECOG performans status-PS, komorbiditeti) kao i karakteristike samog tumora kao što su lokalizacija, veličina tumora, multifokalnost ili multicentričnost. U pojedinim situacijama, nije moguće uraditi nijednu neurohiruršku intervenciju.

Savremena tehnološka i farmaceutska dostignuća doprinose preciznijem izvođenju maksimalne bezbedne resekcije tumora. Neuronavigacija olakšava identifikaciju lokalizacije tumorske promene u mozgu, a najčešće korišćeni sistemi koriste dvojnju infracrvenu kameru ili elektromagnetni sistem (elektromagnetna navigacija) (115).

U identifikaciji elokventnih i govornih zona mozga koristi se mapiranje korteksa u budnom stanju pacijenta (eng. *awake brain mapping*) uz pomoć elektrokortikografije (116). Intraoperativno može se koristiti i ultrazvuk ili MR. Pojedine studije su ukazale na to da intraoperativnom MR-vođena neurohirurgija može biti efektivnija od konvencionalne neuronavigacije, odnosno može povećati stepen hirurške resekcije, čime se povećava kvalitet života ili povećava ukupno preživljavanje pacijenata sa glioblastomom (klasa dokaza II) (117).

Upotreba 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA) je takođe jedan od načina za bolju vizuelizaciju tumora i njegovog odnosa sa okolnim moždanim parenhimom. Za oko 6 sati od peroralne primene 5-ALA, metabolički produkt ove kiseline (protoporfirin IX) može se detektovati u tumorskom tkivu (118). Time se može napraviti jasnija granica između tumorskog tkiva i okolnog, tumorom nezahvaćenog, moždanog tkiva koje ne pokazuje efekat fluorescencije.

Angiografija sa korišćenjem indocijanin zelenog pomaže u identifikaciji krvnih sudova, čime se smanjuje mogućnost povrede krvnih sudova a samim tim i krvarenja prilikom operacije tumora mozga (119).

Podela hirurških tehnika u lečenju glioblastoma je predstavljena na **slici 8**.



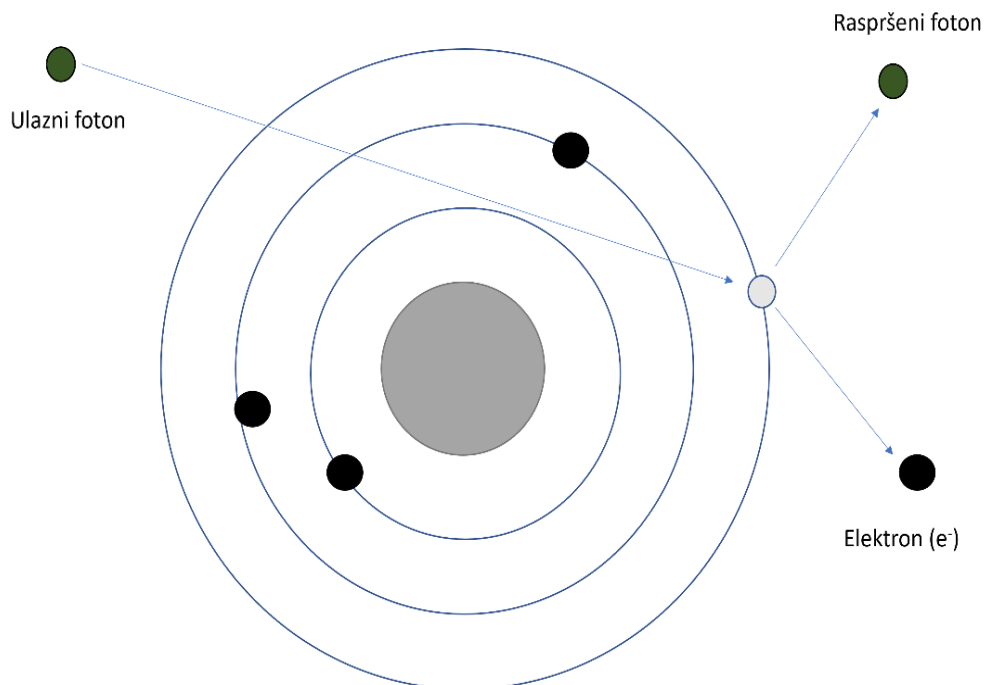
**Slika 8.** Neurohirurško lečenje glioblastoma

## 1.6.2. Radioterapija

### 1.6.2.1. Osnove radioterapije

Radioterapija (RT; zračna terapija) podrazumeva primenu jonizujućeg zračenja u lečenju brojnih malignih i nekih benignih tumora i stanja. Iako je pojam zračenja ostao isti dok je tehnologija napredovala, cilj primene zračne terapije je takođe ostao isti. Preciznije rečeno, cilj zračenja u lečenju bolesti je da isporučiti dovoljno visoku dozu zračenja na metu, a istovremeno sačuvati okolno zdravo tkivo od permanentnog oštećenja (120).

Zračna terapija se sprovodi primenom fotonskog zračenja-Iks ( $x$ ) i gama ( $\gamma$ ) zračenja, korpuskularnog zračenja (elektroni, protoni, neutroni, Pi-mezoni, teški joni). Interakcija fotonskog jonizujućeg zračenja i materije ostvaruje se preko 3 glavna mehanizma: fotoelektrični efekat, Komptonov efekat (koji je najbitniji kod kliničke radioterapije; **slika 9**) i efekat stvaranja parova (121). S druge strane, naelektrisane čestice će izgubiti i predati svoju energiju medijumu (tkivu) preko dva glavna mehanizma: kolizija (eng. *collisional stopping power*) i radijacija (eng. *radiative stopping power*) (121).



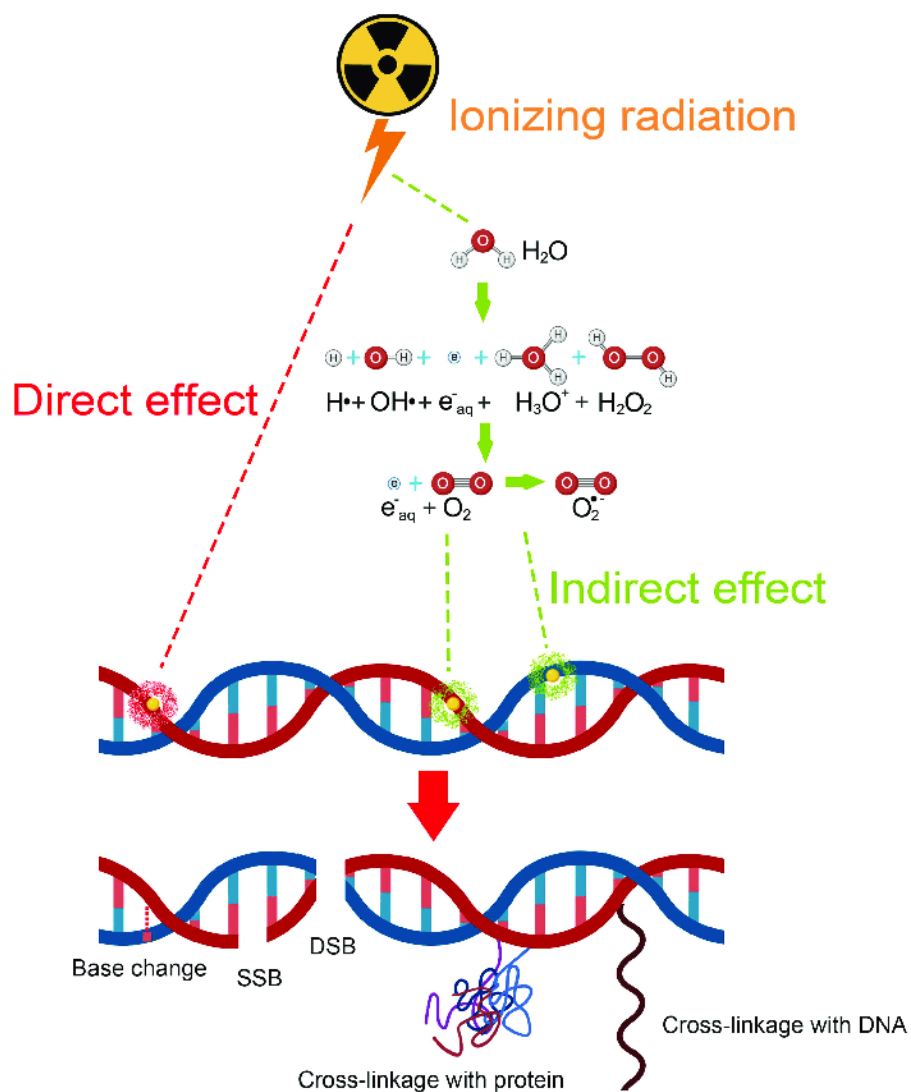
**Slika 9.** Interakcija fotonskog zračenja sa materijom - Komptonov efekat

Najvažnija meta kod primene radioterapije je DNK lanac. Smatra se da je dvostruko oštećenje DNK lanca izazvano zračenjem glavni uzrok smrti ćelije (120).

Zračenje dovodi do različitih ćelijskih odgovora koji uključuju prepoznavanje oštećenja DNK, mobilizaciju proteina za popravak DNK, popravak ili pokušaj popravke oštećenja DNA, pokretanje kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, dok kod nepopravljivog oštećenja dolazi do ćelijske smrti.

Jonizujuće zračenje interreaguje s biološkom materijom na više različitih načina. Zračenje može delovati direktnim ili indirektnim mehanizmima koji će dovesti do smrti tumorskih ćelija (122). Interakcija fotonskog zračenja sa materijom (Komptonov efekat) je predstavljen na **slici 9**. Direktnim mehanizmom oštećenja ćelije podrazumeva se ono oštećenje koje direktnim pogotkom u metu, dovodi do jednolančanih ili dvolančanih prekida DNK, nakon čega dolazi do obustave ćelijske proliferacije i/ili smrti ćelije i apoptoze (**slika 10**) (122).

S druge strane, indirektni mehanizam podrazumeva da visokoenergetski fotoni u interakciji sa materijom proizvode elektrone koji vrše direktnu jonizaciju atoma i pri tome dovode do prekida hemijskih veza. Nakon toga dolazi do stvaranja slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta kiseonika, što deluje na biološki sistem, odnosno intracelularni milje, dovodeći do ćelijskog stresa, oštećenja biomolekula i promene u signalnim putevima ćelije (122). Ovo je ujedno i najčešći mehanizam preko koga standardno fotonsko zračenje deluje na tumorske ćelije.

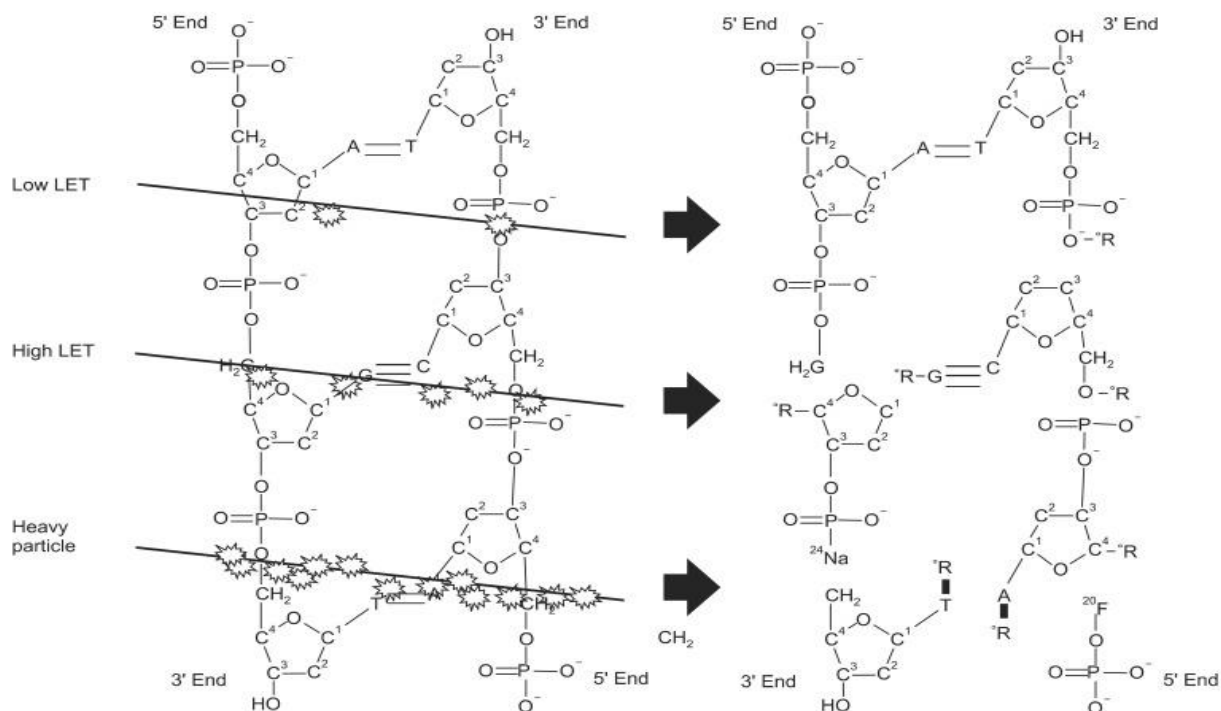


**Slika 10.** Shematski prikaz mehanizma jonizujućeg zračenja na ćelije

*Izvor: Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. Int J Nanomedicine. 2021;16:1083–1102. (122)*

Sa radiobiološke strane, ista data doza iz različitih vrsta zračenja može proizvesti različite biološke efekte, zbog čega se efekat datog zračenja upoređuje sa efektom X zračenja u smislu njegove relativne biološke efektivnosti (RBE) (121).

Kod X- ili  $\gamma$ - zračenja niskog linearnog transfera energije (LET), većina slobodnih radikala, kao što su hidroksili, superoksid i vodonik peroksid, nastaju zbog jonizacije vode i uglavnom dovode do indirektnog oštećenja mete. S druge strane, kod zračenja visokog LET, kao kada su u pitanju protoni, najpre dolazi do direktne kolizije (sudara) sa metom, odnosno do direktnog oštećenja DNK (123).



**Slika 11.** Interakcije niskog LET, visokog LET i teških čestica sa DNK. Zračenje niskog LET stvara slobodne radikale koji dovode do jednolančanog prekida DNK. Zračenje visokog LET uzrokuje više lezija koji dovode do dvolančanog prekida DNK. Tokom interakcije sa teškim česticama, fragmentacijom elemenata atoma dolazi do nastanka izotopa

Izvor: Park SH, Kang JO. *Basics of particle therapy I: physics. Radiat Oncol J.* 2011;29(3):135. (123)

Postoje različite konvencionalne metode zračenja. Sve metode omogućavaju preciznu dozu zračenja usmerenu ka tumoru i ograničavaju količinu zračenja u blizini zdravog tkiva. Savremena tehnologija i savremene mašine omogućavaju bolju konformalnost i bolju poštedu okolnog tkiva. Zračna terapija se generiše preko linearnih akceleratora i radioaktivnih izvora, a potom usmerava prema meti (npr. tumor). Zračna terapija se može sprovoditi kao spoljašnja ili teleradioterapija (transkutana RT; eng. *External Beam Radiation Therapy - EBRT*) ili brahiterapija (124). Transkutana radioterapija je najčešće korišćena forma radioterapije. Prema energiji jonizujućeg zračenja, transkutana radioterapija može biti superficijalna, ortovoltazna i megavoltazna radioterapija, a izvor zračenja nalazi se izvan tela bolesnika, odnosno na određenoj udaljenosti od tela bolesnika. Kod brahiterapije, koja predstavlja invazivnu formu zračenja, radioaktivni izvor se dovodi u kontakt sa tumorom ili u njegovu blizinu (124).

Frakcionisanje zračenja podrazumeva raspodelu ukupne doze u većem ili manjem broju frakcija, u precizno određenim vremenskim intervalima. Standardno ili konvencionalno (protrahovano) frakcionisanje podrazumeva podelu ukupne doze zračenja na određeni broj frakcija koje se sprovede radnim danima (ponedeljak-petak), a doza po jednoj frakciji iznosi standardno 1,8 - 2 Gy (125,126). Shodno indikacijama, zračenje se može sprovести po hipofrakcionisanom režimu zračenja, hiperfrakcionisanom i akcelerisanom režimu zračenja (126). Hipofrakcionisani režim zračenja podrazumeva primenu nešto veće dnevne doze zračenja, uz smanjeni ukupni broj frakcija zračenja (126). Hiperfrakcionisani režim zračenja zasniva se najpre na primeni većeg broja frakcija, pri čemu je dnevna doza po frakciji nešto niža od doze kod standardnog frakcionisanja, dok akcelerisani režim zračenja podrazumeva skraćivanje trajanja celokupnog zračnog tretmana (125), tako što se veći broj frakcija u određenom vremenskom intervalu primenjuje u jednom danu (126). Na izbor frakcionisanja zračenja

utiču mnogi faktori, od kojih su najznačajniji oni koji su vezani za pacijenta, uključujući osobine samog tumora i okolnog zdravog tkiva. Oporavak subćelijskih povreda (reparacija), regeneracija (repopulacija), preraspodela ćelijskog ciklusa (redistribucija) i reoksigenacija su činioci koji doprinose razlikama u odgovoru normalnog tkiva i tumora na različite režime frakcionisanja (125).

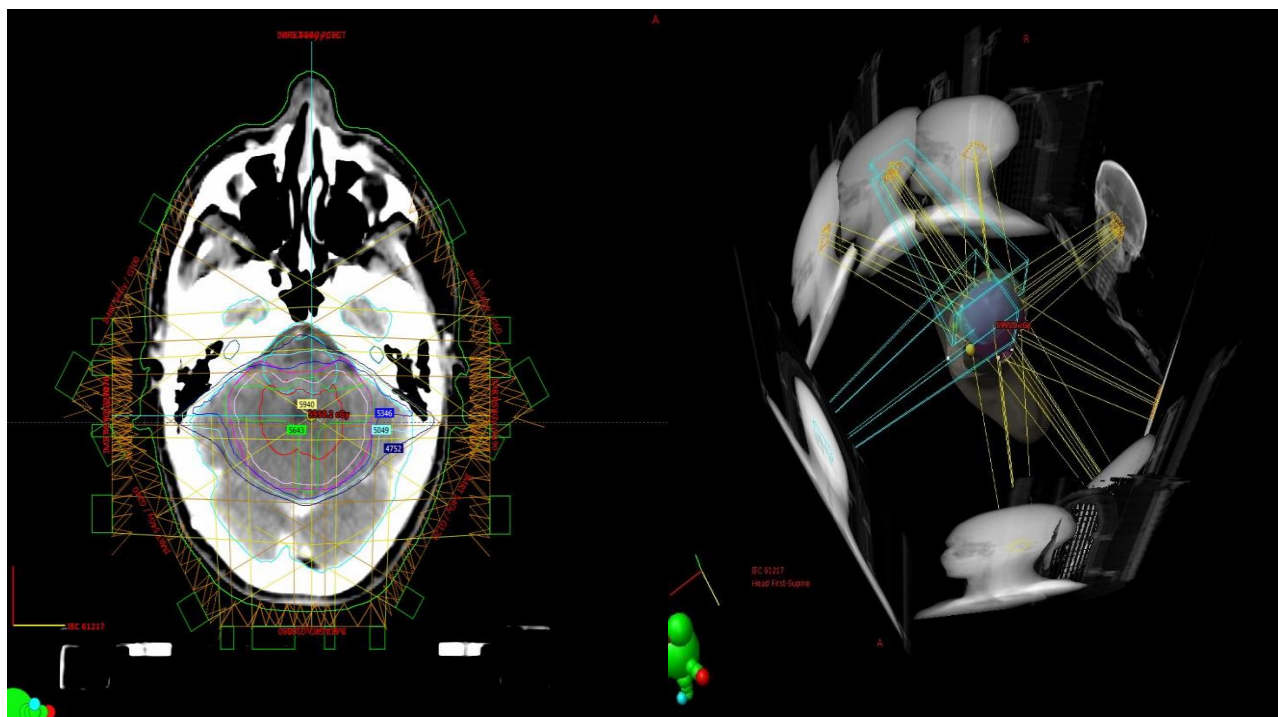
Radioterapija se može sprovesti pre ili posle operativnog lečenja (adjuvantna/postoperativna RT) (127). U određenim indikacijama može se sprovesti i intraoperativna RT (128) ili profilaktička RT. Takođe, radioterapija se može sprovesti pre ili nakon hemoterapije ili istovremeno (konkomitantno) (129) sa hemioterapijom. U pojedinim slučajevima, radioterapija se može sprovesti kao jedini modalitet lečenja, i to kao radikalna ili paliјativna RT.

Zračna terapija se generiše i sprovodi preko radioterapijskih mašina za spoljašnju (transkutanu) zračnu terapiju (ortovoltazni aparati, izotopski aparati i linearni akceleratori) i preko radioizotopa koji se nalazi u aparatima za brahiterapiju. Za transkutanu zračnu terapiju, sada se najčešće koriste linearni akceleratori.

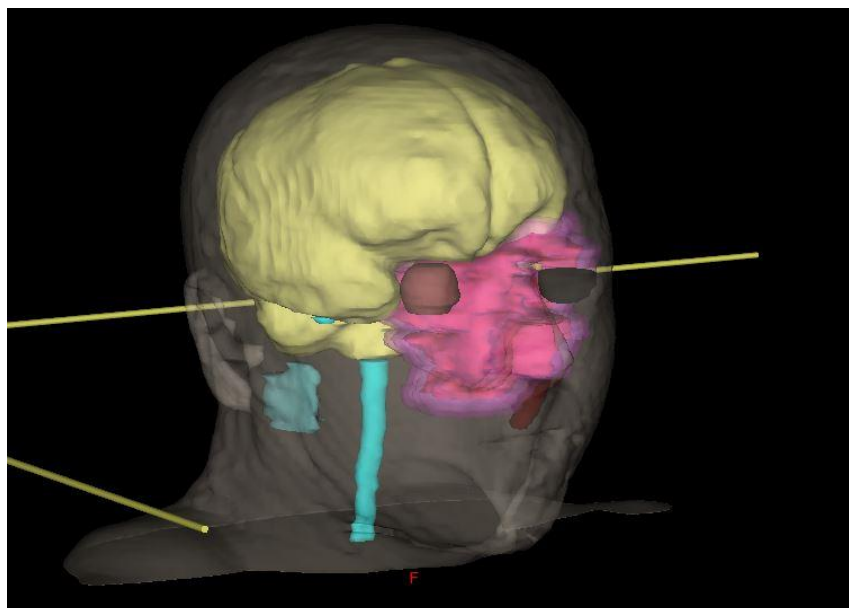
### Savremene tehnike planiranja zračne terapije

Trodimenzionalna (3 - D) konformalna zračna terapija (3D - RT, eng. *3D - CRT*) predstavlja tehniku zračne terapije koja se bazira na volumnom planiranju, odnosno tehniku kod koje se planiranje i isporuka zračne terapije na ciljni volumen bazira na 3D slikama (imidžingu), najčešće dobijenim na CT za planiranje RT (130). Samim tim, distribucija doze zračenja je prilagođena nepravilnom obliku ciljnog volumena. Kod ove tehnike zračne terapije, najčešće se koristi više zračnih polja radi bolje konformalnosti i zaštite okolnog nezahvaćenog (zdravog) tkiva. Nakon delineacije ciljnih volumena, i dobijanja 3 - D slike ciljnog volumena, pravi se aranžman zračnih polja, a kompjuterski sistem izračunava optimalnu izodoznu distribuciju, uz zaštitu okolnog tkiva (124). Ciljni volumeni su definisani prema *International Commission on Radiation Units and Measurements* 50 i 62 (ICRU 50; ICRU 62) (131,132)

Intenzitetom zračenja modulirana radioterapija (IMRT) predstavlja naprednu formu 3 - D konformalne zračne terapije. Ova tehnika podrazumeva primenu više zračnih snopova tj. polja (segmentna polja) usmerenih iz više uglova (133). Moduliranje intenziteta zračenja za svako od ovih segmentnih polja dovodi do različite raspodele doze unutar svakog segmentnog polja, ali se ukupna željena distribucija doze dobija superponiranjem tih polja (kontrolisana nehomogenost doze). Da bi se ova tehnika sprovela u praksi, linearni akceleratori koriste tzv. multilamelarni kolimator (eng. *multileaf collimator* - MLC). Ova tehnika omogućava bolju konformalnost i bolju zaštitu okolnih tkiva i organa koji imaju svoj prag radiotolerancije, a samim tim i smanjenje neželjenih efekata (134). Međutim, IMRT povećava volumen normalnog tkiva izloženog niskim dozama zračenja (veća integralna doza), ali može smanjiti ukupnu dozu na okolnim kritičnim strukturama i organima (133). IMRT se može sprovesti kao „*step-and-shoot*“ IMRT tehnika i kao dinamička IMRT. Ciljni volumeni su definisani i planirani prema ICRU 50 i 62, kao i prema preporukama *International Commission on Radiation Units and Measurements* 83 (ICRU 83) (135). Prikaz planiranja IMRT tehnikom prikazan je na **slikama 12 i 13**.



**Slika 12.** Aranžman zračnih polja kod IMRT tehnike planiranja RT (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)



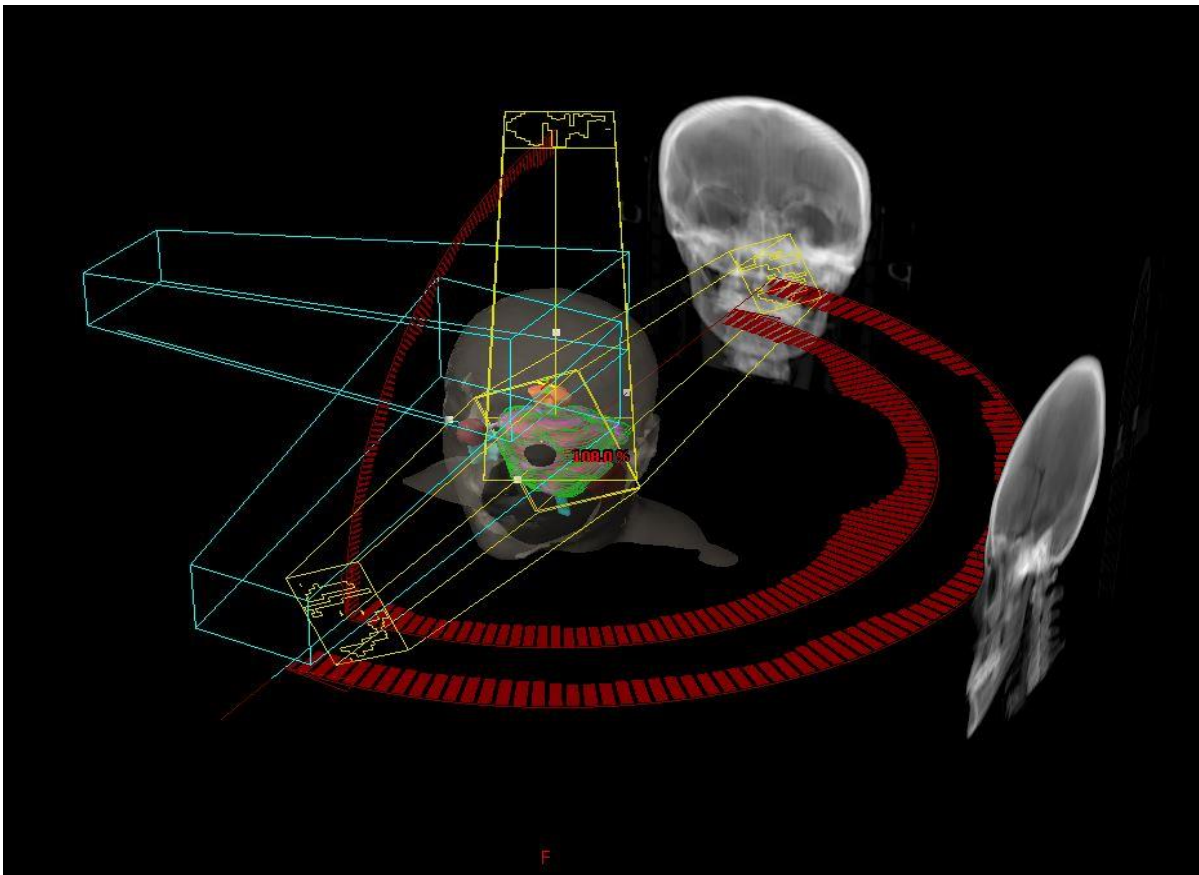
**Slika 13.** Prikaz virtuelnog pacijenta nakon delineacije ciljnih volumena i organa pod rizikom (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

Intenzitetom zračenja modulirana lučna terapija (eng. *intensity modulated arc therapy* - IMAT) predstavlja naprednu tehniku IMRT, čiji je cilj da pruži visoku konformalnost zračne terapije pomoću koje se doza doprema preko jednog ili više lukova (eng. *arc*) tokom rotacije gentrija (136). Prednosti dinamičke IMAT u odnosu na fiksnu IMRT jesu što rotaciona priroda isporuke doze kod IMAT pruža fleksibilnost u samoj raspodeli doze, što se praktično ogleda u dozimetrijskoj prednosti IMAT. Druga



prednost je i visoka efektivnost isporuke doze (136). Postoje 2 glavna načina za izvođenje IMAT: volumetrijski modulirana lučna terapija (*volumetric modulated arc therapy* - VMAT) i tomoterapija.

**Volumetrijski modulirana lučna terapija** (*Volumetric Modulated Arc Therapy* - VMAT) predstavlja naprednu tehniku IMAT, odnosno IMRT. VMAT tehniku karakteriše pomeranje lifova MLC promenljivom brzinom, rotacionim pomeranjem gentryja promenljivom brzinom i varijacijom brzine doze (eng. *dose rate*) i rotacijom kolimatora. Izodozna pokrivenost ciljnih volumena je slična i kod klasičnih IMRT planova i VMAT planova. U pojedinim studijama je navedeno da je bolja konformalnost i homogenizacija doze dobijena VMAT tehnikom (137), dok je u drugim studijama, IMRT tehnika pokazala nešto bolju homogenost doze (138). Međutim, ukupno trajanje tretmana je kraće kao i manje isporučeneh monitorskih jedinica (*MU*) kod VMAT tehnike, (139). Prikaz VMAT tehnike planiranja prikazan je na **slici 14**.



**Slika 14.** Prikaz polja kod VMAT (*RapidArc*) tehnike (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

**Tomoterapija** predstavlja metodu lučne zračne terapije. Aparat za tomoterapiju se sastoji od megavoltažnog CT (skenera) i linearnog akceleratora (140). Tomoterapija se može podeliti na aksijalnu (serijsku) tomoterapiju kod koje se doza isporučuje slajs po slajs (eng. *slice therapy*) ili spiralnu tomoterapiju (eng. *helical tomotherapy*) kod koje akcelerator isporučuje dozu dok spiralno rotira oko pacijenta (slično kao kod spiralnog CT skeniranja pacijenta) (140). Odnosno, pacijent se pomera kroz aparat, dok se izvor zračenja rotira oko pacijenta u slajsevima (aksijalna tomoterapija) ili spiralno (spiralna tomoterapija).

ICRU 50 (131) (definiše 5 ciljnih volumena od interesa tokom planiranja zračne terapije:

- Volumen tumora (eng. *gross tumor volume* - GTV) je volumen koji predstavlja jasno vidljiv ili opipljiv tumor. GTV se može identifikovati i definisati na imidžingu (npr. CT, MR itd.);
- Klinički volumen mete (eng. *clinical target volume* - CTV) predstavlja volumen koji sadrži GTV i suspektu mikroskopsku bolest. CTV je volumen koji mora dobiti propisanu dozu kako bi se efektivno lečio tumor, odnosno pacijent.
- Planirani ciljani volumen (eng. *planning target volume* - PTV) je volumen koji u sebi sadrži GTV i CTV i koji se delineiš zbog pokrivanja mogućih odstupanja zbog geometrije pacijenta i pokreta organa i *set-up* grešaka.
- Tretirani volumen (eng. *treated volume* - TV) je volumen koji prima propisanu dozu i uslovljen je geometrijom pacijenta na osnovu koje je planiran PTV i njegova izodозна distribucija. Međutim, PTV i TV nisu sinonimi, a idealan plan je kada je odnos TV/PTV = 1.0.
- Ozračeni volumen (eng. *irradiated volume* - IV) podrazumeva volumen tkiva koji prima značajnu dozu, odnosno dozu koja bi mogla dovesti do određenih neželjenih efekata ili bolesti.

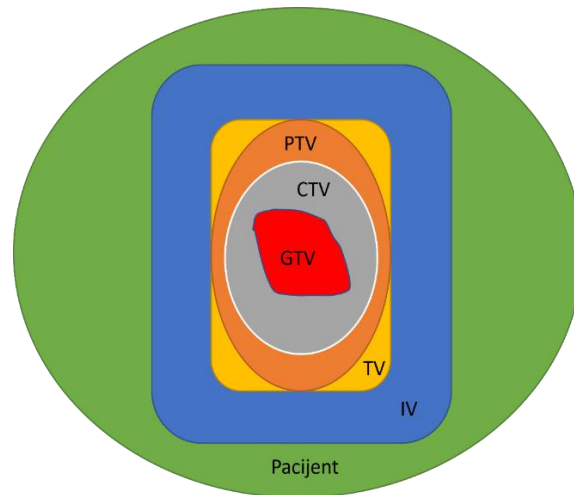
Kako u ICRU 50 nisu definisani volumeni zdravih, tumorom nezahvaćenih organa i tkiva, ICRU 62 (132) zadržava pojmove GTV, CTV, PTV, TV i IV, ali definiše i nove pojmove:

- Organi pod rizikom („organi od rizika“) (eng. *organs at risk* - OAR) je svaka struktura, organ ili tkivo u neposrednoj blizini ciljnih volumena obuhvaćenim zračenjem kod kojih postoji izvestan rizik od oštećenja i neželjenih efekata izazvanih zračenjem.



**Slika 15.** Prikaz pojedinih organa pod rizikom kod planiranja tumora mozga: narandžastom bojom delineisana optička raskrsnica, oker bojom desni optički živac, plavom bojom levi optički živac, crnom bojom desna očna jabučica, zelenom bojom leva očna jabučica, mozak plavom „cyan“ bojom (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

- Planiranje organa u volumenu rizika (eng. *planning organ at risk volume* - PRV) predstavljaju proširenje organa pod rizikom zbog mogućih pokreta dodavanjem odgovarajuće margine.
- Unutrašnji ciljni volumen (eng. *internal target volume* - ITV) predstavlja volumen koji je zapravo proširenje volumena CTV i koji uzima u obzir pokrete CTV, kao što su disajni pokreti ili probavna peristaltika i pokreti.



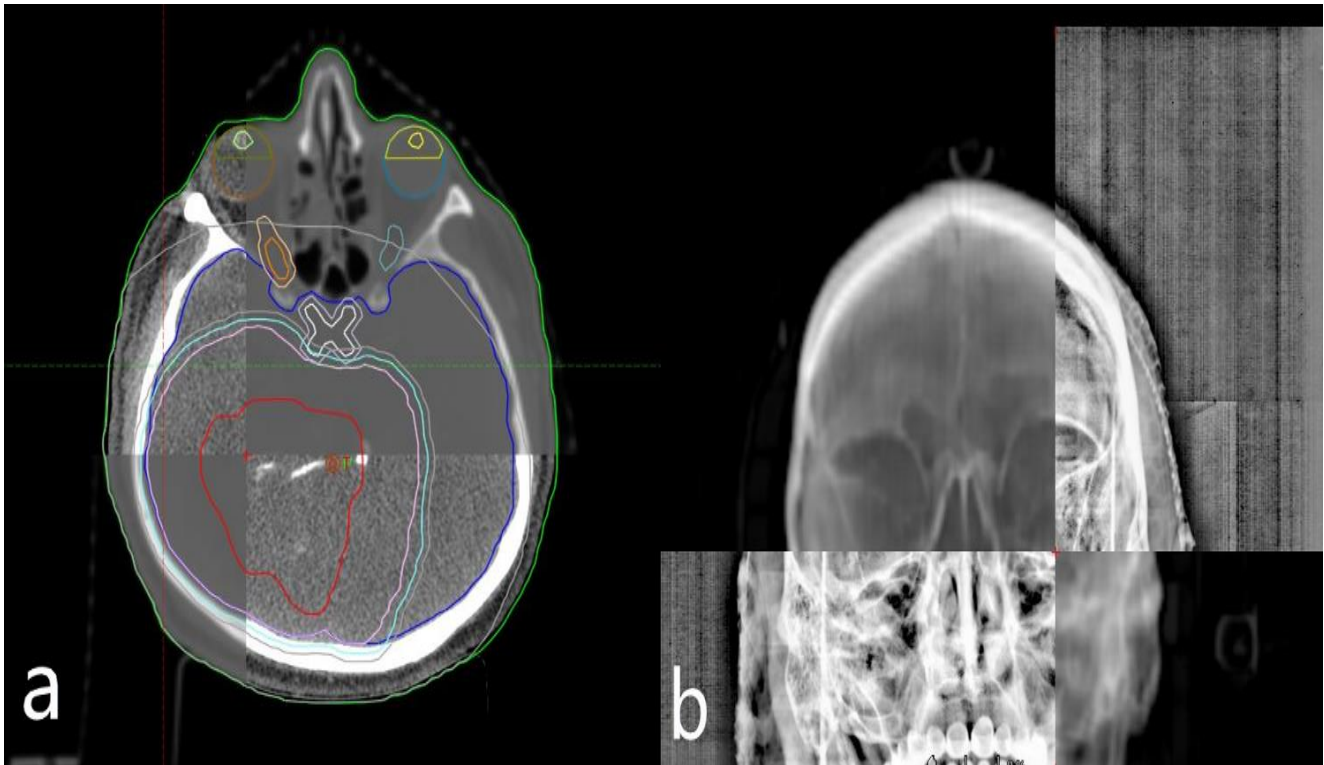
**Slika 16.** Ciljni volumeni definisani prema ICRU 50

Stereotaksičnu radioterapiju (SRT) predstavljaju kompleksne mašine i tehnike preko kojih se planira zračna terapija i isporučuju visoke doze zračenja na ciljni volumen s vrlo uskim marginama, čime se omogućava poštediti okolnog zdravog tkiva. Stereotaksična radioterapija tela (SBRT) bazira se na primeni precizno usmerenog jonizujućeg zračenja na ekstrakranijalne (141) i intrakranijalne lezije (142), dok se stereotaksična radiohirurgija (SRS) odnosi na sprovođenje visoke doze jonizujućeg zračenja u jednoj frakciji na intrakranijalnu leziju/lezije (141). Stereotaksična radioterapija se može izvesti na savremenim aparatima koji zadovoljavaju sve tehnološke predušlove (imobilizacija, imidžing itd.). Najčešće su u pitanju modifikovani linearni akceleratori, Cyber nož, X-nož, Gama nož, aparat za tomoterapiju (141). Indikacije za stereotaksičnu radioterapiju su jasno definisane i treba napomenuti da kod tumora koji imaju infiltrativni rast (poput visokogradusnih glioma), stereotaksična zračna terapija (npr. SRS) nema prioritet u odnosu na klasičnu adjuvantnu standardnu transkutane radioterapiju (143).

Sve savremene tehnike zračenja prati pojam „slikom vođena radioterapija“ (eng. *image guided radiation therapy* - IGRT). IGRT obuhvata sve metode imobilizacije i imidžinga (ultrazvuk - UZ, radiografija, CT, MR) pomoću kojih se proverava i osigurava preciznost pozicioniranja pacijenata pre same frakcije zračenja (144).

Aranžman zračnih polja određuje medicinski fizičar, na taj način da se propisanom dozom pokrije ciljni volumen, dok istovremeno prati dozna ograničenja za organe pod rizikom. Analiza plana zračne terapije se vrši u sistemu za planiranje RT, grafički tj. tabelarno ili kvantifikovano preko histograma volumne doze (DVH). DVH prikazuje simuliranu doznu distribuciju unutar volumena od interesa, kao i matematičko-statički proračun distribucije doze ciljnih volumena i organa pod rizikom (145). Vršiti se procena izodoznih površina tj. distribucija doze ciljnog volumena, kao i doprinos doze na organe pod rizikom. DVH se može koristiti kao ulazni podatak za procenu verovatnoće postizanja lokalne tumorske kontrole i verovatnoće pojave terapijskih komplikacija (145). Ograničenja za organe pod rizikom su definisani prema *Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic* (QUANTEC) (146), ali

postoje i preporuke različitih studija. Ukoliko plan zadovoljava sve propisane kriterijume, vrši se verifikacija plana, nakon čega se može otpočeti zračna terapija. Shodno protokolu i prema potrebi, minimum jednom, a najčešće više puta nedeljno vrši se provera geometrije zračenja sa referentnom geometrijom pacijenta i to poređenjem digitalno rekonstruisanih radiografija (DRR) sa kilovoltaznim ili megavoltaznim portal snimcima koji se sprovode pre frakcije zračenja. Takođe, u istom cilju sprovodi se i *cone beam* CT pre zračne frakcije (slika 17).



**Slika 17.** a) *Cone beam* CT - provera pozicije pre frakcije RT; b) portal snimak - provera pozicije pacijenta pre frakcije RT (kilovoltazni imidžing i DRR) (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

### 1.6.2.2. Radioterapija glioblastoma

Zbog infiltrativne prirode glioblastoma (mikroskopske ćelije u okolini makroskopski vidljivog tumora), lokalizacije tumora i rizika od postoperativnog morbiditeta, smatra se da kompletnu resekciju tumora i eradicaciju svih tumorskih ćelija nije moguće postići, te je ukazana potreba i za primenom lokalne radioterapije. Radioterapija kod pacijenata sa glioblastomom se vremenom menjala. Istorijski, ranije se radioterapija glioblastoma primenjivala primenom opozitnih polja, odnosno kao radioterapija celog mozga (eng. *whole brain radiation therapy* - *WBRT*) (147). Neki od razloga za primenu zračne terapije celog mozga bili su i podaci da glioblastom ima infiltrativni rast i da se radiološkim pregledima ne može utvrditi jasna mikroskopska bolest (proširenost) (148,149), kao i da često ima multicentričan rast. Hochberg i saradnici su u svojoj studiji objavljenoj 1980. godine došli do zaključka da se kod većine ispitivanih pacijenata, postmortem CT snimcima i autopsijskim pregledom, tumorske ćelije mogu

definisati unutar 2 cm od tumora (150). Takođe, jedan od zaključaka je bio da je multicentričnost zapažena kod 4% nelečenih i kod 6% pacijenata lečenih radioterapijom ili radio-hemioterapijom. Pojedine studije su pokazale da se ćelije tumora mogu naći u moždanom tkivu i više od 4 cm od tumorske mase (151). Showalter i saradnici zaključili su da se prosečno vreme preživljavanja i vreme do progresije ne razlikuju značajno između grupe kod kojih je primenjena radioterapija celog mozga i grupe pacijenata kod kojih je primenjena fokalna 3 - D konformalna radioterapija, a progresija bolesti je bila lokalna kod svih posmatranih pacijenata (152). Takođe, primena zračne terapije celog mozga nosi veći rizik od radionekroze i toksičnosti u vidu kognitivne disfunkcije (153). Uvođenje kompjuterizovane tomografije i magnetne rezonancije u planiranje radioterapije doprinelo je preciznijoj delineaciji ciljnih volumena (154), dok je tehnološki napredak radioterapijskih mašina i radioterapijskog okruženja omogućio planiranje i izvođenje savremene radioterapije. Uvođenje 3 - D konformalne radioterapije smanjilo je stopu toksičnosti kod pacijenata sa gliomima (155).

Definisanje optimalne radioterapijske doze za lečenje glioblastoma pretrpelo je značajne izmene tokom prethodnih decenija. Naime, pojedine studije su pokazale statistički značajno bolje preživljavanje kod pacijenata kod kojih je primenjena doza iznad 50 Gy (156). S druge strane, nije bilo razlike u toksičnosti između pacijenata kod kojih je data doza od 50 i 60 Gy (156). Eskalacija doze iznad 60 Gy nije dala željene rezultate. Rezultatima obdukcije pacijenata, utvrđeno je da postoji veliki rizik od radijacione nekroze kada se primeni doza veća od 60 Gy (149).

Radioterapija se kod glioblastoma najčešće primenjuje kao adjuvantna, odnosno postoperativna radioterapija, a ređe i kao radikalna radioterapija. U određenim indikacijama, u zavisnosti od vremena proteklog od zračenja, može se sprovesti i reiradijacija.

Standardno savremeno lečenje glioblastoma danas uključuje hiruško lečenje, radioterapiju i hemioterapiju (157). Stupp i saradnici objavili su rezultate studije 2005. godine i pokazali da je primena temozolomida istovremeno (konkomitantno) sa radioterapijom, a potom i adjuvantnom primenom temozolomida, značajno uticala na bolje ukupno preživljavanja ovih pacijenata (127). Nakon toga, većina svetskih protokola uvodi ovaj protokol (Stupov protokol) u standardno lečenje glioblastoma.

## **Planiranje radioterapije glioblastoma**

Za optimalnu delineaciju ciljnih volumena i ozračivanje glioblastoma bile su potrebne jasne smernice za definisanje biološkog ponašanja bolesti, odnosno puteva širenja i obrasca relapsa bolesti. Kako je prethodno navedeno u tekstu, 1980. godine dobijeni su podaci da se tumorske ćelije mogu naći unutar 2 cm od primarnog ishodišta tumora (150).

U studiji Lee i saradnika koja je uključila 36 pacijenata sa glioblastomom, PTV je formiran dodavanjem izotropnih margina od 2-3 cm u odnosu na GTV, sa eskalacijom doze od 70-80 Gy, a zračna terapija je planirana 3 - D konformalnom zračnom terapijom (158). Istraživači su zaključili da je relaps bolesti centralnog tipa, odnosno da se rekurentni tumor nalazi u regiji visokih doza (158). Chen i saradnici su takođe izvestili da uprkos eskalaciji doze od 90 Gy, relaps bolesti ostaje lokalni. Zračna terapija je planirana 3 - D konformalnom tehnikom, a formirana su tri PTV, i to dodavanjem margine od 0,5 cm za PTV1, 1,5 cm za PTV2 i 2,5 cm za PTV3. Centralni relaps zabeležen je kod je 78% pacijenata, 13% pacijenata je imalo relaps u zračnom polju, dok je 9% pacijenata imalo marginalni relaps, što upućuje na to da bliske margine pri delineaciji kod visoko konformalnih tehnika ne povećavaju rizik od marginalnog ili udaljenog relapsa bolesti (159).



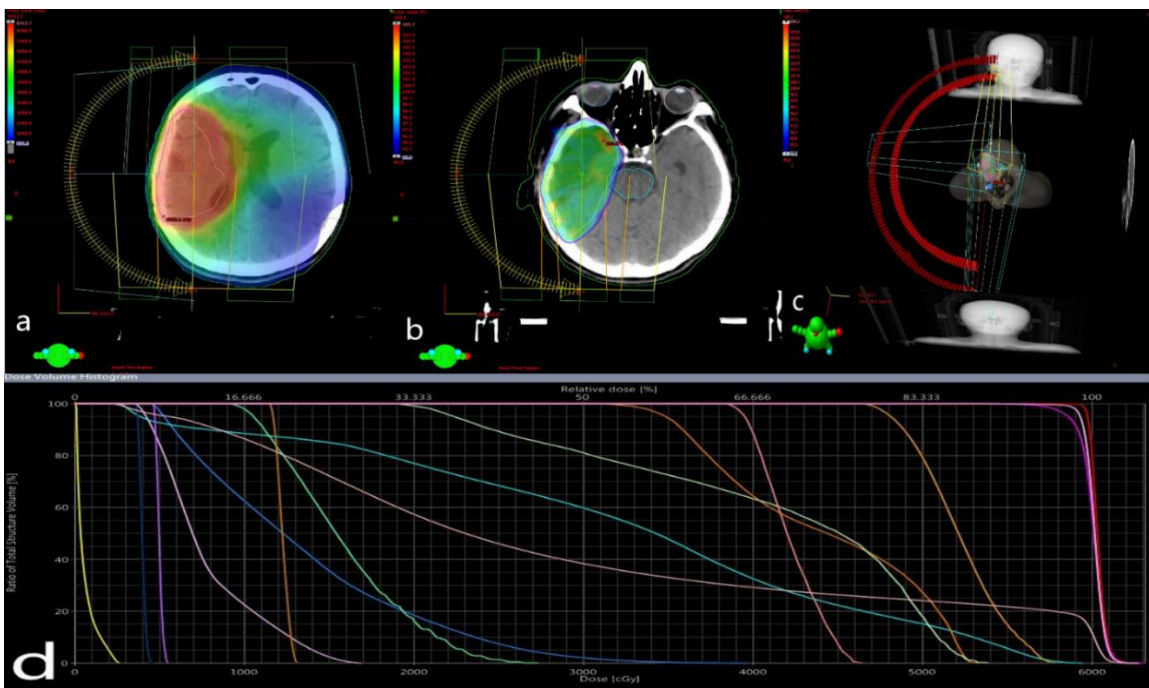
Za planiranje zračne terapije glioblastoma postoji nekoliko prihvaćenih vodiča. Prema Evropskoj organizaciji za istraživanje i lečenje raka (eng. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* - EORTC) preporučuje se da se zračna terapija sprovodi u jednoj fazi. Niyazi i saradnici su 2016. godine analizirali dostupne vodiče o radioterapijskom planiranju (delineaciji) glioblastoma i objavili vodič „ESTRO ACROP“ za delineaciju ciljnih volumena kod glioblastoma što će biti predstavljeno u narednom delu teksta (*European Society for Radiotherapy and Oncology-ESTRO; Advisory Committee for Radiation Oncology Practice* - ACROP; ESTRO-ACROP) (160).

ACROP odbor za vodiče preporučuje da se za imobilizaciju koristi termoplastična imobilizaciona maska, a debljina slajseva tokom CT za planiranje RT bi trebalo biti 1-3 mm. Preporučuje se spajanje (fuzionisanje) postoperativne MR sa CT za planiranje RT, a MR treba biti stara do 2 nedelje pre planiranja RT. GTV se delineiše tako da obuhvata postoperativni kavum uz rezidualni tumor (ukoliko postoji) koji pokazuje postkontrastno pojačanje signala na T1W MR. CTV bi trebalo konstruisati dodavanjem izotropne margine od 20 mm na GTV, dok se PTV formira dodavanjem margine od 3-5 mm. CTV bi trebalo smanjiti prema anatomskim barijerama kao što su kosti lobanje, optički put, optička hijazma i moždano stablo (0 mm), zatim prema šatoru malog mozga, srpastoj pregradi velikog mozga (falks) i moždanim komorama (5 mm). Uključivanje regije nepravilnosti uočene na T2W i FLAIR sekvencama MR je opciono. Ukoliko je u pitanju sekundarni glioblastom, zone koje nemaju postkontrastno pojačanje mogu biti deo tumora, zbog čega je potrebno uzeti u obzir zone povišenog intenziteta signala u T2W. U zavisnosti od kompleksnosti ciljnog volumena, zračna terapija se može planirati 3 - D konformalnom zračnom terapijom, IMRT ili VMAT tehnikom. Standardna doza koja se preporučuje je 60 Gy, podeljena u 30 frakcija (2 Gy/dan), dok se za starije pacijente (preko 70 godina) ili one sa lošijim opštim stanjem i PS (Karnofski PS < 70%) preporučuje hipofrakcionisani režim zračne terapije (40 Gy /15 frakcija ili 34 Gy/10 frakcija) (160).

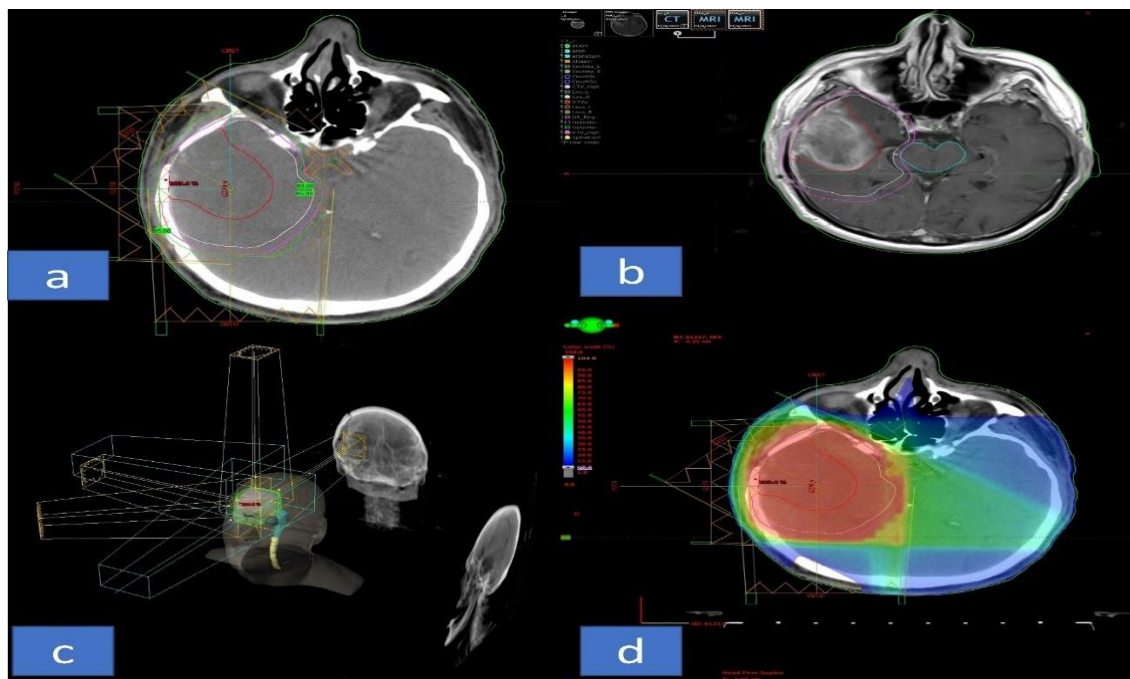
Organi pod rizikom (OAR) koje treba delineisati su optički živci, optička hijazma, oči, očna sočiva, moždano stablo i mozak. Potencijalni (relativni) organi pod rizikom su puž (kohlea) smešten u unutrašnjem uvu, suzne žlezde, hipofiza i hipotalamus. Doza se propisuje prema ICRU 50 i ICRU 62 vodičima, čime se osigurava da 95% izodozna površina propisane doze pokriva minimum 95% ciljnog volumena. Subdoziranje je moguće u odnosu na bliskost sa rizičnim strukturama (OAR) (160). Analiza plana zračne terapije odnosno izodoznu distribuciju se vrši u sistemu za planiranje RT. Takođe analizira se dozni doprinos na organe pod rizikom koristeći QUANTEC preporuke i preporuke različitih studija. Prema QUANTEC, pojedina dozna ograničenja za organe pod rizikom su: a) moždano stablo, cela struktura,  $D_{max} < 54$  Gy (*endpoint*: trajna kranijalna neuropatija ili nekroza, <5%),  $D1-10cc \leq 59$  Gy (*endpoint*: trajna kranijalna neuropatija ili nekroza, < 5%), b) optička hijazma, cela struktura,  $D_{max} \leq 55$  Gy (*endpoint*: optička neuropatija, < 3%), c) optički živci, cela struktura,  $D_{max} \leq 55$  Gy (*endpoint*: optička neuropatija, < 3%), d) kohlea, cela struktura, srednja doza < 45 Gy (*endpoint*: senzorneuralni gubitak sluha, < 30%), e) mozak,  $D_{max} < 60$  Gy (simptomatska nekroza, < 3%) (146). Za makulu oka, istraživači preporučuju da očna mrlja (makula) primi  $D_{max} < 45$  Gy (161), dok za suzne žlezde  $D_{max}$  iznosi < 40 Gy (162), a hipofizu  $D_{max} < 50$  Gy (163) i očno sočivo  $D_{max} < 10$  Gy (idealno manje od 6 Gy) (162). Prema RTOG 0933 studiji, dozna ograničenja za hipokampus su  $D100 \leq 9$  Gy, a  $D_{max} < 16$  Gy (164).

ESTRO-ACROP vodič predlaže planiranje zračne terapije 3D - RT, IMRT ili VMAT tehnikom, u zavisnosti od specifičnosti lokalizacije tumora u mozgu i blizine kritičnih struktura (160).

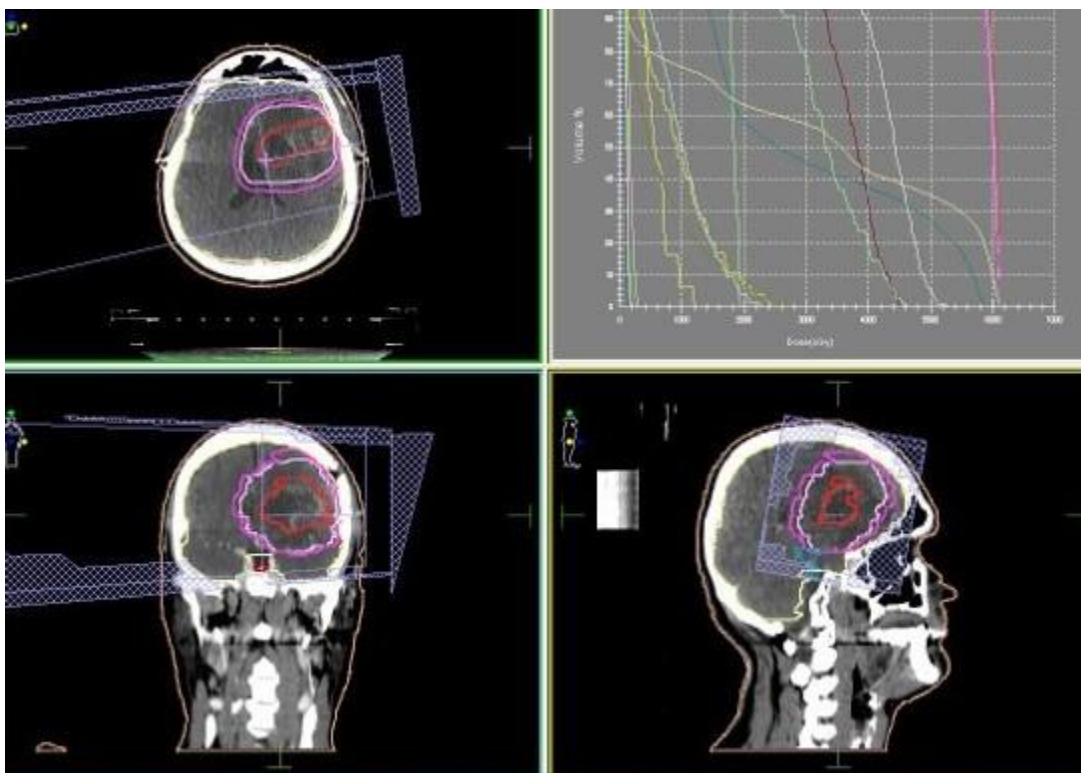
Prikaz planiranja IMRT I VMAT tehnikom zračne terapije sa izodoznim distribucijama prikazani su na **slukama 18 i 19**. Prikaz planiranja 3D - RT prikazan je na **sluki 20**.



**Slika 18.** a) prikaz izodozne distribucije ciljnih volumena VMAT tehnikom kod pacijentkinje sa glioblastomom; b) prikaz ciljnog volumena koji je pokriven 95% izodozom; c) prikaz zračnih polja VMAT (*RapidArc*) tehnikom; d) histogram volumne doze (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)



**Slika 19.** Delineacija ciljnih volumena multicentričnog glioblastoma u koregistraciji CT za planiranja zračne terapije i MR endokranijuma i planiranje zračne terapije IMRT tehnikom: a) ciljni volumeni (GTV, CTV, PTV) na CT za planiranje i aranžman polja; b) ciljni volumeni (GTV, CTV, PTV) na koregistrovanom MR za planiranje zračne terapije, c) prikaz planiranja IMRT - zračna polja „beam eye view“; e) izodozna distribucija (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)



**Slika 20.** Prikaz ciljnih volumena i planiranja 3D-RT kod pacijenta sa glioblastomom (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

*Radiotherapy and Oncology Group* (RTOG) (RTOG 0525 i RTOG 0825 studije) preporučuje sprovođenje zračne terapije u 2 faze. U prvoj fazi se propisuje doza od 46 Gy u 23 frakcije, a potom se sprovodi povećanje doze na smanjeni volumen (*boost*) sa 10 Gy u 5 frakcija (165). Kako je navedeno u tabeli Niyazi i saradnika, gde je načinjen paralelni prikaz delineacije ciljnih volumena EORTC i RTOG vodiča, u prvoj fazi zračenja prema RTOG vodiču, CTV1 se formira tako što se na GTV1 (postoperativna šupljina i/ili rezidualni tumor na T1W sekvenci MR) i peritumorski edem (T2W/FLAIR sekvenca MR) doda margina od 2 cm. U drugoj fazi (*boost*) zračenja, CTV2 se formira tako što se na GTV2 (postoperativna šupljina i/ili rezidualni tumor na T1W sekvenci MR) doda margina od 2 cm. I na PTV1 i PTV2 preporučuje se margina od 3 - 5 mm (160).

Prema EANO, cilj radioterapije kod difuznih glioma je povećanje lokalne kontrole bolesti bez uzrokovanja neurotoksičnosti (113). EANO za lečenje glioblastoma *IDH-wild type* CNS SZO gradus 4 (SZO klasifikacija 2021.) i glioblastoma, NOS, CNS SZO gradusa 4 preporučuje primenu konkomitantne radioterapije sa Temozolomidom, pri čemu doza zračenja bi trebalo biti 54 - 60 Gy, sa 1,8-2 Gy dnevno po frakciji. Za pacijente starosti iznad 65 - 70 godina i MGMT nemetilisane tumore, preporučuje se hipofrakcionisani režim zračenja sa TD 40.05 Gy u 15 frakcija (2.67 Gy dnevno po frakciji). Za MGMT metilisane tumore kod starijih od 65 - 70 godina, preporučuje se konkomitantna radioterapija sa TMZ ili samo primena TMZ. Kod astrocitoma, *IDH*-mutanta, CNS SZO gradusa 4 (prema klasifikaciji iz 2016. godine odgovara glioblastomu, *IDH*-mutant SZO gradus IV) u primarnom pristupu preporučuje se primena radioterapije dozom od 54 - 60 Gy sa 1,8 - 2 Gy dnevno po frakciji, konkomitantno sa hemioterapijom TMZ, mada se potencijalno TMZ može izostaviti (113). EANO preporuka iz 2017. godine (166) se ne razlikuju bitno od preporuka iz 2021. godine. Naime, preporuka za lečenje glioblastoma *IDH*-mutanta SZO gradusa IV je primena radioterapije konkomitantno sa hemioterapijom TMZ, a potom primena adjuvantnog TMZ. Lečenje glioblastoma *IDH-wild type* SZO gradusa IV se podudara sa preporukama iz 2021. godine. Preciznije, preporučena je primena konkomitantne



radioterapije sa Temozolomidom, za pacijente ispod 70 godina. Za MGMT metilisane tumore kod starijih od 70 godina, preporučuje se konkomitantna radioterapija sa TMZ ili samo primena TMZ. Hipofrakcionisani režim zračne terapije (15 frakcija po 2,67 Gy) je preporučen kod starijih pacijenata ili pacijenata sa nepovoljnim prognostičkim faktorima (166).

## Reiradijacija glioblastoma

Uprkos kompletno sprovedenoj terapiji glioblastoma, koja uključuje maksimalnu bezbednu resekciju tumora, radioterapiju i hemioterapiju, najčešće dolazi do progresije bolesti ili lokalnog relapsa (152) u okviru dve godine od postavljanje dijagnoze glioblastoma. Park i saradnici su iz svoje studije dobili podatke da je prosečno vreme od inicijalne dijagnoze do pojave relapsa bolesti 11,1 meseci (167). Iako je primarni tretman za glioblastome jasno definisan, za rekurentne glioblastome nema definitivnih smernica.

EANO preporuke iz 2021. godine preporučuju radioterapiju rekurentnih glioblastoma ukoliko u primarnom pristupu nije primenjena zračna terapija (113). Potencijalne terapijske mogućnosti su ponovna hirurška resekcija, reiradijacija, sistemska terapija i simptomatsko-suportivna terapija (168). Ukoliko postoji indikacija za primenu ponovne zračne terapije, potrebno je uzeti u obzir sve parametre prethodnog plana zračne terapije i DVH, vreme proteklo od prethodne radioterapije, kao i to da li je primenjena ili će se primeniti i konkomitantna ili sekvencijalna hemioterapija. Reiradijacija se može sprovести standardnim ili hipofrakcionisanim režimom frakcionisanja, ali i stereotaksičnom zračnom terapijom ili stereotaksičnom radiohirurgijom. Imajući u vidu radiotoleranciju mozga i struktura i mozgu poput optičke hijazme ili moždanog stabla, reiradijacija nosi povećan rizik od neurotoksičnosti. Za standardno frakcionisanje, prema QUANTEC definisane su očekivane stope toksičnosti u odnosu na primljenu dozu (146). Za stereotaksičnu radiohirurgiju, rizik od neurotoksičnosti i simptomatske radionekroze je značajno povećan ukoliko je doza od 10 i 12 Gy (V10 i V12) primenjena na veći volumen mozga (169). Rizik od neurotoksičnosti i simptomatske radionekroze je manji od 10% ukoliko je kumulativna ekvivalentna doza normalizovana na 2 Gy (eng. *equivalent dose in 2 Gy fractions- EQD2*) između 100 - 110 Gy, a rizik je veći kod primene SRS i SBRT, zbog čega se njihova primena savetuje samo na lezije od 5 - 15 ml (170). Navarria i saradnici su u studiji u kojoj je bilo uključeno 90 pacijenata sa visokogradusnim gliomima (60 pacijenata je imalo glioblastom gradusa 4 po klasifikaciji iz 2021. godine) i kod kojih je sprovedena iradijacija, nakon više od 6 meseci od prethodnog zračnog tretmana, zaključili da je kod 10% pacijenata zabeležena radionekroza. Takođe, neurokognitivna funkcija je bila stabilna do trenutka progresije bolesti kod pacijenata (171). Novija istraživanja sugerišu o mogućim radioprotektivnim efektima primene bevacizumaba konkomitantno sa reiradijacijom. Naime, nakon izlaganja zračenju, zabeležena je ushodna regulacija VEGF, te se kombinacijom radioterapije i bevacizumaba može ostvariti dvostruki efekat i to senzibilizacijom prethodno radiorezistentnog dela tumora, ali i efekat na samu vaskularizaciju tumora (172). Kako bevacizumab ima antiangiogeno dejstvo, potencijalno može biti zaštitni faktor protiv pojave radionekroze (173).

Jedna od alternativa lokalne terapije za rekurentni glioblastom može biti i primena eng. *Tumor Treating Fields* (TTF). TTF tretman koristi naizmenična električna polja niskog intenziteta (1 - 3 V/cm) i intermedijarne frekvencije (100 - 300 kHz), koje deluje biofizičkom silom na naelektrisane i polarizovane molekule, čime se može ostvariti antimitotski efekat na ćelije tumora, uz delovanje i na druge biološke procese (174). Stupp i saradnici su zaključili da upotreba TTF uz TMZ povećava ukupno preživljavanje ovih pacijenata u odnosu na samo primenu TMZ. U ovu studiju je bilo uključeno 695 pacijenata kod kojih je prethodno sprovedena konkomitantna hemioradioterapija. Prosečno ukupno

preživljavanje u grupi pacijenata sa TTF i TMZ bilo je 20.9 meseci, a u grupi gde je primenjen TMZ 16 meseci (175). Blaga do umerena kožna toksičnost je zabeležena kod 52% pacijenata u grupi gde je primenjen TTF i TMZ (175). Imajući u vidu da TTF nije dostupan u svim zemljama, postoje različita razmatranja povezana sa finansijskim mogućnostima zemalja da se TTF uvrsti u standardno lečenje pacijenata sa glioblastomom, ali i razmatranja o odnosu korist-efektivnost (*cost-effectiveness*) (174).

### 1.6.2.3. Radiobiologija glioblastoma

Iako je pokazano da zračna terapija značajno produžava preživljavanje kod pacijenata sa glioblastomom, ovaj tumor pripada grupi radiorezistentnih tumora. Unutarćelijski milje, kao i faktori mikrookoline (176) utiču na radiorezistentnost kod glioblastoma. Među glavnim faktorima koji utiču na efikasnost radioterapije su promene u ćelijskom ciklusu, aktivacija onkogeni i inaktivacija tumor supresorskih gena (177).

Jonizujuće zračenje dovodi do jednolančanih prekida i dvolančanih prekida ćelijske DNK. Iako su dvolančani prekidi ređi, dvolančano oštećenje DNK je verovatno najbitniji mehanizam za uništavanje ćelija tumora (178). Međutim, odgovor ćelija na oštećenje predstavlja kompleksan proces u koji je uključeno više signalnih puteva i mehanizama popravke nastalih oštećenja, što može uticati na stepen radiorezistentnosti. Jedan od mehanizama radiorezistencije kod glioma jeste i aberatni metabolizam ćelija glioma, koji omogućuje brzu popravku DNK oštećenja (178).

Postoje dva važna puta koji učestvuju u popravci dvolančanog oštećenja DNK izazvanog zračenjem i to su homologna rekombinacija i nehomologno sparivanje lanaca (178). EGFR amplifikacija je često prisutna kod glioblastoma i može da promoviše radiorezistentnost, a postoji i hipoteza o postojanju povezanosti između EGFR i popravke oštećenih lanaca DNK posredstvom drugih signalnih puteva poput PI3K-Akt (179). PI3K-Akt najverovatnije dovodi do popravke oštećenja lanaca DNK preko DNK zavisne katalitičke subjedinice protein kinaze, koja je ujedno glavni enzim popravke signalnog puta nehomolognog sparivanja lanaca (180). U popravci dvolančanog oštećenja DNK i regulaciji kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa ključan je *Ataksija telangiektazija mutirani* gen (*ATM*) (181). U prilog tome, govore i podaci da se inhibicijom ATM kinaze potencira radiosenzitivnost ćelija glioblastoma (182).

Tang i saradnici uočili su da je invazivna populacija ćelija glioblastoma razvila fenotip koji se karakterisao povećanim preživljavanjem ćelija, smanjenom stopom apoptoze i pojačanim mehanizmom popravke dvolančanog oštećenja DNK. Analizom transkriptoma uočeno je reprogramiranje invazivnih ćelija glioblastoma uz pojačanu aktivaciju EGFR i nuklearnog faktora- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) povezanih signalnih puteva (183).

S druge strane, postavljena je i hipoteza da matične ćelije glioma ubrzavaju odgovor na DNK oštećenje. De Bacco i saradnici su saopštili da je MET receptorska kinaza na određen način eksprimirana u podrupi radiorezistentnih matičnih ćelija glioma, kao i da je prekomerno eksprimirana u rekurentnom glioblastomu nakon sprovedenog zračenja (184). Navedeni istraživači navode da MET promoviše radiorezistentnost oslanjajući se na AKT aktivnost što dovodi do neprekidne aktivacije Aurora kinaze A i nishodnih činilaca popravke DNK, fosforilacije i citoplazmatskog zadržavanja P21, što je povezano sa anti-apoptotskim funkcijama (184).

Bao i saradnici su ukazali na to da su ćelije koje eksprimiraju CD133 radiorezistentnije u odnosu na ćelije koje ne eksprimiraju CD133 (89). Serafim i saradnici su zapazili povećanu ekspresiju *ECM*

gena i interakcijskih receptora u radiorezistentnim ćelijskim linijama glioblastoma, nakon čega su došli do zaključka da ECM-receptorski interakcijski put može predstavljati vodič radiorezistencije kod glioblastoma (185).

Naidu i saradnici su istraživali povezanost humane apurinične endonukleaze 1 (Ape1) sa radiorezistencijom ćelija glioma u ćelijskim linijama U87 i U251 (186). Ćelijska linija U87 je bila radiorezistentnija, i većina ćelija se nalazila u S i G1 fazi ćelijskog ciklusa. Međutim, uočili su i povezanost radiorezistencije sa aktivnošću Ape1. Naime, postojala je dozno zavisna veza između prekomerne ekspresije Ape1 i povećane radiorezistentnosti (186).

Na radiorezistentnost mogu uticati i epigenetički događaji, poput promena u metilacionom statusu gena. S druge strane, zračenje može dovesti do fosforilacije ili promena u metilacionom statusu histona (187). Mikro RNK (miRNK) mogu dovesti do nishodne ili ushodne regulacije određenih gena. Odnosno, povećanja ili smanjena ekspresija pojedinih mikro RNK može dovesti do radiorezistencije ili radiosenzitivnosti ćelija glioblastoma (188).

### 1.6.3. Sistemsko lečenje glioblastoma

U lečenju glioblastoma, pored hirurškog pristupa i zračne terapije, koristi se i sistemski terapija. Sistemski terapija podrazumeva primenu citostatika odnosno hemioterapije, biološke terapije i target terapije. Sistemsko lečenje generalno iako retko, može početi pre operativnog lečenja tumora, a kod visokogradusnih glioma najpre nakon postavljanja i PH verifikacije tumora, tj. postoperativno, tj. konkomitantno i adjuvantno. Shodno indikacijama, sistemsko lečenje se koristi i u tzv. „salvage“ tretmanu glioblastoma, ali i drugih infiltrativnih glioma. Hemioterapija podrazumeva primenu antimetabolita, alkilirajućih agenasa, biljnih alkaloida, citotoksičnih antibiotika.

U sistemskoj terapiji tumora mozga, posebno mesto zauzimaju alkilirajućí agensi. Najpoznatiji alkilirajućí agensi su derivati nitrogen mustarda (ciklofosamid, ifosamid), derivati nitrozoureje (karmustin - BCNU, lomustin - CCNU), triazeni (temozolomid, dakarbazin, prokarbazin), platinski analozi (cisplatina, karboplatina, oksaliplatina) (189). Neki alkilirajućí agensi imaju sposobnost prolaženja kroz krvno moždanu barijeru (189), što je jedan od glavnih razloga zbog čega su našli primenu kod tumora mozga.

U velikoj randomizovanoj studiji koja je objavljena 2005. godine u kojoj je bilo uključeno 573 pacijenata, pokazano je da su pacijenti kod kojih je primenjena konkomitantna radioterapija sa TMZ, a potom i 6 ciklusa adjuvantnog TMZ, imali značajno duže dvogodišnje preživljavanje, u odnosu na grupu pacijenata kod kojih je primenjena samo radioterapija (127). Shodno tome, ovaj protokol je preporučen širom sveta za lečenje novodijagnostikovanih glioblastoma i naziva se Stupov protokol (127). Do danas, po ovom protokolu, standardno lečenje glioblastoma nakon operativnog lečenja tumora, podrazumeva primenu konkomitantne radioterapije sa hemioterapijom Temozolomidom, a potom primenu adjuvantnog temozolomida (127). Po Stupovom protokolu, istovremena primena Temozolomida daje se u dozi od 75 mg po m<sup>2</sup> dnevno, ali i subotom i nedeljom (kada se ne primenjuje radioterapija), odnosno ukupno 42 dana. Adjuvantna primena Temozolomida daje se u dozi od 150 - 200 mg po m<sup>2</sup>, do ukupno 6 ostvarenih ciklusa (127). Na poslednjim kongresima neuronkologije, često se spominjao i tzv. produženi (eng. *extended Stupp's regimen*) protokol, koju podrazumeva primenu adjuvantnog temozolomida do 12 ciklusa. Preliminarne rezultate ovih studija i toksičnost bi trebalo posebno i detaljno analizirati u budućnosti. Temozolomid se primenjuje peroralnim putem. Kako je prethodno dokazano da primena TMZ doprinosi boljem preživljavanju pacijenata sa glioblastomom, otvorena su mnoga pitanja

vezana za samu primenu TMZ. Odnosno, da li promena režima doziranja može dovesti do još boljih rezultata preživljavanja. U studiji, čiji su rezultati objavljeni 2013. godine, primena „*dose dense*“ adjuvantnog TMZ (75 - 100 mg m<sup>2</sup> tokom 21 dan, u ciklusu koji se ponavlja na 28 dana) nije pokazala benefit u preživljavanju, ali je zapažen prognostički značaj metilacije MGMT promotora (190). Takođe, u grupi pacijenata kod kojih je primenjen „*dose dense*“ TMZ uočeno je više neželjenih efekata gradusa 3 - 5 (190). Naime, kako je MGMT enzim popravke DNK, nakon primene TMZ, MGMT može ukloniti metil grupu u O6-metilguaninu, čime se neutrališe oštećenje DNK koje je posredovano TMZ. Zbog toga, kod hipermetilacije MGMT promotora dolazi do smanjene ekspresije MGMT proteina, odnosno boljeg odgovora na terapiju sa TMZ i samim tim, boljeg preživljavanja pacijenata sa GB, odnosno kod nemetilisanih tumora često nema odgovora na terapiju TMZ (191).

Prema EANO preporukama iz 2021. godine, primena Temozolomida se ne preporučuje za MGMT nemetilisane tumore kod starijih pacijenata od 65 - 70 godina života, ali za pacijente iste životne dobi preporučuje se konkomitantna radioterapija i TMZ ili monoterapija TMZ (113). Konkomitantna primena TMZ sa radioterapijom preporučuje se kod pacijenata sa dobrim opštim stanjem i neurološkim statusom (113).

U sistemskom lečenju glioblastoma, ponekad se koriste i preparati nitrozouree. Ne samo istorijski, i danas postoje različite studije koje daju podatke o kombinaciji različitih citostatika kod pacijenata sa gliomima. Rezultati faze 3 randomizovane studije koji su objavljeni 2019. godine ukazuju na mogućnost boljeg ukupnog preživljavanja pacijenata sa novodijagnostikovanim GB sa primenom dvojne hemioterapije Lomustin-TMZ, i to kod pacijenata sa MGMT metilisanim promotorom. Imajući u vidu da je broj pacijenata uključenih u navedenu studiju relativno mali, sami autori pozivaju na oprezno tumačenje dobijenih rezultata (192).

Bevacizumab je VEGF monoklonsko antitelo čija je osnovna uloga inhibicija angiogeneze (antiangiogena terapija). Primena bevacizumaba sa RT - TMZ kod pacijenata sa glioblastomom nije dovela do očekivanog benefita u ukupnom preživljavanju pacijenata, ali je pokazan benefit u preživljavanju bez progresije bolesti (*Progression Free Survival - PFS*) i u kvalitetu života pacijenata (193). S druge strane, pokazano je da primena bevacizumaba smanjuje vaskularnu propustljivost i otok, a može da smanji rizik od radionekroze kada se primenjuje sa zračnom terapijom (173).

EANO navodi preporuke za glioblastom *IDH-wild type* CNS SZO gradusa 4, glioblastom NOS CNS SZO gradusa 4 i astrocitom CNS SZO gradusa 4 za primenu bevacizumaba u trenutku progresije bolesti ili pojave rekurentnog tumora u zavisnosti od dostupnosti leka, ali takođe navodi i ponovnu primenu TMZ tzv. eng „*rechallenge*“ TMZ i derivate nitrozouree.

U svetu su u toku brojne kliničke studije u kojima se koriste inovativni ili eksperimentalni lekovi i pristupi, poput primene „kancerskih“ vakcina, različita monoklonska antitela i onkolitične virusne terapije. Rezultate ovih studija ćemo moći da vidimo u budućnosti, ali je značajno napomenuti da u ovom trenutku se takvi lekovi ne nalaze u protokolima za lečenje glioblastoma (izuzev bevacizumaba u pojedinim zemljama).

## 1.7. Mikro RNK

### 1.7.1. Mikro RNK u ćelijskim i fiziološkim procesima

Mikro RNK su klasa malih nekodirajućih molekula RNK (21 - 25 nukleotida) koje kontrolišu različite biološke funkcije poput programirane ćelijske smrti po principu apoptoze, ćelijskog ciklusa, proliferacije i angiogeneze, na taj način što regulišu ekspresiju gena na posttranskripcionom nivou (194). Funkcije mikro RNK ispitivane su i zabeležene kod biljaka, životinja i ljudi.

Mikro RNK se spajaju sa RNK-indukovanim kompleksom utišavanja i vezuju se za komplementarnu sekvencu u 3'-netransliranoj regiji, kodirajuću regiju ili pak za 5'-netranslirani region ciljne informacione RNK (iRNK), nakon čega mogu sprečiti translaciju iRNK ili pospešiti razgradnju iRNK (195). Najveći broj zrelih sekvenci mikro RNK se nalazi unutar introna ili egzona nekodirajućih RNK, kao i introna prekursorskih mRNA. Biogeneza mikro RNK je regulisana brojnim koracima i regulatornim mehanizmima, uključujući transkripcionu kontrolu gena mikro RNK, epigenetičku kontrolu gena mikro RNK, regulaciju prvog koraka obrade od primarne (pri)- mikro RNK (dugi primarni transkripti gena mikro RNK) do prekursorske mikro RNK, do regulacije drugog koraka obrade od prekursorske mikro RNK do mikro RNK (196). Među mehanizmima prvog koraka obrade posebno se izdvaja *Drosha* kompleks i *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) (197). Ponekad su mikro RNK transkribovane u dugi transkript kada se nazivaju klasteri, a ako imaju slične *seed* sekvence, smatraju se familijama mikro RNK.

Oštećenje DNK različitim procesima dovodi do brojnih intraćelijskih reakcija, a jednu od bitnih uloga u tom odgovoru na oštećenje DNK i kontroli intraćelijskih procesa imaju i mikro RNK. Mikro RNK učestvuju u odgovoru na DNK oštećenje preko regulisanja faza ćelijskog ciklusa (G0/G1, G2/M), popravke DNK oštećenja i programirane ćelijske smrti po principu apoptoze (198). Mikro RNK mogu da utiču na različite mehanizme za popravku jednostrukih i dvostrukih oštećenja DNK koji najpre uključuju popravku ekscizijom baze, proces homologne rekombinacije i spajanje nehomolognih krajeva (198). Tako, na primer, u odgovoru na oštećenje DNK, mikro RNK-21 preko ciljne mete (gena) *PDCD4* reguliše proces apoptoze, dok mikro RNK-34a preko mete RAD51 utiče na akumulaciju dvostrukih oštećenja DNK (198). Imajući u vidu da akumulacija dvostrukih oštećenja DNK lanaca može dovesti do različitih procesa, uključujući i proces tumorogeneze, jasno je da mikro RNK imaju važnu ulogu u kontroli ovih procesa (199). Takođe, mikro RNK se nekomplementarno vezuju za svoje target gene, tj. jedna mikro RNK može regulisati i više ciljnih gena, dok nekoliko mikro RNK zajedno može da reguliše jedan gen (200).

Mikro RNK imaju bitne uloge u mnogim biološkim i fiziološkim procesima, uključujući ćelijski rast, prenos signala, programiranu ćelijsku smrt, hematopoetsku diferencijaciju krvnih loza, sekreciji hormona. Smatra se da su mikro RNK tkivno specifične. Kako je do sada opisana biogeneza mnogih intraćelijskih mikro RNK, studije su pokazale da se mikro RNK mogu detektovati i u ekstraćelijskom prostoru (201).

Za mehanizam ulaska mikro RNK u ekstraćelijski prostor postoji više hipoteza od kojih se pominju mehanizam pasivnog prolaska nakon apoptoze, nekroze, ali i aktivnom sekrecijom egzozoma i lipoproteina (201). Shodno tome, mikro RNK mogu se izolovati iz ćelija, tkiva i telesnih tečnosti poput seruma i plazme ali i drugih (202). Pokazano je da određene mikro RNK imaju ulogu u ranom razvijanju hematopoetskih ćelija i imunom sistemu. Pojedine mikro RNK mogu potisnuti ekspresiju bitnih gena za hematopoetsku stem ćeliju i time mogu da utiču na proizvodnju progenitorskih ćelija. Takođe, mijeloidna

ćelijska loza je regulisana interakcijom između mikro RNK i određenim transkripcionim elementima (203).

Zapaža se i različita aktivnost mikro RNK u neuronima, sugerišući na ulogu mikro RNK u regulaciji sinaptičke plastičnosti. Mikro RNK su ključni regulatori moždanog razvoja i moždane funkcije. Neke od mikro RNK koje imaju određenu ulogu u mozgu su: mikro RNK-92a koja reguliše neuronsku aktivnost, mikro RNK-129 koja reguliše snagu sinapse, mikro RNK-132 i mikro RNK-212 koje imaju modularne efekte na učenje i pamćenje, ulogu u održavanje intaktne krvno moždane barijere kao i ulogu u razvoju vizuelnog korteksa (204). Uočeno je da postoji spektar mikro RNK koje su bitne tokom razvoja pluća i normalnih fizioloških procesa. Neke od njih su let-7, mikro RNK-155 i mikro RNK-19-72 (205).

### **1.7.2. Mikro RNK u patološkim stanjima i malignim bolestima**

Poremećena regulacija mikro RNK i različit nivo njihove ekspresije zapaža se u mnogim patološkim stanjima. Treba napomenuti da su prvobitna istraživanja povezanosti mikro RNK sa patološkim stanjima bila na animalnim modelima, ali sve više studija pokazuju značaj mikro RNK i kod ljudi. Kako je prethodno pomenuto u tekstu, određene mikro RNK imaju ulogu u homeostazi, normalnom razvoju pluća i njihovom funkcionisanju. Samim tim, poremećena regulacija (ushodna ili nishodna regulacija) specifičnih mikro RNK može dovesti do različitih plućnih bolesti. Poremećena (aberantna) ekspresija mikro RNK zabeležena je u inflamatornim procesima i u sklopu inflamatornog odgovora na nivou plućnog parenhima, fibrozi pluća, bronhijalnoj astmi i kanceru.

Neke od mikro RNK koje se povezuju sa imunološki posredovanim bolestima pluća su mikro RNK-21, mikro RNK-126, članovi familije let-7 mikro RNK (205). Navedene mikro RNK su ispitivane i na animalnim modelima, ali i kod ljudi. Kako je pokazano da mikro RNK mogu posredovati u ranom razvijanju ćelija hematopoetskog sistema i imunom sistemu, deregulacija i aberantna ekspresija se pronalazi u mnogim hematološkim bolestima i malignitetima kao što su hronična limfocitna leukemija (mikro RNK-15a, mikro RNK-16), difuzni B krupnoćelijski limfom i akutna mijeloidna leukemija (mikro RNK-155), ali i autoimunim oboljenjima poput reumatoidnog artritisa i multiple skleroze (203).

U nervnom sistemu, postoji različita ekspresija pojedinih mikro RNK u zavisnosti od tipa ćelija. Povišena ekspresija mikro RNK-129 zapažena je kod epilepsije kod ljudi, ali takođe i na eksperimentalnim modelima, dok su snižene vrednosti mikro RNK-92a detektovane u hipokampusu kod pacijenata sa temporalnom epilepsijom (204). Na animalnom modelu (miš) inhibicija mikro RNK-132 imala je zaštitno dejstvo na hipokampalne neurone i smanjila incidencu spontanih epileptičnih napada (204). Slično je dokazano i sa mikro RNK-134. Naime, dobijeni su podaci da je mikro RNK povišena u operativno odstranjenom hipokampusu i neokorteksu kod pacijenata sa farmakorezistentnom epilepsijom, a inhibicija ove mikro RNK u različitim modelima smanjila je incidencu epileptičnih napada (204).

Pored patoloških, nemalignih bolesti, tokom poslednje decenije, mnogi dokazi upućuju na značaj regulacije mikro RNK u malignim oboljenjima odnosno raku (kanceru). Pojedine mikro RNK mogu da promovišu proliferaciju ćelija, invazivnu sposobnost tumorskih ćelija, angiogenezu, dok druge mikro RNK mogu da inhibiraju navedene procese. Odnosno, mikro RNK mogu delovati kao protoonkogeni ili tumor supresori.

Ekspresija mikro RNK-34a je često snižena u različitim malignim bolestima, što upućuje na njen moguć značaj kao tumor supresora. Lodygin i saradnici su izvestili da je 79% pacijenata sa rakom prostate imalo CpG metilaciju promotora mikro RNK-34a, uz udruženi gubitak ekspresije navedene mikro RNK (206). Takođe, istraživači su slično zapazili kod raka dojke, pluća, debelog creva, bubrega, mokraćne bešike, ćelijskim linijama raka pankreasa i melanoma, ali i kod primarnog melanoma. Od nabrojanih, najmanji procenat je uočen kod raka debelog creva (13%), a najveći kod primarnog melanoma (65%) (206).

Jedna od mikro RNK za koju se takođe smatra da ima bitnu ulogu tumor supresora je familija mikro RNK-let-7. Naime, zapaženo je da je ekspresija let-7 izraženija u odmaklim fazama kancera, i to najpre u mezenhimalnim malignitetima (207). Lee i saradnici su tabelarno prikazali pojedine mikro RNK i njihove target gene, kao i varijacije u ekspresiji mikro RNK kod određenih tumora, i to u smislu povišene ili snižene ekspresije u odnosu na ekspresiju u normalnom tkivu. Prethodno pomenuta mikro RNK, let-7, može imati povećanu ekspresiju kod raka debelog creva i raka pankreasa, a sniženu kod raka pluća ili dojke (207).

Neke mikro RNK mogu delovati i kao onkogeni (eng. *oncomiR*). Jedna od najistraženijih mikro RNK u humanoj onkologiji je mikro RNK-21, a kod solidnih tumora i hematoloških maligniteta zapažena je njena ushodna regulacija.

Povišene vrednosti mikro RNK-21 su pronađene kod visokogradusnih glioma, karcinoma dojke, karcinoma debelog creva, u nesitnoćelijskom karcinomu pluća, karcinoma prostate, a povišena ekspresija ove mikro RNK se povezuje sa odmaklim stadijumima bolesti i rezistencijom na terapiju (208). Od hematoloških maligniteta opisuje se povećana ekspresija mikro RNK-21 kod difuznog B krupnoćelijskog limfoma, hronične mijeloidne leukemije i kod leukemije prirodnih ćelija ubica (NK ćelijska leukemija) (208).

Iako mikro RNK deluju na ćelijsku proliferaciju preko elemenata ćelijskog ciklusa i regulacijom različitih signalnih puteva, postoje i drugi procesi kojima mikro RNK posreduju u procesima tumorogeneze i invazije. Izbegavanje programiranje ćelijske smrti tumorskih ćelija je jedan od tih mehanizama, a veruje se da mikro RNK imaju bitnu ulogu u tome (209). Poremećena regulacija funkcije tumor supresora p53, odnosno njime regulisanih mikro RNK, potkrepljuje otpornost tumorskih ćelija na proces apoptoze. Uz to, noviji dokazi upućuju na to da mikro RNK imaju ulogu u epitelijalno-mezenhimalnoj tranziciji i procesu metastaziranja i indukciji angiogeneze. Kako je signalni put transformišućeg faktora beta (TGF- $\beta$ ) uključen u regulaciju epitelijalno-mezenhimalne tranzicije i pospešivanju metastastskog procesa, mikro RNK koje regulišu signalni put TGF- $\beta$  su često prekomerno ekspimirane u ovim malignitetima. Jedna od mikro RNK koja učestvuje u ovim procesima je mikro RNK 155 i ona promovise epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju, dok mikro RNK 200 i 203 inhibišu tranziciju (209). U dodatku, Petrović i saradnici su sugerisali da mikro RNK 155 može biti uključena u proces patogeneze raka dojke i metastaziranja raka u drenažni limfni region dojke (210).

### 1.7.3. Mikro RNK kod glioblastoma

Brojne studije su pokazale poremećenu ekspresiju različitih mikro RNK kod glioblastoma. Podaci iz literature ukazuju na to da prethodno pomenuta mikro RNK-21 ima određenu ulogu i kod glioblastoma. Chan i saradnici su dokazali prekomernu ekspresiju mikro RNK-21 u tkivu glioblastoma i ćelijskim linijama glioblastoma u poređenju sa netumorskim fetalnim moždanim tkivom i moždanim tkivom

odraslih kod kojih ta ekspresija nije dokazana. U dodatku, inhibicija mikro RNK-21 dovela je do aktivacije kaspaze i potom i povećane stope apoptoze (211).

Yang i saradnici su zaključili da je mikro RNK-21 prekomerno eksprimirana u ćelijskim linijama glioblastoma i tkivu glioblastoma (212). Uzgred, istraživači su došli do zaključka da je ekspresija mikro RNK-21 statistički značajno više povišena kod glioblastoma, nego kod niskogradusnih glioma. Shodno rezultatima studije i dostupnim podacima, sugerisali su da je visoka ekspresija ove mikro RNK povezana sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa GB, a da je gen za insulinu sličan faktor rasta (IGF) vezujući protein 3 (IGFBP3) ciljni gen mikro RNK-21 kod glioma (212).

Druga mikro RNK koja je prekomerno eksprimirana kod glioma je mikro RNK-10b. U studiji koja je imala 43 uzorka glioma (sedamnaest uzoraka su bili uzorci glioblastoma), sugerisana je korelacija između nivoa ekspresije mikro RNK-10b i invazivnosti glioma. Naime, istraživači su došli do saznanja da je mikro RNK-10b povišena kod svih glioma, ali i da je nivo ekspresije ove mikro RNK viši kod visokogradusnih glioma (213).

Međutim, treba se osvrnuti i na mikro RNK koje su nishodno regulisane u glioblastomima, odnosno koje imaju nižu ekspresiju u odnosu na okolno zdravo tkivo.

Snižena ekspresija mikro RNK-758-5p je detektovana u tkivu glioblastoma i ćelijskim linijama glioblastoma u odnosu na normalno tkivo mozga i normalnu ljudsku ćelijsku liniju astrocita. Eksperimentalno je pokazano da prekomerna ekspresija mikro RNK-758-5p dovodi do supresije proliferacije, migracije i invazivnosti ćelija glioblastoma (214). Jedna od studija je pokazala da postoji smanjena ekspresija mikro RNK-210 u tkivima glioma (niskogradusnih i visokogradusnih). Niska ekspresija ove mikro RNK je uočena i u 3 ćelijske linije glioblastoma (A-172 MG, T98G, LN-229). Autori su sugerisali da niska ekspresija mikro RNK-210 može sudelovati u progresiji niskogradusnih glioma ka visokogradusnim gliomima. Odnosno, visoka ekspresija ove mikro RNK bi mogla imati ulogu u inhibiciji migratorne i invazivne sposobnosti glioblastoma (215). Barbano i saradnici su došli do nešto drugačijih rezultata (216). Istraživači su predstavili rezultate koji govore prilog povišene ekspresije pojedinih mikro RNK koje su udružene sa lošijim ukupnim preživljavanjem u grupi sa glioblastomom, te da se među njima posebno izdvajaju mikro RNK-21 i mikro RNK-210 (216). Oprečni rezultati navedene 2 studije o mikro RNK-210 otvaraju novo poglavlje istraživanja, odnosno da li mikro RNK imaju više ciljnih gena. Kod najagresivnijih tumora i najrezistentnijih na terapiju, kakav je i glioblastom, trebalo bi istražiti direktnu i međusobnu povezanost između više mikro RNK, kao i to da li mikro RNK poput mikro RNK-21 imaju dominantnije onkogeno dejstvo u odnosu na druge mikro RNK, koje imaju tumor supresorno dejstvo.

Alrfaei i saradnici su u svojoj studiji koristili 4 uzorka glioblastoma, od kojih su 3 bila de novo a jedan rekurentni glioblastom i kod njih je otkrivena niska ekspresija mikro RNK-100-5p (217). Nakon transfekcije pre-mikro RNK-100 u inicijatorske tumorske ćelije (koje su izolovane iz glioblastoma) zapažen je smanjeni vijabilitet ćelija i smanjena proliferacija ćelija. Transfekcija sa pre-mikro RNK-100 dovela je do smanjenja ekspresije markera matičnih ćelija koji se uobičajeno eksprimiraju u glioblastomu. Prekomerna ekspresija mikro RNK 100-5p dovela je do povećane ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa p21 (217). U studiji objavljenoj 2021. godine pokazana je razlika u profilu ekspresije mikro RNK između matičnih ćelija glioblastoma i već diferentovanih tumorskih ćelija. Iako je detektovano četrnaest mikro RNK sa različitim profilom ekspresije kod matičnih ćelija glioblastoma, najveći značaj imale su mikro RNK-21 i mikro RNK-95, a njihova ekspresija je povezana i sa preživljavanjem pacijenata (218).



#### 1.7.4. Mikro RNK, jonizujuće zračenje i radioterapija

U prethodnim delovima teksta bilo je priče o efektu jonizujućeg zračenja na ćelije, delovanju na DNK ćelija, kao i procesima koji nastaju nakon izlaganja jonizujućem zračenju. Imajući u vidu literarne podatke o uticaju mikro RNK na regulaciju gena i mnoge ćelijske procese, nauka svakodnevno daje nove podatke o tome kako se specifične mikro RNK ponašaju nakon izlaganja jonizujućem zračenju.

Brojne mikro RNK pokazuju izmenjen nivo ekspresije nakon izlaganja jonizujućem zračenju, u vidu ushodne ili nishodne regulacije.

Maes i saradnici su u svom istraživanju pokazali da se nivo ekspresije mikro RNK u ljudskim fibroblastima menja tokom izlaganja niskim dozama zračenja (219). U ranim i kasnim tačkama posmatranja zapažene su razlike u nivou ekspresije specifičnih mikro RNK i to najpre u vidu nishodne regulacije. Međutim, druge mikro RNK su pokazale povećan stepen ekspresije dva sata nakon izlaganja zračenju. Autori su sugerisali da nakon uočene nishodne, a potom ushodne regulacije mikro RNK, oni mogu predstavljati kontrolore ćelijskih procesa nakon izlaganja zračenju, kako bi se aktivirao mehanizam popravke DNK oštećenja i inhibirala programirana ćelijska smrt (219). Kako je do sada opisano da ATM serin kinaza ima bitnu ulogu u ćelijskom odgovoru na oštećenje DNK posredovano jonizujućim zračenjem, ona verovatno ima i ključnu ulogu u regulaciji mikro RNK, njene ekspresije i biogeneze u odgovoru na jonizujuće zračenje (220). Pokazano je da mikro RNK-34a takođe reguliše odgovor na jonizujuće zračenje u više tipova tkiva i tumora.

Stankevicins i saradnici su poredili nivo ekspresije mikro RNK nakon izlaganja X zračenju aplikujući dozu od 5 Gy i to među ćelijskim linijama nemalignog tkiva dojke MCF-10A, ćelijske linije raka T47-D i MCF-7. Istraživači su uočili povećan nivo ekspresije mikro RNK-34a četiri sata nakon zračenja u liniji MCF-10A i MCF-7, dok nisu uočili povećan nivo ekspresije u liniji T47-D koja nije imala funkcionalan p53, a dvadeset četiri sata od sprovedenog zračenja zapazili su smanjenje nivoa ekspresije. Autori su sugerisali da je ekspresija mikro RNK-34a povezana sa dozom rentgenskog zračenja, vremenom proteklog od zračenja i tipa ćelije (221).

Lacombe i saradnici su evaluirali ulogu mikro RNK u odgovoru na zračnu terapiju (222). Istraživači su sugerisali da mikro RNK-34a ima verovatno veliki značaj u radiobiologiji. Naime, naveli su primere iz literature koji pokazuju da izlaganje jonizujućem zračenju dovodi do povećane ekspresije mikro RNK 34a. Dalje, oni govore u prilog brojnim biološkim procesima u okviru ćelijskog odgovora na zračenje koji su regulisani od strane ove mikro RNK i naglašavaju da ona može imati ulogu u odgovoru na zračenje ili radiotoksičnost. Osim mikro RNK-34a, autori opisuju i druge mikro RNK, prevashodno iz familije let-7 koji mogu imati određenu ulogu u radiobiologiji, preciznije senzitivizaciji ćelija na primenu jonizujućeg zračenja, ali i mikro RNK-21 kao moguću meta za prevazilaženje radiorezistencije tumorskih ćelija i smanjenje stepena radiosenzitivnosti normalnih, zdravih ćelija (222).

Kao i kod mnogih tumora, tako i kod glioblastoma postoje brojne mikro RNK koje imaju različit nivo ekspresije. Mikro RNK-128a i njen ciljni gen *polycomb ring finger oncogene (Bmi-1)* mogu imati značajnu ulogu u radiorezistenciji ćelija glioblastoma. Naime, Ye i saradnici su ispitivali uticaj različite doze zračenja na ćelijsku liniju glioma U-87 MG, kao i moguću ulogu reaktivnih jedinjenja kiseonika, mikro RNK-128a i gena *Bmi-1* u ćelijskom odgovoru na primenu zračne terapije (223). Niska ekspresija ove mikro RNK u navedenoj ćelijskoj liniji nakon izlaganja zračenju, dovela je do izbegavanja procesa starenja (propadanja) (eng. *cell senescence*) odnosno do pojave rezistencije na zračenje. U dodatku, sugerisano je da mikro RNK-128 i *Bmi-1* gen mogu biti odgovorni za radiorezistenciju kod ove ćelijske linije glioma (223).

Studija Li i saradnika, prikazala je rezultate gde je nivo ekspresije mikro RNK-320 bio značajno snižen u radiorezistentnoj grupi tkiva glioma, sa značajno povećanim nivoom *forkhead box protein M1* (FoxM1) proteina informacione RNK (224). Prekomerna ekspresija mikro RNK-320 dovela je do povećane radiosenzitivnosti ćelija glioma na primenu zračenja, promovisanja programirane ćelijske smrti, što je uočeno preko smanjenog preživljavanja tumorskih ćelija u ćelijskim linijama U87 i U251. Drugim rečima, mikro RNK-320 je povećala osetljivost na jonizujuće zračenje preko nishodne regulacije sirtuina 1 (Sirt1) i FoxM1 (224).

Mikro RNK-21 je prekomerna eksprimirana u mnogim kancerima, ali i kod glioblastoma. Njena prekomerna ekspresija se dovodi u vezu i sa radiorezistencijom kod glioblastoma. Chao i saradnici su ispitivali mehanizam radiorezistencije u kome mogu da posreduju mikro RNK-21 i njeni target geni (225). Ekspresija mikro RNK-21 je ispitivana u tkivu glioblastoma, ćelijskim linijama glioblastoma A172, T98G i U87MG i normalnom tkivu mozga. Istraživači su predstavili rezultate koji govore u prilog tome da je prekomerna ekspresija mikro RNK-21 povezana sa rezistencijom na zračnu terapiju, dok je blokada ove mikro RNK delovala kao radiosenzitajzer. Nakon blokade mikro RNK-21 (pomoću transfekcije sa anti mikro RNK-21) uočeno je značajno povećanje stepena programirane ćelijske smrti u T98G ćelijskoj liniji (225). U dodatku, blokadom mikro RNK zapažena je povećana ekspresija gena *PDCD4* and *hMSH2*, što je sugerisalo da mikro RNK-21 može posredovati u rezistenciji glioblastoma na zračenje preko navedenih ciljnih gena (225).

Prema pojedinim studijama, mikro RNK-10b može biti potencijalni prediktivni biomarker za odgovor na zračnu terapiju kod pacijenata sa GB (226). Istraživači su u svojoj studiji zaključili da je prekomerna ekspresija mikro RNK-10b smanjila stepen programirane ćelijske smrti, pojačala migratornu i invazivnu sposobnost ćelija glioblastoma i snizila senzitivnost ćelija GB na zračnu terapiju (226).

Mehanizam prevazilaženje rezistencije na primenu hemioterapije temozolomidom kod pacijenata sa glioblastomom i povezanost tog mehanizma sa ekspresijom mikro RNK je takođe tema savremenih istraživanja. Zhao i saradnici su tokom 2020. godine objavili istraživanje u kom su zaključili da se sa mikro RNK-128-3p može pojačati senzitivnost ćelija glioblastoma na temozolomid preko regulacije proteina epitelijalno-mezenhimalne tranzicije c-Met (227).

Imajući u vidu sve procese koji nastaju nakon izlaganja ćelija zračenju, kako tumorskih, tako i zdravih ćelija i sve prethodno opisane i navedene procese u okviru kaskade reakcija na oštećenje ćelija na zračenje, postavlja se pitanje da li se mikro RNK koje učestvuju u regulaciji ove kaskade mogu povezati sa nivoom radijacionih oštećenja, odnosno radijacionih povreda, kao i da li ta oštećenja koja izazivaju simptome mogu biti povezani sa nivoom ekspresije mikro RNK (228). Pokazano je da se nivoi ekspresije mikro RNK-21 značajno menjaju tokom zračne terapije pacijenata sa rakom prostate, kao i da se nivoi ekspresije razlikuju između pacijenata sa i bez prisutne akutne radijacione toksičnosti (229).

## **1.8. Toksičnost terapije kod tumora mozga**

### **1.8.1. Toksičnost radioterapije**

Tehnike radioterapije i tehnologija se neprestano unapređuju kako bi se poboljšala preciznost i efikasnost terapije uz istovremenu redukciju neželjenih efekata. Iako su frakcionisana RT i savremene tehnike zračne terapije značajno smanjile učestalost i gradus toksičnosti, pacijenti kod kojih se sprovodi zračna terapija i dalje mogu imati različite toksičnosti. Toksičnost kod primene zračne terapije na tumore

u endokranijumu možemo podeliti na akutnu i kasnu toksičnost (u literaturi se pominje i subakutna toksičnost). Najčešći akutni neželjeni efekti kod zračenja endokranijuma su mučnina, povraćanje, glavobolja, pogoršanje neurološkog deficita, zamor, promene mentalnog statusa i somnolencija. Efekti akutne toksičnosti zračenja pojavljuju se tokom sprovođenja radioterapije ili do 3 meseca nakon završetka tretmana (230). Kasna toksičnost indukovana radioterapijom razvija se od 3 meseca do nekoliko godina nakon tretmana (230) i uključuje difuznu leukoencefalopatiju, mentalne promene, zamor, gubitak pamćenja, demenciju ili fokuse radionekroze. Faktori povezani sa lečenjem kao što su doza po frakciji, ozračeni volumen tkiva, broj frakcija, ukupna primljena ili apsorbirana doza i trajanje izloženosti zračenju nisu dovoljni da predvide reakciju normalnog tkiva.

Mehanizam radiotoksičnosti CNS je kompleksan i do sada nije u potpunosti razjašnjen. Faktori koji su u korelaciji sa toksičnošću zračenja CNS najpre uključuju radijacionu povredu krvnih sudova, deleciju astrocitnih progenitora oligodendrocita-2 i zrelih oligodendrocita, zatim deleciju populaciju specifičnih neuralnih stem ćelija u hipokampusu, malom mozgu i moždanoj kori, kao i modifikaciju ekspresije citokina (231). Akutni neželjeni događaji su pre svega povezani sa edemom mozga. Edem mozga može nastati i nakon primene jedne frakcije zračenja od 2 Gy (232). Kim i saradnici izdvajaju nekoliko histoloških karakteristika koje se mogu zapaziti kod radijacione povrede mozga kod nekroze bele mase mozga: gubitak ćelija parenhima sa demijelinizacijom bele mase, encefalomalacijom, gliozom i gubitkom neurona, ali i povrede endotela krvnih sudova koje mogu dovesti do prekida krvno-moždane barijere (233). U kasnijoj fazi radijacione povrede mogu se zapaziti telangiektazije, hijalinoza i fibrinoidni depoziti u zidovima krvnih sudova (233).

Dejstvo zračne terapije ogleda se na ćelijama tumora, ali i na ćelijama okolnog zdravog odnosno tumorom nezahvaćenog tkiva. Nakon izlaganja ćelija zračenju, pored direktnog citotoksičnog efekta i nastanka smrti ćelija, brojne studije ukazale su na sekundarne efekte indukovane radijacijom. Naime, nakon smrti ćelija, dolazi do različitog odgovora okolnog tkiva na smrt ćelija, što može dovesti do daljeg oštećenja okolnih ćelija. Standardna zračna terapija fotonima svoj efekat najviše ostvaruje posredstvom slobodnih radikala. Međutim, nastanak slobodnih radikala, odnosno nakupljanje reaktivnih vrsta kiseonika se dešava i nakon smrti tumorskih i zdravih ćelija. Tokom oksidativnog stresa, dolazi do ekscesivnog stvaranja i nakupljanja reaktivnih jedinjenja kiseonika što dovodi do daljeg oštećenja ćelijskih elemenata. Reaktivna jedinjenja kiseonika mogu nastati iz aktiviranih leukocita, neurona, makrofaga, dok tkivna hipoksija izazvana vaskularnim oštećenjem može biti dugotrajan izvor za produkciju reaktivnih jedinjenja kiseonika (233). Propustljivost krvno moždane barijere, uz nakupljanje T-limfocita i drugih tipova leukocita stvara mikrookruženje sa različitim procentom imunih ćelija, od kojih najviše su zastupljene mijeloidne ćelije, sa različitom odnosom mikroglije iz tkiva i makrofaga iz cirkulacije (234). Liddelov i saradnici su izvestili da su reaktivni astrociti značajno indukovani povredom centralnog nervnog sistema, a njihov nastanak podstiče aktivirana neuroinflamirana mikroglija, preko sekrecije  $IL-1\alpha$ ,  $TNF-\alpha$  i C1 komponente komplemента (235). Oni dodaju i da su ovi A1 reaktivni astrociti veoma zastupljeni u neurodegenerativnim bolestima (235). Ovakvi rezultati upućuju na brojne mehanizme koji se mogu aktivirati, pri bilo kojoj vrsti povrede centralnog nervnog sistema, ali se naglašava na procesu neuroinflamacije. Takođe, nakon izlaganja zračenju, zapaženo je oslobađanja medijatora zapaljenja, odnosno dolazi do inflamatornog odgovora, koji može voditi do hronične inflamacije i oštećenja tkiva (236). Odmah nakon izlaganja zračenju, najbitniji proinflamatorni citokini koji su uključeni u odgovor na zračenje mozga, pluća i kože su interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor nekrotišući faktor alfa ( $TNF-\alpha$ ) i transformišući faktor rasta beta ( $TGF-\beta$ ) (236). Nakon primenjene zračne frakcije i oštećenja ćelija, mikroglija i glijalne ćelije mogu proizvoditi citokine poput IL-1, IL-6,  $TNF-\alpha$ . Ovi proinflamatorni citokini mogu uticati na proces neurotransmisije preko aferentne grane živca lutaoca (lat. *nervus vagus*) i preko dalje komunikacije sa određenim delovima CNS izazvati zamor (eng. *fatigue*) (237). Desmarais i saradnici koristili su animalni model (Fišer pacov) i pokazali su

da nakon zračenja mozga dozom od 15 Gy, dolazi do značajno povećane ekspresije citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , sa pikom oko 4 sata nakon zračenja (238). Pogoršanje neuroloških simptoma ili pojava neurološkog deficita može biti posledica i demijelinizacije nakon sprovedenog zračenja. Međutim, demijelinizaciju okolnog tkiva može izazvati i tumorska masa zbog kompresije na parenhim i krvne sudove, dok primena hemioterapije može dodatno dovesti do demijelinizacije (239).

Radioterapijom indukovani zamor (eng. *fatigue*) je jedan od najčešćih simptoma koji pacijenti imaju tokom zračne terapije, a ovaj simptom se može održavati i više nedelja ili meseci nakon završenog lečenja. Zamor većeg gradusa na skali toksičnosti može narušiti kvalitet života kod pacijenata. Mehanizam nastanka zamora je kompleksan. Kowalczyk i saradnici su predstavili podatke iz literature o patofiziologiji zamora indukovanog radioterapijom, te naveli više potencijalnih faktora koji mogu biti uzroci nastanka zamora. Neki od njih su genetski faktori, poremećena regulacija hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežne osovine, poremećena regulacija pojedinih transmitera, ali i mitohondrijalna disfunkcija, poremećen nivo citokina zapaljenski odgovor i prekid krvno-moždane barijere (240). Kako je nastanak zamora kod pacijenata kompleksan, treba uzeti u obzir i opterećenost bolešću, performans status i već postojeći neurološki deficit, druge primenjene modalitete onkološkog lečenja (hemioterapija, imunoterapija itd.), ali i pridružene bolesti koje mogu uticati na nastanak zamora ili stepen zamora, pojedinačno ili u sadejstvu jednih sa drugima. Ferris i saradnici su istraživali povezanost radioterapijske doze na pojedine strukture mozga i akutnog zamora kod pacijenata kod kojih se primenjuje radioterapija tumora regije glave i vrata (241). Navedeni autori zaključili su da maksimalna doza zračenja ( $D_{max}$ ) na moždano stablo i kičmenu moždinu je povezana sa povišenim rizikom za nastanak akutnog zamora (241). Jedan od nedostataka ove studije, kako su i sami istraživači naveli, jeste da nije bilo dozimetrijskih podataka za bazalne ganglije, a bazalne ganglije su prepoznate kao jedan od mogućih faktora rizika za nastanak zamora kod pacijenata kod kojih se sprovodi zračna terapija mozga. Kod pacijenata koji su na lečenju radioterapijom, zamor nastaje najčešće tokom druge ili treće nedelje lečenja, odnosno postepeno se pojačava do kraja lečenja. S druge strane, zamor kod primene hemioterapije dostiže svoj pik nekoliko dana nakon sprovedenog ciklusa hemioterapije (242).

U dostupnoj medicinskoj literaturi može se naći više studija koje se bave problemom neurokognitivnog oštećenja nakon primene zračne terapije na deo mozga (zračna terapija proširenog ležišta primarnog tumora mozga) ili ceo mozak (npr. kod metastaza u mozgu ili profilaktička zračna terapija celog mozga kod sitnoćelijskog karcinoma pluća). Cheng i saradnici su istraživali povezanost oštećenja prospektivnog pamćenja nakon primene zračne terapije celog mozga kod pacijenata sa metastazama u mozgu. U ovoj studiji korišćeno je nekoliko neuropsiholoških testova i zadataka, a istraživači su zaključili da postoji značajno oštećenje eng. *event-based prospective memory* - EBPM nakon sprovedene zračne terapije celog mozga (243). Na osnovu animalnog modela na glodarima, predložena su tri mehanizma nastanka kognitivnog oštećenja: teorija vaskularne paradigme, neuroinflamacija i neuroanatomska teorija. Teorijom vaskularne paradigme opisuju se vaskularna oštećenja u vidu ishemije, a potom i nekroza bele mase (244). Zbog gubitka oligodendrocita dolazi do aktivacije mikroglije zbog čega dolazi do povećanja reaktivnih kiseoničkih jedinjenja i citokina tj. neuroinflamacije (244). Hronična neuroinflamacija dovodi do smanjenja proliferacije neuralnih prekursora u hipokampusu (hipokampalna neurogeneza), što se ogleda u slabljenju kognicije. Neuroanatomska teorija podrazumeva da je slabljenje kognitivnih sposobnosti direktna posledica oštećenja pojedinih struktura u mozgu (244). Postavlja se pitanje da li ovi mehanizmi mogu postojati i u kojoj meri i kod parcijalnog zračenja mozga, odnosno dela mozga u kojem se nalazi tumor, prevashodno ako je tumor udaljen od zona od značaja (npr. hipokampus za očuvanje kognitivnih sposobnosti). Poslednjih nekoliko godina, istražuje se zračenjem indukovani eng. „*bystander*“ efekat, odnosno efekat zračenja na ćelije koje nisu „*target*“ ćelije, ali se nalaze uz *target* ćelije (245).

## 1.8.2. Toksičnost hemioterapije kod tumora mozga

Kod primene istovremene (konkomitantne) zračne terapije sa hemioterapijom, nekada je teško odvojiti toksičnost jedne terapije od druge. Međutim, svaka terapija ima svoje specifičnosti i samim tim jedna vrsta onkološkog lečenja češće može dovesti do određene toksičnosti.

Hemioterapija koja se primenjuje u lečenju glioma podrazumeva primenu temozolomida, preparata nitrozouree (karmustin, lomustin, fotemustin, nimustin), PCV protokol (prokarbazin, karmustin, vinkristin), irinotekan i platinskih derivati i ređe drugih cistostatika. Derivati nitrozouree najčešće dovode do hematološke toksičnosti i plućne fibroze.

U lečenju glioblastoma, u konkomitantnom i adjuvantnom pristupu lečenja standardno se primenjuje temozolomid u sklopu Stupovog protokola. Stup je 2005. godine u svom istraživanju naveo da je hematološka toksičnost gradusa 3 i gradusa 4 (prema eng. *Common Terminology Criteria for Adverse Events* - CTCAE, verzija 2) primećena kod 7% pacijenata u konkomitantnoj fazi lečenja (radioterapija i hemioterapija Temozolomidom). Kod adjuvantne primene temozolomida, 14% pacijenata je imalo hematološku toksičnost gradusa 3 i 4 (127). U konkomitantnom pristupu lečenja, od navedene toksičnosti gradusa 3 i 4, najviše pacijenata je imalo neutropeniju (4%), a kod adjuvantne primene temozolomida, najviše pacijenata je imalo trombocitopeniju (14%) (127). Zaista, mnoge studije potom su prijavile pojedinačne, različite hematološke toksičnosti, od mijelosupresije i pojave pancitopenije (246) i aplazije kostne srži, pa do hematoloških maligniteta, poput akutne mijeloidne leukemije (247). Pojedinačno, ali i kao posledica hematološke toksičnosti (limfopenija, neutropenija), pojedini pacijenti su imali različite bakterijske, virusne i gljivične infekcije (247). Jedna od najčešćih bakterijskih infekcija koja potencijalno može dovesti do teških pneumonija jeste infekcija bakterijom *Pneumocystis carinii*. Shodno tome, u profilaksi ove infekcije često se koristi trimetoprim-sulfametoksazol, po određenoj šemi.

Od nehematološke toksičnosti, Stup je u svojoj studiji zapazio da se zamor umerenog do teškog stepena javlja kod 26% pacijenata u grupi kod kojih je primenjena samo radioterapija. S druge strane, zamor umerenog do teškog stepena zabeležen je kod 33% pacijenata u grupi pacijenata kod kojih je primenjena konkomitantna radioterapija sa temozolomidom (127). Takođe, kod 5% pacijenata zabeležena je pojava tromboembolijskih događaja (127). Bae i saradnici su ispitivali pojavu hematološke i nehematološke toksičnosti kod 300 pacijenata sa gliomima gradusa 3 ili 4 kod kojih je temozolomid primenjen u konkomitantnom režimu sa radioterapijom, adjuvantnom ili palijativnom režimu. Njihovi rezultati su pokazali da je najveći broj pacijenata imao trombocitopeniju kao hematološku toksičnost (13.7%), dok su od nehematoloških toksičnosti najviše izražene mučnina (44.3%), povraćanje (37%), anoreksija (14.3%), glavobolja (10.7%), a zamor bio prisutan kod 10.3% pacijenata. Mehanizam toksičnosti temozolomida je i dalje potpuno nerazjašnjen. Međutim, vrlo često u studijama se navodi mogućnost genetske izmene u genima odgovornim za popravku DNK, kao i epigenetičko utišavanje MGMT promotora (84). S druge strane, kombinacija nekih lekova, poput antiepileptika sa temozolomidom može dovesti do mijelosupresije, a nekada i sam antiepileptik može dovesti do različitih hematoloških poremećaja (246,247).

Imajući u vidu da se toksičnost višeg gradusa retko događa kod primene temozolomida, uz dobru subjektivnu toleranciju pacijenata na ovaj lek i nekomplikovano uzimanje leka (per os), primena temozolomida je i dalje prva linija sistemske terapije (konkomitantno, potom adjuvantno) u vodećim svetskim protokolima lečenja glioblastoma.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati razlike u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a pre, tokom i nakon zračenja i mogući uticaj na akutnu toksičnost i utvrđivanje vremenskog profila uočenih promena za moguće predviđanje akutne toksičnosti kod bolesnika sa glioblastomom.
2. Uporediti promene nivoa ekspresije pojedinačnih miR-10b/21/34a kod pacijenata koji su razvili akutnu toksičnost i pacijenata bez akutne toksičnosti.
3. Ispitati povezanost između promene nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa kliničko- prognostičkim faktorima (veličina i lokalizacija tumora, patohistološki podtip i *IDH1* status) i ishodom lečenja kod bolesnika sa glioblastomom.
4. Ispitati nivo ekspresije miR-10b/21/34a kod operisanih bolesnika sa glioblastomom pre radioterapije i kod zdravih osoba u cilju utvrđivanja potencijalnih razlika u nivoima njihove ekspresije.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Pacijenti

U ovoj studiji je bilo uključeno 43 bolesnika sa glioblastomom koji su lečeni u Klinici za neurohirurgiju, na odeljenju za neuroonkologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije i u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Klinika za radiološku onkologiju i dijagnostiku, Služba radioterapije, počevši od oktobra 2017. godine do kraja 2020. godine, a koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje u istraživanje. Za istraživanja u okviru ove disertacije dobijena su odobrenja etičkih komisija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, broj 29/X-12 od 12.10.2017. i 1322/X-39 od 01.10.2020. Svaki bolesnik je pre uključivanja u istraživanja usmeno i pisano obavešten o istraživanju pri čemu je svaki bolesnik potpisao informisani pristanak za uključivanje u istraživanje.

Istraživanje je obuhvatilo bolesnike sa novodijagnostikovanim glioblastomom kod kojih je lečenje započeto operacijom (maksimalno bezbedna hirurška resekcija). Preoperativno, shodno protokolu, svim pacijentima je urađena kompjuterizovana tomografija i/ili magnetna rezonancija na osnovu koje se planirao operativni zahvat. Po dobijanju patohistološkog nalaza glioblastoma (ranije „glioblastom multiforme“), pacijenti su prikazani konzilijumu za tumore centralnog nervnog sistema, na kome je doneta odluka o nastavku lečenja specifičnom onkološkom terapijom. Shodno odluci konzilijuma, po protokolu, lečenje je potom nastavljeno primenom zračne terapije istovremeno (konkomitantno) sa hemioterapijom temozolomidom. Nakon završetka istovremene tj. konkomitantne faze lečenja, bolesnici su lečenje nastavili primenom adjuvantne hemioterapije temozolomidom, do ukupno šest ciklusa (Stupov protokol).

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: pojava alergije na hemioterapiju, pojava drugih komorbiditeta (kardio- i respiratorna insuficijencija, akutna insuficijencija bubrega), pojava akutnih hirurških stanja ili infektivnih stanja, primena hormonske terapije (sem kortikosteroidne terapije koja se primenjuje kod većine bolesnika sa glioblastomom kao simptomatska terapija).

Akutna toksičnost je procenjivana i ocenjivana nedeljno, primenom *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0* kriterijuma. U studiju, pored bolesnika sa glioblastomom, bila je uključena i grupa od 10 zdravih dobrovoljaca. Ova grupa je formirana radi praćenja korelacije promene nivoa mikro RNK kod bolesnika sa glioblastomom u odnosu na zdrave osobe. Akutna toksičnost koja je zabeležena, praćena i gradirana kod ovih pacijenata bila je pojava glavobolje, mučnine, povraćanja, epileptičkih napada, zamora, somnolencije, konfuzije i agitiranosti.

U toku istraživanja, praćenje i ispitivanje bolesnika odnosno određivanje nivoa mikro RNK iz uzoraka krvi bilo je po sledećoj dinamici: pre početka radioterapije, tokom radioterapije (nakon 15. zračenja) i nakon završetka radioterapije (nakon poslednje frakcije zračenja).

U toku istraživanja, procenjivan je i ishod bolesti. Definisani su sledeći parametri na osnovu kojih se procenjuje ishod bolesti: preživljavanje bez progresije bolesti – PFS (eng. *progression-free survival*) i ukupno preživljavanje – OS (eng. *overall survival*). Preživljavanje bez progresije bolesti definisano je kao vreme bez progresije bolesti od trenutka započinjanja zračne terapije i hemioterapije temozolomidom do trenutka progresije bolesti, dok je ukupno preživljavanje definisano kao vreme od postavljanje patohistološke dijagnoze glioblastoma do trenutka smrti pacijenata od bilo kog uzroka.

### 3.2. Planiranje zračne terapije

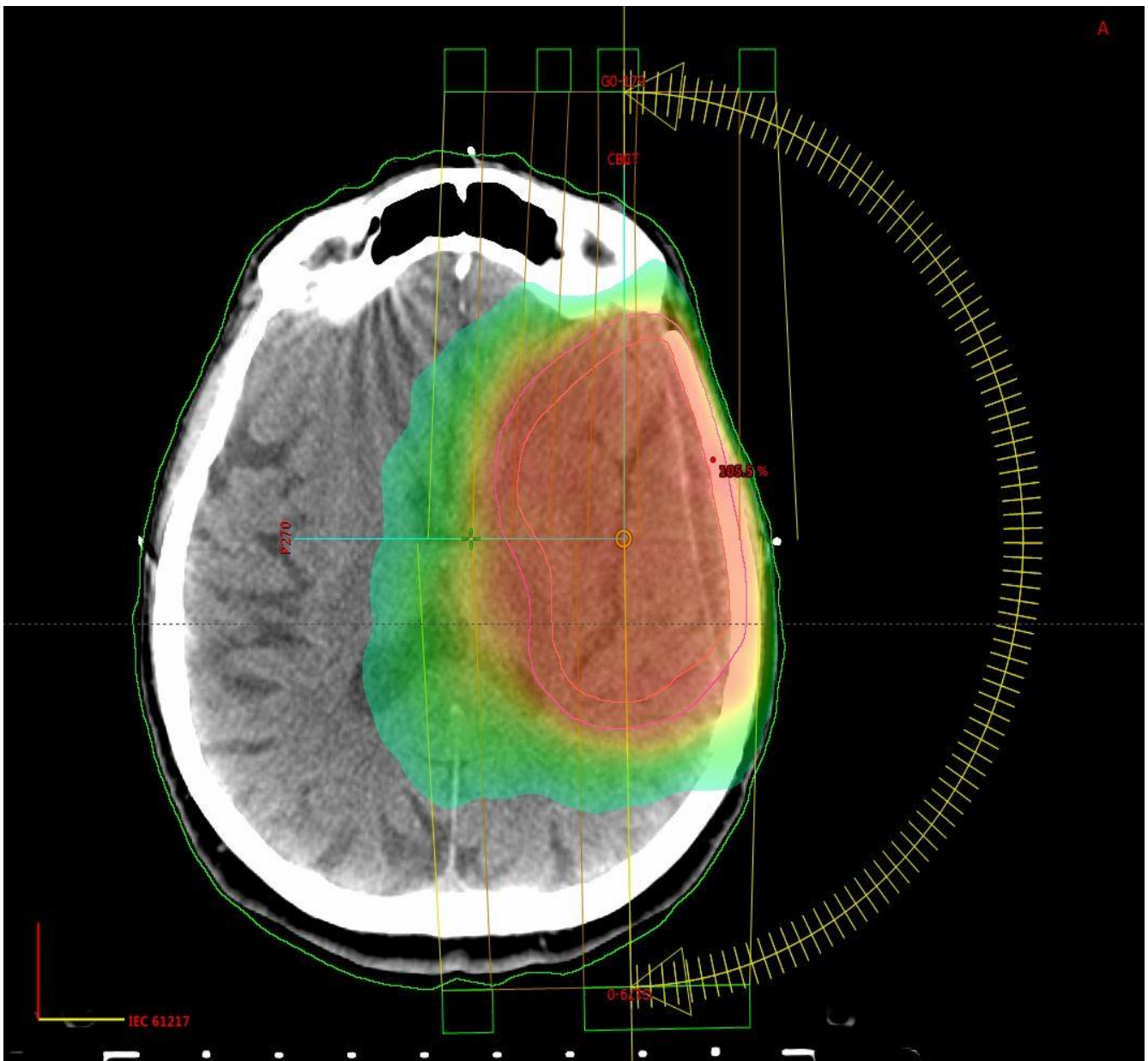
U sklopu osnovne obrade i pripreme za zračnu terapiju, učinjeni su osnovni laboratorijski testovi za procenu hematološke, renalne i funkcije jetre. Zračna terapija je planirana prema protokolu Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije koji je zasnovan na zvaničnim preporukama i vodiču za delineaciju ciljnih volumena kod radioterapije glioblastoma ESTRO-ACROP. Za adekvatno planiranje zračne terapije učinjena je termoplastična imobilizaciona maska, a potom i CT za planiranje zračne terapije. Postoperativno, kod pacijenta je učinjena i MR endokranijuma. Volumeni od interesa koji su delineisani: volumen tumora tj. GTV (*Gross Tumor Volume*), klinički volumen mete - CTV (*Clinical Target Volume*), planirani volumen mete - PTV (*Planning Target Volume*). Ciljni volumeni su delineisani prema EORTC preporukama za ciljne volumene u jednoj fazi lečenja, a koji su navedeni u ESTRO-ACROP vodiču. Za preciznu identifikaciju i delineaciju ciljnih volumena učinjena je fuzija imidžinga CT za planiranje zračne terapije (CT simulacija) i postoperativne MR endokranijuma. Po potrebi, učinjena je i fuzija sa preoperativnim MR endokranijuma. GTV je delineisan kao tumorska šupljina (kavum) ili ostatak/recidiv tumora koji je prikazan u vidu postkontrastnog pojačanja na T1 sekvenci MR endokranijuma. Klinički volumen mete je formiran dodavanjem margine od 2 cm na GTV. Prema vodiču, učinjena je korekcija CTV prema anatomskim barijerama, tako da CTV ne prelazi više od 0 mm na kost lobanje, 5 mm na moždane komore, 5 mm na šator malog mozga i srpastu pregradu velikog mozga (falks) i 0 mm za optičke živce i optičku raskrnicu. Planirani volumen mete je formiran, dodavajući izotropnu marginu od 3 - 5 mm na CTV. Takođe, učinjena je delineacija organa pod rizikom (OAR): očne jabučice, očni živci, očna sočiva, optička raskrsnica (hijazma), hipofiza, moždano stablo, mozak, oba unutrašnja uva (kohlee). Na ciljni volumen učinjena je preskripcija doze sa TD 60 Gy u 30 frakcija, 2 Gy dnevno po jednoj frakciji (frakcionisano, protrahovano zračenje), sa zahtevom da 95% izodoza pokriva 99% PTV. Takođe, učinjena je preskripcija doznih ograničenja za organe pod rizikom: očne jabučice (makula)  $D_{\max}$  45 Gy, očna sočiva  $D_{\max}$  10 Gy, očni živci  $D_{\max} < 54$  Gy, optička hijazma  $D_{\max} < 55$  Gy, moždano stablo  $D_{\max} < 54$  Gy i 1–10 cc  $< 59$  Gy, unutrašnje uvo  $D_{\text{mean}} < 45$  Gy.

Zračna terapija je planirana postoperativnom 3 - D konformalnom (3 - D CRT) ili volumetrijski modulisanom lučnom zračnom terapijom (VMAT) (prikaz VMAT planiranja na **slikama 21, 22, 23**). Aranžman zračnih polja učinjeni su od strane medicinskih fizičara potom i verifikacija zračnog plana na fantomu. Analiza i odobrenje planova zračne terapije učinjeni su u kooperaciji radijacionog onkologa i medicinskih fizičara.

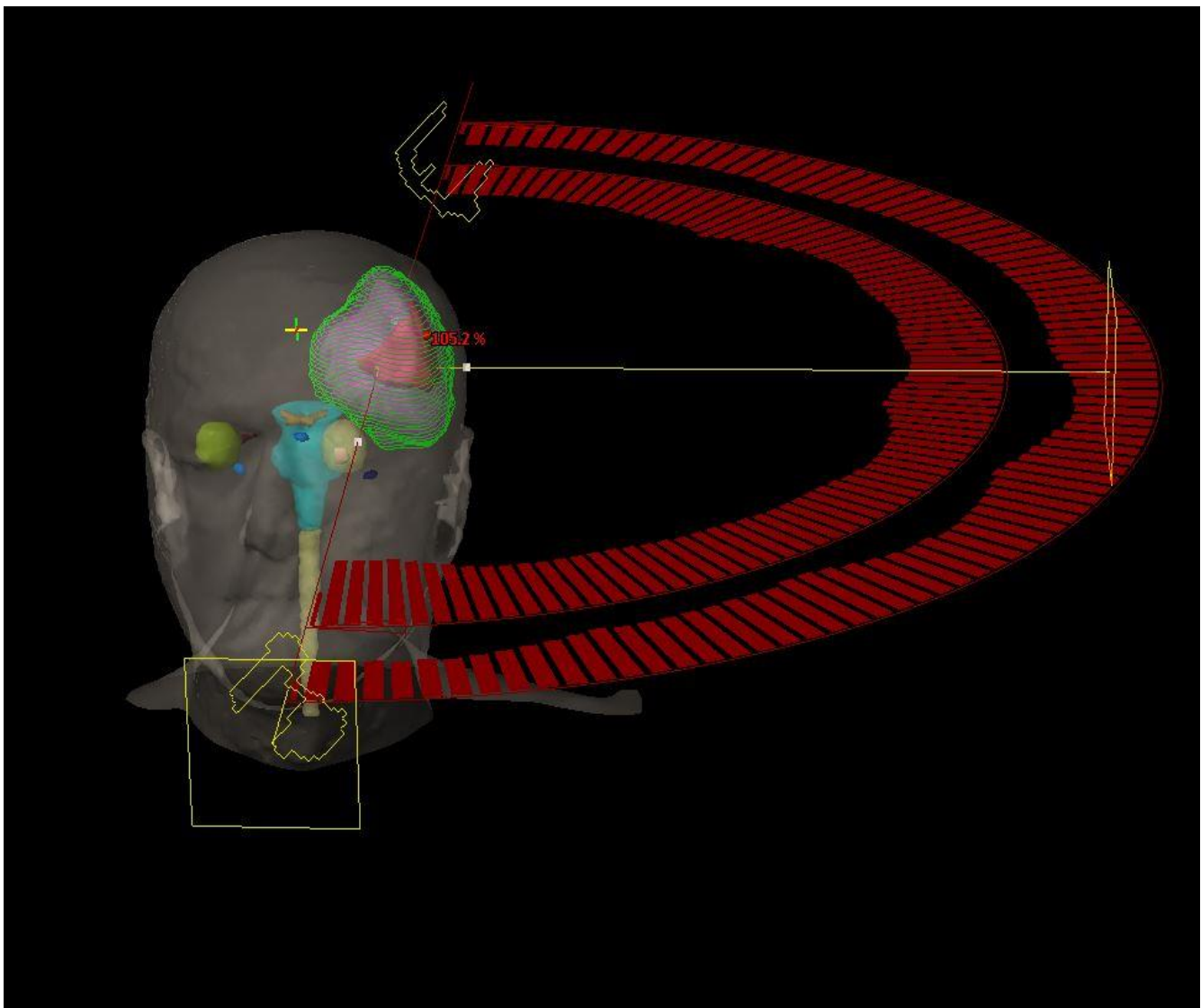
Zračna terapija je planirana na sistemima za planiranje zračne terapije: CMS XiO v4.8 (CMS Software, The Elekta group, Stockholm, Sweden) i Eclipse (u Eclipse v15.5; Varian Medical Systems, USA). Zračna terapija je po protokolu kod pacijenata sa glioblastomom započeta četiri do osam nedelja nakon operativnog lečenja. Zračna terapija je sprovedena na linearnim akceleratorima.

Na linearnom akceleratoru, za imobilizaciju i postavljanje bolesnika u „terapijski“ položaj i za upravljanje konzolom u komandnoj sobi bili su zaduženi radioterapijski tehničari/viši radiološki tehničari i strukovnih medicinski radiolozi. Minimum jednom nedeljno, a po potrebi i češće izvršeno je snimanje kilovoltaznim (KV) i megavoltaznim (MV) imidžingom, a po potrebi je rađen i *Cone beam* CT radi adekvatne provere pozicije pacijenta tokom trajanja zračne terapije. Dužina trajanja zračne terapije je bila ukupno 6 nedelja.

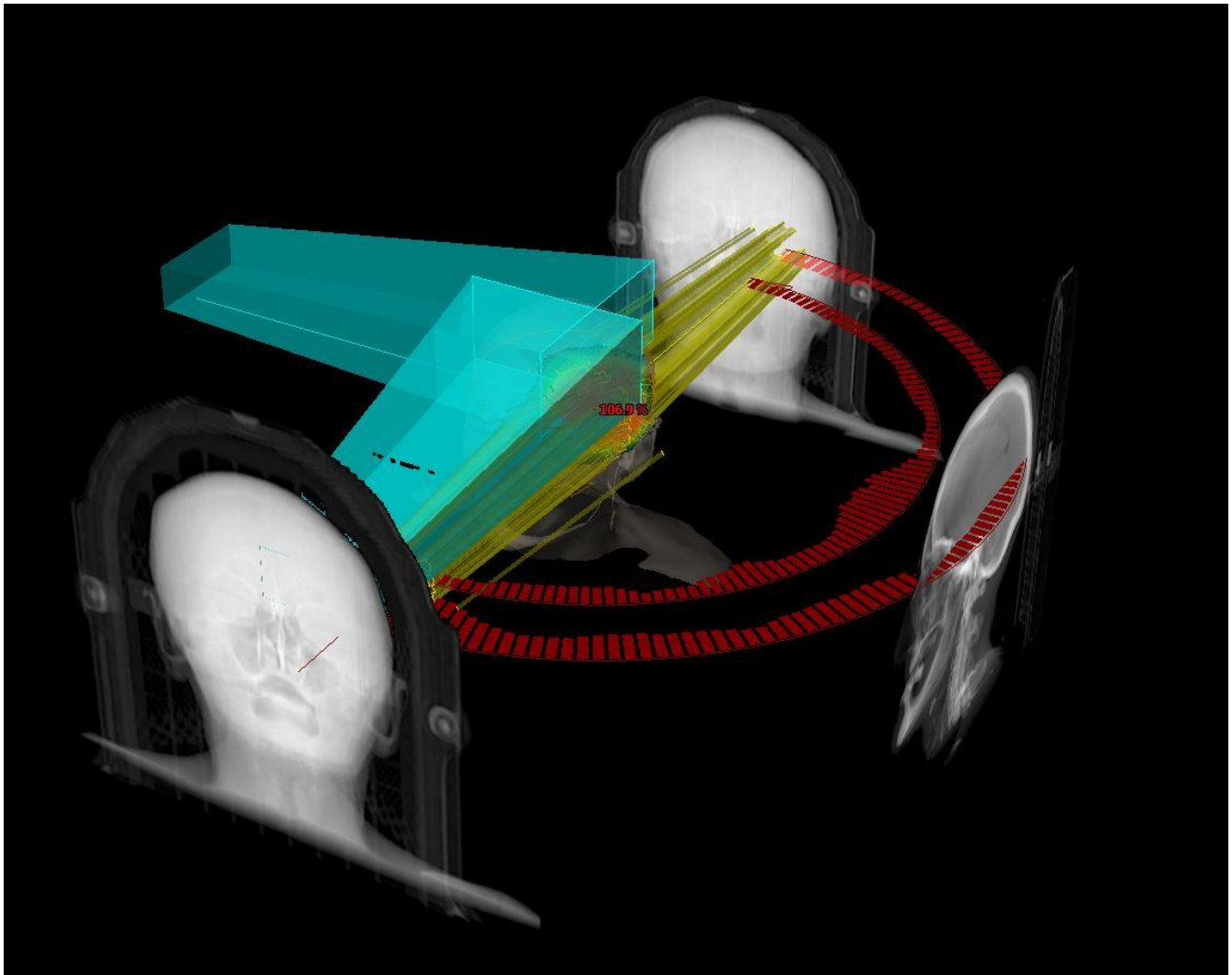




**Slika 21.** Ciljni volumeni CTV (narandžasta ivica) i PTV (roze ivica) na slici sa prikazanom izodoznom distribucijom (spektar boja, gde crvena prebojenost označava pokrivenost propisanom dozom, dok promena boja od žute ka zelenoj označava pad doze prema parenhimu mozga koji ne pripada ciljnom volumenu za zračnu terapiju). Krug sa linijama sa leve strane, označen trouglom na početku i kraju, označava simulaciju tehnike planiranja VMAT (*RapidArc*) (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)



**Slika 22.** Prikaz tehnike planiranja VMAT (RapidArc). Crveni polukrugovi simuliraju tehniku planiranja i sprovođenja zračne terapije na virtuelnom pacijentu. Zelenom bojom delineisana desna očna jabučica, oker bojom leva očna jabučica, narandžasta boja označava optičku raskrnicu, „cyan“ plava boja desni očni živac, tamno plava boja levi optički živac, žuta boja kičmenu moždinu, svetlo plava boja moždano stablo. Ciljni volumeni su prikazani punom bojom: crvena boja-GTV, ljubičasta boja CTV, zelena boja PTV (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)



**Slika 23.** Simulacija zračnih polja i tehnike zračenja volumetrijski modulisanom lučnom zračnom terapijom-VMAT (*RapidArc*) (*eye beam view*) (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

### 3.3. Primena hemioterapije

Zračna terapija je sprovedena u konkomitantnom pristupu sa hemioterapijom temozolomidom koji je primenjen u dozi od  $75 \text{ mg/m}^2$ , 7 dana nedeljno, od prvog do poslednjeg dana tokom radioterapije. Nakon 4 nedelje pauze, terapija je nastavljena adjuvantnom primenom temozolomida do 6 ciklusa, po standardnom protokolu (ciklus: 5 dana TMZ na svakih 28 dana). Primenjena je doza od  $150 \text{ mg/m}^2$  u toku prvog ciklusa. Od drugog ciklusa doza je povećana na  $200 \text{ mg/m}^2$ , kod svih pacijenata koji su dobro tolerisali hemioterapiju, tj. shodno protokolu lečenja, sa mogućnošću korekcije u vidu smanjenja doze shodno laboratorijskim pokazateljima ili privremenog odnosno trajnog prekida u slučaju toksičnosti višeg gradusa ili pogoršanja opšteg stanja.

### 3.4. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Za potrebe ispitivanja nivoa mikro RNK uzeti su uzorci od 6 ml krvi sa EDTA za svaku tačku praćenja bolesnika, koji su potom poslani na odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Vreme predviđeno od uzimanja uzorka do obrade uzorka bilo je do 45 minuta.

Mononuklearne ćelije periferne krvi su izolovane iz pune krvi sa EDTA centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću medijuma za separaciju (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich).

### 3.5. Izolovanje mikro RNK

Izolacija i prečišćavanje mikro RNK (miRNK) molekula iz limfocita, urađeno je korišćenjem Tri Reagent (Sigma Aldrich) prema protokolu proizvođača, i to 0,2 ml hloroforma i 0,5 ml izopropanola na 1 ml TRI reagensa, a zatim 1 ml 75% etanola rastvorenog u vodi bez nukleaza. Koncentracije izolovanih molekula miRNK izmerene su na BioSpec Nano spektrofotometru (Shimadzu corporation, Japan). Uzorci RNK su zatim kvantifikovani na BioSpec Nano (Shimadzu Corporation, Japan) spektrofotometru. Uzorci sa koeficijentom odnosa (eng. *odds ratio*) A260/280 NM između 1,7 i 2.1 smatrali su se adekvatnim za analizu.

U cilju kvantifikacije nivoa ekspresije, odnosno, količine molekula miRNK-21/10b/34a odnosu na endogenu kontrolu, RNU6B (identifikacioni broj 001093), korišćeni su specifični TaqMan®MicroRNA eseji sa identifikacionim brojevima: 002218, 000397 i 000426 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Za reakciju reverzne transkripcije korišćeno je 10 ng izolovane RNK i komponente Taqman®MicroRNA Reverse Transcription Kit-a (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Umnožavanje cDNK molekula urađeno je metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu korišćenjem prajmera sa petljom (Stem-Loop RT-qPCR) uz pomoć TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, UK) na 7500 Real Time PCR System aparatu (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Vrednosti relativne kvantifikacije analizirane su 7500 System SDS softverom (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), komparativnom delta delta Cycle threshold metodom (ddCt) pomoću formule  $RQ \text{ uzorak} = 2^{-(dCt \text{ uzorak} - dCt \text{ kalibrator})}$ ;  $dCt = Ct_{miR-10b/21/34a} - Ct_{RNU6B}$ . RQ predstavlja vrednost relativne kvantifikacije (eng. *relative quantity*).

### 3.6. Statistička analiza

Sve analize su urađene korišćenjem odgovarajućih statističkih testova (*Friedman Test*, *Wilcoxon signed rank test* i *Wilcoxon signed rank test* sa kontinualnom korekcijom, *Kruskall Wallis test*, *Spearman-ov* i *Pearson-ov test* korelacije, *Kaplan-Meier-ov test*). Korišćen je linearni *mixed-effect* model u paketu *lme4* za R statističko računarsko okruženje (R Core Team, Vienna, Austria, 2019) za svakog pojedinca u svim istraživanim vremenskim tačkama. Pored toga, korišćena je *Friedman-ova* dvosmerna analiza prilagođena *Bonferroni* korekcijom za višestruke uparene testove i *Wilcoxon signed rank test* sa

kontinualnom korekcijom (za poređenje ponovljenih merenja u dve i tri vremenske tačke). *Spearman* rank test korelacije korišćen je za korelacionu analizu između nivoa mikro RNK. *Fisher* egzaktni test upotrebljen je za proveru distribucije pacijenata u određenim grupama. *Mann-Whitney* test je korišćen za poređenje dve, a *Kruskall Wallis* test za upoređivanje 3 ili više grupa. Za analize korelacije nivoa ekspresije mikro RNK i kliničkih parametara korišćeni su *Pearson* i *Spearman* test, a za određivanje krive preživljavanja korišćen je Kaplan-Meier test. Za ispitivanje značajnosti razlike je korišćen *Log-Rank* (*Mantel-Cox* test). Statistička obrada za potrebe ove disertacije je urađena pomoću programa IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

### 3.7. Bioinformatička analiza

Kako bi se sprečio zajednički uticaj tri mikro RNK-10b/21/34a, korišćena je bioinformatička analiza miRNet. Internet mreža miRNet predstavlja bioinformatičku platformu baziranu na podacima o mikro RNK. Ova mreža integriše podatke o interakcijama mikro RNK sa genima i ima mogućnost da pronade mete, ukoliko više mikro RNK ima uticaja u različitim tkivima i bolestima (248).

Za analizu uobičajenih gena koji su povezani sa mikro RNK-10b/21/34a, unosni parametri bili su sledeći: Organism: *Homo sapiens*; ID Type: miRBase ID; Targets: Genes (miRtarBase v8.0). Takođe, istraživano je koji su signalni putevi aktivirani, prema Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) database - KEGG PATHWAY, koja predstavlja skup mape signalnih puteva sa interakcijom, reakcijom i mrežama između molekula određenog signalnog puta.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci i kliničko-patološke karakteristike pacijenata

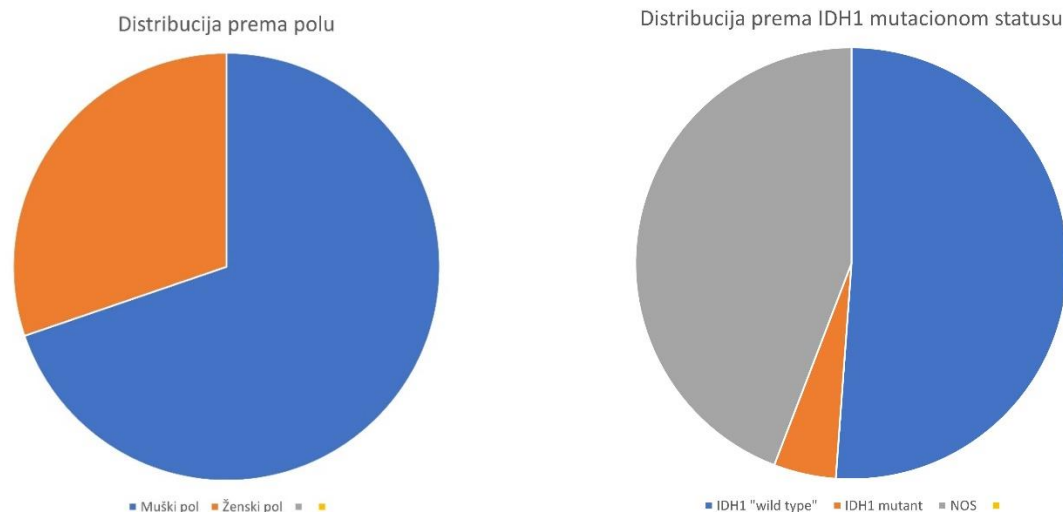
U istraživanje su bila uključena 43 pacijenta sa patohistološki verifikovanim glioblastomom. Najveći broj pacijenata je bio muškog pola (69.8%), dok je 30.2% pacijenata bilo ženskog pola. Prosečna starost pri dijagnozi bolesti bila je  $57.14 \pm 10.607$  (opseg 27 - 72). U grupi ispitivanih pacijenata, nije bilo pacijenata ECOG PS 0, 3 i 4. Najveći broj pacijenata (90.7%) u trenutku uključivanja u istraživanje, odnosno pre početka zračne terapije i hemioterapije temozolomidom imao je performans status 1.

Kod najvećeg broja pacijenata tumor je bio lokalizovan u slepoočnom režnju mozga sa udelom od 34.9%, a potom u čeonom režnju mozga sa udelom od 32.6%. Najređe su bile lokalizacije tumora u talamusu (2.3%), kao i zahvaćenost više režnjeva mozga (2.3%). Najveći broj tumora u mozgu bio je jednak ili veći od 4 cm (62.8%).

U odnosu na patohistološki tip ili podtip tumora, najčešće je dijagnostikovano glioblastom („konvencionalni glioblastom“) sa udelom od 90.7%, dok su od specifičnih entiteta ili obrazaca glioblastoma dijagnostikovani glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom kod jednog pacijenta (2.3%), dok je krupnoćelijski glioblastom dijagnostikovano kod 3 pacijenta (7%). Testiranje *IDH1* mutacionog statusa pokazalo je da je najveći broj pacijenata (91.2%) imalo glioblastom *IDH1-wild type*.

Distribucija pacijenata prema polu i *IDH* statusu mutacije je predstavljena na kružnim dijagramima na **slici 24**.

Detaljne demografske i kliničko-patološke karakteristike predstavljene su u **tabeli 1**.



**Slika 24.** Na prvom kružnom dijagramu nalazi se distribucija pacijenata prema polu, dok je na drugom kružnom dijagramu prikazana distribucija prema *IDH1* mutacionom statusu

**Tabela 1.** Demografske i kliničko-patološke karakteristike pacijenata

<b>Kliničko-patološke karakteristike pacijenata</b>	<b>Broj pacijenata (%) / Mean<sup>a</sup> + SD<sup>b</sup></b>
<b>Pol</b>	
Muški	30 (69.8%)
Ženski	13 (30.2%)
<b>Starost pri dijagnozi bolesti</b>	
	57.14 ± 10.607
<b>ECOG PS<sup>c</sup></b>	
1	39 (90.7%)
2	4 (9.3%)
<b>Lokalizacija tumora</b>	
Čeoni režanj	14 (32.6%)
Slepoočni režanj	15 (34.9%)
Temeni režanj	10 (23.3%)
Potiljačni režanj	2 (4.7%)
Multilobarni tumor	1 (2.3%)
Talamus	1 (2.3%)
<b>Veličina tumora</b>	
<4 cm	16 (37.2%)
≥4 cm	27 (62.8%)
<b>Histološki tip</b>	
Glioblastom	39 (90.7%)
Glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom	1 (2.3%)
Krupnoćelijski glioblastom	3 (7.0%)
<b>IDH1 mutacioni status</b>	
<i>IDH1-wild type</i>	22 (51.2%)
<i>IDH1-mutant</i>	2 (4.7%)
Glioblastoma, NOS	19 (44.2%)
<b>Operativno lečenje</b>	
Kompletna resekcija	38 (88.37%)
Subtotalna resekcija	5 (11.63%)
<b>Radioterapijska doza</b>	
60 Gy <sup>d</sup>	43 (100%)
<b>Hemioterapija sa temozolomidom</b>	
Konkomitantno sa RT	43 (100%)
Adjuvantni temozolomid	43 (100%)
<b>Antiepileptična terapija</b>	
Da	43 (100%)

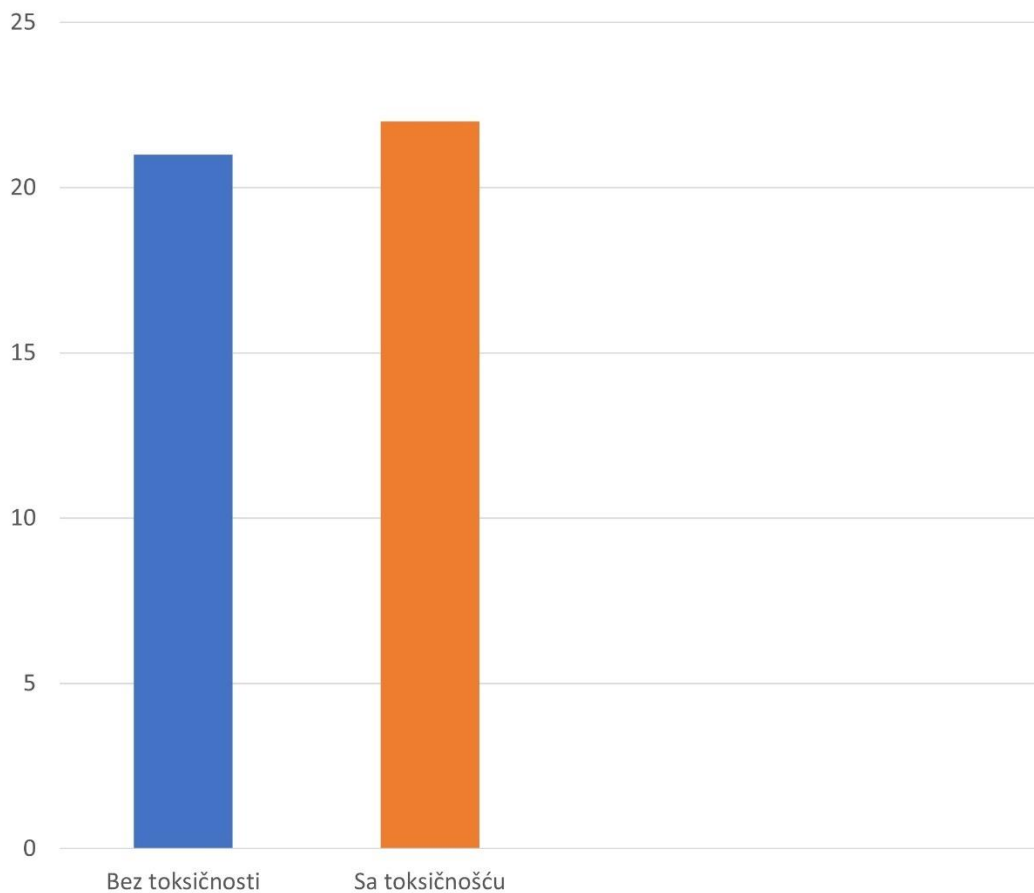
<sup>a</sup>Mean (eng.) – aritmetička sredina (mera centralne tendencije u statistici); <sup>b</sup>SD- standardna devijacija; <sup>c</sup>ECOG PS- The Eastern Cooperative Oncology Group performans status; <sup>d</sup>Gy-Grej



## 4.2. Ispitivanje toksičnosti

Toksičnost je zabeležena i ocenjena nedeljno tokom lečenja i gradirana prema CTCAE verzija 5.0. (toksičnost gradusa 1 - 4). Za potrebe istraživanja i korelacije sa nivoom ekspresije mikro RNK-10b/21/34a nedeljno je zabeležena i gradirana akutna toksičnost, a posebno analizirana na petnaestoj i tridesetnoj frakciji RT sa TMZ tokom lečenja.

Akutna toksičnost koja je zabeležena kod pacijenata bila je pojava glavobolje, mučnine, povraćanja, epileptičkih napada, zamora, somnolencije, konfuzije i agitiranosti. Druge toksičnosti nisu zabeležene. Pre početka zračne terapije sa hemioterapijom, pacijenti nisu imali nikakvu toksičnost jer nije otpočeta onkološka terapija, a lični lekovi koji su uzimali (npr. antiepileptički lekovi) nisu doveli do simptoma koji bi se preklapili sa nekim simptomima praćene toksičnosti. Od ukupno 43 pacijenata, 22 pacijenata je imalo neku od navedenih toksičnosti. Nije bilo toksičnosti gradusa 4. Grafički prikaz ukupne toksičnosti prikazan je na **slici 25**. Detaljniji podaci o toksičnosti nalaze se u **tabelama 2 i 3**.



**Slika 25.** Ukupna toksičnost kod pacijenata sa glioblastomom koja je zabeležena tokom lečenja u konkomitantnom pristupu lečenja radioterapijom i hemioterapijom sa temozolomidom



**Tabela 2.** Toksičnost na 15. frakciji RT sa TMZ

Gradus	Broj pacijenata	%
Bez toksičnosti	28	65.1
1	7	16.3
2	6	14.0
3	2	4.7
Ukupno	43	100

RT- radioterapija; TMZ- temozolomid

**Tabela 3.** Toksičnost na 30. frakciji RT sa TMZ

Gradus	Broj pacijenata	%
Bez toksičnosti	26	60.5
1	5	11.6
2	9	20.9
3	3	7.0
Ukupno	43	100

RT- radioterapija; TMZ- temozolomid

Grupe pacijenata sa i bez toksičnosti nisu se statistički razlikovali u distribuciji prema polu i prosečnoj starosti, prema *Pearson Chi-Square* testu,  $p = 0.817$  i Studentovom T-testu,  $p = 0,736$  (**tabela 4**).

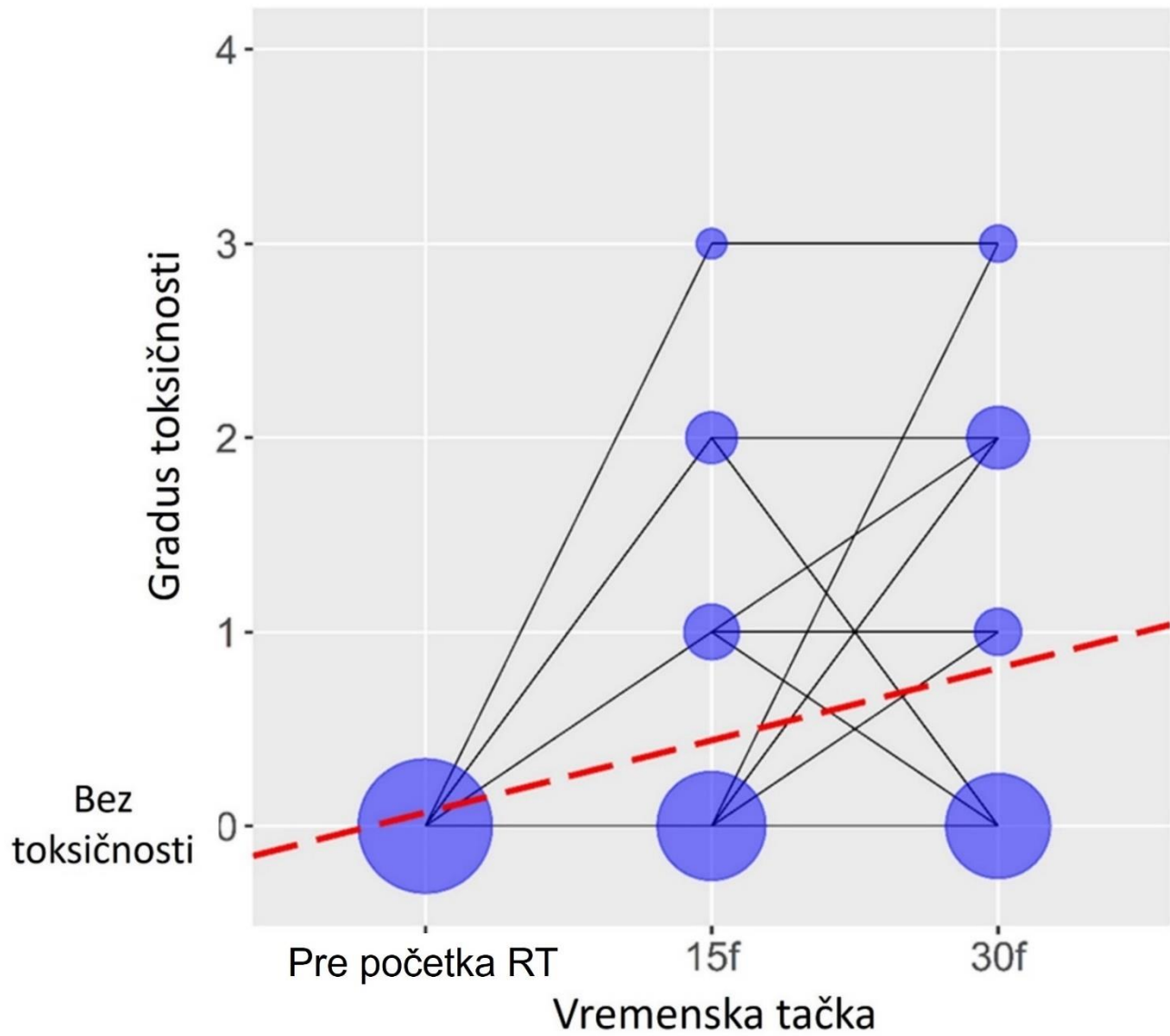
Distribucija frekvencije pacijenata podeljenih u grupe u skladu sa statusom *IDH1* mutacije pokazala je da je značajno veći broj pacijenata bez toksičnosti bio u grupi sa statusom *IDH1-wild type*, dok su pacijenti sa toksičnošću pretežno bili distribuirani u grupi pacijenata „*not other specified*“ (NOS) ( $p = 0.016$ , Fisher's exact test, **tabela 4**).

**Tabela 4.** Kliničke karakteristike pacijenata. Razlike između grupa pacijenata sa i bez toksičnosti grupe. Starost pri dijagnozi predstavljena je kao *mean* ± standardna devijacija

Kliničke karakteristike pacijenata	Broj (%) pacijenata po grupi/ <i>mean</i> <sup>a</sup> ± standardna devijacija	Razlike između grupa, <i>p</i> vrednosti
<b>Pol</b>		
Ženski bez toksičnosti	6 (28.6%)	<i>p</i> = 0.817
Ženski sa toksičnošću	7 (31.8%)	
Muški bez toksičnosti	15 (71.4%)	
Muški sa toksičnošću	15 (68.2%)	
<b>Starost pri dijagnozi</b>		
Bez toksičnosti	56.57 ± 8.060	<i>p</i> = 0.736
Sa toksičnošću	57.68 ± 12.748	
<b>Pacijenti bez toksičnosti</b>	21 (48.8%)	
<b>Pacijenti koji su imali bilo koju toksičnosti (u bilo kojoj tački praćenja)</b>	22 (51.2%)	
Toksičnost na 15. frakciji	15 (68.2%)	
Bez toksičnosti na 15. frakciji	7 (31.8%)	
Toksičnost na 30. frakciji	17 (77.3%)	
Bez toksičnosti na 30. frakciji	5 (22.7%)	
<b>Gradus radiotoksičnosti na 15. frakciji</b>		
1	7 (46.7%)	
2	6 (40%)	
3	2 (13.3%)	
<b>Gradus radiotoksičnosti na 30. frakciji</b>		
1	5 (29.4%)	
2	9 (52.9%)	
3	3 (17.6%)	
<b>IDH1 mutacioni status</b>		
Mutant bez toksičnosti	1 (4.8%)	<i>p</i> = 0.016
Mutant sa toksičnošću	1 (4.5%)	
„Wild type“ bez toksičnosti	15 (71.4%)	
„Wild type“ bez toksičnosti	7 (31.8%)	
NOS <sup>b</sup> bez toksičnosti	5 (23.8%)	
NOS <sup>b</sup> sa toksičnošću	14 (63.6%)	
<b>Histološki podtip</b>		
Glioblastom bez toksičnosti	21 (100%)	<i>p</i> = 0.167
Glioblastom sa toksičnošću	18 (81.8 %)	
Glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom bez toksičnosti	0 (0.0%)	
Glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom sa toksičnošću	1 (4.5%)	
Krupnoćelijski glioblastom bez toksičnosti	0 (0.0%)	
Krupnoćelijski glioblastom sa toksičnošću	3 (13.6%)	

<sup>a</sup>Mean (eng.) – aritmetička sredina; <sup>b</sup>NOS-not other specified

Prema *Mixed-effect* linearnom modelu, utvrđeno je statistički značajno povećanje gradusa toksičnosti tokom vremena zračne terapije konkomitantno sa TMZ ( $b = 0.372$ ,  $p < 0.001$ , **slika 26**).



**Slika 26.** Gradus toksičnosti tokom vremena lečenja radioterapijom i hemioterapijom temozolomidom. Gradus toksičnosti se ocenjivao od 1 do 4; u našem istraživanju nisu zabeležene toksičnosti gradusa 4. „Bez toksičnosti“ predstavlja pacijente pre početka zračne terapije sa hemioterapijom (*baseline*) i ne predstavlja gradus; 15f i 30f predstavljaju 15. i 30. frakciju zračne terapije

Istraživan je nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a kod 43 pacijenta u tri vremenske tačke (odnosno analizirano je 129 uzoraka za svaki mikro RNK molekul) i to pre početka konkomitantne RT sa TMZ (eng. *baseline*), na 15. frakciji zračne terapije i nakon poslednje, tj. 30. frakcije zračne terapije.

Pored toga, svaka mikro RNK pojedinačno je uključena u dodatnu univarijantnu analizu, odnosno svaka mikro RNK analizirana je zasebno. Ove tri ispitivane mikro RNK nisu uzete u obzir za multivarijantni model, zbog svoje multikolinearnosti tj. visoke pozitivne korelacije jedne među drugom u svim vremenskim tačkama.

Univarijantna analiza je pokazala da su viši nivoi ekspresije miR-10b i miR-21 pretežno povezani sa većim gradusom toksičnosti, ( $b = 0.0006$ ,  $p = \mathbf{0.014}$ ;  $b = 0.0008$ ,  $p = \mathbf{0.013}$ , **tabela 5**).

Nivoi ekspresije miR-34a nisu povezani sa gradusom toksičnosti ( $b = 0.0005$ ;  $p = 0.400$ ).

**Tabela 5.** Univarijantna analiza miR-10b/21/34a i stepen toksičnosti

Mikro RNK	Vremenska tačka			Univarijantna analiza <sup>a</sup>	
	Pre početka RT	15f	30f	b	<i>p</i> vrednost <sup>b</sup>
<b>miR-10b</b>	111.28 (2.13 - 816.89)	92.99 (1.00 - 922.88)	117.78 (1.47 - 2751.50)	0.0006	<b>0.014</b>
<b>miR-21</b>	62.38 (2.68 - 825.43)	50.53 (2.79 - 960.07)	61.56 (1.00 - 1940.21)	0.0008	<b>0.013</b>
<b>miR-34a</b>	12.05 (1.00 - 210.55)	37.35 (3.48 - 352.38)	82.94 (2.94 - 871.28)	0.0005	0.400

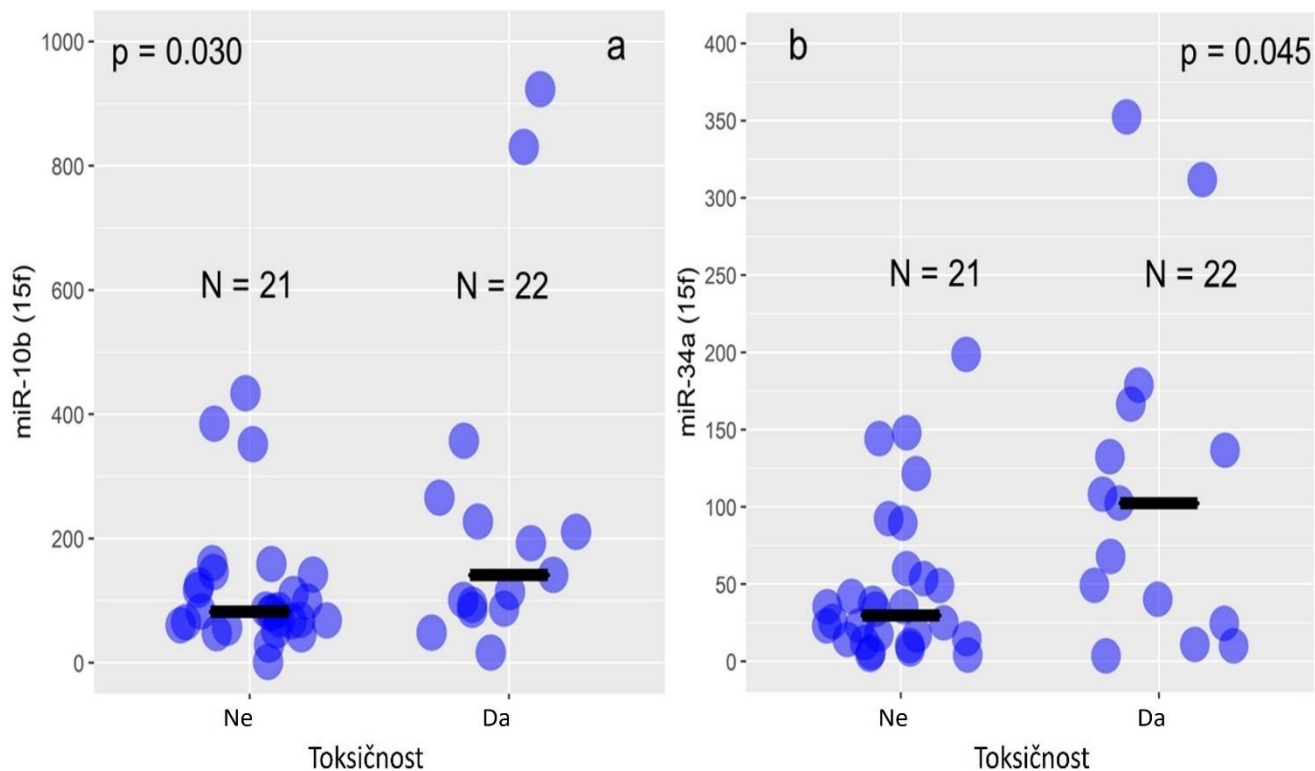
<sup>a</sup>Univarijantni regresioni modeli sa stepenom toksičnosti kao zavisnim varijablama. Medijane vrednosti ekspresije mikro RNK sa opsegom minimum-maksimum u zagradama predstavljene su za početne vrednosti (*baseline*), za 15. frakciju (15f) i 30. frakciju zračne terapije (30f); <sup>b</sup>*p* vrednosti jednake ili manje od 0.05 su statistički značajne (podebljan stil).

Poredeći grupe bez toksičnosti i sa toksičnošću na 15. frakciji zračne terapije, rezultati su pokazali statistički značajno više nivoe ekspresije miR-10b i miR-34a u grupi pacijenata koji su imali toksičnost. ( $p = 0,030$  i  $p = 0,045$ , *Mann–Whitney U* test) (tabela 6, slika 27). Nije bilo statistički značajne razlike između grupa u tački pre početka zračne terapije (*baseline*) i na 30. frakciji zračne terapije ( $p = 0.747$  i  $p = 0.941$ ).

**Tabela 6.** Razlike u nivoima relativne ekspresije miR-10b/21/34a između pacijenata bez toksičnosti i sa toksičnošću, pre početka zračne terapije, na 15. i 30. frakciji zračne terapije sa TMZ

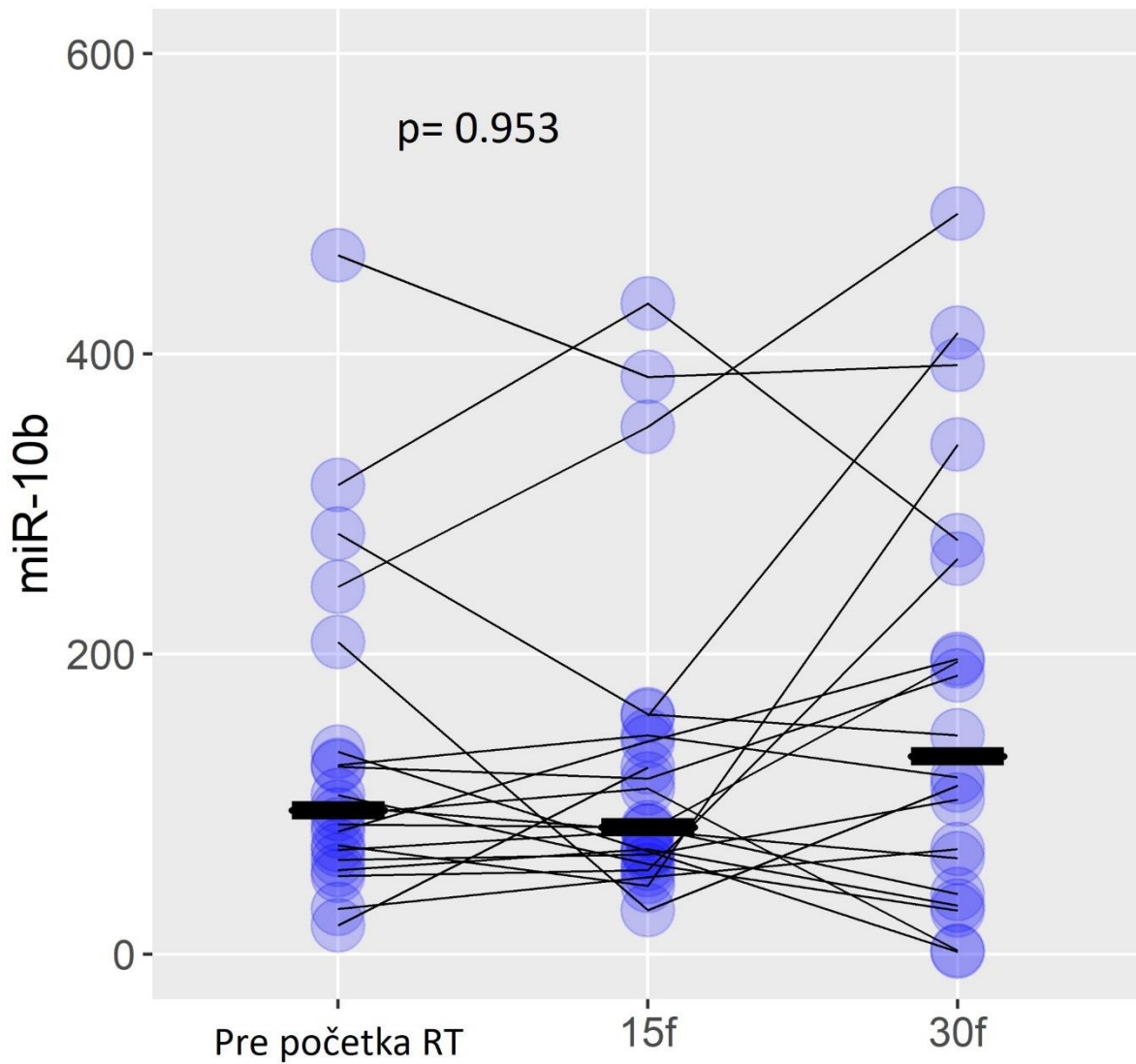
<sup>a</sup> MiR-10b nivo relativne ekspresije			
	Bez toksičnosti	Sa toksičnošću	<i>p</i> vrednost sa toksičnošću vs bez toksičnosti
<b>Pre RT<sup>b</sup></b>	98.43 (19.24 - 622.53)	147.51 (2.13 - 816.89)	
<b>15f<sup>c</sup></b>	84.62 (29.22 - 433.53)	95.47 (1.00 - 922.88)	<b>0.030</b>
<b>30f<sup>d</sup></b>	145.71 (1.47 - 631.66)	112.95 (14.59 - 2751.50)	0.747
<b><i>p</i> vrednost pre RT vs 15f vs 30f</b>	0.953	0.834	
<sup>a</sup> MiR-21 nivo relativne ekspresije			
	Bez toksičnosti	Sa toksičnošću	<i>p</i> vrednost sa toksičnošću vs bez toksičnosti
<b>Pre RT</b>	40.84 (5.82 - 278.98)	73.48 (2.68 - 825.43)	
<b>15f</b>	30.80 (4.37 - 542.32)	80.39 (2.79 - 960.07)	0.108
<b>30f</b>	52.35 (1.00 - 340.62)	68.53 (7.86 - 1940.21)	0.882
<b><i>p</i> vrednost pre RT vs 15f vs 30f</b>	0.229	0.142	
<sup>a</sup> MiR-34a nivo relativne ekspresije			
	Bez toksičnosti	Sa toksičnošću	<i>p</i> vrednost sa toksičnošću vs bez toksičnosti
<b>Pre RT</b>	10.05 (1.55 - 105.20)	15.81 (1.00 - 210.55)	
<b>15f</b>	25.72 (5.78 - 198.64)	63.92 (3.48 - 352.38)	<b>0.045</b>
<b>30f</b>	49.25 (2.94 - 871.28)	89.44 (7.51 - 853.35)	0.941
<b><i>p</i> vrednost pre RT vs 15f vs 30f</b>	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	

<sup>a</sup>Medijane nivoa relativne ekspresije miR-10b/21/34a sa minimumom i maksimumom u zgradama; <sup>b</sup>RT- radioterapija; <sup>c</sup>15f-15. frakcija zračne terapije; <sup>d</sup>30f- 30. frakcija zračne terapije; *p* vrednosti jednake ili manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim u skladu sa rezultatima *Wilcoxon's signed rank* testa (između 2 grupe) i *Friedman's* testa za upoređivanje 3 grupe (podebljan stil); *p* vrednosti između 0,1 i 0,05 smatrane su statističkim trendom.

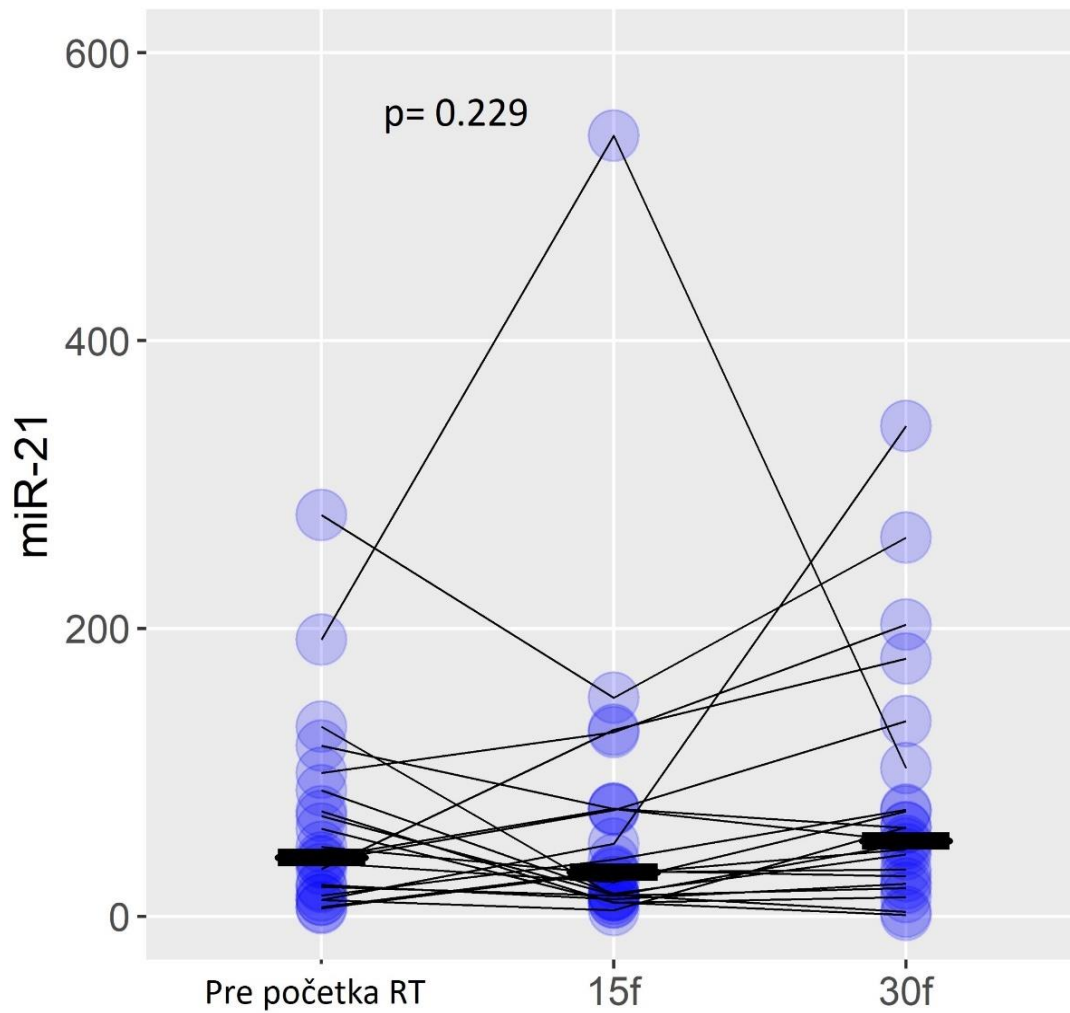


**Slika 27.** Poređenje između pacijenata sa i bez toksičnosti na 15. frakciji zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije miR-10b (a) i miR-34a (b) (RQ *relative quantity units*) u svakoj analiziranoj grupi sa i bez toksičnosti na 15. frakciji RT (15f)

Promene nivoa ekspresije miR-10b/21/34a tokom zračne terapije sa konkomitantnim temozolomidom kod pacijenata bez toksičnosti predstavljene su grafički na slikama 28, 29, i 30.



**Slika 28.** Promene nivoa ekspresije miR-10b tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-10b kod pacijenata bez toksičnosti;  $p$  predstavlja statističku vrednost; 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija



**Slika 29.** Promene nivoa ekspresije miR-21 tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-21 kod pacijenata bez toksičnosti;  $p$  predstavlja statističku vrednost; 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija

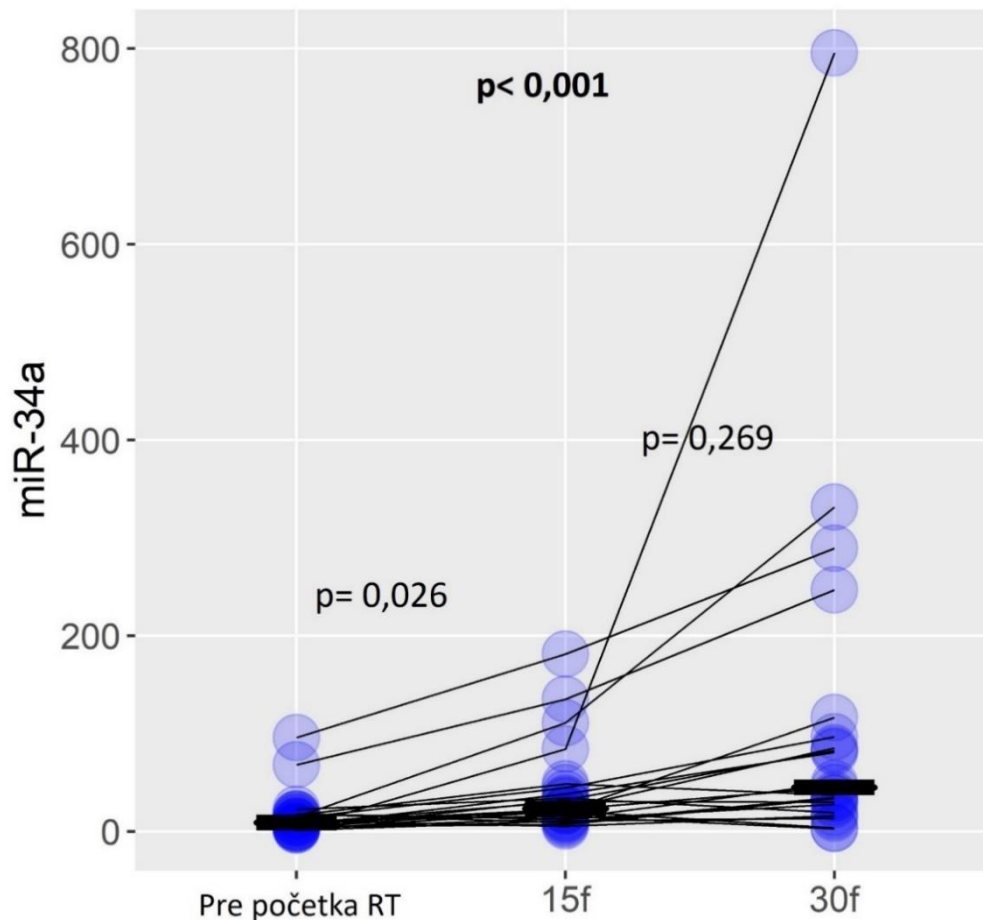


U okviru grupe pacijenata bez toksičnosti (N = 21) nivoi ekspresije miR-34a bili su značajno povišeni na 15. i 30. frakciji zračne terapije u odnosu na početne vrednosti ekspresije miR-34a, odnosno pre početka zračne terapije ( $p < 0.001$  Friedman test, **tabela 6, slika 30**).

Pored toga, urađen je test *pairwise comparison* između početnih vrednosti sa 15. frakcijom zračne terapije, početnih vrednosti sa 30. frakcijom zračne terapije i između 15. i 30. frakcije zračne terapije. Značajne vrednosti su prilagođene koristeći metod *Bonferroni* korekcije za višestruko testiranje.

Nivoi ekspresije miR-34a bili su statistički značajno veći na 15. frakciji u poređenju sa početnim vrednostima ekspresije pre zračne terapije (*Wilcoxon's test*,  $p = 0.026$ , **slika 30**), kao i na 30. frakciji u poređenju sa početnim (*baseline*) nivoima ekspresije miR-34a (Friedman's test,  $p < 0.001$ , **tabela 6, slika 30**).

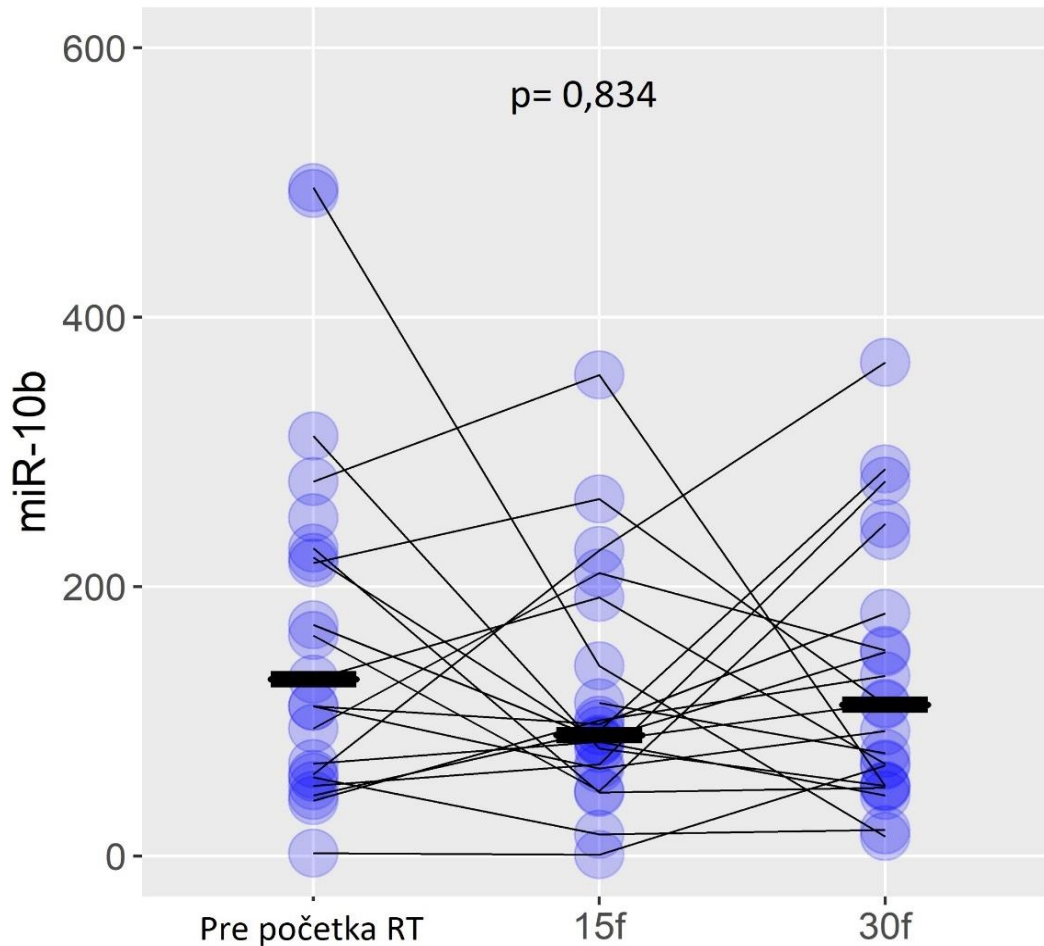
Nivoi ekspresije miR-34a nisu se statistički značajno razlikovali između 15. i 30. frakcije zračne terapije (*Wilcoxon's test*,  $p = 0.269$ , **slika 30**). Treba napomenuti da su medijane miR-34a bile najviše na 30. frakciji zračne terapije.



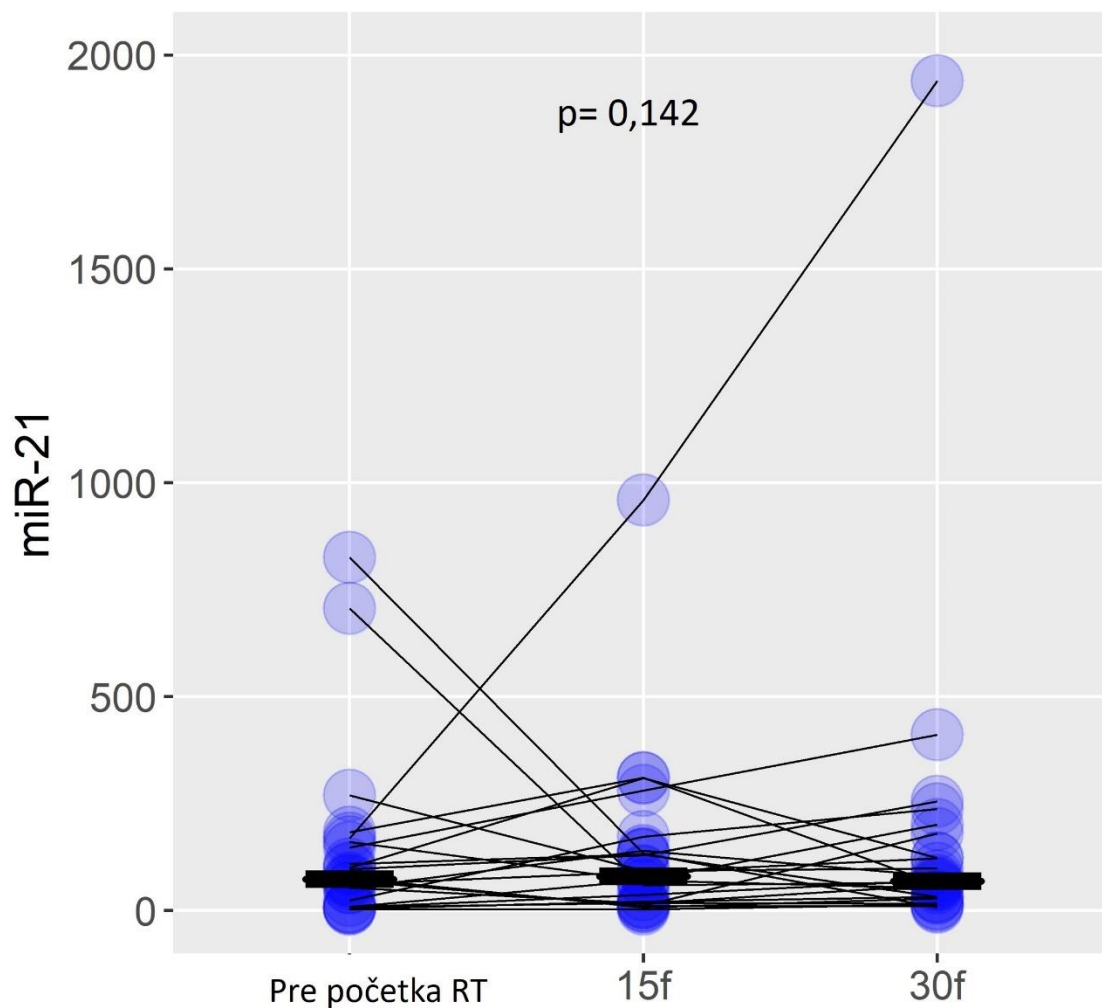
**Slika 30.** Promene nivoa ekspresije miR-34a tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-34a kod pacijenata bez toksičnosti;  $p$  predstavlja statističku vrednost; 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija

Situacija je bila slična u grupama pacijenata koji su imali toksičnost tokom zračne terapije (N = 22).

Promene nivoa ekspresije miR-10b/21/34a tokom zračne terapije sa konkomitantnim temozolomidom kod pacijenata sa toksičnošću predstavljene su grafički na slikama 31, 32, i 33.



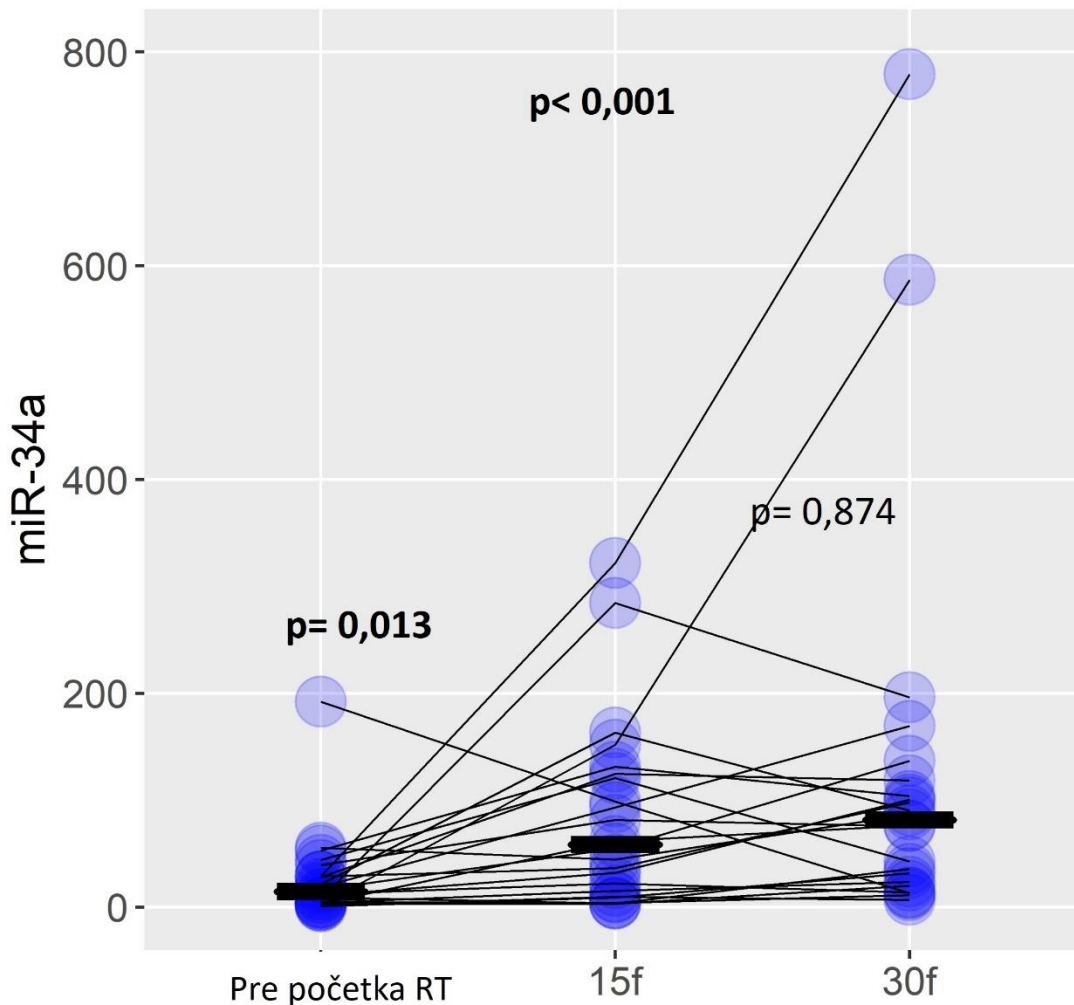
**Slika 31.** Promene nivoa ekspresije miR-10b tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-10b kod pacijenata sa toksičnošću;  $p$  predstavlja statističku vrednost; 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija



**Slika 32.** Promene nivoa ekspresije miR-21 tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-21 kod pacijenata sa toksičnošću;  $p$  predstavlja statističku vrednost. 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija

Nivoi ekspresije miR-34a su se statistički značajno razlikovali kod pacijenata sa toksičnošću između početnih (*baseline*) vrednosti (pre početka zračne terapije), 15. frakcije i 30. frakcije zračne terapije (*Friedman's test*  $p < 0.001$ , **tabela 6, slika 33**).

Nivoi ekspresije miR-34a bili su značajno viši na 15. i 30. frakciji u odnosu na početne vrednosti, dok se nivoi ekspresije miR-34a između 15. i 30. frakcije nisu značajno razlikovali (*Wilcoxon's test*,  $p = 0.013$ ,  $p < 0.001$ , i  $p = 0.874$ , **slika 33**).



**Slika 33.** Promene nivoa ekspresije miR-34a tokom zračne terapije sa TMZ. Ljubičaste tačke predstavljaju svakog pacijenta, dok crna podebljana horizontalna linija predstavlja medijanu ekspresije (RQ *relative quantity units*) za miR-34a kod pacijenata sa toksičnošću; p predstavlja statističku vrednost. 15f i 30f-15. i 30. frakcija zračne terapije; RT-radioterapija

## Korelaciona analiza

Značajne pozitivne korelacije uočene se među sve tri ispitivane mikro RNK, u sve tri praćene vremenske tačke, što ukazuju na to da se sve tri mikro RNK menjaju i prate isti profil smera u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u odgovoru na lečenje (**tabela 7**).

Najjače korelacije (sa najvišim korelacionim koeficijentom) su pronađene između:

1. miR-10b i miR-21 na 15-oj frakciji kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću (rho = 0.950,  $p < 0.001$ , Spearman's test),
2. miR-21 i miR-34a na 30-oj frakciji kod pacijenata bez ispoljene toksičnosti (rho = 0.856,  $p < 0.001$ , Spearman's test),
3. miR-21 i miR-34a na 15-oj frakciji kod pacijenata bez ispoljene toksičnosti (rho = 0.846,  $p < 0.001$ , Spearman's test),
4. miR-21 i miR-34a na 15-oj frakciji kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću (rho = 0.807,  $p < 0.001$ , Spearman's test).

**Tabela 7.** Korelacije među nivoima ekspresije miR-10b/21/34a

Varijabla 1	Varijabla 2	<sup>a</sup> N	Vremenska tačka	Toksičnost	Korelacioni koeficijent	<i>p</i> vrednosti
miR-10b	miR-21	28	15 f <sup>b</sup>	Ne	rho = 0.441	$p = 0.019$
miR-10b	miR-34a	28	15 f	Ne	rho = 0.376	$p = 0.049$
miR-21	miR-34a	28	15 f	Ne	rho = 0.846	$p < 0.001$
miR-10b	miR-21	15	15 f	Da	rho = 0.950	$p < 0.001$
miR-10b	miR-34a	15	15 f	Da	rho = 0.789	$p < 0.001$
miR-21	miR-34a	15	15 f	Da	rho = 0.807	$p < 0.001$
miR-10b	miR-21	26	30 f	Ne	rho = 0.644	$p < 0.001$
miR-10b	miR-34a	26	30 f	Ne	rho = 0.590	$p = 0.002$
miR-21	miR-34a	26	30 f	Ne	rho = 0.856	$p < 0.001$
miR-10b	miR-21	17	30 f	Da	rho = 0.762	$p < 0.001$
miR-10b	miR-34a	17	30 f	Da	rho = 0.434	$p = 0.082$
miR-21	miR-34a	17	30 f	Da	rho = 0.770	$p < 0.001$

<sup>a</sup>N-broj pacijenata; *p* vrednost jednaka ili manja od 0.05 je smatrana značajnom (podebljan stil); <sup>b</sup>f-frakcija

## Bioinformatička analiza

Prema miRNet-u (miRNA-centric network visual analytics platform bioinformatics tool), postoji 6 uobičajenih ciljnih gena za miR-10b/21/34a: *Breast cancer type 1 susceptibility gene (BRCA1)*, *Kelch repeat and BTB domain-containing protein 6 (KBTBD6)*, *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (MKNK2)*, *peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)*, *tropomyosin 1 (TPM1)* i *nuclear FMR1 interacting protein 2 (NUFIP2)* koji su delovi signalnih puteva mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (*mitogen-activated protein kinase- MAPK*), insulina, dilatativne kardiomiopatije, receptora aktiviranih proliferatorom peroksizoma (*peroxisome proliferator-activated receptor- PPAR*), adipocita, Fankonijeve anemije, hipertrofične kardiomiopatije i signalnih puteva kontrakcije srčanog mišića.

### 4.3 Povezanost između promene nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa kliničko-prognostičkim faktorima i ishodom bolesti

#### 4.3.1. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa veličinom tumora

Ispitivana je povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa veličinom tumora (tumor manji od 4 cm i tumor jednak ili veći od 4 cm) u sve tri vremenske tačke praćenja (ekspresija mikro RNK pre RT, na 15. frakciji i 30. frakciji RT) (**tabela 8**).

Za miR-10b pronađena je statistička značajnost za veličinu tumora manjeg od 4 cm ( $p = 0.027$ ) u tački praćenja pre početka RT. Odnosno, uočen je statistički značajno viši nivo ekspresije miR-10b kod pacijenata koji su imali tumore manje od 4 cm. Nije bilo statistički značajne razlike u vremenskim tačkama na 15. i 30. frakciji RT.

Za miR-21 pronađena je statistička značajnost za tumor manji od 4 cm ( $p = 0.047$ ) u tački pre početka RT. Odnosno, uočen je statistički značajno viši nivo ekspresije miR-21 kod pacijenata koji su imali tumore manje od 4 cm. Nije bilo statistički značajne razlike u vremenskim tačkama na 15. i 30. frakciji RT.

Nivo ekspresije nije bio statistički značajan za veličinu tumora ni u jednoj tački praćenja za miR-34a.

**Tabela 8.** Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa veličinom tumora

	<b>Tumor manji od 4 cm</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>miR-10b pre RT<sup>a</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	214.86 (2.13 - 816.89)	<b><i>p</i> = 0.027</b>
<b>miR-10b 15<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	115.37 (1.00 - 384.54)	<i>p</i> = 0.763
<b>miR-10b 30<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	112.87 (14.59 - 493.53)	<i>p</i> = 0.940
<b>miR-21 pre RT</b> medijana ( <i>min-max</i> )	81.69 (11.39 - 825.43)	<b><i>p</i> = 0.047</b>
<b>miR-21 15<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	37.94 (4.37 - 542.32)	<i>p</i> = 0.340
<b>miR-21 30<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	55.95 (7.86 - 202.81)	<i>p</i> = 0.407
<b>miR-34a pre RT</b> medijana ( <i>min-max</i> )	18.09 (1.91 - 210.55)	<i>p</i> = 0.159
<b>miR-34a 15<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	39.64 (4.04 - 311.70)	<i>p</i> = 0.624
<b>miR-34a 30<sup>f</sup></b> medijana ( <i>min-max</i> )	68.27 (12.48 - 363.04)	<i>p</i> = 0.940

<sup>a</sup>RT-radioterapija; <sup>f</sup>f-frakcija; statistički značajna *p* vrednost naznačena podebljanim fontom (*bold*)

### 4.3.2. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa lokalizacijom tumora i patohistološkim tipom tumora

Zbog nepovoljnog odnosa broja različitih lokalizacija tumora (čeoni režanj-14 pacijenata, slepoočni režanj 15, temeni režanj-10 pacijenata, potiljačni režanj-2 pacijenta, multilobarni tumor-1 pacijent, talamus-1 pacijent) i potencijalnih prediktora, nije bilo moguće raditi poređenje u odnosu na svaku lokalizaciju posebno. Takođe, nije bilo moguće statistički porediti patohistološke podtipove zbog nepovoljnog odnosa broja podtipova: 39 pacijenata je imalo glioblastom, 1 pacijent je imao glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom, dok su 3 pacijenta imala krupnoćelijski glioblastom.

Umesto toga, a shodno podacima iz literature, napravljene su 3 grupe za poređenje lokalizacije tumora sa nivoima ekspresije miR-10b/21/34a u tački pre početka RT, i to: tumori u čeonom režnju (frontalni), tumori u slepoočnom režnju (temporalni) i tumori u drugim lobusima (ostalo) (**tabela 9**) (Kruskal-Wallis test).

**Tabela 9.** Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa lokalizacijom tumora

	<b>Medijana (min-max)</b>	<b>p vrednost</b>
<b>miR-10b</b>		
Čeoni režanj	153.23 (2.13 - 622.53)	$p = 0.675$
Slepoočni režanj	92.99 (41.18 - 816.89)	
Ostale lokalizacije	102.18 (30.09 - 465.62)	
<b>miR-21</b>		
Čeoni režanj	81.69 (11.42 - 825.43)	$p = 0.183$
Slepoočni režanj	53.48 (2.68 - 706.23)	
Ostale lokalizacije	35.70 (5.82 - 278.98)	
<b>miR-34a</b>		
Čeoni režanj	15.96 (4.65 - 210.55)	$p = 0.273$
Slepoočni režanj	10.05 (1.00 - 61.01)	
Ostale lokalizacije	7.60 (1.55 - 105.20)	



### 4.3.3. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa *IDH1* mutacionim statusom

Zbog nepovoljnog odnosa broja ishoda i potencijalnih prediktora, nije bilo moguće raditi poređenja u odnosu na *IDH1* status sa 3 grupe (22 pacijenta je imalo glioblastom, *IDH1-wild type*, 2 pacijenta je imalo glioblastom, *IDH1* mutant, dok je 19 pacijenata imalo glioblastom, NOS). Shodno podacima iz literature o prognostičkom značaju postojanja i odsustva mutacije, napravljene su 2 grupe za procenu povezanosti nivoa ekspresije miR-10b/21/34a: glioblastom *IDH1-wild type* i glioblastom, *IDH1*-mutant + NOS. Rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a u 2 navedene grupe (**tabela 10**).

**Tabela 10.** Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa *IDH1* mutacionim statusom

	<i>IDH1-wild type</i>	<i>IDH1-mutant+NOS</i> <sup>a</sup>	<i>p</i> vrednost
<b>miR-10b pre RT</b> <sup>b</sup> medijana ( <i>min-max</i> )	130.44 (52.20 - 622.53)	94.61 (2.13 - 816.89)	<i>p</i> = 0.234
<b>miR-10b 15f</b> <sup>c</sup> medijana ( <i>min-max</i> )	83.35 (16.03 - 433.53)	100.70 (1.00 - 922.88)	<i>p</i> = 0.451
<b>miR-10b 30f</b> medijana ( <i>min-max</i> )	131.75 (1.47 - 493.53)	102.96 (2.32 - 2751.50)	<i>p</i> = 0.560
<b>miR-21 pre RT</b> medijana ( <i>min-max</i> )	57.16 (2.68 - 278.98)	69.74 (4.60 - 825.43)	<i>p</i> = 0.903
<b>miR-21 15f</b> medijana ( <i>min-max</i> )	30.53 (2.79 - 542.32)	70.57 (4.37 - 960.07)	<i>p</i> = 0.451
<b>miR-21 30f</b> medijana ( <i>min-max</i> )	60.56 (1.00 - 410.72)	62.03 (3.11 - 1940.21)	<i>p</i> = 0.981
<b>miR-34a pre RT</b> medijana ( <i>min-max</i> )	13.52 (3.16 - 105.20)	10.11 (1.00 - 210.55)	<i>p</i> = 0.662
<b>miR-34a 15f</b> medijana ( <i>min-max</i> )	34.48 (3.48 - 198.64)	41.93 (4.04 - 352.38)	<i>p</i> = 0.504
<b>miR-34a 30f</b> medijana ( <i>min-max</i> )	51.42 (2.94 - 363.04)	88.52 (3.71 - 871.28)	<i>p</i> = 0.644

<sup>a</sup>NOS-Not other specified <sup>b</sup>RT-radioterapija; <sup>c</sup>f-frakcija

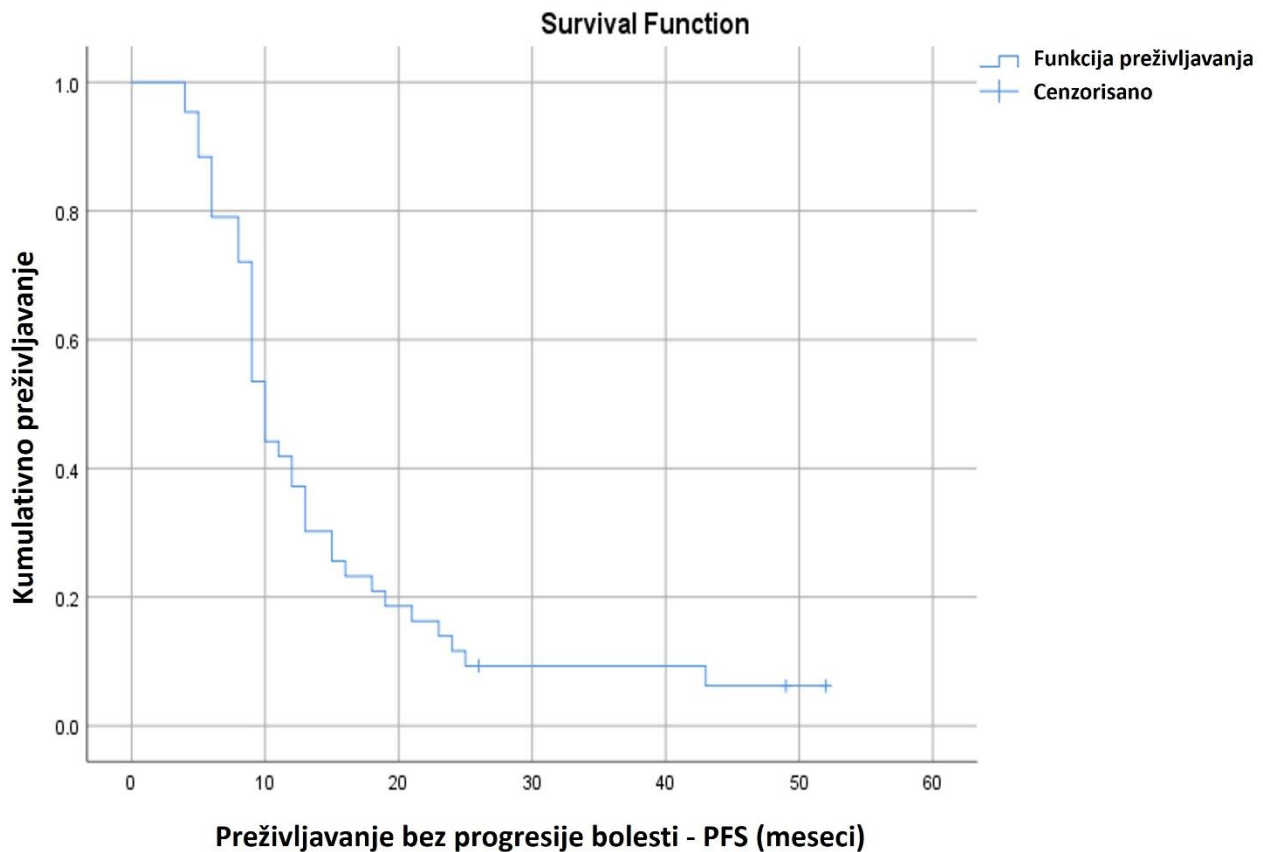
#### 4.3.4. Povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa preživljavanjem bez progresije bolesti (PFS) i ukupnim preživljavanjem (OS)

U okviru ishoda bolesti, praćeno je vreme do progresije bolesti (PFS), kao i ukupno preživljavanje (OS).

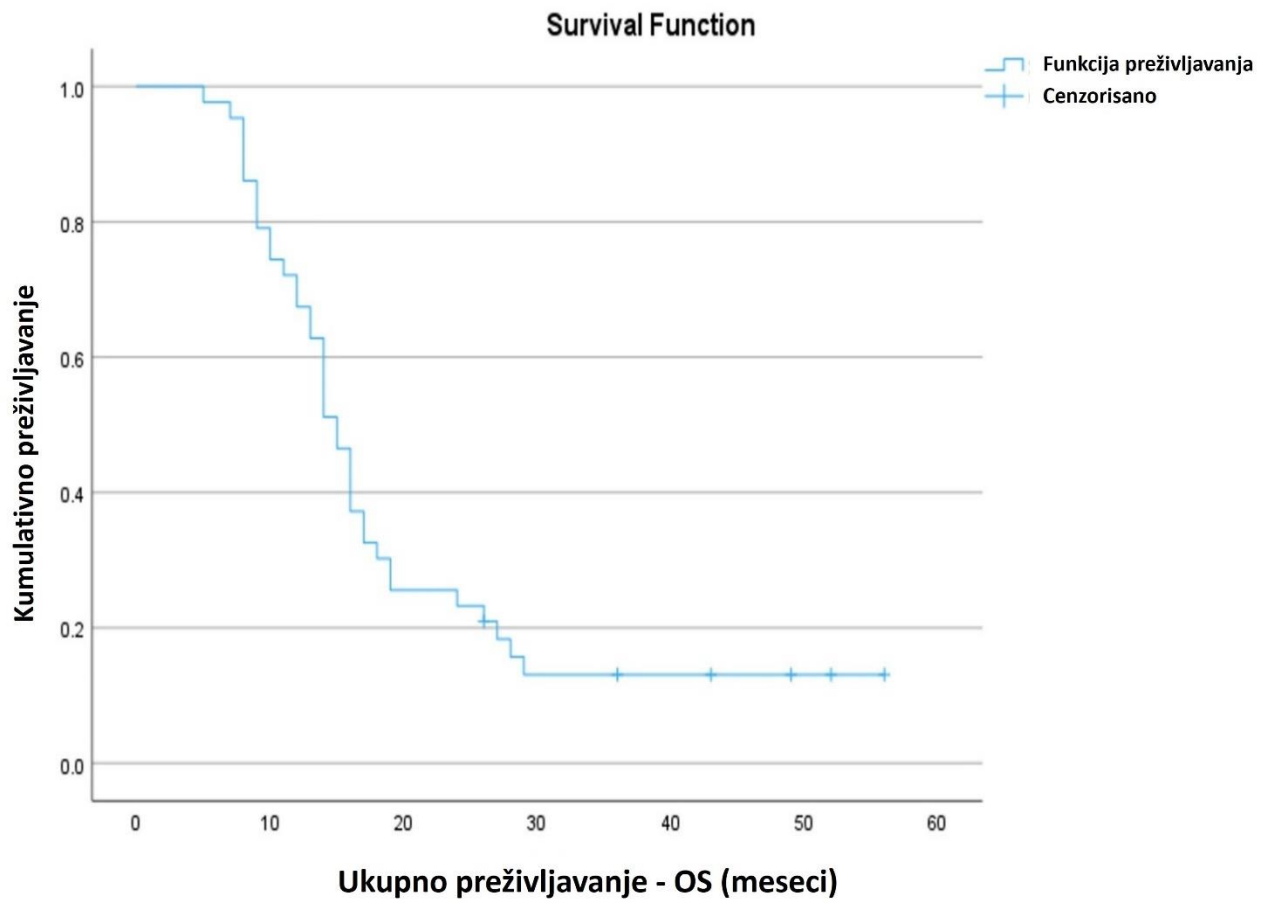
Od 43 pacijenta uključena u istraživanje koji su redovno praćeni na kontrolama do novembra 2022. godine, progresiju bolesti imalo je 40 pacijenata (93%), dok je preminulo ukupno 37 pacijenata (86%).

Medijana preživljavanja bez progresije bolesti je bila 10 meseci (8.936 - 11.064 CI 95%) (**slika 34**).

Medijana ukupnog preživljavanja u ispitivanoj grupi pacijenata bila je 15 meseci (13.25 - 16.75 CI 95%) (**slika 35**).



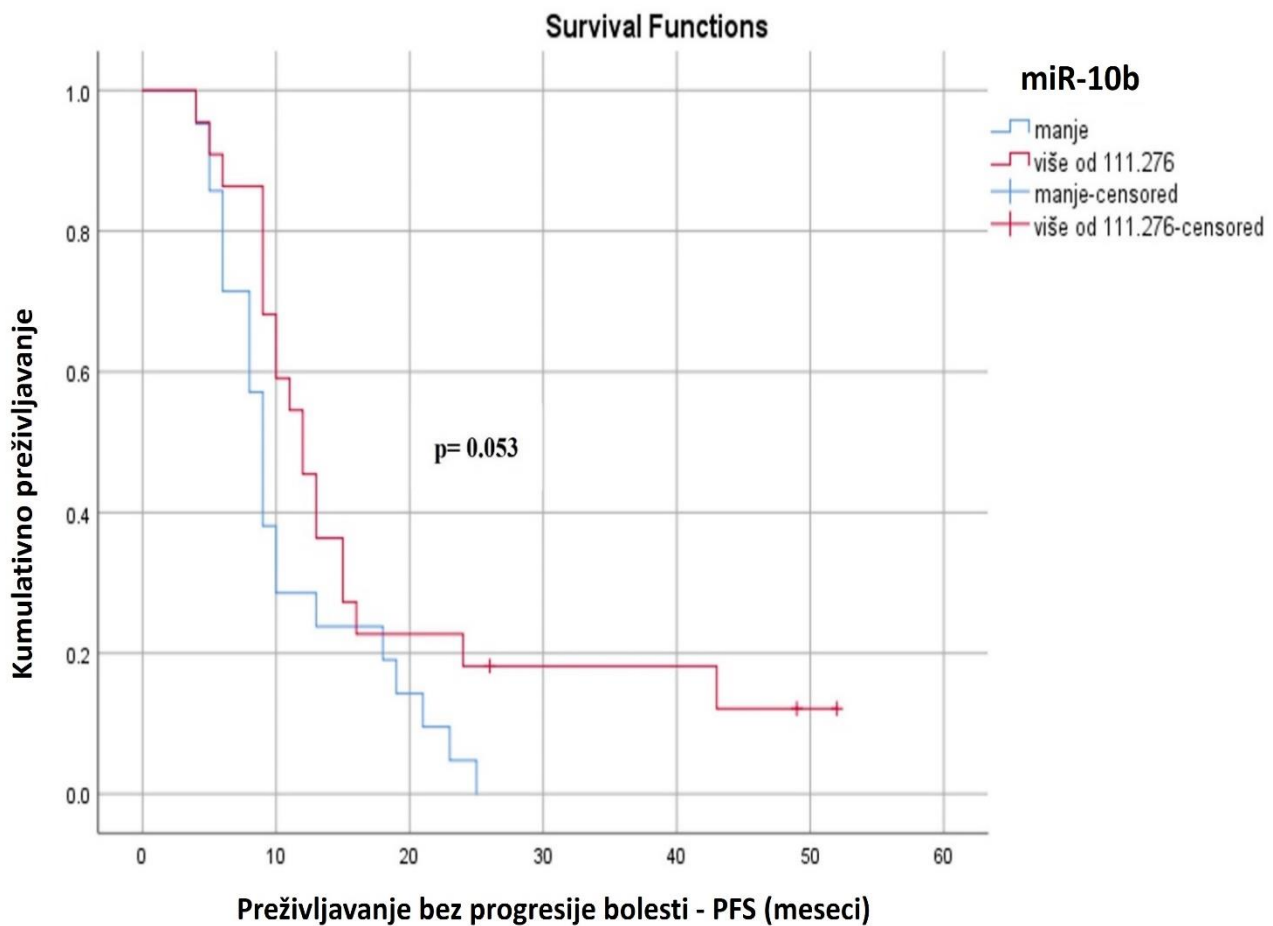
**Slika 34.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez progresije bolesti (PFS)



**Slika 35.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata u mesecima

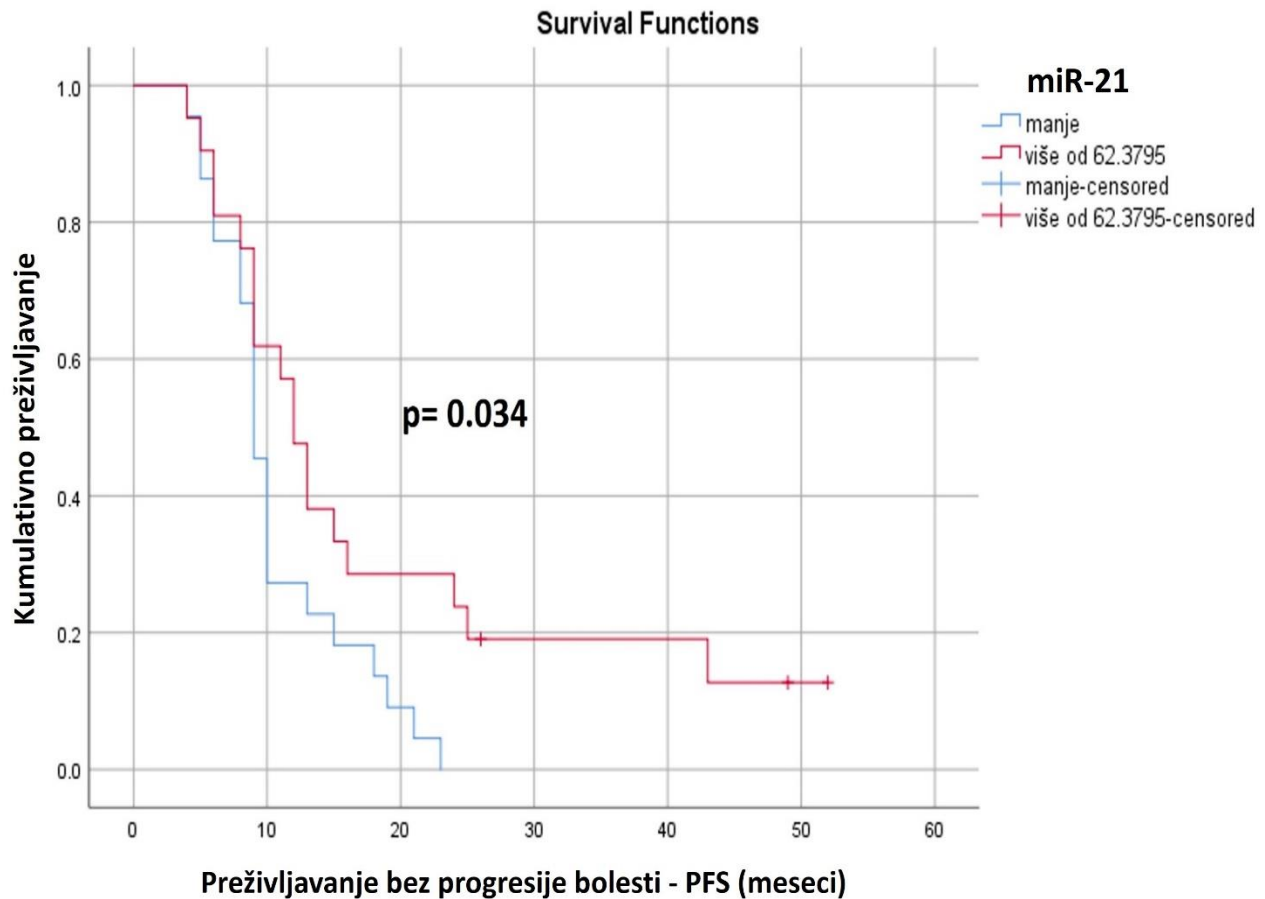
Poređene su razlike u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a, ispod i iznad medijane (*low* miR i *high* miR) i ishodom lečenja (PFS, OS).

Prema *Log-Rank Mantel-Cox* testu, poredeći vreme preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-10b (*low* miR i *high* miR), p vrednost je granična (statistički trend) ( $p = 0.053$ ), govoreći u prilog tome da vrednost ekspresije miR-10b iznad medijane (*high* miR) može biti povezana sa dužim periodom preživljavanja bez progresije bolesti (**slika 36**).



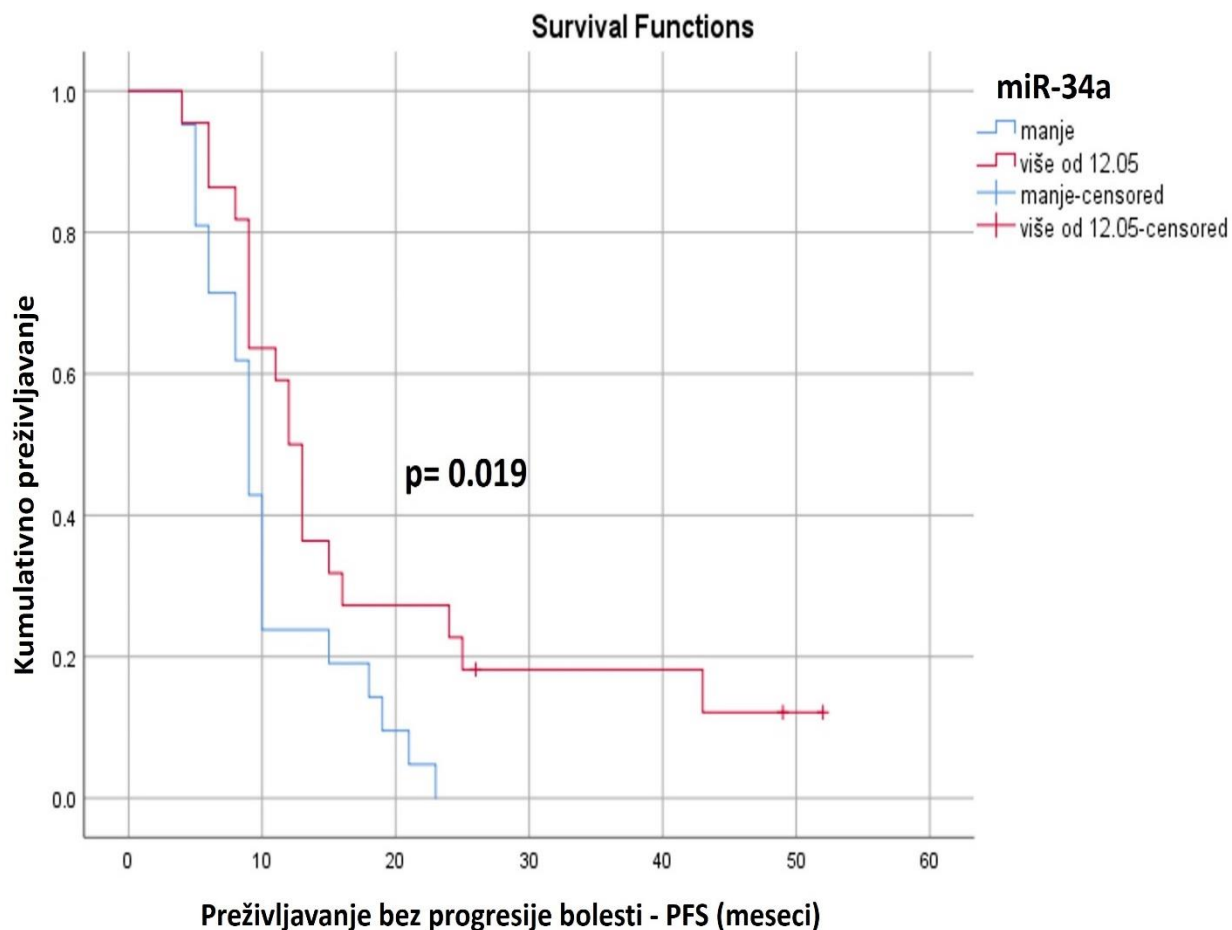
**Slika 36.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja pacijenata bez progresije bolesti (PFS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-10b

Shodno *Log-Rank Mantel-Cox* testu, poredeći preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-21 (*low* miR i *high* miR), utvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju bez progresije bolesti za vrednosti ekspresije miR-21 iznad medijane (više od 62.3795),  $p = 0.034$  (slika 37).



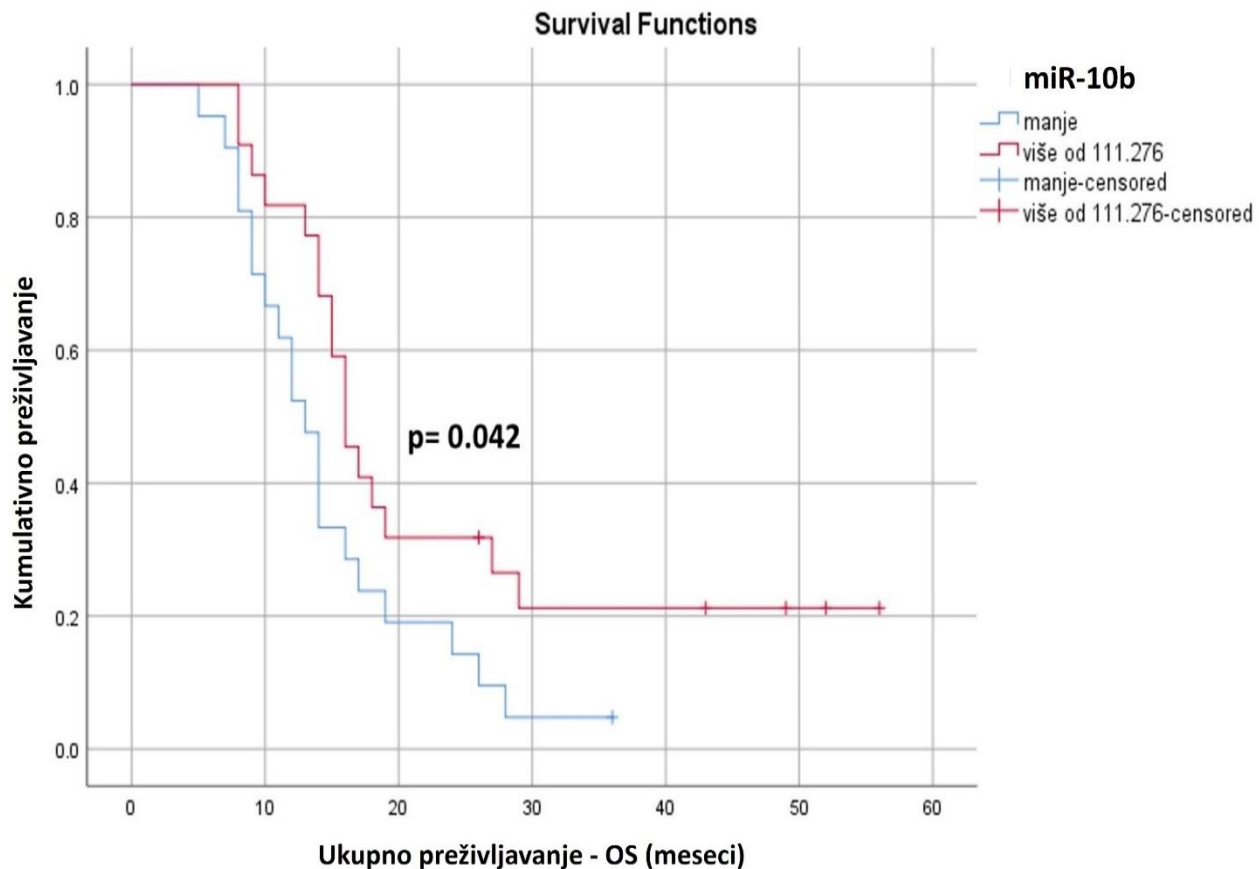
**Slika 37.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja pacijenata bez progresije bolesti (PFS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-21

Korišćen je *Log-Rank Mantel-Cox* test i poređeno je preživljavanje bez progresije bolesti između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-34a (*low* miR i *high* miR). Naime, utvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju bez progresije bolesti za vrednosti ekspresije miR-34a iznad medijane (više od 12.05),  $p = 0.019$  (slika 38).



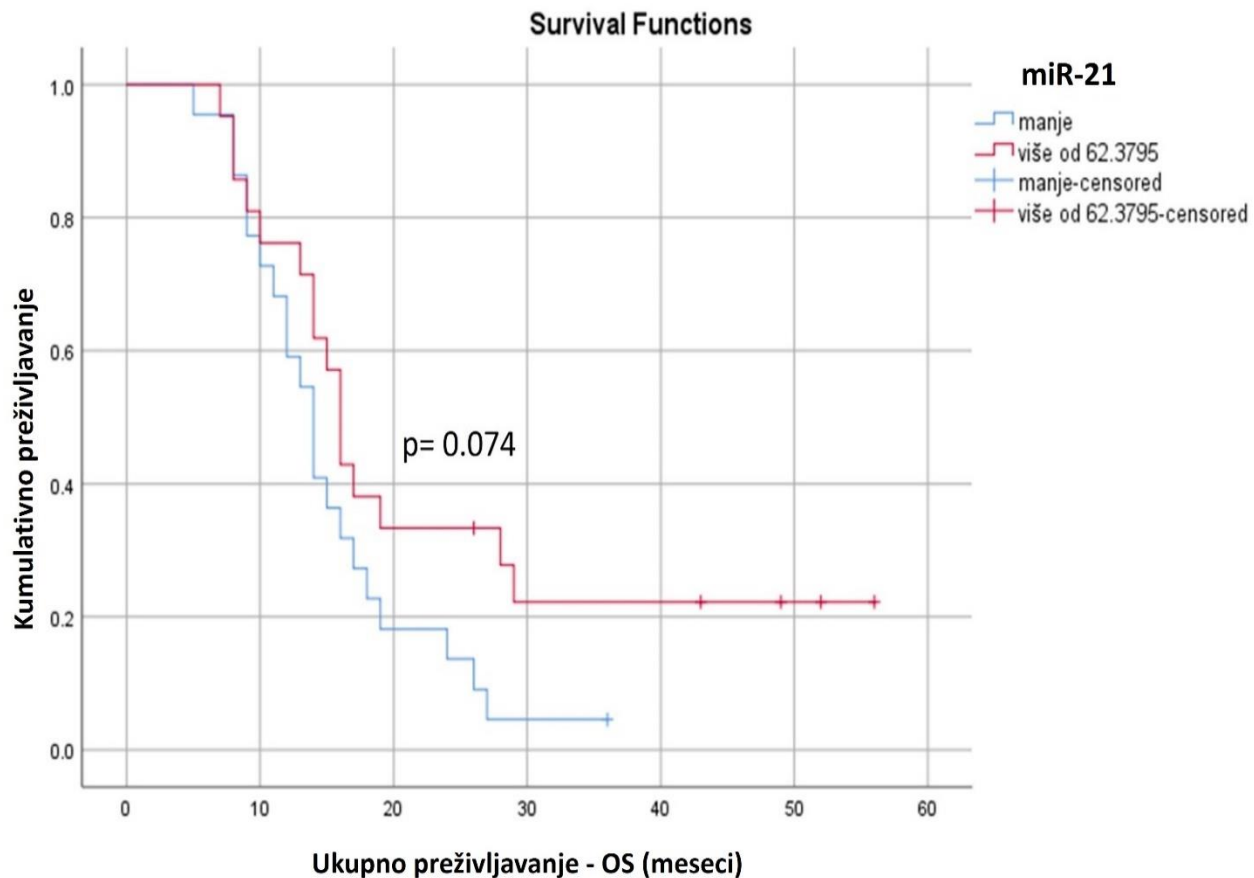
**Slika 38.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja pacijenata bez progresije bolesti (PFS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-34a

Prema *Log-Rank Mantel-Cox* testu, poredeći ukupno preživljavanje između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-10b (*low* miR i *high* miR), dobijena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju pacijenata za vrednosti ekspresije miR-10b iznad medijane (više od 111.276),  $p = 0.042$  (slika 39).



**Slika 39.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja pacijenata (OS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-10b

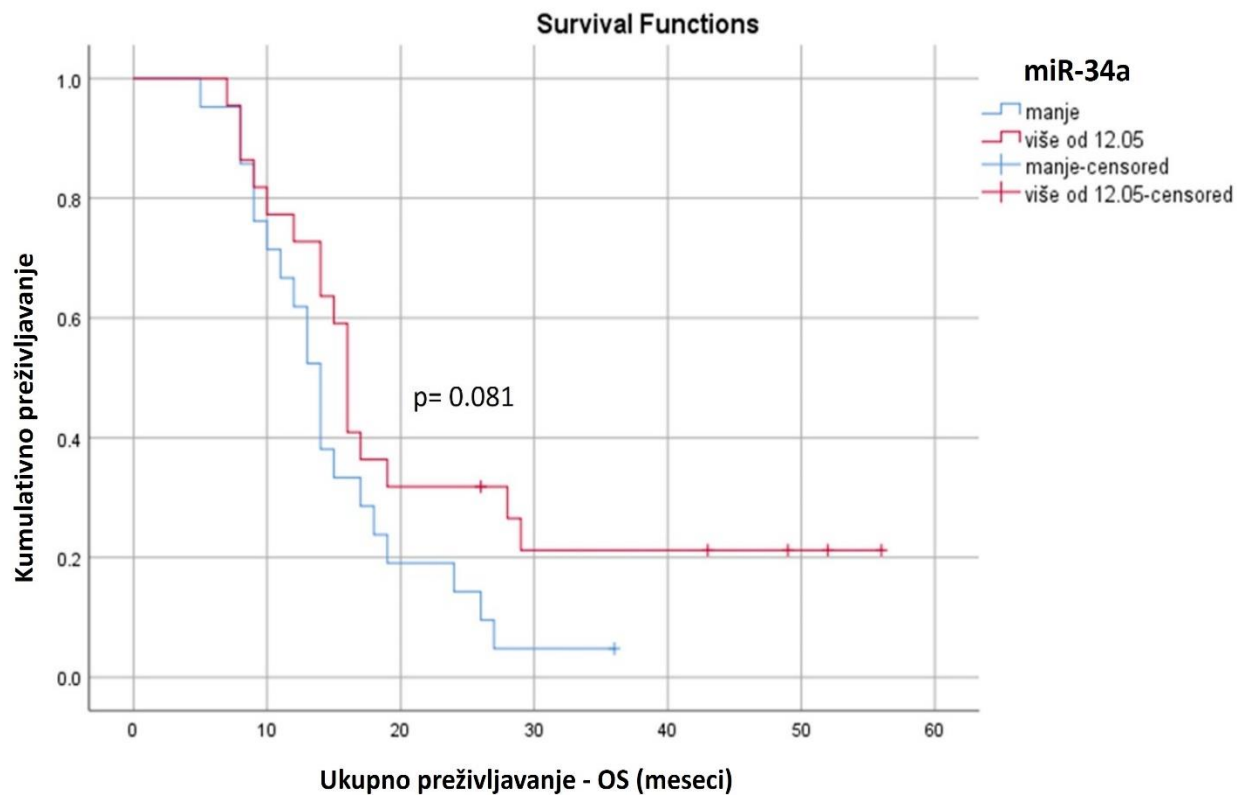
Shodno *Log-Rank Mantel-Cox* testu, poredeći ukupno preživljavanje između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-21 (*low* miR i *high* miR), nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju za vrednosti ekspresije miR-21 iznad ili ispod medijane (medijana 62.3795),  $p = 0.074$  (slika 40).



**Slika 40.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja pacijenata (OS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-21



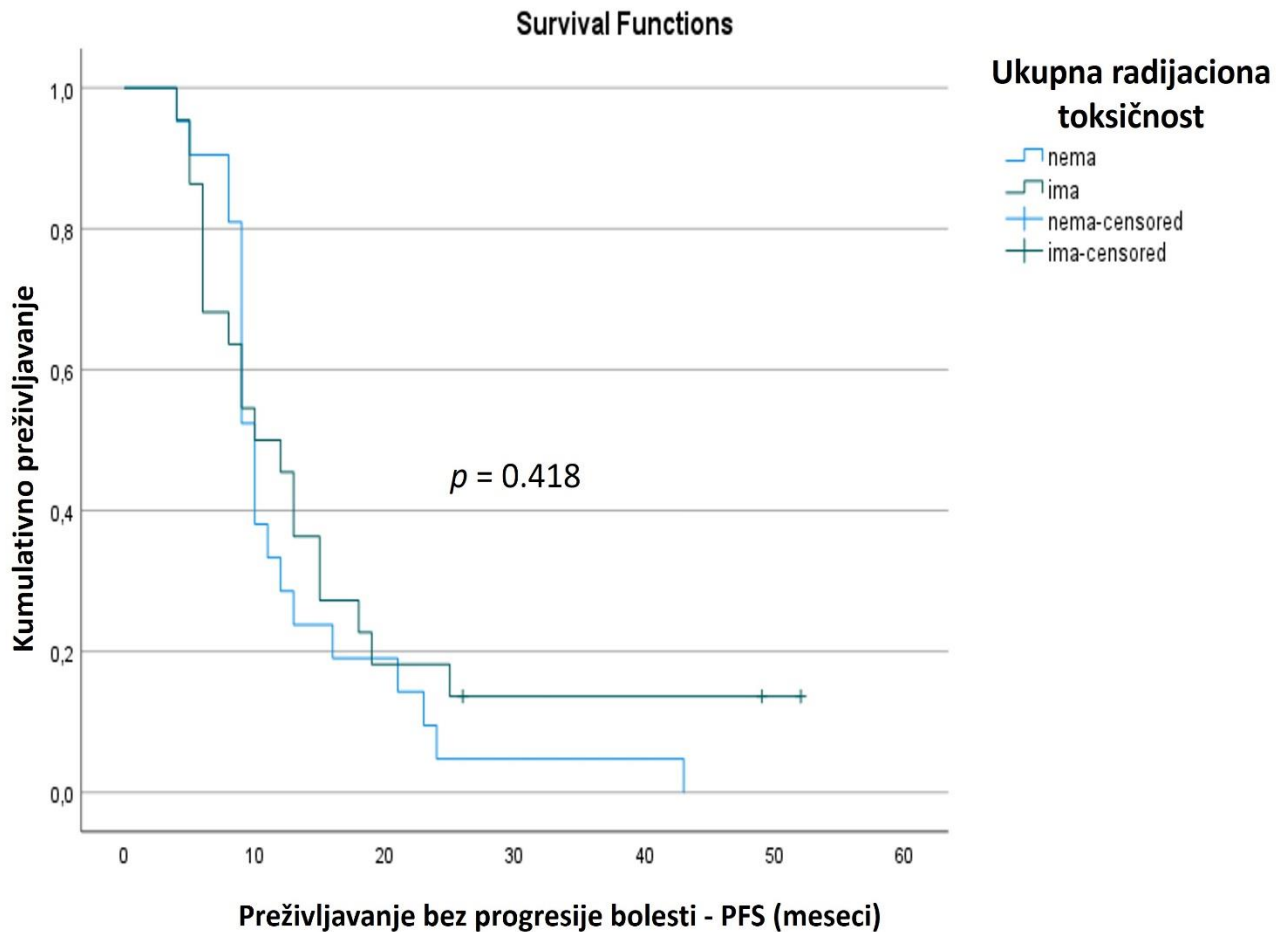
Prema *Log-Rank Mantel-Cox* testu, poredeći ukupno preživljavanje između grupa iznad i ispod medijane nivoa ekspresije miR-34a (*low* miR i *high* miR), nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju za vrednosti ekspresije miR-34a iznad ili ispod medijane (medijana 12.05),  $p = 0.081$  (slika 41).



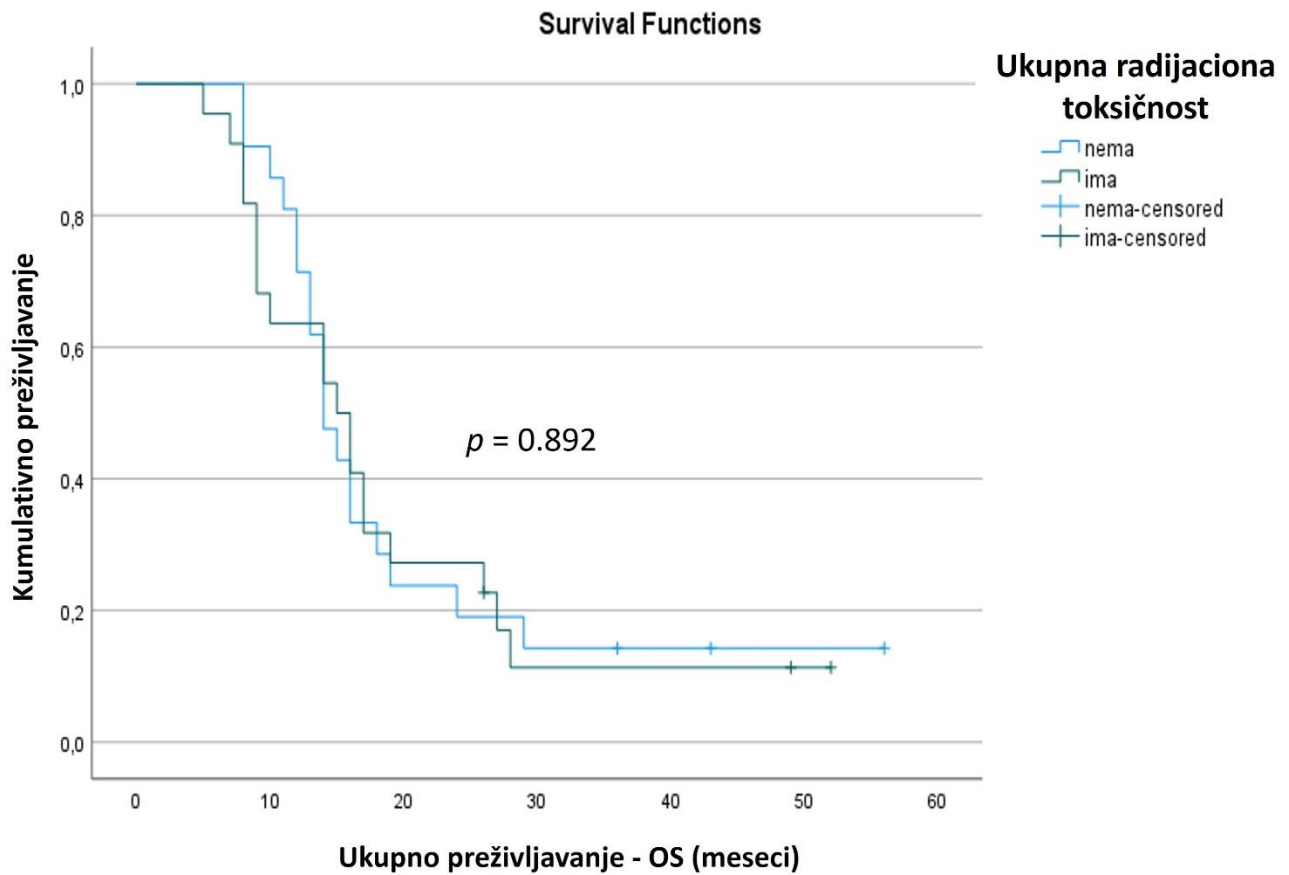
**Slika 41.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja pacijenata (OS) u mesecima poredeći grupe iznad i ispod medijane ekspresije miR-34a

Dalje, poređena je grupa pacijenata koji su imali toksičnost i grupa pacijenata koji nisu imali toksičnost, u odnosu na preživljavanje bez progresije bolesti, kao i na ukupno preživljavanje.

Shodno *Log-Rank Mantel-Cox* testu nije utvrđena statistički značajna razlika između poređenih grupa u odnosu na preživljavanje bez progresije bolesti ( $p = 0.418$ , **slika 42**) i ukupno preživljavanje ( $p = 0.892$ , **slika 43**).



**Slika 42.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja pacijenata bez progresije bolesti (PFS) u mesecima poredeći grupu pacijenata koji su imali toksičnost i grupu pacijenata koji nisu imali toksičnost



**Slika 43.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja pacijenata (OS) u mesecima poredeći grupu pacijenata koji su imali toksičnost i grupu pacijenata koji nisu imali toksičnost

#### 4.4. Ispitivanje razlike u nivou ekspresije miR-10b/21/34a između pacijenata i zdravih kontrola

Poređen je nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a kod operisanih pacijenata sa glioblastomom pre radioterapije i kod zdravih osoba (kontrola) u cilju utvrđivanja potencijalnih razlika u nivoima njihove ekspresije.

Nije pronađena statistički značajna razlika između poređenih grupa (**tabela 11**).

**Tabela 11.** Ekspresija mikro miR-10b/21/34a kod pacijenata i zdravih kontrola

	<b>Medijana (<i>min-max</i>)<sup>a</sup></b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>miR-10b</b>		
Pacijenti	111.28 (2.13 - 816.89)	0.375
Kontrole	205.49 (18.47 - 593.47)	
<b>miR-21</b>		
Pacijenti	62.38 (2.68 - 825.43)	0.682
Kontrole	72.41 (23.67 - 153.17)	
<b>miR-34a</b>		
Pacijenti	12.05 (1.00 - 210.55)	0.102
Kontrole	7.89 (3.17 - 12.72)	

<sup>a</sup>(*min-max*)-minimalne i maksimalne vrednosti ekspresije mikro RNK;

## 5. DISKUSIJA

Ovo istraživanje je obuhvatilo 43 pacijenta sa patohistološki verifikovanim glioblastomom. Na osnovu dosadašnjih naučnih činjenica iz oblasti radijacione onkologije i radiobiologije, medikalne onkologije i molekularne biologije, ovo istraživanje je pokušalo da proširi dosadašnja znanja iz navedenih oblasti kod pacijenata sa glioblastomom, ali i da dobije nove naučne odgovore.

S obzirom na to da svaka primenjena terapija može izazvati toksičnost različitog gradusa, registrovanje i praćenje toksičnosti onkološke terapije je od posebnog značaja. Razlog tome leži u činjenici da određeni broj pacijenata može imati toksičnost većeg gradusa, koja može odložiti ili obustaviti dalju primenu onkološke terapije, te tako uticati na krajnji ishod lečenja i/ili narušiti kvalitet života pacijenata. U svetu su u toku brojne studije koje ispituju potencijalne biomarkere za predikciju odgovora na terapiju, toksičnost i prognozu same bolesti. Određivanje nivoa ekspresije različitih mikro RNK je i sada među aktuelnim dešavanjima u svetu nauke i sprovodi se intenzivno u cilju identifikacije potencijalnog pouzdanog biomarkera za odgovor na datu terapiju, ali i prognozu bolesti. Summerer i saradnici su predstavili nekoliko cirkulišućih mikro RNK dobijenih iz plazme pacijenata, koji mogu biti potencijalni biomarkeri prognoze bolesti ili odgovora na terapiju kod pacijenata sa tumorima glave i vrata (249). Ispitivanje nivoa ekspresije različitih mikro RNK je sprovedeno tokom prethodnih godina kod malignih, ali i kod nemalignih bolesti. U dodatku, ispitivan je i uticaj jonizujućeg zračenja na nivo ekspresije brojnih mikro RNK (228). Toraih i saradnici su sugerisali da postoji spektar mikro RNK koji pokazuje različitu ekspresiju nakon zračenja glioblastoma i predstavili su mnoge mikro RNK koje mogu da podstiču radiorezistentnost ili radiosenzitivnost ćelija glioblastoma (250). Druga istraživanja su pokazala da pojedine mikro RNK mogu imati ulogu kao serumski biomarkeri koji bi pomogli u distinkciji između niskogradusnih glioma i glioblastoma (251), npr. kada postoji radiološka dilema u diferencijalnoj dijagnozi glioma ili kada postoji kontraindikacija za neurohiruršku intervenciju i patohistološku verifikaciju. Međutim, po našim saznanjima, do momenta definisanja ovog istraživanja i objavljivanja našeg naučnog članka, do sada nije istraživani vremenski profil nivoa ekspresije mikro RNK kod pacijenata u toku lečenja glioblastoma po Stupovom protokolu. Analizirane su demografske karakteristike pacijenta, karakteristike tumora, razvoj toksičnosti, ishod lečenja i njihova povezanost sa nivoom ekspresije mikro RNK-10b/21/34a, koje su izolovane iz mononuklearnih ćelija periferne krvi pacijenata. Nivoi ekspresije mikro RNK-10b/21/34a su određivani pre prve frakcije zračne terapije, na 15. frakciji zračne terapije sa konkomitantnom HT temozolomidom i nakon poslednje frakcije zračne terapije konkomitantno sa hemioterapijom temozolomidom. Shodno tome, analizirano je ukupno 129 uzoraka seruma u kome je određivan nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a.

Analizom demografskih podataka u ovom istraživanju pokazano je da je najveći broj pacijenata bio muškog pola (69.8%), dok je prosečna starost pacijenata tokom postavljanja dijagnoze bolesti bila  $57.14 \pm 10.607$  (SD) godina. Po ECOG performans status skali, skoro svi pacijenti su imali PS 1 (90.7%), dok je performans status 2 imalo 9.3% pacijenata. Pregledom i analizom medicinske literature, može se zaključiti da su slične demografske karakteristike imali i pacijenti u drugim istraživanjima.

U našem istraživanju je pokazano da je najveći broj pacijenata bio muškog pola (69.8%). U Stupovoj studiji, 64% pacijenata je bilo muškog pola u grupi kod koje je primenjena RT+TMZ, dok je 61% pacijenata bilo muškog pola u grupi kod koje je primenjena samo RT. Novija istraživanja iz 2022. godine potvrđuju slične demografske karakteristike. Na primer, u istraživanju Brown i saradnika, 59.8% procenata je bilo muškog pola (252). S obzirom na primećenu dominantnost muškog pola u obolevanju od glioblastoma, istraživači su započeli studije sa ciljem da rasvetle mehanizme za ovakvo biološko ponašanje glioblastoma i različitu polnu distribuciju. Imajući u vidu da i druge maligne, ali i nemaligne

bolesti pokazuju neravnomernu stopu incidence u odnosu na pol, istraživanja se baziraju na hipotezi bioloških razlika između muškaraca i žena, odnosno da su bolesti povezane sa polnim hormonima, kao što su testosteron i estrogen. Iako je dokazana biološka razlika među polovima za druge tumore, postavlja se pitanje da li isto važi i za glioblastom. Yu i saradnici su izvestili da postoji značajna ushodna regulacija androgenskih receptora u tkivu glioblastoma, u odnosu na tkivo mozga udaljeno od tumora (253). Takođe, Rodríguez-Lozano su ispitivali uticaj testosterona na ćelijskim linijama glioblastoma U87, U251 i D54 (254). Shodno rezultatima njihove studije, autori su sugerisali da testosteron ima ulogu u progresiji glioblastoma, delujući na procese proliferacije, migracije i invazije (254). S druge strane, drugo pitanje je da li estrogen može imati protektivni efekat kod žena za nastanak glioblastoma. Kabat i saradnici su sugerisali da postoji moguć uticaj endogenih steroidnih hormona na gliomagenezu (255). Autori su došli do tog zaključka analizirajući dostupnu literaturu, a oslanjajući se na podatke da pojedini gliomi imaju izvesnu ekspresiju estrogenskih receptora, te da su transplatirani glioblastomi na animalnim modelima sporije rasli kod ženki, uz napomenu da primena estrogenskih modulatora dovodi do inhibicije proliferacije glioma (255). Međutim, do danas, nema definitivnog zaključka o etiopatogenezi vezanih za polnu distribuciju kod glioblastoma. Iako, Verger i saradnici su naveli da su nezavisni prediktori ishoda bili starija životna dob i loš KPS, te da su ovi parametri bili češće zastupljeni kod ženskog pola (256). Samim tim, pacijentkinje su imale lošije preživljavanje u njihovom istraživanju, u odnosu na muški pol (256).

Što se tiče starosne dobi pacijenata sa glioblastomom, prosečna starost naših pacijenata tokom postavljanja dijagnoze bolesti bila 57.14 godine. U Stupovoj studiji, koja je objavljena 2005. godine, bilo je uključeno 286 pacijenata u grupi pacijenata kod kojih je bila primenjena radioterapija i 287 pacijenata kod kojih je primenjena radioterapija sa TMZ (127). U prvoj grupi (samo RT) prosečna starost pacijenata je bila 57 godina, dok je u drugoj grupi (RT+TMZ), prosečna starost bila 56 godina (127). Uprkos dosta većem uzorku pacijenata u odnosu na naš uzorak, zapaža se slična, odnosno identična prosečna starost u navedenim grupama. U studiji Brown i saradnika, prosečna starost pacijenata sa glioblastomom bila je 59.2 godine života (252). Prema centralnom registru za tumore mozga u Sjedinjenim Američkim Državama (eng. *The Central Brain Tumor Registry of the United States - CBTRUS*) za period od 2006-2010. godine, glioblastomi činili su 45.2% od svih primarnih malignih tumora mozga, dok je pik incidencije bio kod pacijenata između 75 - 84 godine života (7). Imajući u vidu podatke koje govore u prilog tome da se glioblastom javlja u poznoj životnoj dobi, postavlja se pitanje etiologije i patogeneze, odnosno mehanizma nastanka glioblastoma u dubokoj starosti. Wick i saradnici sugerišu da razlog nastanka glioblastoma u ovoj životnoj dobi može biti zbog imunološkog deficita, kao i dodatnih faktora kao što je smanjena mogućnost popravke DNK oštećenja (257). Međutim, životna dob pacijenta je prepoznata i kao prognostički faktor (252). Starosna dob može uticati na izbor terapije i kombinaciju modaliteta terapije. Poznato je da osobe starije životne dobi češće imaju brojne komorbiditete. Shodno tome, određen broj pacijenata neće biti podoban za hirurško lečenje, dok drugi deo pacijenata neće biti podoban za primenu hemioterapije ili radioterapije. Odnosno, jedan deo starijih pacijenata koji je podoban za navedene modalitete lečenja, može imati veću i češću toksičnost terapije. U dodatku, treba napomenuti da u nekim protokolima postoje izdvojene preporuke za lečenje pacijenata koji se označavaju kao „stariji“ pacijenti. S druge strane, kliničari različito definišu pojam „stariji pacijenti“ i samim tim, preporuke za lečenje „starijih pacijenata“ mogu da se razlikuju. EANO daje preporuke i terapijski algoritam za starije pacijente sa glioblastomom, ali je naveden opseg „starijih“: > 65 - 70 godina (113). Ipak, imajući u vidu da razlika od 5 godina može biti značajna u izboru terapije, u obzir bi trebalo uzeti i ostale parametre (pridružena oboljenja, ECOG PS itd.). Prema vodiču ESTRO-ACROP, grupa „starijih“ podrazumevala je pacijente iznad 70 godina života (160).

ECOG PS (0 - 5) (odgovara SZO PS), kao i Karnofski performans status pacijenta (KPS) (0 - 100%) su prepoznati kao bitan faktor u izboru optimalnog terapijskog postupka, a vrlo često su

prepoznati i kao prognostički faktori (113). U našem istraživanju, skoro svi pacijenti su imali ECOG PS 1 (90.7%), dok je 9.3% pacijenata imalo PS 2 pre početka RT sa HT TMZ. Međutim, prema kriterijuma za uključivanje pacijenata u naše istraživanje (pacijenti PS 0 ili 1), u našem istraživanju nije bilo pacijenata PS 3 i 4. Takođe, imajući u definicije ECOG PS skale, u našoj grupi nijedan pacijent nije imao PS0. S obzirom na to da su svi pacijenti u našem istraživanju imali PS1 u trenutku prikaza konzilijumu, jedan deo pacijenata (9.3%) je zbog privremenog i lakšeg pogoršanja simptoma do početka RT imao PS2 (što je i zabeleženo kao PS, jer se uzorkovanje krvi radilo pre početka RT). Nakon simptomatske terapije, performans status je popravljen, te su svi pacijenti po početku RT sa konkomitantnom HT TMZ imali PS1. Imajući u vidu navedeno, sa oprezom bi trebalo porediti naše rezultate ECOG PS sa rezultatima drugih istraživanja, izuzev onih istraživanja koji su imali grupu pacijenata kao što je bila u našem istraživanju. Primera radi, u Stupovoj studiji, u grupi pacijenata kod kojih je primenjena RT sa TMZ, PS 0 je imalo 39%, PS 1 je imalo 47%, a PS 2 je imalo 13% pacijenata (127). Međutim, jedan od kriterijuma za uključivanje pacijenata i u Stupovu studiju jeste da pacijenti imaju PS 2 ili manje. U studiji Parkera i saradnika, u kojoj je bio uključen isti broj pacijenata, kao i u našem istraživanju (43 pacijenta), PS 0 je imalo 53%, PS 1 je imalo 42%, a PS 2 je imalo 5 % pacijenata (258). Sveobuhvatno, u navedenim istraživanjima, kao i većini drugih istraživanja, pacijentima kojima se ordinirala konkomitantna HT TMZ imali su PS 2 i manji. S obzirom da je PS prepoznat kao prognostički faktor, mnogi protokoli preporučuju hipofrakcionisani režim zračne terapije kod pacijenata sa KPS manjim od 70% (KPS 70% odgovara ECOG PS >1). Tako i EANO, za pacijente sa KPS manjim od 70% preporučuje hipofrakcionisani režim zračne terapije (ukupna doza 40.05 Gy, podeljena u 15 frakcija, sa po 2.67 Gy po frakciji) dok se za pacijente sa KPS ispod 50% (što bi odgovaralo ECOG PS >2) i pacijente koji ne mogu da potpišu pristanak za lečenje preporučuje palijativno zbrinjavanje (113). Prema vodiču ESTRO-ACROP za starije pacijente (> 70 godina), pacijente sa lošijim performans statusom (< 70%) preporučuje se prethodno spomenuti hipofrakcionisani režim RT (40.05 Gy u 15 frakcija), kao i režim sa 34 Gy u 10 frakcija (3.4 Gy po frakciji) (160). Performans status (ECOG/SZO, KPS) ima veliku ulogu i u proceni lečenja kod pacijenta sa relapsom bolesti, bilo da se radi o retreatmanu zračnom terapijom, ponovnom uvođenju TMZ (eng. TMZ *rechallenge*), izboru druge linije hemioterapije ili primene bevacizumaba.

U mnogim istraživanjima, procenjivana je povezanost lokalizacije glioblastoma u mozgu sa ishodom bolesti. U našem istraživanju, glioblastom je bio lokalizovan najčešće u slepoočnom režnju mozga (34.9%), potom u čeonom režnju mozga (32.6%) i temenom režnju mozga (23.3%). Caloglu i saradnici su u svojoj studiji, u kojoj je bilo uključeno 75 pacijenata sa glioblastomom, procenjivali moguće prognostičke faktore koji mogu da utiču na preživljavanje pacijenata (259). Naime, procenjivali su uticaj pola, starosne dobi, KPS, lokalizacije tumora i pojavu multicentričnosti tumora, veličinu tumora, stepen resekcije, anamnestičke podatke o epileptičkim napadima, način lečenja i vreme do početka RT, kao i trajanje RT tretmana. Kod njihovih pacijenata, glioblastom je najčešće bio lokalizovan u čeonom režnju (31%), potom je bio prezentovan kao multilobarni tumor (27%), a na trećem mestu po učestalosti u odnosu na lokalizaciju, u slepoočnom režnju mozga (17%) (259). Rezultati njihove studije nisu pokazali statistički značajnu razliku za preživljavanje u odnosu na lokalizaciju tumora. Ipak, zanimljivo je da je lokalizacija tumora u čeonom režnju mozga pretežno registrovana kod ženskog pola (259). U studiji Donato i saradnika, koja je imala isti broj pacijenata kao i naša (43 pacijenta), kod najvećeg broja pacijenata glioblastom je bio lokalizovan u slepoočnom režnju (17 pacijenata), čeonom režnju (11 pacijenata) i temenom režnju (7 pacijenata), što je slična distribucija, kao i u našoj studiji (15 pacijenata / 14 pacijenata / 10 pacijenata). Međutim, nema jasnih podataka o mogućem uticaju lokalizacije tumora kao prognostičkog faktora (260). Velika studija Wen i saradnika, u kojoj je bilo uključeno 25 698 pacijenata, pokazala je da je lokalizacija tumora nezavisan prognostički faktor, kao i starosna dob, rasa, veličina tumora i način lečenja (261). Autori navode da je supratentorijalna lokalizacija tumora povezana sa boljim preživljavanjem pacijenata. Ipak, treba imati u vidu da se u pomenutoj studiji, lokalizacija, odnosno primarno mesto tumora, označavalo kao supratentorijalni tumor, infratentorijalni tumor, tumor

mozga sa preklapanjem (eng. *brain overlap*) i tumor nepoznate lokalizacije. Supratentorijalni tumor podrazumevao je lokalizaciju glioblastoma u velikom mozgu, čeonom režnju, slepoočnom režnju, temenom režnju i okcipitalnom režnju (261), te nije procenjivan prognostički značaj lokalizacije po režnjevima mozga. Lokalizacija tumora u mozgu može uticati na izbor hirurške tehnike lečenja, ali i biti ograničavajući faktor stepena resekcije, odnosno veličine ostatka tumora. Zbog toga, u literaturi se mogu naći podaci da je lokalizacija tumora u čeonom lobusu povoljan prognostički faktor, prevashodno zbog mogućnosti kompletne resekcije tumora. Lokalizacija tumora u elokventnim zonama mozga ili lokalizacija tumora oko velikih arterijskih krvnih sudova može i potpuno onemogućiti hirurški pristup tumoru. S obzirom na to da je stepen resekcije prepoznat kao prognostički faktor, a da lokalizacija tumora može uticati na stepen resekcije tumora, samim tim i lokalizacija tumora indirektno može predstavljati prognostički faktor. U dodatku, neki istraživači čak sugerišu na različitost i značaj lokalizacije tumora na levoj ili desnoj strani mozga, odnosno u levoj ili desnoj moždanoj hemisferi. Imajući u vidu literaturne podatke o asimetriji moždane strukture između dve hemisfere, njihovih funkcija i genske ekspresije, neki istraživači su pokušali da dalje istraže značaj lokalizacije tumora u mozgu. Tako, Ellingson i saradnici su u svojoj studiji istraživali moguće postojanje razlike u metilaciji promotora MGMT u odnosu na lokalizaciju tumora. U njihovim rezultatima, pokazano je da se MGMT nemetilisani tumori više usmeravaju ka desnoj hemisferi, odnosno da se MGMT metilisani tumori nalaze više ka levoj hemisferi. Takođe, pacijenti sa tumorima lokalizovanim u blizini levog slepoočnog režnja imaju značajno bolje preživljavanje u odnosu na druge lokalizacije tumora i nezavisno od statusa metilacije MGMT promotora i lečenja (262). U našem istraživanju, lokalizacija tumora u levoj i desnoj hemisferi nisu uzete kao zasebne varijable za istraživanje, već isključivo kao deo mozga / režanj i to nezavisno od strane mozga, dok se metilacija promotora MGMT nije radila rutinski u našoj zemlji.

Spekulacija o veličini tumora, kao faktoru koji može uticati na izbor hirurške tehnike i stepen resekcije tumora, ali i uopšteno kao prognostičkog faktora, postoji odavno. S obzirom na literaturne podatke koji su predstavljeni u naučnim radovima, tumori su često klasifikovani na one tumore koji su veličine manje od 4 cm i jednako ili više od 4 cm. Međutim, nema jasnih razloga zašto se navedena veličina tumora uzima kao primer. Debata o tome često uključuje pitanja koja se odnose na to da li je to veličina kada se tumor najčešće dijagnostikuje, odnosno kada se zbog prisutne simptomatologije urade dijagnostičke metode poput CT i MR endokranijuma ili pak, utiče na stepen resekcije, uspeh adjuvantnog lečenja i prognozu bolesti. U studiji, objavljenoj 1979. godine, odnosno na predstavljenim grafikonima te studije, uočava se da su tumori (tumor + otok) razvrstani i upoređivani u odnosu na sledeće veličine:  $< 100 \text{ mm}^2$ ,  $100 - 200 \text{ mm}^2$ ,  $200 - 300 \text{ mm}^2$ ,  $300 - 400 \text{ mm}^2$  i  $> 400 \text{ mm}^2$  (263). Autori su sugerisali da nije verovatno da veličina lezija utiče na prognozu bolesti. Između ostalog, oni navode da lokalizacija lezije može imati veći značaj, nego veličina lezije. Drugim rečima, tumor lokalizovan u centralnoj regiji može brzo dovesti do smrtnog ishoda, te mala lezija u motornom korteksu može dovesti do motornih ispada i samim tim brže dijagnoze bolesti, kao i to da pacijenti mogu tolerisati veće tumorske lezije u čeonim režnjevima (263). Caloglu i saradnici su stratifikovali pacijente po veličini tumora na tumore  $\leq 4 \text{ cm}$  i tumore  $> 4 \text{ cm}$  (259), kao i Wen i saradnici (261). Donato i saradnici su podelili pacijente koji imaju glioblastom na one pacijente koji imaju tumor veličine  $< 4 \text{ cm}$  i one  $\geq 4 \text{ cm}$  i sugerisali su da je veličina tumora većeg od 4 cm povezana sa lošijim ishodom (260). Slično, u našem istraživanju, pacijenti su stratifikovani na one koji imaju glioblastom veličine  $< 4 \text{ cm}$  i one pacijente koji imaju tumor veličine  $\geq 4 \text{ cm}$ . Kako smo u ovom istraživanju merili nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a u 3 vremenske tačke, upoređivali smo i procenjivali nivo ekspresije navedenih mikro RNK sa veličinom tumora, o čemu će dalje u tekstu biti reči.

Prethodno diskutujući o veličini i lokalizaciji tumora, spomenut je i stepen resekcije tumora, na koji mogu uticati navedene karakteristike tumora. Stepem resekcije tumora je u mnogobrojnim studijama potvrđen kao jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora kod pacijenata sa glioblastomom. EANO



navodi da je cilj hirurškog lečenja kod pacijenata sa difuznim gliomima uklanjanje što većeg dela tumora koristeći mikrohirurške tehnike, ali bez ugrožavanja neurološke funkcije (113). U Stupovom istraživanju, u grupi kod koje je primenjena RT sa TMZ, biopsija je učinjena kod 17% pacijenata, kompletna resekcija tumora kod 39%, a parcijalna resekcija tumora kod 44% pacijenata (127). Ilić i saradnici su na osnovu svoje studije zaključili da šira hirurška resekcija tumora sa okolnom peritumorskom zonom predstavlja najpovoljniji prognostički faktor kod pacijenata sa GB (264). U studiji Brown i saradnika u koju je bilo uključeno 490 pacijenata sa glioblastomom, kod 60% pacijenata je učinjena citoredukcija (eng. *debulking*), ali nije bio označen tačan stepen resekcije. Međutim, autori su naglasili, da pored ostalih prognostičkih faktora, hirurško lečenje, tj. citoredukcija je nezavisan prognostički faktor povezan sa ukupnim preživljavanjem pacijenata (252). Iako većina studija naglašava značaj kompletne resekcije u odnosu na druge operative tehnike, u prognozi pacijenata sa glioblastomom, u literaturi se mogu naći i drugačiji podaci. Naime, u metanalizi AbdelFatah i saradnika, nije pronađena značajna razlika u preživljavanju između grupa sa kompletnom i nekompletnom resekcijom. Međutim, autori su sugerisali na određeni broj šturih podataka, odnosno na kvalitet dokaza uključenih studija. U dodatku, autori su naveli da nije bilo adekvatnih podataka o kvalitetu života ovih pacijenata (265). U našem istraživanju, kod 88.37% pacijenata je bila učinjena kompletna resekcija tumora, dok je kod 11.63% pacijenata bila učinjena subtotalna resekcija. Objašnjenje za nešto veći stepen resekcije u našem istraživanju u odnosu na podatke iz drugih istraživanja, može se objasniti time da pacijenti kod kojih je učinjena samo biopsija tumora, nisu bili uključeni u ovo istraživanje, shodno svim kriterijumima istraživanja i ispunjavanja ostalih uslova. Trebalo bi uzeti u obzir, da po kriterijumima za uključivanje u naše istraživanje, pacijenti bi trebalo da budu PS 0 ili 1, kao i da je učinjen odgovarajući operativni zahvat. Drugim rečima, često kod pacijenata kod kojih je učinjena samo biopsija tumora može se očekivati nešto lošiji performans status (PS > 2), te samim tim pacijenti višeg PS, ne bi bili kandidati za primenu Stupovog protokola, odnosno sprovođenje zračne terapije sa dozom od 60 Gy u 30 frakcija i doziranjem temozolomida po protokolu. Imajući u vidu prethodno navedeno, može se govoriti u prilog tome da maksimalno bezbedna hirurška resekcija, osim što je prognostički faktor kod pacijenata sa glioblastomom, utiče na kvalitet života i redukciju simptoma. Samim tim, oporavkom opšteg stanja i neurološkog statusa, citoredukcija tumora doprinosi boljem performans statusu pacijenta, čime se stvaraju uslovi za primenu dalje onkološke terapije, odnosno radioterapije i hemioterapije.

Imajući u vidu klasifikaciju tumora CNS iz 2016. godine, u kojoj su pored histoloških parametara po prvi put uključeni i molekularni parametri za postavljanje dijagnoze glioblastoma, bilo je jasno da glioblastomi i dalje predstavljaju širok pojam. Štaviše, zbog svoje invazivnosti i biološkog ponašanja, glioblastom se smatra bolešću celog mozga (266). Zbog heterogenosti i specifičnih morfoloških obeležja, prepoznati su i određeni podtipovi i varijante glioblastoma. Tako, pored „konvencionalnog“ glioblastoma, opisane su varijante gliosarkom i krupnoćelijski glioblastom. U SZO klasifikaciju tumora CNS u 2016. godini, pored ove dve varijante glioblastoma, dodata je i varijanta epiteloidni glioblastom. Sve tri pomenute varijante glioblastoma pripadaju *IDH-wild type* glioblastomima (9). Pored ovih varijanti, opisani su i određeni obrasci glioblastoma, poput glioblastoma sa primitivnom neuronskom komponentom, sitnoćelijskog i „*granular cell*“ glioblastoma (9). Ove varijante i obrasci glioblastoma mogu imati nešto drugačije biološko ponašanje, odnosno jedna varijanta može biti agresivnija od druge ili rezistentnija na lečenje, a samim tim imati lošiji ishod. Zbog toga, u naučnim radovima često se sreću razvrstani svi podtipovi glioblastoma i njihova zasebna analiza. Međutim, retrospektivnim poređenjem preživljavanja između varijanti gliosarkoma i krupnoćelijskih glioblastoma u odnosu na konvencionalni glioblastom nije bilo značajne razlike. U studiji koja je obuhvatila 3895 pacijenata, konvencionalni glioblastom imalo je 95.8% pacijenata, dok je gliosarkom imalo 2.6% pacijenata, a krupnoćelijski glioblastom imalo je 1.6% pacijenata. Iako redak, glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom može imati nešto drugačiji obrazac biološkog ponašanja. Naime, ovaj obrazac glioblastoma ima tendenciju ka spinalnoj diseminaciji putem likvora (267). Iako se u našem istraživanju

nalazi relativno mali broj pacijenata za ovakvu analizu, ipak se naši rezultati slažu sa podacima iz literature. Odnosno, najveći broj pacijenata je pripadao („konvencionalnom“) glioblastomu (90.7%), potom je varijantu krupnoćelijski glioblastom imalo 7% pacijenata, a obrazac glioblastom sa primitivnom neuronskom komponentom imalo je 2.3% pacijenata.

U četvrtoj klasifikaciji tumora CNS SZO koja je objavljena 2016. godine, prvi put smo se sreli sa pojmovima kao što su glioblastom, *IDH*-mutant i glioblastom, *IDH-wild type* gradus IV. Prisustvo *IDH* mutacije kod pacijenata je povezano sa boljim preživljavanjem i boljim terapijskim odgovorom na primenu temozolomida (78). Po poslednjoj klasifikaciji tumora CNS iz 2021. godine, shodno savremenim kriterijumima postoji samo glioblastom, *IDH-wild type* CNS SZO gradus 4 (12). S obzirom na vreme početka našeg istraživanja (2017. godine) i do mogućstva primene novih kriterijuma za patohistološku dijagnozu, glioblastomi su klasifikovani po klasifikaciji SZO iz 2016. godine. U odnosu na *IDH* status, više od polovine pacijenata je imalo *IDH1-wild type* (51.2%), potom NOS (44.2%) i najmanji broj pacijenata je imao *IDH1*-mutirani glioblastom (4.7%). Literatura takođe govori u prilog predominacije *IDH-wild type* glioblastoma. U Stupovoj studiji iz 2005. godine, na osnovu koje je kasnije i započeta primena Stupovog protokola, nije bilo podataka o statusu *IDH* mutacije kod pacijenata sa glioblastomom (127). Christians i saradnici su analizirali prognostičku ulogu *IDH* mutacije kod pacijenata sa anaplastičnim astroцитomom (po klasifikaciji tumora CNS iz 2016. godine) i glioblastomom i zaključili da pacijenti koji imaju *IDH1* i *IDH2* mutaciju imaju značajno duže preživljavanje. U njihovoj studiji, u grupi pacijenata sa glioblastomom, 95% pacijenata nije imalo mutaciju (glioblastom, *IDH-wild type* SZO gradus IV), dok je 5% pacijenata imalo *IDH* mutaciju. Između ostalog, u istom istraživanju, *IDH-wild type* i nemetilisan promotor MGMT imalo je 61% pacijenata sa glioblastomom (268). U istraživanju Brown i saradnika, *IDH* mutaciju je imalo 10.6% pacijenata, a najveći broj pacijenata koji je imao *IDH* mutaciju, imao je ispod 50 godina života. Uzgred budi rečeno, u njihovom naučnom članku nije navedeno da li preostali broj pacijenata pripada samo grupi *IDH-wild type* ili grupi NOS (252). Drugi istraživači ispitivali su i značaj *IDH* mutacije u odgovoru na hemioterapiju temozolomidom. Shodno tome, rezultati su pokazali da *IDH* mutacija kod sekundarnog glioblastoma ima prediktivni značaj o povoljnom odgovoru pacijenata na primenu temozolomida (78). Iako najveći broj pacijenata u našem istraživanju nije imao *IDH* mutaciju, što se slaže sa literaturnim podacima, treba uzeti u obzir da se u našoj zemlji standardno određuje mutacija gena *IDH1*, ali ne i *IDH2*, što bi donekle moglo uticati na ukupan broj pacijenata sa *IDH* statusom. Murugan i saradnici su pokazali da se *IDH2* mutacija nalazila u 4 (0.5%) od 796 ispitivanih pacijenata sa glioblastomom (269). Posebna dilema postoji kod pacijenata koji su označeni kao glioblastom, NOS. Po definiciji pojam glioblastom NOS (eng. *Not Other Specified*) podrazumevao je grupu pacijenata sa glioblastomom kod kojih nije bilo moguće odrediti *IDH* status ili je pak, nalaz *IDH* statusa mutacije nekonkluzivan. U našoj grupi pacijenata, glioblastom NOS je imalo 44.2% pacijenata. Uzevši u obzir podatke da je u našoj zemlji postojala tehnička mogućnosti određivanja *IDH1* statusa mutacije, ne možemo govoriti u prilog tome da ovde NOS predstavlja tehnički nedostatak u patohistološkoj verifikaciji *IDH1* statusa mutacije, ali možemo govoriti o tehničkom nedostatku verifikacije *IDH2* mutacije. Ipak, u odnosu na mali procenat zastupljenosti *IDH2* mutacije kod glioblastoma, u našem istraživanju bi trebalo pojam glioblastom, NOS posmatrati kao nekonkluzivnost nalaza.

U našem istraživanju, po kriterijumima, uključeni su pacijenti kod kojih je primenjen Stupov protokol lečenja nakon operativnog lečenja. Kod svih pacijenata primenjena je radioterapijska doza od 60 Gy u 30 frakcija uz konkomitantnu primenu temozolomida, a po završetku konkomitantne faze lečenja, kod pacijenata je lečenje nastavljeno primenom adjuvantne hemioterapije temozolomidom. Zračna terapija je planirana 3 - D konformalnom tehnikom ili VMAT tehnikom, a delinacija ciljnih volumena je učinjena prema EORTC preporukama iz ESTRO-ACROP vodiča za delinaciju glioblastoma. Naime, doza od 60 Gy, podeljena u 30 dnevnih frakcija, predstavlja najpovoljniji režim

radioterapijskog lečenja za pacijente sa glioblastomom. Postoperativna radioterapijska doza od 60 Gy je predstavljena kao standard lečenja visokogradusnih astrocitoma još u dvadesetom veku i kada nije primenjivana adjuvantna hemioterapija. Naime, 1991. godine objavljena je studija Bleehen i saradnika, u kojoj su autori ispitivali razliku između različitih režima radioterapijskog lečenja kod pacijenata sa visokogradusnim gliomima (gliomi gradusa 3 i 4) (270). Autori su ispitivali različite dozne režime zračne terapije sa ishodom bolesti i to grupu sa radioterapijskom dozom od 45 Gy u 20 frakcija i grupu sa dozom od 60 Gy u 30 frakcija, a bila su uključena ukupno 474 odrasla pacijenta. Istraživači su zaključili da postoji značajno duže prosečno preživljavanje u grupi pacijenata kod kojih je primenjena doza od 60 Gy u 30 frakcija (270). Međutim, sa savremenog stanovišta iz literature, razlika u preživljavanju svakako postoji između visokogradusnih glioma gradusa 3 i gradusa 4, zbog čega tumačenje ovih rezultata treba pažljivo uzeti u obzir. Takve razlike su između ostalog uticale i na dalje proučavanje tumora mozga, te samim tim i na poslednje dve klasifikacije tumora mozga. Ipak, tokom narednih godina, standardna doza u većini protokola bila je 60 Gy. Tako i u Stupovoj studiji, obe grupe pacijenata (grupa bez konkomitantnog TMZ i grupa sa konkomitantnim TMZ) su imale propisanu radioterapijsku dozu od 60 Gy, podeljenih u 30 dnevnih frakcija, a zračna terapija je planirana 3 - D konformalnom tehnikom. Nije nepoznanica da je postojala težnja lekara da se radioterapijska doza eskalira u cilju poboljšanja efikasnosti lečenja, odnosno prevazilaženja hipoksije tumora i radiorezistentnosti glioblastoma. Studije u kojima se sprovodila eskalacija doze kod glioblastoma su češće bile zastupljene nakon uvođenja nove tehnologije, softvera i novih tehnika planiranja zračne terapije poput IMRT, VMAT, tomoterapije i protonske terapije. Shodno tome, Wegner i saradnici su u retrospektivnoj studiji analizirali trendove i ishod bolesti povezan sa eskalacijom doze kod pacijenata sa glioblastomom. U ovu studiju je bio uključen 33391 pacijent, a kod 1223 pacijenta je primenjena eskalirana doza zračne terapije (271). Kod pacijenata kod kojih je eskalirana doza zračne terapije, doza je bila u opsegu 66 - 89.4 Gy, sa medijanom doze zračne terapije od 70 Gy. Analizirajući podatke o ishodu bolesti, istraživači su zaključili da nije bilo koristi od eskalacije doze (271). S druge strane, imajući u vidu dozna ograničenja na mozak i posebne strukture mozga poput optičke hijazme i moždanog stabla, kod eskalacije doze RT, može se očekivati veći procenat komplikacija. Meta analiza Singh i saradnika, pokazala je da eskalacija doze RT ima prednost, u odnosu na standardnu dozu RT kada se primenjuje samostalno, odnosno bez TMZ (272). Međutim, kombinovano lečenje sa eskaliranom dozom RT i TMZ nije značajno poboljšalo ishod pacijenata, u odnosu na grupu sa standardnom dozom RT uz TMZ. Shodno tome, može se razmišljati o eventualnoj eskalaciji doze RT kod onih pacijenata koji nisu podobni za primenu hemioterapije (272). Između ostalog, predstavljeni su i preliminarni rezultati faze 2 studije NRG Oncology BN001 u kojima je analizirano preživljavanje pacijenata kod kojih je primenjena eskalacija doze zračne terapije fotonima, primenom IMRT tehnike sa dozom od 75 Gy u 30 frakcija i grupe kod kojih je sprovedena standardna zračna terapija sa dozom 60 Gy u 30 frakcija. Rezultati ove studije pokazali su da nema statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju između dve analizirane grupe (273). Prema EANO vodiču za dijagnostiku i lečenje difuznih glioma objavljenog 2021. godine, uočava se da je prvi izbor lečenja kod novodijagnostikovanih pacijenata sa glioblastomom *IDH-wild type* SZO gradus 4, kao i za glioblastom NOS SZO gradus 4, primena konkomitantne radioterapije sa TMZ, a preporučena radioterapijska doza 54 - 60 Gy, ali da se za pacijente starosti iznad 65 - 70 godina i MGMT nemetilisane tumore preporučuje doza od 40 Gy u 15 frakcija (113). Po novoj klasifikaciji i EANO vodiču i za astroцитom, *IDH*-mutiran SZO gradus 4 (po staroj klasifikaciji glioblastom, *IDH*-mutiran, SZO gradus IV) preporučena je radioterapijska doza 54 - 60 Gy (113). Drugim rečima, nema velikih izmena u pogledu preporučene RT doze, tj. maksimalna preporučena doza RT je i dalje 60 Gy. Iako je naše istraživanje započeto 2017. godine, preporučena doza po vodičima iz 2016. i 2021. godine, u potpunosti potkrepljuje datu dozu našim pacijentima. Međutim, može se zapaziti da postoji preporučeni opseg doze 54 - 60 Gy. Iako nije naglašeno koji bi pacijenti bili podobni za dozu od 54 Gy, mogu se potencijalno uzeti u obzir svi klinički i patohistološki parametri, ali i pojava toksičnosti terapije (radioterapije i hemioterapije), kada se doza

može prilagoditi. U pogledu hemioterapije, u našem istraživanju primenjena je protokolom preporučena doza temozolomida kod svih pacijenata, kako u konkomitantnom pristupu, tako i u adjuvantnom pristupu lečenja. Pored preporučenih 6 ciklusa adjuvantne primene temozolomida, pojedine studije su ispitivale benefit produžene primene adjuvantne hemioterapije TMZ, do ukupno 12 ciklusa. Meta analiza Attarian i saradnika nije pokazala benefit u preživljavanju pacijenata bez progresije bolesti, kao ni ukupnom preživljavanju kod pacijenata sa produženom primenom TMZ (274).

Kako je jedan od ciljeva našeg istraživanja bio ispitivanje akutne toksičnosti, ispitivane su razlike u nivoima ekspresije mikro RNK-10b/21/34a pre RT, tokom RT i nakon poslednje frakcije RT i njihov mogući uticaj na akutnu toksičnost. Pacijenti su tokom aktivnog lečenja praćeni minimum jednom nedeljno, a po potrebi i češće. Svaka od primećenih akutnih toksičnosti je zabeležena, analizirana i gradirana prema CTCAE, verzija 5.0. U istraživanju su bile zabeležene sledeće toksičnosti: glavobolja, mučnina, povraćanje, epileptički napadi, zamor, somnolencija, konfuzija i agitiranost. Nije analizirana hematološka toksičnost. Za potrebe analize i utvrđivanja nivoa ekspresije, napravljene su dve grupe za analizu pacijenata, odnosno grupa bez toksičnosti i grupa sa toksičnošću. U našem istraživanju, uzimajući u obzir vremenske tačke na 15. frakciji konkomitantne RT sa TMZ i 30. frakcije RT sa TMZ, od 43 ispitivana pacijenta, 22 pacijenta je imalo neku toksičnost (51.2%). Od tih pacijenata koji su imali bilo koju toksičnost, a u odnosu na vremensku tačku posmatranja, 68.2% pacijenata je imalo toksičnost na 15. frakciji RT sa TMZ, dok je nakon 30. frakcije RT sa TMZ akutnu toksičnost imalo 77.3% pacijenata. Akutna radijaciona toksičnost se obično manifestuje 7-14 dana nakon početka RT (275). S obzirom na podatke iz literature, naši rezultati podržavaju navedenu tvrdnju. Međutim, veći broj naših pacijenata koji su imali neku toksičnost, imali su je nakon poslednje frakcije RT sa TMZ. Takođe, zapaženo je povećanje gradusa toksičnosti tokom vremena sprovođenja RT sa TMZ. Akutna radijaciona toksičnost najčešće nastaje zbog inflamacije ili pak predstavlja odraz depopulacije brzorastućih epitelnih ćelija (275). Razlog za nešto češću toksičnost na kraju sprovedene RT, možemo objasniti kumulativnim efektom zračne terapije na ciljno tkivo, tj. ciljni volumen i okolno tkivo. Ciljni volumen za delineaciju kod glioblastoma predstavlja operativnu šupljinu (kavum) (GTV), zaostali deo tumora ili recidiv tumora, 2 cm okolnog moždanog tkiva u svim pravcima oko tumora (CTV) (uz korekciju margina ka prirodnim barijerama i OAR) i marginu od 3 - 5 mm koja čini PTV. Drugim rečima, CTV čini vrlo često okolni moždani parenhim koji je radiografski tumorski neizmenjen, ali može obuhvatiti deo ili ceo okolni edem. Imajući u vidu da se kod naših pacijenata sprovodi konkomitantna zračna terapija sa hemioterapijom temozolomidom, često se procena toksičnosti ova dva modaliteta terapije ne može odvojiti. S obzirom na mehanizam nastanka pojedinih toksičnosti, smatra se da se neke hemioterapijske toksičnosti ipak mogu odvojiti od radioterapijskih, npr. pojava dijareje i hematološke toksičnosti, tj. mijelosupresije kod primene hemioterapije (230). Nehematološke toksičnosti koje su zabeležene u Stupovoj studiji, u grupi kod koje je sprovedena samo RT gradusa 2 jesu zamor kod 21% pacijenata, drugi konstitucionalni simptomi kod 5%, osip i druga dermatološka toksičnost kod 5%, infekcija kod 1%, problemi sa vidom kod 12%, a mučnina i povraćanje kod 3%. Toksičnost gradusa 3 i/ili 4 zabeležena je u vidu zamora kod 5% pacijenata, drugi konstitucionalni simptomi, kao i osip i druge dermatološke toksičnosti kod manje od 1% pacijenata, infekcija kod 2% pacijenata, problemi sa vidom kod 1% pacijenata, a mučnina i povraćanje kod manje od 1% pacijenata (127). Sveobuhvatno, u dodatnom materijalu studije nije naveden ukupni broj pacijenata koji je imao bilo koju toksičnost, kao što je to urađeno u našoj grupi (22 sa toksičnošću i 21 pacijent bez toksičnosti). Prostim sabiranjem pacijenata iz Stupove grupe koji su imali nehematološku toksičnost, dobijamo broj od 168 pacijenata sa toksičnošću (od ukupno 286 u grupi RT). U grupi pacijenata RT sa TMZ (287 pacijenata), prostim sabiranjem dobijamo podatak da je ukupna toksičnost gradusa 2 bila zabeležena kod 200 pacijenata, a toksičnost gradusa 3 i/ili 4 kod 42 pacijenta. Međutim, ovo ne možemo tumačiti i analizirati sa sigurnošću, samim tim ni porediti sa pacijentima iz naše grupe. Kako nemamo sve podatke, ne možemo znati da li su oni pacijenti koji su imali toksičnost gradusa 2, u daljem toku lečenja razvili istu toksičnost gradusa 3/4, koja je navedena. U dodatku, ne

znamo da li je jedan pacijent imao 2 ili više različite toksičnosti. Shodno tome, ovaj ukupni broj koji smo dobili prostim sabiranjem, ne znači nužno da je to zaista ukupni broj pacijenata koji je imao toksičnost. U dodatku, treba spomenuti da u vreme kada je Stupova studija rađena, gradus toksičnosti je ocenjivan prema CTC verziji 2.0, a u našem istraživanju prema CTCAE verziji 5.0, odnosno mogu postojati nešto drugačije definicije gradusa toksičnosti.

U odnosu na distribuciju prema polu i prosečnoj starosti pacijenata, nije bilo statistički značajne razlike između grupe pacijenata koja je imala toksičnost i one grupe koja nije imala toksičnost. Međutim, u odnosu na *IDH1* status mutacije, značajno veći broj pacijenata koji su imali glioblastom *IDH1-wild type* je bio bez toksičnosti, odnosno pacijenti sa toksičnošću su pretežno bili u grupi glioblastom NOS. U literaturi nema preciznih podataka o potencijalnom mehanizmu nastanka i sklonosti ka nastanku radiotoksičnosti ili toksičnosti HT kod pacijenata sa glioblastomom, u odnosu na *IDH* mutacioni status, ali se mogu postaviti hipoteze koje bi vodile ka novim istraživanjima u tom pravcu. Uopšteno govoreći, mehanizam radijacione toksičnosti je složen i nije dovoljno pojašnjen. Ipak, postoje brojni molekularni i ćelijski mehanizmi za koje se smatra da mogu imati bitnu ulogu u mehanizmu radiotoksičnosti CNS. Poremećaj krvno-moždane barijere može se pojaviti kao rezultat oštećenja endotelnih ćelija i smatra se jednim od razloga nastanka sekundarnog edema mozga. Uopšteno rečeno, akutni simptomi toksičnosti mogu biti direktna posledica nastanka sekundarnog edema (233). Jedna *in vivo* studija je pokazala da zračenje može dovesti do produkcije citokina u mozgu i rane ekspresije proinflamatornih gena, za koje su autori sugerisali da su verovatni uzrok pojave ranih simptoma nakon zračne terapije mozga (276). Pošto jonizujuće zračenje, koje se koristi u standardnoj radioterapiji, dovodi do oštećenja ćelija najčešće mehanizmom delovanja slobodnih radikala, smatra se da kasni neželjeni efekti zračenja mozga, mogu biti rezultat dugotrajnog delovanja slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species* - ROS), citokina (233) i mikro RNK koji regulišu signalne komponente oksidativnog stresa (222). Proinflamatorni citokini i faktori rasta značajno povećavaju koncentraciju unutarćelijskih reaktivnih jedinjenja kiseonika. Pokazano je da se veća koncentracija makrofaga i limfocita zapaža kod *IDH-wild type* tumora, dok se kod *IDH*-mutiranih tumora, nalazi skoro isključivo mikroglia (234). Kako je već nešto detaljnije navedeno u uvodu ove disertacije, jedan od faktora koji je u korelaciji sa toksičnošću zračenja CNS uključuje i radijacionu povredu krvnih sudova (231). S obzirom na to da kod glioblastoma postoji poremećena vaskularna mreža u odnosu na normalno moždano tkivo, postavlja se pitanje da li postoji razlika u vaskulaturi u odnosu na *IDH* mutacioni status glioblastoma. Kod *IDH* mutiranih glioma, pokazano je da stereoizomer 2-hidroksiglutarata deluje kao aktivator EglN prolil 4-hidroksilaze čime dovodi do smanjenja nivoa hipoksija inducibilnog faktora-1 $\alpha$  i smanjene ekspresije gena, koji su uključeni u signalne puteve vezane za angiogenezu (277). U dodatku, Zhang i saradnici su naveli da je postojanje *IDH* mutacije udruženo sa značajno sniženom aktivacijom komplementa i sniženim brojem CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija (278). Dalje, autori navode da 2-hidroksi glutarat deluje kao međućelijski medijator kod *IDH* mutiranih glioma i utiče na sprečavanje aktivacije komplementa i T ćelija (278). Takođe, u literaturi se nalaze podaci koji sugerišu da su *IDH-wild type* niskogradusni gliomi više prokrvljeni, nego *IDH* mutirani niskogradusni gliomi (279). Analizirajući prethodno navedeno, kao i to da se u mehanizmu radiotoksičnosti često spominje radijaciona povreda krvnih sudova i endotelnih ćelija, te prekid krvno-moždane barijere, možemo dalje da razmišljamo o tome na koji način jonizujuće zračenje utiče na vaskulaturu i mikrookolinu tumora, u odnosu na *IDH* mutacioni status. Odnosno, postavlja se pitanje da li se zbog potencijalno manjeg inflamatornog odgovora kod *IDH*-mutiranih glioblastoma i smanjene angiogeneze očekuje manja toksičnost, nego u odnosu na *IDH-wild type*. U našem istraživanju veći broj pacijenata koji nije imao toksičnost nalazio se u grupi *IDH-wild type*. Ovo zapravo ukazuje na početak naše debate o mehanizmu radiotoksičnosti u odnosu na *IDH* mutacioni status i govori u prilog tome da se ne može sa sigurnošću povezati status *IDH* mutacije i radiotoksičnosti. Uzgred, budi rečeno, može se spekulirati o tome, da li se nakon operativnog lečenja i ekstirpacije tumora i podvezivanja ili uklanjanja aberantnih i umnoženih krvnih sudova tumora, gubi na značaju mehanizma toksičnosti u odnosu na *IDH*

status. Odnosno, da li postoperativne promene utiču na okolni parenhim i smanjen krvni protok, te posledično manju radijacionu povredu krvnih sudova, ostaje predmet daljeg istraživanja. U našem istraživanju, najveći broj pacijenata sa toksičnošću bio je u grupi glioblastoma NOS, što predstavlja još veću dilemu, ali najpre ukazuje na to, da su u mehanizam radiotoksičnosti uključeni mnogi drugi procesi i mehanizmi. Ne treba zanemariti i druge potencijalne mehanizme radiotoksičnosti. Kada govorimo o mikrookolini glioblastoma, treba imati u vidu da njih čine reaktivni astrociti, endotelne ćelije, imune ćelije, od kojih najviše mikroglija i makrofazi (279). U radiotoksičnosti takođe, ulogu ima i okolno, tumorom nezahvaćeno tkivo mozga. Odnosno, reakcija ćelija na radijaciono oštećenje tj. povredu zdravog tkiva uključuje reakciju različitih tipova ćelija, kao što su astrociti, mikroglija, oligodendrociti, endotelne ćelije i neuroni koji izazivaju zapaljensku kaskadu i dovode do vaskularne povrede, oštećenja krvno-moždane barijere, ćelijske smrti neuralnih progenitora i sprečavanje procesa neurogeneze (280). I pored svih savremenih tehnika planiranja i sprovođenja RT i smanjene integralne doze zračenja, neke strukture mozga mogu da prime nisku dozu zračenja i ipak dovedu do nekih toksičnih efekata. Primera radi, zračenjem izazvana mučnina i povraćanje mogu nastati već nakon primene zračenja doze veće od 0.35 Gy, koje nastaje kao odgovor okidačke zone hemoreceptora produžene moždine, na zračenjem izazvane proinflamatorne draži (281). Uz to, toksičnost ili neželjeni efekti mogu nastati i dejstvom jonizujućeg zračenja na ćelije izvan zračnog polja, odnosno mehanizmom efekta eng. *bystander effect*, što je potvrđeno *in vivo* studijama. Ovaj efekat sugerise povezanost i komunukaciju između ozračenih i neozračenih ćelija. Smatra se da primena jonizujućeg zračenja na određeni deo tkiva ili ćelija može dovesti do oštećenja hromozoma, kao i ćelijskih i molekularnih oštećenja na udaljenom tkivu (282). Nakon sprovedenog jonizujućeg zračenja, patohistološkim pregledom se mogu uočiti demijelinizacija, proliferativne ili degenerativne glijalne reakcije, gubitak endotelnih ćelija i kapilarno začepljenje (231). Razlozi koji mogu doprineti toksičnosti centralnog nervnog sistema su oštećenje vaskularnih struktura, gubitak oligodendrocitnih tip 2 astrocitnih progenitora, kao i zrelih oligodendrocita, neuralnih stem ćelija u hipokampusu, malom mozgu i moždanoj kori, kao i opšti poremećaj ekspresije citokina (231). U stručnoj literaturi se može pronaći podatak da su oligodendrociti veoma osetljivi na jonizujuće zračenje (283). Zbog toga, jonizujuće zračenje i pored direktnih efekata na oligodendrocite, može dovesti do oslobađanja citokina, koji dodatno mogu da oštete oligodendrocite. Imajući u vidu da se govori o radijacionom oštećenju koje može dovesti do povećane ekspresije proinflamatornih medijatora, postoje i druge supstance koje su povezane sa nivoom ekspresije proinflamatornih medijatora i njihovim međusobnim uticajem, poput  $\beta$ -endorfina. U odgovoru na stres i zapaljenje kao delu imunog odgovora, može doći do proizvodnje citokina i potom lučenja glukokortikoida, delovanjem hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežne osovine. U dodatku, naglašava se i posebna veza između imunog sistema i  $\beta$ -endorfina, koji može imati i inhibitorski efekat na cirkulišuće citokine, ali i stimulišući efekat na imuni sistem (284). Jedna od najčešćih zabeleženih toksičnosti kod primene radioterapije bilo koje regije je pojava zamora, koji se najčešće manifestuje nakon 3 - 4 nedelje od početka RT (285). Mehanizam nastanka radioterapijom indukovano zamora nije u potpunosti razjašnjen. Međutim, Hermann i saradnici su na animalnom modelu pokazali da se nivo  $\beta$ -endorfina u plazmi značajno povećava 4 nedelje nakon početka RT, sugerišući da  $\beta$ -endorfin može posredovati u nastanku zamora indukovano radioterapijom (285).

U našem istraživanju ispitivali smo nivo ekspresije mikro RNK-10b/21/34a, kako smo naveli prethodno, u 3 vremenske tačke. Naši rezultati su pokazali da su viši nivoi ekspresije miR-10b i miR-21 pretežno povezani sa gradusom toksičnosti, dok nivoi ekspresije miR-34a nisu povezani sa gradusom toksičnosti. Poredeći grupe bez toksičnosti i sa toksičnošću na 15. frakciji zračne terapije, utvrdili smo statistički značajno više nivoe ekspresije miR-10b i miR-34a u grupi pacijenata koji su imali toksičnost. Međutim, nije bilo razlike između grupa u tački pre početka RT i nakon 30. frakcije RT. Kada smo posmatrali nivoe ekspresije u grupi pacijenata koji nisu imali toksičnost, nivoi ekspresije miR-34a su bili značajno viši na 15. frakciji i nakon 30. frakcije RT, u odnosu na početne vrednosti ekspresije miR-34a.

Dalje, medijane vrednosti miR-34a su bile najveće nakon poslednje frakcije RT. Takođe, u grupi pacijenata koji su imali toksičnost zapažena je slična situacija. Naime, nivoi ekspresije miR-34a su bili značajno viši na 15. frakciji i nakon poslednje frakcije RT u odnosu na početne vrednosti. Naši rezultati su dalje ukazali na značajne pozitivne korelacije među ispitivanim mikro RNK u sve tri vremenske tačke, a najjače korelacije su uočene između miR-10b i miR-21 na 15-oj frakciji kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću, miR-21 i miR-34a nakon 30 frakcije RT bez ispoljene toksičnosti, miR-21 i miR-34a na 15. frakciji kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću i između miR-21 i miR-34a na 15. frakciji RT kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću. Kako je ukratko prepričan deo rezultata ove disertacije u prethodnom delu ovog pasusa, možemo zaključiti da su se nivoi ekspresije sve 3 ispitivane mikro RNK menjali po vremenskim tačkama. Da bismo mogli razumeti i rasvetliti moguću ulogu mikro RNK u predikciji toksičnosti kod primene RT sa TMZ, moramo se ponovo vratiti i analizirati mehanizam toksičnosti. Kao što smo već naveli, najčešće inflamatorna reakcija indukovana zračenjem je posledica produkcije i delovanja slobodnih radikala, odnosno ROS. Nakon izlaganja jonizujućem zračenju dolazi do produkcije različitih citokina koji dodatno stimulišu inflamatorni odgovor, a mikro RNK regulišu ključne gene u odgovoru na stres, a samim tim i zapaljensku reakciju. MiR-34a je uključena u prekomernu proizvodnju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze 2 (NOX2), ali i drugih enzima koji pospešuju stvaranje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, te je moguće da utiče na oksidativnu, odnosno antioksidativnu ravnotežu (286,287). Tako, na primer, miR-34a menja profil ekspresije citokina kao što su interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), čime utiče na regulaciju odgovora na zapaljenje (222). Proinflamatorni citokini kao što su TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$  i adhezioni molekuli poput intracelularnog adhezionog molekula (ICAM) mogu sudelovati u radijacionoj toksičnosti mozga (231). Takođe, eksperimentalno je pokazano da je nivo ekspresije proinflamatornih medijatora poput IL-1b, IL-6 i TNF- $\alpha$  povećan nakon sprovedenog jonizujućeg zračenja na mozgu animalnog modela (Fišer pacova) (238). Pored toga, primećeno je da se nivo ekspresije gena TGF- $\beta$  i nivo cirkulišućeg IL-6 menja u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa karcinomom prostate kod kojih se primenjuje RT. Naime, rezultati Stanojković i saradnika pokazali su da je povećana koncentracija interleukina-6 (IL-6) povezana sa višim gradusom akutne genitourinarne toksičnosti kod pacijenata kod kojih se sprovodi zračna terapija u lečenju karcinoma prostate, dok je nivo ekspresije TGF- $\beta$  bio snižen tokom lečenja RT (288). Wang i saradnici, su ispitivali povezanost medijatora zapaljenja sa nastankom radijacionog pneumonitisa, te su njihovi rezultati pokazali da su interleukin-8 i TGF- $\beta$ 1 značajno povezani sa nastankom radijacionog pneumonitisa gradusa  $\geq 2$  (289). Kopčalič i saradnici su zapazili značajnu povezanost između nivoa ekspresije cirkulišućih TGF- $\beta$ 1 pre početka RT sa najvišim stepenom toksičnosti, kao i nivoa ekspresije TGF- $\beta$ 1 nakon 25. frakcije RT i stepena toksičnosti u ovoj vremenskoj tački. Između ostalog, autori su uočili povezanost između nivoa ekspresije IL-6 pre početka RT i stepena zamora nakon 25. frakcije RT. Ipak, autori naglašavaju i dodatne faktore koji su povezani sa ovim rezultatima, poput komorbiditeta (šećerna bolest) kao i navika (pušači cigareta) (290). Na ovim primerima možemo videti različite podatke o nivoima ekspresija istih citokina, što može biti rezultat reakcije različitog tkiva i ćelija na RT. U prilog tome može ići i to, da se osim različitog tkiva koje se nalazi u ciljnom volumenu zračenja, u određenim onkološkim oboljenjima se primenjuju i dodatni modaliteti lečenja poput različite hemioterapije (neoadjuvantno, konkomitantno/adjuvantno, sistemski), te hormonoterapije, koja može aktivirati i dodatne mehanizme oštećenja, odnosno pojavu toksičnosti. Uz to, poznato je i da pojedini komorbiditeti menjanju strukturu okolnog tkiva i njegovu vaskularnu mrežu. Kako je poznato da se proces zapaljenja nakon oštećenja ćelija kontinuirano dešava u procesu nastanka malignog oboljenja i njegove progresije što vodi ka proizvodnji hemokina i citokina, mobilizacije zapaljenskih ćelija na mestu oštećenja (291), može postojati i određeno sabirno dejstvo u vidu daljeg oštećenja ćelija izazvano primenom jonizujućeg zračenja. Drugim rečima, ovakvo delovanje bi se potencijalno manifestovalo u vidu toksičnosti i pojavi simptoma toksičnosti. Mikro RNK imaju značajnu dvosmernu povezanost sa ekspresijom citokina, te povećan ili snižen nivo ekspresije neke mikro RNK

zbog neodgovarajuće produkcije citokina, može dalje dovesti do poremećaja ćelijske homeostaze (292). Takođe, na mikro RNK mogu delovati brojni stimuli poput metabolita i hormona (292).

Kako su mikro RNK predstavljene kao ključne komponente ćelijske fiziologije, neki istraživači su pokušali da bliže objasne njihov značaj u kaskadi kod zapaljenja povezanih sa kancerom. Na osnovu pregleda literature postoje sugestije da mikro RNK regulišu gene povezane sa produkcijom različitih citokina. Shodno tome, pojedini autori su i šematski predstavili dijagram pojedinih citokina i mikro RNK koje mogu biti povezane sa nastankom inflamacije kod kancera. Između ostalih, može se zaključiti da se miR-21 povezuje sa proizvodnjom TNF- $\alpha$  i IL-6 (291). Odnosno, miR-21 može da ima značajnu ulogu u odgovoru na zapaljenje (293). Na animalnom modelu je otkriveno, da su citokini IL-4, IL-5, IL-12-p35 i IL-13 zavisni od modulacije mikro RNK-21 (294). S druge strane, pokazano je da miR-10b može da umanji stepen apoptoze izazvane jonizujućem zračenjem u ćelijama glioblastoma (226). Dalje, koinhibicija miR-10b i miR-21 može značajno smanjiti rast ćelija i invazivnu sposobnost u ćelijskoj liniji glioblastoma U87MG, sugerišući na njihov sinergistički uticaj na njihove zajedničke gene (295). Mikro RNK-21 nishodno reguliše proteine informacionih RNK, čiji proteinski proizvodi učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa, apoptoze, popravke oštećenja DNK-a, hipoksije i povezana je sa radiosenzitivnošću zdravih tkiva i tumora, kao i radiorezistentnošću tumora (296).

S obzirom na predstavljene dokaze iz literature o ulozi mikro RNK u kaskadi i kontroli zapaljenja kod kancera i progresije kancera, trebalo bi dalje razmišljati o ulozi tj. kontroli mikro RNK u kaskadi zapaljenja nakon primenjene RT. Citokini su među najbitnijim proteinima čija je ekspresija kontrolisana od strane mikro RNK, a njihova ushodna regulacija i uloge koju ostvaruju mogu uticati i na nivo ekspresije samih mikro RNK (297). Smatra se da postoji dvosmerna regulacija između mikro RNK i citokina iz T-limfocita (297). Između ostalog, opisana je i značajna povezanost mikro RNK-155 sa T-pomoćnim ćelijama (297). Imajući u vidu prethodno pomenutu akutnu genitourinarnu toksičnost i povezanost sa citokinima, trebalo bi pomenuti i rezultate istraživanja o mogućoj povezanosti mikro RNK i genitourinarne toksičnosti, kod pacijenata sa karcinomom prostate. Naime, istraživači su ispitivali povezanost nivoa ekspresije miR-21/146a/155 u 3 vremenske tačke (pre RT, nakon RT i na prvoj kontroli nakon sprovedene RT), sa akutnom genitourinarnom toksičnošću. Autori su uočili najvišu koncentraciju miR-21 nakon sprovedene RT u grupi pacijenata koji su imali radiotoksičnost, kao i značajno više nivoa ekspresije miR-146a/155 kod pacijenata sa akutnom radiotoksičnošću, u odnosu na pacijente koji nisu imali radiotoksičnost. Takođe, istraživači su izvestili da postoji značajna promena nivoa ekspresije miR-146a/155 kod pacijenata koji nisu imali radiotoksičnost (229). Iz njihovih rezultata može se zaključiti da ekspresija miR-21 varira značajno između pacijenata sa toksičnošću i pacijenata bez toksičnosti, što se razlikuje u odnosu na rezultate našeg istraživanja. Kod ovakvog poređenja, mora se uzeti u obzir da su Kopčalić i saradnici ispitivali akutnu radiotoksičnost kod pacijenata sa rakom prostate. Preciznije rečeno, ciljni volumeni zračne terapije, doza zračne terapije i organi pod rizikom su drugačiji, pa je samim tim i toksičnost drugačija. Takođe, kod naših pacijenata se sprovodila konkomitantna radioterapija sa TMZ, te potencijalno dodatno dejstvo TMZ na radiotoksičnost ne treba zanemariti. Zbog toga, upotreba određene mikro RNK za predviđanje radiotoksičnosti može se razlikovati između različitih vrsta maligniteta. Promena nivoa ekspresije mikro RNK-21 u mononuklearnim ćelijama krvi u odgovoru na jonizujuće zračenje, može biti povezana tj. uslovljena tipom ili podtipom tumora ili gradusom tumora.

Liu i saradnici su ispitivali potencijalnu ulogu mikro RNK-34a u odgovoru na jonizujuće zračenje i postavili sumnju da miR-34a ima ulogu kao ključni medijator u radijacionom oštećenju, a samim tim da može da ima ulogu i u zaštiti od jonizujućeg zračenja (298). Pojedini molekuli učestvuju u regulaciji radiosenzitivnosti poput familije proteina *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Njihova prekomerna ekspresija snižava radiosenzitivnost različitih malignih ćelija, zbog čega se ispitivao uticaj Bcl-2, kao direktne mete za delovanje mikro RNK-34a. Naime, miR-34a može da poveća radiosenzitivnost nishodnom



regulacijom proteina Bcl-2, nakon čega dolazi do povećanja stopa apoptoze i narušavanja vijabilnosti ćelija (298). Eksperimentalno je pokazano na ćelijama glioblastoma, da kada se nivo ekspresije Bcl-2 smanji nakon primene jonizujućeg zračenja, stopa apoptoze raste (298). Ovo je jedan od mehanizama koji može uticati na povećanje radijacionog oštećenja.

U našem istraživanju, korišćeni su različiti statistički pristupi kako bi se objektivno i iz različitih uglova analizirala potencijalna povezanost između nivoa ekspresije molekula mikro RNK-10b/21/34a i toksičnosti i stepena toksičnosti tokom vremena (vremenske tačke). Toksičnost se najčešće događa posle određenog vremena nakon izloženosti zračenju, što je dobro poznata činjenica, a koja je i u skladu sa našim dobijenim rezultatima. Tačnije, naši rezultati govore u prilog tome da je povećanje nivoa ekspresije miR-10b i miR-21 povezano sa većim gradusom toksičnosti, što ukazuje da bi ove dve mikro RNK mogle da budu indikatori gradusa tj. stepena toksičnosti. S druge strane, miR-34a, može da ima drugačiju ulogu, u smislu regulisanja homeostaze nakon izloženosti jonizujućem zračenju. Nivoi ekspresije miR-10b i miR-34a su se statistički značajno razlikovali između grupe sa toksičnošću i grupe bez toksičnosti na 15. frakciji, ali ne i na 30. frakciji. Ispred navedeno može da ukazuje na to da najvažniji događaji biološkog mehanizma radiotoksičnosti mogu da nastanu upravo u ovoj vremenskoj tački (15. frakcija). Nivo ekspresije miR-34a je bio značajno povišen nakon sprovedenog konkomitantnog lečenja RT sa TMZ. U dodatku, nivo ekspresije miR-34a se razlikovao između početnih vrednosti i 15. frakcije RT, kao i između početnih vrednosti i nakon 30. frakcije RT, ali nije bilo statistički značajne razlike u nivou ekspresije između 15. i nakon 30. frakcije RT, što smo i očekivali. Odnosno, kako smo pomenuli u tekstu, miR-34a potencijalno može biti prepoznata kao dozimetar za ekspoziciju jonizujućem zračenju (222), odnosno nivo njene ekspresije može da se povećava sa povećanjem doze zračenja. Trebalo bi imati u vidu da su pojedinačne, dnevne, terapijske doze kod sprovođenja postoperativne zračne terapije za lečenje glioblastoma 2 Gy (odnosno 30 dnevnih frakcija po 2 Gy), čime se smanjuje rizik od nastajanja radijacione toksičnosti. Dokumentovane razlike između grupa kod kojih je poređena toksičnost ukazuju na to da mikro RNK-34a ima mogućnost da utiče na stratifikaciju pacijenata u grupu sa nižim, odnosno višim rizikom od razvijanja radijacione toksičnosti. Kao što je i pomenuto, druge studije su pokazale da mikro RNK-34a učestvuje u regulaciji bioloških procesa u mehanizmu radijacione toksičnosti, najpre u vidu proizvodnje citokina, oštećenja vaskularnih sudova, nastanka fibroze, kao i u odgovoru na oštećenje DNK. U dodatku, trebalo bi spomenuti da je nivo ekspresije miR-34a u T-limfocitima u korelaciji sa vremenom, dozom zračenja i mutacionim statusom *ATM* gena (299), što je dodatni dokaz njene povezanosti sa krajnje individualnom radiosenzitivnošću.

Korelaciona analiza pokazala je da svaka pojedinačna mikro RNK upotpunjava jedna drugu u pogledu odgovora na jonizujuće zračenje, te da bi zajedno mogle imati sinergistički efekat, odnosno, da na neki način sudeluju u odgovoru na jonizujuće zračenje. Takođe, mnogobrojne mikro RNK mogu da ciljaju i regulišu jedan isti gen, te kombinacija delovanja ovih mikro RNK može odrediti ekspresiju odgovarajućih informacionih RNK (300). Prema našoj bioinformatičkoj analizi, signalni putevi ovih mikro RNK se ukrštaju. Takođe, rezultati bioinformatičke analize ukazuju da je gen *BRCA1* zajednički ciljani gen za ispitivane mikro RNK-10b/21/34a. Od ranije je poznato da je dvostruko oštećenje DNK lanca najbitniji događaj nakon primene jonizujućeg zračenja, nakon čega dolazi do aktivacije mehanizma popravke DNK oštećenja. Protein BRCA1 promovise homolognom rekombinacijom posredovanu popravku dvostrukog oštećenja DNK lanca i predstavlja potencijalno dobar prediktivni molekul za odgovor na radioterapiju (301). Analiza KEGG putanje pokazala je da su targeti ispitivanih mikro RNK uključeni u signalni put Fankonijeve anemije. Naime, Fankonijeva anemija je forma urođene aplastične anemije i nasleđuje se autosomno recesivno ili kao X-povezani genetski poremećaj koji karakteriše krhkost hromozoma, urođene malformacije i sklonost ka nastanku malignih bolesti (302). Pacijenti koji boluju od Fankonijeve anemije su obično izuzetno osetljivi na jonizujuće zračenje, pa tako i primenu radioterapije (303).

U našem istraživanju pokušali smo da otkrijemo da li postoji povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa kliničko patološkim faktorima, a jedan od njih je i veličina tumora pre operativnog lečenja. Nivo ekspresije ovih mikro RNK smo takođe pratili u 3 vremenske tačke (pre početka RT, na 15. frakciji i nakon 30. frakcije RT). Jedinu statističku značajnost dobili smo za nivo ekspresije miR-10b i miR-21, za veličinu tumora manjeg od 4 cm, u tački praćenja pre početka RT, što nismo očekivali. Odnosno, očekivali smo da će nivo ekspresije miR-10b i miR-21 biti statistički značajan za tumore veće od 4 cm. Mikro RNK-21 je prepoznata kao jedan od najjačih onkogeno i igra ključnu ulogu u kancerogenezi, metastatskom potencijalu i relapsu bolesti (296), što nas je usmerilo ka teoriji da tumori koji su pri prezentaciji bolesti veći, mogu imati veću ekspresiju ove mikro RNK. Takođe, miR-10b se smatra visoko onkogenom mikro RNK i zapažena je njena prekomerna ekspresija kod glioblastoma, kao i to da može uticati na tumorogenezu tj. gliomagenezu (304). U prilog te hipoteze uzeli smo činjenicu da je u tkivu tumora dojke pronađena prekomerna ekspresija mikro RNK-21, dok je primena inhibitora miR-21 nazvanog *antimiR-21* inhibisala rast ćelija tumora kako *in vitro*, tako i *in vivo* (305). Takođe, analizirajući druge mikro RNK, došli smo do podataka iz studije Yanga i saradnika, gde je utvrđeno da je nivo ekspresije miR-32 kod hepatocelularnog karcinoma, u pozitivnoj korelaciji sa brojem fokusa i veličinom tumora, ali nema značajnosti sa drugim kliničko-patološkim faktorima, kao što su pol, starost i diferentovanost tumora (306). Takođe, manji tumori u mozgu su, sa neurohirurškog aspekta, često podobniji za potpuno uklanjanje, te nakon potpune ekstirpacije tumora, teorijski bi se moglo očekivati da nivo ekspresije bude manji, nego kod većih tumora. Kod većih tumora potencijalno se može očekivati određeni zaostatak tumora, a samim tim i šansa za veću ekspresiju mikro RNK. Mada, ovo u potpunosti ne potvrđuje našu sumnju. Ipak, i mali tumori ukoliko su lokalizovani u elokventnim zonama mozga mogu biti samo parcijalno resekovani ili pak samo bioptirani. Za relevantnost tumačenja nivoa ekspresije mikro RNK i povezanosti sa veličinom tumora, najpre bi trebalo izmeriti nivo ekspresije mikro RNK pre početka operativnog lečenja, a mi smo u našem istraživanju merili nivo ekspresije mikro RNK nakon operativnog lečenja, a pre početka RT. Međutim, ukoliko govorimo o glioblastomima, koji imaju karakterističnu heterogenu patohistološku sliku i kod kojih se, između ostalog, uočavaju različiti fokusi i veličina nekroze, postoji mogućnost da kod manjih tumora, fokusi nekroze budu manje izraženi, te da mikrookolina glioblastoma i okolnog tkiva, još uvek nema potpuno poremećenu intracelularnu i intercelularnu komunikaciju i da se prekomerna ekspresija mikro RNK može detektovati u nešto većoj koncentraciji i kod manjih tumora. Uz to, proliferativna sposobnost tumora istovremeno može biti veća. Mehanizam oslobađanja mikro RNK nije u potpunosti jasan, ali se pretpostavlja da se oslobađaju iz apoptoznih telašaca, kao i vijabilnih tumorskih ćelija, dok se intercelularna komunikacija preko mikro RNK odvija preko egzozoma, ekstracelularnih vezikula, pukotinastih veza itd. (307). Upravo, miR-21 iz egzozoma izvedenih iz glioblastoma, utiče na celu mikrookolinu tumora, a takođe deluje na proces angiogeneze preko posrednika VEGFR2 (307). U pogledu miR-10b, trebalo bi imati u vidu da jedine zdrave ćelije koje mogu da ekspimiraju miR-10b jesu ljudske moždane endotelne ćelije (308), što može uticati i na ukupnu ekspresiju miR-10b. U dodatku, miR-21, osim što je prepoznata kao potentan onkomiR, kao što smo naveli prethodno u tekstu, uključena je i u inflamatorni odgovor, popravak oštećenja DNK lanca, jer može da nishodno reguliše („utišava“) više meta. Takođe, u našem istraživanju miR-21 merena je iz limfocita, što bi ukazivalo na to da su promene nivoa ekspresije mikro RNK više usmerene na predikciju toksičnosti.

Pojedina istraživanja su pokazala na različitu ekspresiju mikro RNK u određenim delovima mozga. Tako, neke od najčešćih mikro RNK koje se nalaze u slepoočnom režnju neokorteksa su: hsa-let-7a-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-23c, hsa-let-7c, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7d-5p i mnoge druge (309). Takođe, spekuliše se o mogućem uticaju pojedinih mikro RNK na razvoj određenih delova mozga i njihovih funkcija. Primera radi, miR-941 je specifična za ljudski mozak i visok nivo njene ekspresije se nalazi u ljudskom prefrontalnom korteksu i cerebelumu i smatra se da ima ulogu u signalizaciji neurotransmitera, govoru i slično (310). S obzirom na to da su pojedine studije pokazale

različitu ekspresiju mikro RNK u nekim delovima mozga, mi smo istraživali da li se razlikuju nivoi ekspresije miR-10b/21/34a u odnosu na lokalizaciju tumora, a grupe smo podelili na: tumor u čeonom režnju, tumor u slepoočnom režnju i tumor u ostalim lokalizacijama. Nismo našli statističku značajnost u nivou ekspresije miR-10b/21/34a između tumora u čeonom režnju, slepoočnom režnju i tumora u ostalih lokalizacijama. Ozdogan i saradnici su ispitivali nivo ekspresije miR-221 kod glijalnih tumora u različitim lokalizacijama mozga, te takođe nisu pronašli statističku značajnost između nivoa ekspresije miR-221 i specifične lokalizacije tumora u mozgu (311).

Mikro RNK imaju važnu ulogu u gliomagenezi i regulišu mnoge gene i signalne puteve. Kako je prethodno dokazana uloga *IDH* mutacije kod glioblastoma, kao i to da je nivo ekspresije miR-10b/21 prekomerno eksprimiran u ćelijama glioblastoma, ispitivali smo moguću povezanost nivoa ekspresije miR-10b/21/34a iz mononuklearnih ćelija periferne krvi kod naših pacijenata i *IDH1* mutacionim statusom. Kod *IDH1* pozitivnog mutacionog statusa, aktivnost IDH mutiranog enzima podstiče stvaranje 2-hidroksiglutarata, što potom vodi ka izmenjenom epigenetičkom statusu i metaboličkom reprogramiranju. Ovaj proizvod, 2-hidroksiglutarat, inhibiše funkciju T-limfocita i na taj način „utišava“ odgovor imunološkog sistema na tumor (312). Postavili smo hipotezu da će viši nivoi ekspresije miR-10b/21 biti u pozitivnoj korelaciji sa *IDH1-wild type* glioblastomom. Takav rezultat bi potencijalno dodatno stratifikovao pacijente sa glioblastomom. Kako je miR-21 jedan od najjačih onkogeno sa dokazanom prekomernom ekspresijom kod GB, kao i da je GB zavisao od miR-10b (ablacija gena za miR-10 je letalna za ćelije glioma) (308), dokaz o povezanosti ova dva parametra bi potencijalno dodatno definisao grupu *IDH1-wild type* glioblastoma i stvorio uslove za dalja istraživanja u rasvetljavanju mehanizma biološke agresivnosti tumora. Međutim, u našem istraživanju nismo našli statističku značajnost u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a povezanu sa *IDH1* mutacionim statusom. Opet bi trebalo naglasiti, da su uzorci za analizu nivoa ekspresije mikro RNK uzeti pre početka RT, odnosno nakon operativnog lečenja, što bi moglo uticati na rezultate. Štaviše, ni ti rezultati možda ne bi bili dovoljno precizni, kao kad bi se nivo ekspresije mikro RNK određivao direktno iz uzoraka glioblastoma ili cerebrospinalne tečnosti (likvora). U dodatku, treba pomenuti da nisu samo miR-10b i miR-21 jedine značajne mikro RNK za gliomagenezu kod glioblastoma, jer postoji spektar mikro RNK koje imaju potencijalnu ulogu i deluju kao onkogeni (eng. *oncomiR*) ili pak, kao tumor supresori. Sippl i saradnici su sugerisali da miR-181a2 može biti prognostički marker za određene pacijente sa *IDH1-wild type* glioblastomom. S obzirom na to da je pokazano da miR-181a2 reguliše *IDH1* ekspresiju u masnom tkivu i uzevši u obzir kakav uticaj ima *IDH1* mutacija u kliničkom toku i biološkom ponašanju glioblastoma, istraživači su ispitivali moguću uticaj nivoa ekspresije miR-181a2 na IDH ekspresiju, klinički tok i prognozu pacijenata sa GB. Za potrebe istraživanja koristili su tkivne uzorke glioblastoma, a za kontrolnu grupu korišćeno je postmortalno tkivo mozga od donora koji nisu bolovali od glioma. Njihova studija je pokazala značajno duže ukupno preživljavanje kod pacijenata koji su imali glioblastom *IDH1-wild type* sa niskom ekspresijom miR-181a2 (313). Rezultati Wanga i saradnika su predstavili specifičan mikro RNK profil (eng. *miRNAs signature*), sačinjen od 23 mikro RNK, koji ima 1.5 puta veću ekspresiju kod *IDH1* mutiranih glioblastoma, nego kod *IDH-wild type* glioblastoma (314). Među te 23 mikro RNK, ne nalaze se miR-21 i miR-10b, ali se nalazi miR-34a. Ozdogan i saradnici nisu pronašli povezanost između nivoa ekspresije ispitivane miR-221 i *IDH* mutacionog statusa (311).

U našoj grupi pacijenata, medijana preživljavanja bez progresije bolesti bila je 10 meseci, dok je medijana ukupnog preživljavanja bila 15 meseci. Ovi rezultati su u skladu i sa podacima iz literature. U Stupovoj studiji, medijana ukupnog preživljavanja je bila 14.6 meseci u grupi kod kojih je primenjen RT+TMZ (127). Međutim, u Stupovoj grupi pacijenata, medijana preživljavanja bez progresije bolesti bila je 6.9 meseci (127), dok je u našoj grupi medijana PFS bila 10 meseci. Međutim, u našoj grupi ispitivana su 43 pacijenta, a u Stupovoj grupi RT sa TMZ 287 pacijenta. Odnosno, Stupp i saradnici su u svojoj studiji imali uključeno skoro 6 puta više pacijenata, u odnosu na naš broj pacijenata. Stupova

studija je objavljena 2005. godine, a s obzirom na vreme proteklo od te studije, trebalo bi podatke OS i PFS uporediti i sa rezultatima novijih istraživanja. U vezi sa tim, pronašli smo istraživanje, u kome je bio uključen isti broj pacijenata, kao u našem istraživanju (43 pacijenta). Takođe, i kod njihovih pacijenata sproveden je Stupov protokol, odnosno konkomitantna RT sa TMZ, a potom adjuvantna primena TMZ. Slično, u njihovoj kohorti, kod najvećeg broja pacijenata (91%) urađena je totalna resekcija tumora, a kod 9% parcijalna resekcija tumora. Mada, u njihovom istraživanju bili su uključeni i pacijenti ECOG PS 2, što nije bio slučaj kod našeg istraživanja, kao što smo prethodno naveli (zbog propisanih indikacija). Medijana ukupnog preživljavanja kod njihovih pacijenata je bila 15 meseci, što je identično kao u našoj grupi pacijenata. Ipak, autori nisu naveli PFS, tako da taj rezultat ne možemo upoređivati. Marenco-Hillebrand i saradnici su 2020. godine objavili sistematski pregled trenda ishoda glioblastoma tokom vremena, odnosno ishoda lečenja pre i posle ere kombinovanog lečenja RT i TMZ (315). Ta studija pokazala je centralnu tendenciju medijane ukupnog preživljavanja od 13.5 meseci. Medijana ukupnog preživljavanja između perioda pre implementacije protokola RT + TMZ bila je 12.5 meseci, dok je medijana ukupnog preživljavanja sa RT + TMZ protokolom iznosila 15.6 meseci (315). Štaviše, autori su naveli, da analizom 9 studija sa prikupljenim podacima nakon 2010. godine, centralna tendencija medijane ukupnog preživljavanja iznosila je 15 meseci. U dodatku, oni navode da je u kliničkim studijama primena bevacizumaba, *tumor treating fields* i specifičnih vakcina pokazala napredak u medijani OS (315). Međutim, mogu se naći i drugačiji rezultati od prethodno predstavljenih. Na primer, meta analiza Kaka i saradnika nije ustanovila benefit u primeni bevacizumaba kod adultnih pacijenata sa novodijagnostikovanom glioblastomom u pogledu OS, ali jeste sugerisala benefit za PFS (316). Među najnovijim objavljenim istraživanjima, koja izveštavaju o ishodu pacijenata sa glioblastomom, jeste i istraživanje Brown i saradnika, objavljeno krajem juna 2022. godine (252). Autori su analizirali tok bolesti i lečenja, tj. ishod kod 490 pacijenata sa glioblastomom, ali je njihova grupa bila heterogenija u odnosu na našu grupu pacijenata. Odnosno, u njihovoj analizi bili su uključeni pacijenti kod kojih je sproveden različit stepen operativnog zahvata, uključujući i samo biopsiju tumora. Takođe, veći deo pacijenata je lečen standardnom radioterapijom i hemioterapijom, dok je manji deo pacijenata lečen nestandardnom radioterapijom i hemioterapijom ili pak, nije imao adjuvantno lečenje. Sveobuhvatno, u njihovoj studiji, ukupno preživljavanje je bilo 9.2 meseca. Međutim, multivarijantnom analizom pokazano je da je grupa pacijenata koja je lečena standardnom radioterapijom i hemioterapijom imala medijanu ukupnog preživljavanja 16.9 meseci, kod nestandardne RT-HT 9.2 meseca, dok oni pacijenti kod kojih nije bila primenjena terapija medijana OS bila 2.8 meseca (252). Ovi podaci nam govore, da standardan Stupov protokol i dalje čini prvu liniju terapije kod pacijenata sa novodijagnostikovanom glioblastomom. Međutim, isto tako, ovi podaci govore, da je i pored svih napora, preživljavanje pacijenata sa glioblastomom izuzetno poražavajuće. Glioblastom u najvećem broju pacijenata u toku vremena relapsira, odnosno dolazi do progresije bolesti, što ukazuje na rezistentnost bolesti na svo primenjeno lečenje. Dosta spekulacija i istraživanja ima na ovu temu i poseban značaj se pridaje tzv. matičnoj ćeliji glioblastoma, koja ima morfološke i funkcionalne slične karakteristike, kao i uobičajena neuralna stem ćelija. Istraživanja su pokazala da matična ćelija glioblastoma doprinosi progresiji i invazivnoj sposobnosti ćelija glioblastoma, kao i da ima sposobnost samoobnove (87), a jedan od prepoznatih markera tih matičnih ćelija glioblastoma je CD133 (89). Upravo, pozitivnost ćelija na CD133 može biti povezana sa radiorezistentnošću i hemiorezistentnošću glioblastoma (89).

Postoje mnogi epigenetički mehanizmi koji istovremeno ili sekvencijalno mogu biti uključeni u regulaciju biološkog ponašanja glioblastoma, pa samim tim i odgovora na lečenje. Mikro RNK preko regulacije različitih gena učestvuju u brojnim ćelijskim procesima, uključujući sposobnost proliferacije ćelija, diferencijacije ćelije, apoptoze, angiogeneze, promovisanja besmrtnosti ćelije i slično (317). Iako nisu jedine, u tekstu su pomenute miR-10b i miR-21, koje imaju ulogu onkogeni kod glioblastoma, pa samim tim mogu uticati i na matične stem ćelije glioblastoma, ali i na mehanizme rezistencije na primenjeno lečenje. Među najznačajnijim mikro RNK koje se povezuju sa mehanizmom

radiorezistentnosti su miR-21, miR-210, miR-212 i miR-135b (250). Pokazano je da miR-21 podstiče radiorezistentnost i kod ćelija karcinoma dojke na taj način što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u u G2/M fazi (318). Imajući u vidu to da su ćelije najosetljivije na primenu jonizujućeg zračenja u G2 fazi i M fazi ćelijskog ciklusa (mitozi) (319), onda se može zaključiti da zaustavljanje ćelijskog ciklusa u ovim fazama, dovodi do radiorezistentnosti, odnosno neuspeha lečenja radioterapijom, ukoliko se govori u tom kontekstu. Chao i saradnici su ispitivali na koji način miR-21 i njeni target geni promovišu radiorezistentnost kod glioblastoma (225). Naime, oni su merili nivo ekspresije miR-21 iz tkiva glioblastoma, normalnog tkiva mozga i ćelijskih linija glioblastoma (A172, T98G i U87MG). Njihovi rezultati su pokazali da je prekomerna ekspresija miR-21 u ćelijama i tkivu glioblastoma povezana sa radiorezistentnošću ćelija glioblastoma (225). Odnosno, primena anti-miR-21 je povećala senzitivnost ćelija glioblastoma na jonizujuće zračenje, što je detektovano povećanom stopom apoptoze, nakon sprovedene procedure. U dodatku, autori su sugerisali da miR-21 može da posreduje u radiorezistentnosti ćelija glioblastoma regulacijom ciljnih gena *PDCD4* i *hMSH2* (225).

U ovom istraživanju mi smo ispitivali, između ostalog, povezanost nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa preživljavanjem bez progresije bolesti i ukupnim preživljavanjem. S obzirom da ne postoji definisana *cut off* vrednost za mikro RNK koje se ispituju, za analizu koristili smo vrednosti ispod i iznad medijane za odgovarajuće mikro RNK. Za PFS, odnosno povezanost dužeg preživljavanja bez progresije bolesti sa vrednošću ekspresije iznad medijane miR-10b, *p* vrednost je granična ( $p = 0.053$ ), što možemo smatrati statističkim trendom, dok smo statističku značajnost dobili za vrednost ekspresije iznad medijane miR-21 ( $p = 0.034$ ) i miR-34a ( $p = 0.019$ ). U pogledu, ukupnog preživljavanja, jedinu statističku značajnost smo dobili za vrednost ekspresije miR-10b iznad medijane, koja je povezana sa dužim ukupnim preživljavanjem ( $p = 0.042$ ). U nekoliko navrata smo naveli, značaj onkogene miR-10 i miR-21 u patogenezi glioblastoma. S obzirom na to da je ovaj deo rezultata pokazao nešto drugačiju sliku od očekivane, dalja istraživanja su potrebna kako bi i ovaj deo u potpunosti razjasnio. Ipak, imamo više faktora koji mogu uticati na ove rezultate. Iako smo obradili 129 uzoraka pacijenata sa glioblastomom, u kojima smo merili nivo ekspresije miR-10b/21/34a, broj pacijenata uključen u istraživanje je relativno mali (43 pacijenta). S druge strane, izolovanje mikro RNK je učinjeno iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, a ne iz cerebrospinalne tečnosti ili direktno iz tkiva tumora, gde se može očekivati veća ekspresija mikro RNK. Takođe, s obzirom na to da naše ispitivane mikro RNK imaju ulogu i u regulaciji ćelijskih procesa na primenu jonizujućeg zračenja, te povezanosti sa proinformativnim medijatorima, postavlja se pitanje da li su ove mikro RNK relevantne kao prognostički markeri ishoda bolesti, ukoliko se izoluju nakon lečenja (npr. nakon operativnog lečenja ili u toku radioterapije), kada se menja i mikrookolina ciljnog volumena. Ipak, ostavlja se mogućnost da se ovi rezultati ispituju i potvrde na većem uzorku, što bi svakako bacilo drugačije svetlo na ulogu mikro RNK kod glioblastoma.

Kako je miR-10b prepoznata kao onkogen kod GB, a naši rezultati upućuju da je vrednost ekspresije miR-10b iznad medijane povezana sa dužim OS, možemo da postavimo pitanje da li drugi mehanizmi, uključujući i aktivaciju imunog sistema imaju veću ulogu od očekivane. Odnosno, da li povećana ekspresije miR-10b vodi ka jačem odgovoru imunog sistema u eliminaciji tumorskih ćelija ili pak, boljem odgovoru na primenjeno lečenje. Iako je medijana ukupnog preživljavanja pacijenata u našem istraživanju bila 15 meseci, u odnosu na novije podatke iz literature (npr. 9.2 meseca) (252), ipak je u našem istraživanju medijana OS nešto veća. Uzgred, kako smo dokazali da veći nivo ekspresije miR-10b može ukazivati na toksičnost i gradus toksičnosti, a pacijenti koji su imali duži OS sa vrednostima ekspresije miR-10b iznad medijane, moramo razmišljati o tome, da li pacijenti koji imaju toksičnost imaju i bolje preživljavanje. U našem istraživanju, tu hipotezu nismo potvrdili, ali možemo sugerisati na to da je potrebno istraživanje sa većim brojem pacijenata kako bismo zaista potvrdili ili odbacili tu hipotezu.

Ispitivali smo da li postoji razlika u preživljavanju kod pacijenata koji su imali neku toksičnost i pacijenata bez toksičnosti, ali nismo pronašli statističku značajnost. Uzimajući u obzir to, uz validaciju odgovarajuće mikro RNK koja može da vrši predikciju akutne radiotoksičnosti, potencijalno bi se mogli prepoznati pacijenti, kod kojih bi takva predikcija mogla uticati na poboljšanje kvaliteta života (npr. optimalno vreme za uključivanje simptomatske terapije tokom lečenja). Predikcija visokog gradusa toksičnosti mogla bi značajno uticati i na dalji terapijski postupak, a samim tim i na kvalitet života pacijenata sa GB.

U cilju utvrđivanja potencijalnih razlika u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a između pacijenata i zdravih kontrola, poredili smo nivo ekspresije mikro RNK kod pacijenata pre početka RT i nivo ekspresije kod zdravih kontrola i nije bilo statistički značajne razlike. Naime, mikro RNK su deo dinamičnog nekodirajućeg transkriptoma koji je individualan i predstavljaju kratkoročne parametre jer se menjaju, te naši sveukupni rezultati ukazuju na značaj praćenja vremenskih profila mikro RNK.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali vremenske profile miR-10b/21/34a kod pacijenata sa glioblastomom, koji su lečeni po Stupovom protokolu. Prema našim dosadašnjim saznanjima, do sada nije ispitivan vremenski profil mikro RNK kod pacijenata sa glioblastomom koji su lečeni po Stupovom protokolu, kao ni moguća povezanost ovih mikro RNK sa radiotoksičnošću i hemiotoksičnošću. Rezultati ove disertacije bi mogli podstaći i druge istraživače da učestvuju u daljem istraživanju mikro RNK kod pacijenata sa glioblastomom, jer glioblastom, do danas, predstavlja jedan od najagresivnijih tumora u humanoj onkologiji.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati našeg istraživanja pokazali su sledeće demografske i kliničke karakteristike pacijenata obolelih od glioblastoma:

- Najveći broj pacijenata bio je muškog pola (69.88%), dok je 30.2% pacijenata bilo ženskog pola.
- Prosečna starost pacijenata pri dijagnozi glioblastoma bila je 57.14 godina.
- Tumor je najčešće bio lokalizovan u slepoočnom režnju (34.9%), potom čeonom režnju (32.6%) i temenom režnju (23.3.%), što čini ukupno 90.8% u odnosu na sve druge lokalizacije.
- Najveći broj pacijenata (62.8%) imao je tumor veći od 4 cm u trenutku dijagnoze bolesti.
- Najčešći histološki tip je bio glioblastom („konvencionalni glioblastom“) (90.7%), dok su ostali entiteti i obrasci glioblastoma bili značajno ređi.
- *IDHI-wild type* tip glioblastoma imao je najveći broj pacijenata (51.2%); glioblastom NOS u našem istraživanju imalo je 44.2% pacijenata, a *IDHI*-mutirani glioblastom imalo je 4.7% pacijenata.

2. Kako smo detaljno analizirali svaku ispoljenu toksičnost i gradus tih toksičnosti, zaključili smo da je neku toksičnost u bilo kojoj tački praćenja tokom lečenja imalo 51.2% pacijenata.

- Od pacijenata koji su imali toksičnost, 77.3% je imalo toksičnost nakon poslednje frakcije zračne terapije sa TMZ, dok je 68.2% pacijenata imalo toksičnost na 15. frakciji RT.
- Toksičnost gradusa 2 i 3 na 15. frakciji RT ukupno je imalo 53.3% pacijenata.
- Toksičnost gradusa 2 i 3 na 30. frakciji RT imalo je 70.5% pacijenata.
- Najveći broj pacijenata bez ispoljene toksičnosti bio je u grupi pacijenata glioblastom *IDHI-wild type*, dok je najveći broj pacijenata sa ispoljenom toksičnošću bio u grupi glioblastom, NOS.
- Prema *mixed-effect* linearnom modelu, utvrđeno je statistički značajno povećanje gradusa toksičnosti tokom vremena RT sa TMZ.
- Imajući u vidu da je najveći broj pacijenata (77.3%) imao toksičnost nakon poslednje frakcije, kao i da je toksičnost gradusa 2 i 3 imalo 70.5% pacijenata nakon poslednje frakcije RT, ovi rezultati upućuju na to da kumulativne doze zračne terapije i TMZ mogu imati značajnu ulogu u razvijanju toksičnosti na kraju terapije.

3. Naše istraživanje je pokazalo jasan vremenski profil mikro RNK-10b/21/34a i njihovu povezanost sa toksičnošću i gradusom te toksičnosti:

- Pokazano je da postoje statistički značajno viši nivoi ekspresije miR-10b i miR-34a u grupi pacijenata koji su imali toksičnost na 15. frakciji RT sa TMZ, dok nije bilo značajnosti između vrednosti ekspresije miR-10b/34a pre početka RT - TMZ i 30. frakcije.
- U grupi pacijenata sa i bez toksičnosti, nivoi ekspresije miR-34a su bili značajno viši na 15. i na 30. frakciji, u odnosu na ekspresiju miR-34a pre početka RT - TMZ.
- Univarijantna analiza je pokazala da su viši nivoi ekspresije miR-10b i miR-21 povezani sa većim gradusom toksičnosti.
- Mikro RNK-10b može imati ulogu u predikciji toksičnosti i gradusa toksičnosti, dok bi se miR-21 mogla koristiti za predviđanje gradusa toksičnosti.
- Korelacionom analizom pokazana je značajna pozitivna korelacija između sve 3 mikro RNK u ispitivanim vremenskim tačkama, što ukazuje na to da se sve tri mikro RNK menjaju i prate isti profil smeru u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

- Kod pacijenata sa ispoljenom toksičnošću na 15. frakciji, najjače korelacije su pronađene između miR-10b i miR-21, kao i miR-21 i miR-34a.
- Prema rezultatima ovog istraživanja, miR-34a bi se potencijalno mogla smatrati faktorom (biomarkerom) za predviđanje akutne toksičnosti na 15. frakciji RT.
- Prema varijacijama nivoa ekspresije miR-10b i miR-34a, 15. frakcija RT sa TMZ, može biti ključna tačka za predviđanje toksičnosti tokom RT sa TMZ.
- Predviđanje toksičnosti i gradusa toksičnosti na 15. frakciji pomoću mikro RNK, moglo bi uticati na individualizaciju lečenja svakog pacijenta ponaosob i samim tim poboljšati kvalitet života.

4. Naše istraživanje je pokazalo da ne postoji značajna povezanost između nivoa ekspresije miR-10b/21/34a sa kliničko-patološkim faktorima (lokalizacija tumora, patohistološki podtip tumora, *IDH1* mutacioni status), sem sa veličinom tumora. Tumori manji od 4 cm su imali statistički značajno višu ekspresiju miR-10b/21 u tački pre početka RT, u odnosu na tumore veće od 4 cm.

5. Medijana preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) kod naših pacijenata bila je 10 meseci, a medijana ukupnog preživljavanja (OS) bila je 15 meseci. Nije bilo statistički značajne razlike u PFS i OS između grupa koje su imale i koje nisu imale toksičnost.

6. Poređenjem razlika u nivoima ekspresije miR-10b/21/34a ispod i iznad medijane njihovih vrednosti i ishoda lečenja (PFS, OS), utvrdili smo da postoji statistički značajna razlika za duži PFS za vrednosti ekspresije miR-21 i miR-34a iznad medijane. Duži OS imali su pacijenti sa vrednostima ekspresije miR-10b iznad medijane.

7. Nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou ekspresije miR-10b/21/34a kod operisanih pacijenata sa glioblastomom i zdravih kontrola, što potvrđuje da su mikro RNK deo dinamičnog nekodirajućeg transkriptoma i da se tokom vremena menjaju, a da na njihove profile mogu uticati različiti faktori, poput jonizujućeg zračenja.

8. Rezultati bioinformatičke analize ukazuju da je gen *BRCA1* zajednički ciljani gen za miR-10b/21/34a.

9. Rezultati ovog istraživanja mogu predstavljati značajan napredak ka individualizaciji lečenja kod pacijenata sa GB, što je prioritetni cilj istraživača i neuroonkologa. Ovaj koncept je jedinstven i sugerise da se dinamične promene, kao što su varijacije nivoa ekspresije mikro RNK, mogu koristiti kao parametri za predikciju radiosenzitivnosti, odgovora na RT i predikciju akutne toksičnosti. Određivanje mikro RNK profila u određenim vremenskim tačkama tokom tretmana može predstavljati značajan napredak u oblasti istraživanja onkologije i molekularne biologije i personalizaciju tretmana, čime bi se smanjio nivo komplikacija i poboljšao kvalitet života kod pacijenata sa glioblastomom. Rezultati ove disertacije bi mogli podstaći i druge istraživače da učestvuju u daljem istraživanju mikro RNK kod pacijenata sa glioblastomom, jer glioblastom, do danas, predstavlja jedan od najagresivnijih tumora u humanoj onkologiji.



## 7. LITERATURA

1. Ostrom QT, Barnholtz-Sloan JS. Current State of Our Knowledge on Brain Tumor Epidemiology. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Jun;11(3):329–35.
2. Leece R, Xu J, Ostrom QT, Chen Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003-2007. *Neuro-Oncol.* 2017 Oct 19;19(11):1553–64.
3. Institut za javno zdravlje Srbije "dr Milan Jovanović Batut" (2019). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije, Beograd, 2020. <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2019a.pdf>
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
5. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncol.* 2020;22(12 Suppl 2):iv1–96.
6. Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life.* 2009;2(4):386–93.
7. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol.* 2013;15 Suppl 2:ii1-56.
8. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch.* 2017;471(2):257–69.
9. 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.
10. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
11. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. Central nervous system tumours. 5th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2021. (World health organization classification of tumours).
12. 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.
13. Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH, Morgan LL. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med.* 2007;64(9):626–32.
14. Yang M, Guo W, Yang C, Tang J, Huang Q, Feng S, et al. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2017;12(5):e0175136.
15. Wrensch M, Miike R, Lee M, Neuhaus J. Are prior head injuries or diagnostic X-rays associated with glioma in adults? The effects of control selection bias. *Neuroepidemiology.* 2000;19(5):234–44.

16. Salvati M, Artico M, Caruso R, Rocchi G, Orlando ER, Nucci F. A Report on Radiation-Induced Gliomas. *Cancer*. 1991;67(2):392–7.
17. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(21):1528–37.
18. Walter AW, Hancock ML, Pui CH, Hudson MM, Ochs JS, Rivera GK, et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children’s Research Hospital. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1998;16(12):3761–7.
19. Cupic M, Lazarevic I, Kuljic-Kapulica N. Oncogenic viruses and their role in tumor formation. *Srp Arh Celok Lek*. 2005;133(7–8):384–7.
20. Strong MJ, Blanchard E, Lin Z, Morris CA, Baddoo M, Taylor CM, et al. A comprehensive next generation sequencing-based virome assessment in brain tissue suggests no major virus - tumor association. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):71.
21. Fujimoto H, Asaoka K, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H, Kaji M. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2003 Jan;42(1):33–40.
22. Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouft MT, Singhrao S, Dierich MP, et al. Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996;156(6):2247–55.
23. Walker L, Thompson D, Easton D, Ponder B, Ponder M, Frayling I, et al. A prospective study of neurofibromatosis type 1 cancer incidence in the UK. *Br J Cancer*. 2006;95(2):233–8.
24. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin*. 2007;25(4):925–46, viii.
25. Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA, Kim HJ, Tsilou ET, Zhuang Z, et al. Neurofibromatosis type 2. *Lancet Lond Engl*. 2009 Jun 6;373(9679):1974–86.
26. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(1):27–36.
27. Kleihues P, Schäuble B, zur Hausen A, Estève J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*. 1997;150(1):1–13.
28. Dora V, Diego G, Rómulo B, Natalia O. First Case Report of Turcot Syndrome Type 1 in Colombia. *Case Rep Oncol Med*. 2012;2012:1–4.
29. Hottinger AF, Khakoo Y. Neurooncology of familial cancer syndromes. *J Child Neurol*. 2009;24(12):1526–35.
30. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot’s syndrome. *N Engl J Med*. 1995;332(13):839–47.

31. Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, Genuardi M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet.* 2003;122A(4):325–34.
32. Zhu G, Pan C, Bei JX, Li B, Liang C, Xu Y, et al. Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Front Oncol.* 2020;10:595187.
33. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892–9.
34. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):154–60.
35. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):793–805.
36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
37. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401–4.
38. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 2006;25(38):5220–7.
39. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995;81(3):323–30.
40. Knudsen ES, Wang JYJ. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16(4):1094–9.
41. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068 Erratum in: *Nature.* 2013 Feb 28;494(7438):506.
42. Wu J, Bresnick EH. Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(10):477–85.
43. Gersey Z, Osiason AD, Bloom L, Shah S, Thompson JW, Bregy A, et al. Therapeutic Targeting of the Notch Pathway in Glioblastoma Multiforme. *World Neurosurg.* 2019;131:252-263.e2.
44. Somasundaram K, Reddy SP, Vinnakota K, Britto R, Subbarayan M, Nambiar S, et al. Upregulation of ASCL1 and inhibition of Notch signaling pathway characterize progressive astrocytoma. *Oncogene.* 2005;24(47):7073–83.
45. Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, et al. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2007;106(3):417–27.
46. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2010;28(1):17–28.
47. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, et al. Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1. *Cancer Res.* 2009;69(18):7243–51.

48. Xu C, Wu X, Zhu J. VEGF Promotes Proliferation of Human Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells through VEGF Receptor 2. *Sci World J.* 2013;2013:1–8.
49. Rao RD, Uhm JH, Krishnan S, James CD. Genetic and signaling pathway alterations in glioblastoma: relevance to novel targeted therapies. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2003;8:e270-280.
50. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryō T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63(20):6962–70.
51. Joshi SK, Lucic N, Zuniga R. Molecular pathogenesis of glioblastoma multiforme: Nuances, obstacles, and implications for treatment. *World J Neurol.* 2015;5(3):88.
52. Van Brocklyn J. Sphingolipid Signaling Pathways as Potential Therapeutic Targets in Gliomas. *Mini-Rev Med Chem.* 2007;7(10):984–90.
53. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010;28(6):1075–83.
54. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14(5):381–95.
55. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, et al. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 1997;57(19):4183–6.
56. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, et al. The Prognostic Significance of Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Activation in Human Gliomas. *J Clin Oncol.* 2004;22(10):1926–33.
57. Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal.* 2013;11(1):97.
58. Nazarenko I, Hede SM, He X, Hedrén A, Thompson J, Lindström MS, et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci.* 2012;117(2):99–112.
59. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276–312.
60. Vitovcova B, Skarkova V, Rudolf K, Rudolf E. Biology of Glioblastoma Multiforme-Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):E5324.
61. Wang L, Zhao K, Ren B, Zhu M, Zhang C, Zhao P, et al. Expression of cortactin in human gliomas and its effect on migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep.* 2015;34(4):1815–24.
62. Schiapparelli P, Guerrero-Cazares H, Magaña-Maldonado R, Hamilla SM, Ganaha S, Goulin Lippi Fernandes E, et al. NKCC1 Regulates Migration Ability of Glioblastoma Cells by Modulation of Actin Dynamics and Interacting with Cofilin. *EBioMedicine.* 2017;21:94–103.
63. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683–710.
64. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 1996;56(1):150–3.

65. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol Zurich Switz.* 1996;6(3):217–23; discussion 23–24.
66. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061–8.
67. Koh HJ, Lee SM, Son BG, Lee SH, Ryoo ZY, Chang KT, et al. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2004;279(38):39968–74.
68. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(13):932–41.
69. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483(7390):479–83.
70. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510–22.
71. Kayabolen A, Yilmaz E, Bagci-Onder T. IDH Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications? *Biomedicines.* 2021;9(7):799.
72. Zhang C, Moore LM, Li X, Yung WKA, Zhang W. IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncol.* 2013;15(9):1114–26.
73. Liu A, Hou C, Chen H, Zong X, Zong P. Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Front Oncol.* 2016;6:16.
74. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765–73.
75. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002–7.
76. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009;27(25):4150–4.
77. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5743–50.
78. SongTao Q, Lei Y, Si G, YanQing D, HuiXia H, XueLin Z, et al. IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci.* 2012;103(2):269–73.
79. Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Front Oncol.* 2020;9:1547.
80. Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair.* 2007;6(8):1071–8.

81. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):296–307.
82. Liu L, Gerson SL. Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications: Fig. 1. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):328–31.
83. Brandner S, von Deimling A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas: Molecular markers in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(6):694–720.
84. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003.
85. Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*. 2005;113(3):379–85.
86. Dou J, Gu N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. *Tumor Biol*. 2010;31(4):243–53.
87. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396–401.
88. Kasper S. Exploring the Origins of the Normal Prostate and Prostate Cancer Stem Cell. *Stem Cell Rev*. 2008;4(3):193–201.
89. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60.
90. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*. 2015;29(12):1203–17.
91. Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 2006;444(7120):761–5.
92. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, et al. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers*. 2011;3(3):3242–78.
93. Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncol*. 2007;9(3):319–25.
94. Armstrong TS, Bishof AM, Brown PD, Klein M, Taphoorn MJB, Theodore-Oklota C. Determining priority signs and symptoms for use as clinical outcomes assessments in trials including patients with malignant gliomas: Panel 1 Report. *Neuro-Oncol*. 2016;18(suppl 2):ii1–12.
95. Rigi M, Almarzouqi SJ, Morgan ML, Lee AG. Papilledema: epidemiology, etiology, and clinical management. *Eye Brain*. 2015;7:47–57.
96. Giannopoulos S, Kyritsis AP. Diagnosis and Management of Multifocal Gliomas. *Oncology*. 2010;79(3–4):306–12.
97. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(7):455–65.

98. Liu J, Shen L, Tang G, Tang S, Kuang W, Li H, et al. Multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme: a case report and literature review. *J Int Med Res.* 2020;48(6):300060520930459.
99. Mujic A, Hunn A, Taylor AB, Lowenthal RM. Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J Clin Neurosci.* 2006;13(6):677–81.
100. Upadhyay N, Waldman AD. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol.* 2011;84 Spec No 2:S107-111.
101. Singh H, Maurya V, Gill SS. Computerised Tomography Features in Gliomas. *Med J Armed Forces India.* 2002;58(3):221–5.
102. Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Palmer JD, et al. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chin Clin Oncol.* 2017;6(4):40–40.
103. Pope WB, Brandal G. Conventional and advanced magnetic resonance imaging in patients with high-grade glioma. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2018;62(3):239-253.
104. Chojak R, Koźba-Gosztyła M, Strychan K, Gajos D, Kotas M, Tyliczszak M, et al. Impact of surgical resection of butterfly glioblastoma on survival: a meta-analysis based on comparative studies. *Sci Rep.* 2021;11(1):13934.
105. Hnilicová P, Richterová R, Kantorová E, Bittšanský M, Baranovičová E, Dobrota D. Proton MR spectroscopic imaging of human glioblastomas at 1.5 Tesla. *Gen Physiol Biophys.* 2017;36(05):531–7.
106. Salama GR, Heier LA, Patel P, Ramakrishna R, Magge R, Tsiouris AJ. Diffusion Weighted/Tensor Imaging, Functional MRI and Perfusion Weighted Imaging in Glioblastoma—Foundations and Future. *Front Neurol.* 2018;8:660.
107. Valentini MC, Mellai M, Annovazzi L, Melcarne A, Denysenko T, Cassoni P, et al. Comparison among conventional and advanced MRI, 18F-FDG PET/CT, phenotype and genotype in glioblastoma. *Oncotarget.* 2017;8(53):91636–53.
108. Drake LR, Hillmer AT, Cai Z. Approaches to PET Imaging of Glioblastoma. *Molecules.* 2020;25(3):568.
109. Omuro A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA.* 2013;310(17):1842.
110. Gulati S, Jakola AS, Nerland US, Weber C, Solheim O. The Risk of Getting Worse: Surgically Acquired Deficits, Perioperative Complications, and Functional Outcomes After Primary Resection of Glioblastoma. *World Neurosurg.* 2011;76(6):572–9.
111. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. *J Neurosurg.* 2011;115(1):3–8.
112. Hart MG, Metcalfe SE, Grant R, Grant GR, Solyom EF, Grosset DG. Biopsy versus resection for high grade glioma. a. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2000;2:CD002034.
113. 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.

114. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, Cahill DP, Bello L, Narita Y, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer*. 2021;149:23–33.
115. Orringer DA, Golby A, Jolesz F. Neuronavigation in the surgical management of brain tumors: current and future trends. *Expert Rev Med Devices*. 2012;9(5):491–500.
116. Walter J, Kuhn SA, Waschke A, Kalff R, Ewald C. Operative treatment of subcortical metastatic tumours in the central region. *J Neurooncol*. 2011;103(3):567–73.
117. Kubben PL, ter Meulen KJ, Schijns OE, ter Laak-Poort MP, van Overbeeke JJ, Santbrink H van. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1062–70.
118. Novotny A, Stummer W. 5-Aminolevulinic Acid and the Blood-Brain Barrier – A Review. *Med Laser Appl*. 2003;18(1):36–40.
119. Ferroli P, Acerbi F, Albanese E, Tringali G, Broggi M, Franzini A, Broggi G. Application of intraoperative indocyanine green angiography for CNS tumors: results on the first 100 cases. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;109:251-7.
120. Allison RR, Sibata C, Patel R. Future radiation therapy: photons, protons and particles. *Future Oncol*. 2013;9(4):493–504.
121. Turner JE. INTERACTION OF IONIZING RADIATION WITH MATTER: *Health Phys*. 2005;88(6):520–44.
122. Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:1083–1102.
123. Park SH, Kang JO. Basics of particle therapy I: physics. *Radiat Oncol J*. 2011;29(3):135.
124. Mehta S, Suhag V, Semwal M, Sharma N. Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Med J Armed Forces India*. 2010;66(2):158–62.
125. Withers HR. Biologic basis for altered fractionation schemes. *Cancer*. 1985;55(S9):2086–95.
126. Ahmed KA, Correa CR, Dilling TJ, Rao NG, Shridhar R, Trotti AM, et al. Altered Fractionation Schedules in Radiation Treatment: A Review. *Semin Oncol*. 2014;41(6):730–50.
127. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996.
128. Pilar A, Gupta M, Ghosh Laskar S, Laskar S. Intraoperative radiotherapy: review of techniques and results. *Ecancermedicalscience*. 2017;11:750.
129. Aupérin A, Le Péchoux C, Pignon JP, Koning C, Jeremic B, Clamon G, et al. Concomitant radio-chemotherapy based on platin compounds in patients with locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A meta-analysis of individual data from 1764 patients. *Ann Oncol*. 2006;17(3):473–83.



130. Purdy JA. 3D treatment planning and intensity-modulated radiation therapy. *Oncol Williston Park N.* 1999;13(10 Suppl 5):155–68.
131. Jones D. ICRU Report 50-Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy. *Med Phys.* 1994;21(6):833–4.
132. Landberg T, Chavaudra J, Dobbs J, Gerard JP, Hanks G, Horiot JC, et al. ICRU Reports. *Rep Int Comm Radiat Units Meas.* 1999;os-32(1):48–51.
133. Aoyama H, Westerly DC, Mackie TR, Olivera GH, Bentzen SM, Patel RR, et al. Integral radiation dose to normal structures with conformal external beam radiation. *Int J Radiat Oncol.* 2006;64(3):962–7.
134. Nakamura K, Sasaki T, Ohga S, Yoshitake T, Terashima K, Asai K, et al. Recent advances in radiation oncology: intensity-modulated radiotherapy, a clinical perspective. *Int J Clin Oncol.* 2014;19(4):564–9.
135. The International Commission on Radiation Units and Measurements. *J ICRU.* 2010;10(1):NP.2-NP.
136. Shepard DM, Cao D. Clinical implementation of intensity-modulated arc therapy. *Front Radiat Ther Oncol.* 2011;43:80-98.
137. Rao M, Yang W, Chen F, Sheng K, Ye J, Mehta V, et al. Comparison of Elekta VMAT with helical tomotherapy and fixed field IMRT: Plan quality, delivery efficiency and accuracy: Comparison of VMAT with tomotherapy and IMRT. *Med Phys.* 2010;37(3):1350–9.
138. Crijns W, Budiharto T, Defraene G, Verstraete J, Depuydt T, Haustermans K, et al. IMRT-based optimization approaches for volumetric modulated single arc radiotherapy planning. *Radiother Oncol.* 2010;95(2):149–52.
139. Shaffer R, Nichol AM, Vollans E, Fong M, Nakano S, Moiseenko V, et al. A Comparison of Volumetric Modulated Arc Therapy and Conventional Intensity-Modulated Radiotherapy for Frontal and Temporal High-Grade Gliomas. *Int J Radiat Oncol.* 2010;76(4):1177–84.
140. Palma DA, Verbakel WFAR, Otto K, Senan S. New developments in arc radiation therapy: A review. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(5):393–9.
141. Martin A, Gaya A. Stereotactic Body Radiotherapy: A Review. *Clin Oncol.* 2010;22(3):157–72.
142. Wiggeraad RGJ, Petoukhova AL, Versluis L, van Santvoort JPC. Stereotactic Radiotherapy of Intracranial Tumors: A Comparison of Intensity-Modulated Radiotherapy and Dynamic Conformal Arc. *Int J Radiat Oncol.* 2009;74(4):1018–26.
143. Chen JC, Girvigian MR. Stereotactic radiosurgery: indications and results - part 2. *Perm J.* 2006 Spring;10(1):9-15.
144. Sterzing F, Engenhardt-Cabillic R, Flentje M, Debus J. Image-guided radiotherapy: a new dimension in radiation oncology. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(16):274-80.
145. Drzymala RE, Mohan R, Brewster L, Chu J, Goitein M, Harms W, et al. Dose-volume histograms. *Int J Radiat Oncol.* 1991;21(1):71–8.

146. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constine LS, Eisbruch A, et al. Use of Normal Tissue Complication Probability Models in the Clinic. *Int J Radiat Oncol.* 2010;76(3):S10–9.
147. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 1978;49(3):333–43.
148. Salazar O, Rubin P, McDonald J, Feldstein M. Patterns of failure in intracranial astrocytomas after irradiation: analysis of dose and field factors. *Am J Roentgenol.* 1976;126(2):279–92.
149. Salazar OM, Philip Rubin MD, Feldstein ML, Pizzutiello R. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: Final Report. *Int J Radiat Oncol.* 1979;5(10):1733–40.
150. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology.* 1980;30(9):907–907.
151. Silbergeld DL, Chicoine MR. Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg.* 1997;86(3):525–31.
152. Showalter TN, Andrel J, Andrews DW, Curran WJ, Daskalakis C, Werner-Wasik M. Multifocal Glioblastoma Multiforme: Prognostic Factors and Patterns of Progression. *Int J Radiat Oncol.* 2007;69(3):820–4.
153. Marks JE, Baglan RJ, Prasad SC, Blank WF. Cerebral radionecrosis: Incidence and risk in relation to dose, time, fractionation and volume. *Int J Radiat Oncol.* 1981;7(2):243–52.
154. Heesters MA, Wijrdeman HK, Struikmans H, Witkamp T, Moerland MA. Brain tumor delineation based on CT and MR imaging. Implications for radiotherapy treatment planning. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft Al.* 1993;169(12):729–33.
155. Leibel SA, Scott CB, Loeffler JS. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. *Semin Oncol.* 1994;21(2):198–219.
156. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol.* 1979;5(10):1725–31.
157. Rajaratnam V, Islam M, Yang M, Slaby R, Ramirez H, Mirza S. Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers.* 2020;12(4):937.
158. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbort K, Gebarski SS, Martel MK, et al. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol.* 1999;43(1):79–88.
159. Chan JL, Lee SW, Fraass BA, Normolle DP, Greenberg HS, Junck LR, et al. Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1635–42.
160. Niyazi M, Brada M, Chalmers AJ, Combs SE, Erridge SC, Fiorentino A, et al. ESTRO-ACROP guideline “target delineation of glioblastomas”. *Radiother Oncol.* 2016;118(1):35–42.
161. Parsons JT, Bova FJ, Fitzgerald CR, Mendenhall WM, Million RR. Radiation retinopathy after external-beam irradiation: analysis of time-dose factors. *Int J Radiat Oncol.* 1994;30(4):765–73.

162. Jeganathan VSE, Wirth A, MacManus MP. Ocular Risks From Orbital and Periorbital Radiation Therapy: A Critical Review. *Int J Radiat Oncol*. 2011;79(3):650–9.
163. Pai HH, Thornton A, Katznelson L, Finkelstein DM, Adams JA, Fullerton BC, et al. Hypothalamic/pituitary function following high-dose conformal radiotherapy to the base of skull: demonstration of a dose–effect relationship using dose–volume histogram analysis. *Int J Radiat Oncol*. 2001;49(4):1079–92.
164. Gondi V, Pugh SL, Tome WA, Caine C, Corn B, Kanner A, et al. Preservation of Memory With Conformal Avoidance of the Hippocampal Neural Stem-Cell Compartment During Whole-Brain Radiotherapy for Brain Metastases (RTOG 0933): A Phase II Multi-Institutional Trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(34):3810–6.
165. Colman H, Berkey BA, Maor MH, Groves MD, Schultz CJ, Vermeulen S, et al. Phase II Radiation Therapy Oncology Group trial of conventional radiation therapy followed by treatment with recombinant interferon- $\beta$  for supratentorial glioblastoma: Results of RTOG 9710. *Int J Radiat Oncol*. 2006;66(3):818–24.
166. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315–29.
167. Park JK, Hodges T, Arko L, Shen M, Dello Iacono D, McNabb A, et al. Scale to Predict Survival After Surgery for Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3838–43.
168. Seystahl K, Wick W, Weller M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma—An update. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:389–408.
169. Blonigen BJ, Steinmetz RD, Levin L, Lamba MA, Warnick RE, Breneman JC. Irradiated Volume as a Predictor of Brain Radionecrosis After Linear Accelerator Stereotactic Radiosurgery. *Int J Radiat Oncol*. 2010;77(4):996–1001.
170. Minniti G, Niyazi M, Alongi F, Navarria P, Belka C. Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma. *Radiat Oncol*. 2021;16(1):36.
171. Navarria P, Pessina F, Clerici E, Bellu L, Franzese C, Franzini A, et al. Re-irradiation for recurrent high grade glioma (HGG) patients: Results of a single arm prospective phase 2 study. *Radiother Oncol*. 2022;167:89–96.
172. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 1999;59(14):3374–8.
173. Levin VA, Bidaut L, Hou P, Kumar AJ, Wefel JS, Bekele BN, et al. Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Bevacizumab Therapy for Radiation Necrosis of the Central Nervous System. *Int J Radiat Oncol*. 2011;79(5):1487–95.
174. Rominiyi O, Vanderlinden A, Clenton SJ, Bridgewater C, Al-Tamimi Y, Collis SJ. Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions. *Br J Cancer*. 2021;124(4):697–709.
175. 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: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(23):2306.

176. Mannino M, Chalmers AJ. Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Mol Oncol*. 2011;5(4):374–86.
177. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. The Molecular and Cellular Basis of Radiosensitivity: Implications for Understanding How Normal Tissues and Tumors Respond to Therapeutic Radiation. *Cancer Invest*. 1999;17(1):56–72.
178. Meng W, Palmer JD, Siedow M, Haque SJ, Chakravarti A. Overcoming Radiation Resistance in Gliomas by Targeting Metabolism and DNA Repair Pathways. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2246.
179. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia*. 2010;12(9):675–84.
180. Toulany M, Schickfluß TA, Fattah KR, Lee KJ, Chen BPC, Fehrenbacher B, et al. Function of erbB receptors and DNA-PKcs on phosphorylation of cytoplasmic and nuclear Akt at S473 induced by erbB1 ligand and ionizing radiation. *Radiother Oncol*. 2011;101(1):140–6.
181. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(4):197–210.
182. Biddlestone-Thorpe L, Sajjad M, Rosenberg E, Beckta JM, Valerie NCK, Tokarz M, et al. ATM Kinase Inhibition Preferentially Sensitizes p53-Mutant Glioma to Ionizing Radiation. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3189–200.
183. Tang Z, Dokic I, Knoll M, Ciamarone F, Schwager C, Klein C, et al. Radioresistance and Transcriptional Reprogramming of Invasive Glioblastoma Cells. *Int J Radiat Oncol*. 2022;112(2):499–513.
184. De Bacco F, D'Ambrosio A, Casanova E, Orzan F, Neggia R, Albano R, et al. MET inhibition overcomes radiation resistance of glioblastoma stem-like cells. *EMBO Mol Med*. 2016;8(5):550–68.
185. Serafim RB, da Silva P, Cardoso C, Di Cristofaro LFM, Netto RP, de Almeida R, et al. Expression Profiling of Glioblastoma Cell Lines Reveals Novel Extracellular Matrix-Receptor Genes Correlated With the Responsiveness of Glioma Patients to Ionizing Radiation. *Front Oncol*. 2021;11:668090.
186. Naidu MD, Mason JM, Pica RV, Fung H, Peña LA. Radiation Resistance in Glioma Cells Determined by DNA Damage Repair Activity of Ape1/Ref-1. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2010;51(4):393–404.
187. Kim JG, Park MT, Heo K, Yang KM, Yi J. Epigenetics Meets Radiation Biology as a New Approach in Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):15059–73.
188. Czochor JR, Glazer PM. microRNAs in Cancer Cell Response to Ionizing Radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(2):293–312.
189. Puyo S, Montaudon D, Pourquier P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(1):43–61.
190. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, et al. Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(32):4085–91.
191. Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist*. 2021;4(1):17-43.

192. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, et al. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 2019;393(10172):678–88.
193. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709–22.
194. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522–31.
195. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(23):9667–72.
196. Davis BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem (Tokyo).* 2010;mvq096.
197. Ballarino M, Pagano F, Girardi E, Morlando M, Cacchiarelli D, Marchioni M, et al. Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs. *Mol Cell Biol.* 2009;29(20):5632–8.
198. Li Y, Tong Y, Liu J, Lou J. The Role of MicroRNA in DNA Damage Response. *Front Genet.* 2022 May;13:850038.
199. Tessitore A, Cicciarelli G, Del Vecchio F, Gaggiano A, Verzella D, Fischietti M, et al. MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer. *Int J Genomics.* 2014;2014:1–10.
200. Xu P, Wu Q, Yu J, Rao Y, Kou Z, Fang G, et al. A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers. *Front Genet.* 2020;11:278.
201. Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, Zhang X. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front Genet.* 2019;10:626.
202. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733–41.
203. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):111–22.
204. Brennan GP, Henshall DC. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(9):506–19.
205. Tomankova T, Petrek M, Kriegova E. Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in the lung. *Respir Res.* 2010;11(1):159.
206. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 2008;7(16):2591–600.
207. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2009;4(1):199–227.
208. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep.* 2016;5(4):395–402.

209. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1(1):15004.
210. Petrović N, Kolaković A, Stanković A, Lukić S, Ćami A, Ivković M, et al. miR-155 expression level changes might be associated with initial phases of breast cancer pathogenesis and lymph-node metastasis. *Cancer Biomark.* 2016;16(3):385–94.
211. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* 2005;65(14):6029–33.
212. Yang CH, Yue J, Pfeffer SR, Fan M, Paulus E, Hosni-Ahmed A, et al. MicroRNA-21 Promotes Glioblastoma Tumorigenesis by Down-regulating Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 (IGFBP3). *J Biol Chem.* 2014;289(36):25079–87.
213. 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.
214. Liu J, Jiang J, Hui X, Wang W, Fang D, Ding L. Mir-758-5p Suppresses Glioblastoma Proliferation, Migration and Invasion by Targeting ZBTB20. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(5):2074–83.
215. Liu S, Jiang T, Zhong Y, Yu Y. miR-210 inhibits cell migration and invasion by targeting the brain-derived neurotrophic factor in glioblastoma. *J Cell Biochem.* 2019;120(7):11375–82.
216. Barbano R, Palumbo O, Pasculli B, Galasso M, Volinia S, D'Angelo V, et al. A MiRNA Signature for Defining Aggressive Phenotype and Prognosis in Gliomas. Hoque MO, editor. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e108950.
217. Alrfaei BM, Clark P, Vemuganti R, Kuo JS. MicroRNA miR-100 Decreases Glioblastoma Growth by Targeting SMARCA5 and ErbB3 in Tumor-Initiating Cells. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19:153303382096074.
218. Tomei S, Volontè A, Ravindran S, Mazzoleni S, Wang E, Galli R, et al. MicroRNA Expression Profile Distinguishes Glioblastoma Stem Cells from Differentiated Tumor Cells. *J Pers Med.* 2021;11(4):264.
219. Maes OC, An J, Sarojini H, Wu H, Wang E. Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):824–34.
220. Mao A, Liu Y, Zhang H, Di C, Sun C. microRNA Expression and Biogenesis in Cellular Response to Ionizing Radiation. *DNA Cell Biol.* 2014;33(10):667–79.
221. Stankevicius L, Almeida da Silva AP, Ventura dos Passos F, dos Santos Ferreira E, Menks Ribeiro MC, G David M, et al. MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol.* 2013;8(1):231.
222. Lacombe J, Zenhausern F. Emergence of miR-34a in radiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;109:69–78.
223. Ye L, Yu G, Wang C, Du B, Sun D, Liu J, et al. MicroRNA-128a, BMI1 polycomb ring finger oncogene, and reactive oxygen species inhibit the growth of U-87 MG glioblastoma cells following exposure to X-ray radiation. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):6247–54.

224. Li T, Ma J, Han X, Jia Y, Yuan H, Shui S, et al. MicroRNA-320 Enhances Radiosensitivity of Glioma Through Down-Regulation of Sirtuin Type 1 by Directly Targeting Forkhead Box Protein M1. *Transl Oncol.* 2018;11(2):205–12.
225. Chao T fei, Xiong H hua, Liu W, Chen Y, Zhang J xuan. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hMSH2. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013;33(4):525–9.
226. Zhen L, Li J, Zhang M, Yang K. MiR-10b decreases sensitivity of glioblastoma cells to radiation by targeting AKT. *J Biol Res-Thessalon.* 2016;23(1):14.
227. Zhao C, Guo R, Guan F, Ma S, Li M, Wu J, et al. MicroRNA-128-3p Enhances the Chemosensitivity of Temozolomide in Glioblastoma by Targeting c-Met and EMT. *Sci Rep.* 2020;10(1):9471.
228. Jia M, Wang Z. MicroRNAs as Biomarkers for Ionizing Radiation Injury. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:861451.
229. Kopcalic K, Petrovic N, Stanojkovic TP, Stankovic V, Bukumiric Z, Roganovic J, et al. Association between miR-21/146a/155 level changes and acute genitourinary radiotoxicity in prostate cancer patients: A pilot study. *Pathol - Res Pract.* 2019;215(4):626–31.
230. Lawrence YR, Wang M, Dicker AP, Andrews D, Curran WJ, Michalski JM, et al. Early toxicity predicts long-term survival in high-grade glioma. *Br J Cancer.* 2011;104(9):1365–71.
231. Belka C, Budach W, Kortmann RD, Bamberg M. Radiation induced CNS toxicity--molecular and cellular mechanisms. *Br J Cancer.* 2001;85(9):1233–9.
232. Kramer S, Lee KF. Complications of radiation therapy: The central nervous system. *Semin Roentgenol.* 1974;9(1):75–83.
233. Kim JH, Brown SL, Jenrow KA, Ryu S. Mechanisms of radiation-induced brain toxicity and implications for future clinical trials. *J Neurooncol.* 2008;87(3):279–86.
234. Arrieta VA, Dmello C, McGrail DJ, Brat DJ, Lee-Chang C, Heimberger AB, et al. Immune checkpoint blockade in glioblastoma: from tumor heterogeneity to personalized treatment. *J Clin Invest.* 2023;133(2):e163447.
235. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481–7.
236. Kim JH, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat Oncol J.* 2014;32(3):103.
237. Dantzer R, Bluthé RM, Layé S, Bret-Dibat JL, Parnet P, Kelley KW. Cytokines and Sickness Behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840(1):586–90.
238. Desmarais G, Charest G, Therriault H, Shi M, Fortin D, Bujold R, et al. Infiltration of F98 glioma cells in Fischer rat brain is temporary stimulated by radiation. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(8):444–50.
239. Helson L. Radiation-induced Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System: A Literature Review. *Anticancer Res.* 2018;38(9):4999–5002.

240. Kowalczyk L, Deutschmann C, Crevenna R, Konrad S, Singer CF, Farr A. Radiotherapy-Induced Fatigue in Breast Cancer Patients. *Breast Care Basel Switz.* 2021;16(3):236–42.
241. Ferris MJ, Zhong J, Switchenko JM, Higgins KA, Cassidy RJ, McDonald MW, et al. Brainstem dose is associated with patient-reported acute fatigue in head and neck cancer radiation therapy. *Radiother Oncol.* 2018;126(1):100–6.
242. Schwartz AL, Nail LM, Chen RNS, Meek P, Barsevick AM, King ME, et al. Fatigue Patterns Observed in Patients Receiving Chemotherapy and Radiotherapy. *Cancer Invest.* 2000;18(1):11–9.
243. Cheng H, Chen H, Lv Y, Chen Z, Li CSR. Prospective memory impairment following whole brain radiotherapy in patients with metastatic brain cancer. *Cancer Med.* 2018;7(10):5315–21.
244. Lynch M. Preservation of cognitive function following whole brain radiotherapy in patients with brain metastases: Complications, treatments, and the emerging role of memantine. *J Oncol Pharm Pract.* 2019;25(3):657–62.
245. Mukherjee S, Chakraborty A. Radiation-induced bystander phenomenon: insight and implications in radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(3):243–63.
246. Stepanović A, Nikitović M, Bogdanović A, Grujičić D. Long-lasting Thrombocytopenia after Transient Pancytopenia Induced by Short-Term Concomitant Radiotherapy and Temozolomide. *Eur J Case Rep Intern Med.* 2020;7(10):001785.
247. Stepanovic A, Nikitovic M. Severe hematologic temozolomide-related toxicity and lifethreatening infections. *J BUON.* 2018;23(1):7-13.
248. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(W1):W244–51.
249. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P, et al. Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer.* 2015;113(1):76–82.
250. Toraih EA, El-Wazir A, Abdallah HY, Tantawy MA, Fawzy MS. Deregulated MicroRNA Signature Following Glioblastoma Irradiation. *Cancer Control.* 2019;26(1):107327481984722.
251. Regazzo G, Terrenato I, Spagnuolo M, Carosi M, Cognetti G, Cicchillitti L, et al. A restricted signature of serum miRNAs distinguishes glioblastoma from lower grade gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):124.
252. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers.* 2022;14(13):3161.
253. Yu X, Jiang Y, Wei W, Cong P, Ding Y, Xiang L, et al. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumor Biol.* 2015;36(2):967–72.
254. Rodríguez-Lozano DC, Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, Bello-Alvarez C, Camacho-Arroyo I. Testosterone Promotes Glioblastoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion Through Androgen Receptor Activation. *Front Endocrinol.* 2019;10:16.



255. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(10):2421–7.
256. Verger E, Valduvicio I, Caral L, Pujol T, Ribalta T, Viñolas N, et al. Does gender matter in glioblastoma? *Clin Transl Oncol.* 2011;13(10):737–41.
257. Wick A, Kessler T, Elia AEH, Winkler F, Batchelor TT, Platten M, et al. Glioblastoma in elderly patients: solid conclusions built on shifting sand? *Neuro-Oncol.* 2018;20(2):174–83.
258. Parker NR, Correia N, Crossley B, Buckland ME, Howell VM, Wheeler HR. Correlation of MicroRNA 132 Up-regulation with an Unfavorable Clinical Outcome in Patients with Primary Glioblastoma Multiforme Treated with Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide Chemotherapy. *Transl Oncol.* 2013;6(6):742-IN34.
259. Caloglu M, Yurut-Caloglu V, Karagol H, Bayir-Angin G, Turan FN, Uzal C. Prognostic factors other than the performance status and age for glioblastoma multiforme: a single-institution experience. *J BUON.* 2009;14(2):211-8.
260. Donato V, Papaleo A, Castrichino A, Banelli E, Giangaspero F, Salvati M, et al. Prognostic Implication of Clinical and Pathologic Features in Patients with Glioblastoma Multiforme Treated with Concomitant Radiation plus Temozolomide. *Tumori J.* 2007;93(3):248–56.
261. Wen J, Chen W, Zhu Y, Zhang P. Clinical features associated with the efficacy of chemotherapy in patients with glioblastoma (GBM): a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *BMC Cancer.* 2021;21(1):81.
262. Ellingson BM, Cloughesy TF, Pope WB, Zaw TM, Phillips H, Lalezari S, et al. Anatomic localization of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylated and unmethylated tumors: A radiographic study in 358 de novo human glioblastomas. *NeuroImage.* 2012;59(2):908–16.
263. Reeves GI, Marks JE. Prognostic Significance of Lesion Size for Glioblastoma Multiforme. *Radiology.* 1979;132(2):469–72.
264. Illic R, Somma T, Savic D, Frio F, Milicevic M, Solari D, et al. A Survival Analysis with Identification of Prognostic Factors in a Series of 110 Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Before and After Introduction of the Stupp Regimen: A Single-Center Observational Study. *World Neurosurg.* 2017;104:581–8.
265. AbdelFatah MAR, Kotb A, Said MA, Abouelmaaty EMH. Impact of extent of resection of newly diagnosed glioblastomas on survival: a meta-analysis. *Egypt J Neurosurg.* 2022;37(1):3.
266. Agarwal S, Sane R, Oberoi R, Ohlfest JR, Elmquist WF. Delivery of molecularly targeted therapy to malignant glioma, a disease of the whole brain. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e17.
267. Shayganfar A, Ebrahimian S, Mahzouni P, Shirani F, Aalinezhad M. A review of glioblastoma tumors with primitive neuronal component and a case report of a patient with this uncommon tumor at a rare location. *Clin Case Rep.* 2020;8(12):2600–4.
268. Christians A, Adel-Horowski A, Banan R, Lehmann U, Bartels S, Behling F, et al. The prognostic role of IDH mutations in homogeneously treated patients with anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):156.

269. Murugan AK, Alzahrani AS. Isocitrate Dehydrogenase IDH1 and IDH2 Mutations in Human Cancer: Prognostic Implications for Gliomas. *Br J Biomed Sci.* 2022;79:10208.
270. on behalf of the Medical Research Council Brain Tumour Working Party, Bleehen N, Stenning S. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. *Br J Cancer.* 1991;64(4):769–74.
271. Wegner RE, Abel S, Horne ZD, Hasan S, Verma V, Ranjan T, et al. National trends in radiation dose escalation for glioblastoma. *Radiat Oncol J.* 2019;37(1):13–21.
272. Singh R, Lehrer EJ, Wang M, Perlow HK, Zaorsky NG, Trifiletti DM, et al. Dose Escalated Radiation Therapy for Glioblastoma Multiforme: An International Systematic Review and Meta-Analysis of 22 Prospective Trials. *Int J Radiat Oncol.* 2021;111(2):371–84.
273. Gondi V, Pugh S, Tsien C, Chenevert T, Gilbert M, Omuro A, et al. Radiotherapy (RT) Dose-intensification (DI) Using Intensity-modulated RT (IMRT) versus Standard-dose (SD) RT with Temozolomide (TMZ) in Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM): Preliminary Results of NRG Oncology BN001. *Int J Radiat Oncol.* 2020;108(3):S22–3.
274. Attarian F, Taghizadeh-Hesary F, Fanipakdel A, Javadinia SA, Porouhan P, PeyroShabany B, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Number of Adjuvant Temozolomide Cycles in Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front Oncol.* 2021;11:779491.
275. Wang K, Tepper JE. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(5):437–54.
276. Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol.* 1995;33(3):619–26.
277. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature.* 2012;483(7390):484–8.
278. Zhang L, Sorensen MD, Kristensen BW, Reifenberger G, McIntyre TM, Lin F. D-2-Hydroxyglutarate Is an Intercellular Mediator in IDH-Mutant Gliomas Inhibiting Complement and T Cells. *Clin Cancer Res.* 2018;24(21):5381–91.
279. Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król S, Gielniewski B. Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules.* 2019;24(5):968.
280. Turnquist C, Harris BT, Harris CC. Radiation-induced brain injury: current concepts and therapeutic strategies targeting neuroinflammation. *Neuro-Oncol Adv.* 2020;2(1):vdaa057.
281. Gorbunov NV, Kiang JG. Brain Damage and Patterns of Neurovascular Disorder after Ionizing Irradiation. Complications in Radiotherapy and Radiation Combined Injury. *Radiat Res.* 2021;196(1):1-16.
282. Najafi M, Fardid R, Hadadi G, Fardid M. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. *J Biomed Phys Eng.* 2014;4(4):163–72.
283. Begolly S, Olschowka JA, Love T, Williams JP, O'Banion MK. Fractionation enhances acute oligodendrocyte progenitor cell radiation sensitivity and leads to long term depletion. *Glia.* 2018;66(4):846–61.

284. Pilozzi A, Carro C, Huang X. Roles of  $\beta$ -Endorphin in Stress, Behavior, Neuroinflammation, and Brain Energy Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):338.
285. Hermann AL, Fell GL, Kemény LV, Fung CY, Held KD, Biggs PJ, et al.  $\beta$ -Endorphin mediates radiation therapy fatigue. *Sci Adv.* 2022;8(50):eabn6025.
286. Li SZ, Hu YY, Zhao J, Zhao YB, Sun JD, Yang Y fan, et al. MicroRNA-34a induces apoptosis in the human glioma cell line, A172, through enhanced ROS production and NOX2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(1):6–12.
287. Cheleschi S, De Palma A, Pascarelli N, Giordano N, Galeazzi M, Tenti S, et al. Could Oxidative Stress Regulate the Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-34a in Human Osteoarthritic Chondrocyte Cultures? *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2660.
288. Stanojković TP, Matić IZ, Petrović N, Stanković V, Kopčalić K, Besu I, et al. Evaluation of cytokine expression and circulating immune cell subsets as potential parameters of acute radiation toxicity in prostate cancer patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):19002.
289. Wang S, Campbell J, Stenmark MH, Zhao J, Stanton P, Matuszak MM, et al. Plasma Levels of IL-8 and TGF- $\beta$ 1 Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Non-Small Cell Lung Cancer: A Validation Study. *Int J Radiat Oncol.* 2017;98(3):615–21.
290. Kopčalić K, Matić IZ, Besu I, Stanković V, Bukumirić Z, Stanojković TP, et al. Circulating levels of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 in patients with prostate cancer undergoing radiotherapy: associations with acute radiotoxicity and fatigue symptoms. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1167.
291. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. The Interplay among miRNAs, Major Cytokines, and Cancer-Related Inflammation. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2020;20:606–20.
292. Dumortier O, Hinault C, Van Obberghen E. MicroRNAs and Metabolism Crosstalk in Energy Homeostasis. *Cell Metab.* 2013;18(3):312–24.
293. Zou Q, Yang M, Yu M, Liu C. Association between miR-126, miR-21, inflammatory factors and T lymphocyte apoptosis in septic rats. *Mol Clin Oncol.* 2021;15(4):206.
294. Lee HY, Lee HY, Choi JY, Hur J, Kim IK, Kim YK, et al. Inhibition of MicroRNA-21 by an antagomir ameliorates allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Exp Lung Res.* 2017;43(3):109–19.
295. Dong CG, Wu WKK, Feng SY, Wang XJ, Shao JF, Qiao J. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. *Int J Oncol.* 2012;41(3):1005–12.
296. Liu J, Zhu H, Yang X, Ge Y, Zhang C, Qin Q, et al. MicroRNA-21 is a novel promising target in cancer radiation therapy. *Tumor Biol.* 2014;35(5):3975–9.
297. Garavelli S, De Rosa V, de Candia P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:3012.
298. Liu C, Zhou C, Gao F, Cai S, Zhang C, Zhao L, et al. MiR-34a in Age and Tissue Related Radio-Sensitivity and Serum miR-34a as a Novel Indicator of Radiation Injury. *Int J Biol Sci.* 2011;7(2):221–33.

299. Kabacik S, Manning G, Raffy C, Bouffler S, Badie C. Time, Dose and Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Status Dependency of Coding and Noncoding RNA Expression after Ionizing Radiation Exposure. *Radiat Res.* 2015;183(3):325–37.
300. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene.* 2010;29(15):2161–4.
301. Kan C, Zhang J. BRCA1 Mutation: A Predictive Marker for Radiation Therapy? *Int J Radiat Oncol.* 2015;93(2):281–93.
302. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet.* 2004;36(11):1219–24.
303. Bosch PC, Bogliolo M, Surrallés J. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway at low doses of ionization radiation. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2015;793:9–13.
304. Chen M, Medarova Z, Moore A. Role of microRNAs in glioblastoma. *Oncotarget.* 2021;12(17):1707–23.
305. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007;26(19):2799–803.
306. Yang H, Li Y, Zhong X, Luo P, Luo P, Sun R, Xie R, Fu D, Ma Y, Cong X, Li W. Upregulation of microRNA-32 is associated with tumorigenesis and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;15(4):4097-4104.
307. Buruiană A, Florian Ștefan I, Florian AI, Timiș TL, Mișu CM, Miclăuș M, et al. The Roles of miRNA in Glioblastoma Tumor Cell Communication: Diplomatic and Aggressive Negotiations. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1950.
308. El Fatimy R, Subramanian S, Uhlmann EJ, Krichevsky AM. Genome Editing Reveals Glioblastoma Addiction to MicroRNA-10b. *Mol Ther.* 2017;25(2):368–78.
309. Lukiw WJ. Evolution and complexity of micro RNA in the human brain. *Front Genet.* 2012;3:166.
310. Hu HY, He L, Fominykh K, Yan Z, Guo S, Zhang X, et al. Evolution of the human-specific microRNA miR-941. *Nat Commun.* 2012;3(1):1145.
311. Ozdogan S, Yaltirik CK, Yilmaz SG, Akdeniz FT, Sumerkent K, Duzkalir AH, et al. Investigation of the Effects of MicroRNA-221 Expression Levels in Glioblastoma Multiforme Tumors. *Anticancer Res.* 2020;40(6):3265–70.
312. Miller JJ, Gonzalez Castro LN, McBrayer S, Weller M, Cloughesy T, Portnow J, et al. Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant gliomas: A Society for Neuro-Oncology (SNO) consensus review on diagnosis, management, and future directions. *Neuro-Oncol.* 2023;25(1):4–25.
313. Sippl C, Schoeneberger L, Teping F, Schulz-Schaeffer W, Urbschat S, Ketter R, et al. Impact of MiRNA-181a2 on the Clinical Course of IDH1 Wild Type Glioblastoma. *Processes.* 2021;9(5):728.
314. Wang Z, Bao Z, Yan W, You G, Wang Y, Li X, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation-specific microRNA signature predicts favorable prognosis in glioblastoma patients with IDH1 wild type. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32(1):59.

315. Marenco-Hillebrand 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.
316. Kaka N, Hafazalla K, Samawi H, Simpkin A, Perry J, Sahgal A, et al. Progression-Free but No Overall Survival Benefit for Adult Patients with Bevacizumab Therapy for the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers.* 2019;11(11):1723.
317. Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioke J, Kedir H, Dusmatova S, et al. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med.* 2016;5(8):1917–46.
318. Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, Rapp K, Braselmann H, Ludyga N, et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol.* 2012;7(1):206.
319. Sharda N, Yang CR, Kinsella T, Boothman D. Radiation Resistance. In: *Encyclopedia of Cancer* [Internet]. Elsevier; 2002 [cited 2023 Jan 22]. p. 1–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122275551005190>

## SPISAK SKRAĆENICA

**GB** - glioblastom

**CNS** - centralni nervni sistem

**SZO** - Svetska zdravstvena organizacija

**IDH** - izocitrat dehidrogenaza

**TERT** - reverzna transkriptaza telomeraze

**EGFR** - receptor epidermalnog faktora rasta

**CDKN2A/B** – inhibitor ciklin zavisne kinaze A/B

**NF** - neurofibromatoza

**HNPCC** - hereditarni nepolipozni kolorektalni kancer (eng. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*)

**APC** - familijarna adenomatozna polipoza

**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina

**VEGF** - vaskularni endotelni faktor rasta,

**PDGF** - faktor rasta izveden iz trombocita

**EGFR** – receptor za epidermalni faktor rasta

**PI3K** - fosfatidilinozitol-3-kinaza

**mTOR** - meta rapamicina kod sisara (eng. *mammalian target of rapamycin*)

**PTEN** - Fosfataza i tenzin homolog (eng. *phosphatase and tensin homolog*)

**RB** - retinoblastom

**GD2/GD3** - ganglioizid D2/D3

**HIF** - hipoksijom inducirani faktor

**NAD** - nikotinamid adenin dinukleotid

**NADP** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NADPH** - redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**MGMT** - O6-metilguanin-DNK-metiltransferaza

**PROM-1** - prominin 1

**BMP** - koštani morfogetetski proteini (eng. *bone morphogenetic protein*)

**CT** - kompjuterizovana tomografija

**MR** - magnetna rezonancija

**T1W** - eng. T1- *weighted* sekvenca

**T2W** - eng. T2- *weighted* sekvenca

**MRS** - magnetno rezonantna spektroskopija

**DTI** - difuzioni tenzorski imidžing

**fMR** - funkcionalna magnetna rezonancija

**PET** - pozitronska emisija tomografija

**EANO** - Evropsko udruženje neuroonkologa (eng. *European Association of Neuro-Oncology*)

**ECOG PS** - eng. *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*

**5-ALA** - 5-aminolevulininska kislina

**RT** - radioterapija

**RBE** - relativna biološka efektivnost

**LET** - linearni energetska transfer

**EBRT** - transkutana radioterapija (eng. *External Beam Radiation Therapy*)

**3D- RT** - trodimenzionalna (konformalna) zračna terapija

**ICRU** - eng. *International Commission on Radiological Units*

**IMRT** - intenzitetom zračenja modulirana radioterapija

**IMAT** - intenzitetom zračenja modulirana lučna terapija

**VMAT** - volumetrijski modulirana lučna terapija

**GTV** - volumen tumora (eng. *Gross Tumor Volume*)

**CTV** - klinički volumen mete (eng. *Clinical Target Volume*)

**PTV** - planirani volumen mete (eng. *Planning Target Volume*)

**TV** - tretirani volumen (eng. *Treated Volume*)

**IV** - ozračeni volumen (eng. *Irradiated Volume*)

**OAR** - organi pod rizikom (eng. *Organs at Risk*)

**PRV** - planiranje volumena organa pod rizikom (eng. *Planning Organs at Risk Volume*)

**ITV** - unutrašnji ciljni volumen (eng. *Internal Target Volume*)

**SRT** - stereotaksična radioterapija

**SBRT** - stereotaksična radioterapija tela (eng. *stereotactic body radiotherapy*)

**SRS** - stereotaksična radiohirurgija (eng. *stereotactic radiosurgery*)

**IGRT** - slikom vođena radioterapija (eng. *image guided radiation therapy*)

**QUANTEC** - eng. *Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic*

**DRR** - digitalno rekonstruisana radiografija

**CBCT** - eng. *cone beam CT*

**WBRT** - zračna terapija celog mozga (eng. whole brain radiotherapy)

**EORTC** - eng. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

**ACROP** - eng. *Advisory Committee for Radiation Oncology Practice*

**ESTRO** - eng. *European Society for Radiotherapy and Oncology*

**D<sub>max</sub>** - maksimalna doza

**KPS** - Karnofski performans status pacijenta

**RTOG** - eng. *Radiotherapy and Oncology Group*

**TMZ** - temozolomid

**HT** - hemioterapija

**EQD2** eng. *Equivalent dose in 2 Gy fractions*

**TTF** - eng. *Tumor Treating Fields*

**ATM** - ataksija telangiektazija

**PFS** - preživljavanje bez progresije bolesti (eng. *Progression Free Survival*)

**OS** - ukupno preživljavanje (eng. *Overall Survival*)

**RNK** - ribonukleinska kiselina

**miR** - mikro RNK (eng. *micro RNA; miRNA; miR*)

**IGF** - insulinu sličan faktor rasta

**FoxM1** - eng. *Forkhead box protein M1*

**IL** - interleukin

**TGF- $\beta$**  - transformišući faktor rasta  $\beta$

**TNF- $\alpha$**  - tumor nekrotišući faktor  $\alpha$

**CTCAE** - eng. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

**Gy** - Grej

**NOS** - eng. *not other specified*

**f** - frakcija

**CI** - interval poverenja (eng. *Confidence Interval*)

**SD** - standardna devijacija

**min** - minimum

**max** – maksimum



**Publikovani radovi iz teze:**

1. Stepanović A, Nikitović M, Stanojković TP, Grujičić D, Bukumirić Z, Srbljak I, Ilić R, Milošević S, Arsenijević T, Petrović N. Association between microRNAs 10b/21/34a and acute toxicity in glioblastoma patients treated with radiotherapy and temozolomide. *Sci Rep.* 2022;12(1):7505. doi: 10.1038/s41598-022-11445-9 **M21 IF 4.996**
2. Stepanović A, Nikitović M, Petrović N. MicroRNAs in high grade gliomas: What is their role? *Medicinski podmladak.* 2023; doi:10.5937/mp74-41114

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Aleksandar Stepanović je rođen 30.10.1985. godine u Loznici. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 2004. godine, a završio ga 2011. godine. Prvo radno mesto imao je u Opštoj Bolnici „Sveti Luka“ u Smederevu 2014. godine, gde je radio u odseku za hospitalni hemioterapijski pristup. Posao na neodređeno vreme dobio je 2015. godine, u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Specijalizaciju iz radijacione onkologije pohađao je na Medicinskom fakultetu u Beogradu, u periodu od 2016-2020. godine, a dana 27.01.2020. položio je specijalistički ispit sa odličnom ocenom. Nakon položenog specijalističkog ispita postaje član na nekoliko konzilijuma u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i član konzilijuma za tumore CNS u Univerzitetском Kliničkom centru Srbije. Doktorske akademske studije na modulu „Biologija tumora i oksidativna oboljenja“ upisao je 2017. godine pod mentorstvom prof. dr Marine Nikitović i VNS dr sc. Nine Petrović. Autor je i koautor više stručnih i naučnih radova. Koautor je brošure za pacijente „Tumori mozga“ i Nacionalnog protokola za lečenje tumora CNS. Aktivno učestvuje na brojnim nacionalnim i međunarodnim kongresima i seminarima. Do sada je dva puta pohađao seminare iz oblasti onkologije u Salzburgu i oba puta dobio priznanje za „*Excellent Case presentation*“. Jednomesečno usavršavanje imao je u Klinici za radioterapiju, u Univerzitetскоj bolnici „AKH“ u Beču, u junu 2022. godine. U istraživačko zvanje istraživač-pripravnik izabran je 2019. godine u Institutu za onkologiju i radiologije Srbije, a u zvanje istraživač-saradnik, izabran je u septembru 2022. godine. Odlukom izbornog veća Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u decembru 2022. godine, izabran je za Kliničkog asistenta na predmetu Klinička onkologija sa radioterapijom.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора др Александар Степановић

Број индекса 2017/5077

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Повезаност микро РНК са клиничким параметрима и одговором на радиотерапију комбиновану са темозоломидом код болесника са глиобластомом“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 13.02.2023.

---

# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора др Александар Степановић

Број индекса 2017/5077

Студијски програм Биологија тумора и оксидативна обољења

Наслов рада „Повезаност микро РНК са клиничким параметрима и одговором на радиотерапију комбиновану са темозоломидом код болесника са глиобластомом“

Ментор Проф. Др Марина Никитовић, ВНС др сц. Нина Петровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 13.02.2023.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Повезаност микро РНК са клиничким параметрима и одговором на радиотерапију комбиновану са темозоломидом код болесника са глиобластомом“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 13.02.2023.

---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.