

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Karolína Šmelková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Cytogenomické změny u difúzních gliálních nádorů

Bakalářská práce

Karolína Šmelková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína ŠMELKOVÁ**
Osobní číslo: **R20729**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Cytogenomické změny u difuzních gliálních nádorů**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

sepsání rešerše na dané téma, praktická část: izolace plazmidů, značení FISH sond, metoda FISH na FFPE řezech nádorů mozku, odečet fluorescenčním mikroskopem

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.* 2010;12(9):675-684. doi:10.1593/neo.10688
Hu N, Richards R, Jensen R. Role of chromosomal 1p/19q co-deletion on the prognosis of oligodendrogliomas: A systematic review and meta-analysis. *Interdiscip Neurosurg Adv Tech Case Manag* 2016; 5: 58-63.
Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology* 2019; 15: 405-417.
Kalita O, Sporikova Z, Hajduch M, et al. The Influence of Gene Aberrations on Survival in Resected IDH Wildtype Glioblastoma Patients: A Single-Institution Study. *Curr Oncol.* 2021;28(2):1280-1293. Published 2021 Mar 21. doi:10.3390/curroncol28020122

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Karolína Šmelková
Název práce	Cytogenomické změny u difúzních gliálních nádorů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.
Rok obhajoby práce	2023
Klíčová slova	CNS, gliální nádory, <i>EGFR</i> , 1p/19q, FISH
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Souhrn

Difúzní gliální nádory jsou nejčastěji diagnostikované nádory centrální nervové soustavy (CNS), které jsou charakteristické závažným průběhem, složitým přístupem k léčbě a vysokou morbiditou. Popis a klasifikace jednotlivých nádorů vychází z histopatologických poznatků. Základní difúzní gliální nádory objevující se převážně u dospělých pacientů jsou astrocytomy, oligodendrogliomy a glioblastomy. Pomocí molekulární diagnostiky došlo k významně vyšší specifikaci v určování diagnózy, budoucí prognózy a následnému postupu v léčbě. Dle molekulárně-cytogenetických metod jsou hodnoceny molekulární markery charakteristické pro daný typ nádoru.

Experimentální část této práce byla zaměřena na hodnocení souboru 39 pacientů s diagnostikovanými tumory CNS. Hodnoceno bylo 6 chromozomálních oblastí a genů, 19q13.32, 1p36.3, *CCND1*, *CEP7*, *EGFR* a *PTEN*, pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Vyšetřována byla přítomnost amplifikace a delecí jednotlivých markerů na vzorcích parafrinované tkáně (FFPE). Statistické výsledky potvrdily obecné poznatky, které se využívají při klinické diagnostice. Významnými pozorovanými výsledky byly vyskytující se amplifikace genu *EGFR* ve velké míře u glioblastomu a přítomnost delecí chromozomálních oblastí 19q13.32 a 1p36.3 typické pro oligodendrogliální nádory. Z hodnocení celkového souboru pacientů byl také potvrzen výskyt glioblastomu jako obecně nejčastěji se vyskytujícího gliálního difúzního nádoru.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Karolína Šmelková
Title	Cytogenomic changes in diffuse gliomas
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetic Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.
The year of presentation	2023
Key words	CNS, gliomas, <i>EGFR</i> , 1p/19q, FISH
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

Summary

Diffuse gliomas are one of the most common tumors of central nervous system (CNS), characterized by high morbidity and difficult approach for treatment. Description and classification of tumors is based on histopathology. Primary adult type diffuse gliomas are astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. Molecular diagnostics has significant results in specification and prediction of diagnosis and future prognosis. Molecular and cytogenetic methods are used for prediction of diagnosis based on presence of molecular markers typical for each of the tumors.

Experimental part of this work was focused on molecular evaluation of a set of 39 patients with central nervous system tumors diagnosis. There were investigated 6 different chromosomal sections and genes such as 19q13.32, 1p36.3, *CCND1*, *CEP7*, *EGFR* and *PTEN*, and their conditions of amplification and deletion by using fluorescence *in situ* hybridization technique and formalin-fixed paraffin-embedded samples (FFPE). Statistical processing of the results revealed and confirmed general results such as high amplification of *EGFR* gene in glioblastoma and presence of chromosomal deletion 19q13.32 and 1p36.3 typical for oligodendroglioma. Also as a general result was confirmed that the most common diffuse glioma tumor is glioblastoma.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením vedoucí bakalářské práce Mgr. Vladimíry Koudelákové, PhD. a s použitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....

Karolína Šmelková

Chtěla bych poděkovat Mgr. Zuzaně Šporikové, Ph.D. a Mgr. Vladimíře Koudelákové, PhD., za rady při vedení a zpracování této bakalářské práce a paní Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za provedení statistické analýzy. Zároveň bych chtěla poděkovat MUDr. Vlastimilu Novákovi, PhD. za cenné připomínky a paní Soně Mlčochové za její ochotu a pomoc při zpracování experimentální části práce.

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Epidemiologie nádorů centrální nervové soustavy	3
3.2	Symptomatologie a klinický obraz	4
3.3	Diagnostika	5
3.3.1	Výpočetní tomografie.....	5
3.3.2	Magnetická rezonance	5
3.4	Terapie.....	6
3.4.1	Chirurgická terapie	6
3.4.2	Radioterapie	6
3.4.3	Chemoterapie	7
3.5	Gliální nádory.....	8
3.5.1	Neurogliální buňky.....	8
3.5.2	Astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a ependymové buňky	8
3.6	Klasifikace gliálních tumorů centrální nervové soustavy a mozku.....	10
3.6.1	Difúzní gliomy dospělého věku	11
3.6.2	Astrocytom, <i>IDH</i> mutant.....	11
3.6.3	Oligodendrogliom, <i>IDH</i> mutant s kódelecí 1p/19q.....	12
3.6.4	Glioblastom, <i>IDH</i> wild type	14
3.7	Molekulární charakteristika difúzních gliálních nádorů.....	15
3.7.1	Molekulární markery difúzních gliálních nádorů.....	16
3.7.2	CDKN2A.....	16
3.7.3	Kodelece chromozomálních ramen 1p/19q.....	16
3.7.4	EGFR.....	17
3.7.5	PTEN	18

3.7.6	CCND1.....	18
3.7.7	IDH.....	19
3.7.8	TERT.....	19
3.8	Metoda fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	20
4	Materiál a metody	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	21
4.2.1	Použité chemikálie	21
4.2.2	Použité soupravy	22
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	22
4.2.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.3	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.3.1	Kultivace bakterií a izolace plazmidu	24
4.3.2	Příprava a značení sondy na FISH	25
4.3.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	26
4.3.4	ReFISH.....	27
5	Výsledky	29
5.1	Vyšetření souboru pacientů	29
5.2	Vyšetřovaný soubor pacientů a jeho charakteristika.....	29
5.3	Cytogenomické změny u sledovaného souboru pacientů.....	31
5.4	Shrnutí výsledků pozorování jednotlivých markerů a jejich výskyt.....	34
6	Diskuse.....	40
7	Závěr	43
8	Použitá literatura	44

Seznam symbolů a zkratk

ATRX	ATRX chromatin remodeler
CCND1	cyklin D1
CDK	cyklin dependentní kinasa
CDKN2A	cyklin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	cyklin dependent kinase inhibitor 2B
CNS	centrální nervová soustava
CT	výpočetní počítačová tomografie
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	epidermal growth factor receptor
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GFAP	glial fibrillary acidic protein
ICP	intrakraniální tlak (intracranial pressure)
IDH	isocitrátdehydrogenáza
MGMT	O6-methylguanin-methyltransferáza
MRI	magnetická rezonance
PTEN	phosphate and tensin homolog
RNA	ribonukleová kyselina
TERT	telomerase reverse transcriptase
TP53	tumor protein p53
WHO	World Health Organization

Seznam obrázků

Obrázek 1: Astrocytární buňky barvené imunobarvením GFAP (Agamanolis, 2023).....	9
Obrázek 2: Schéma klasifikace gliálních nádorů dle nejnovějšího vydání WHO 2021. Upraveno podle Louis et al., 2021	10
Obrázek 3: Klasifikace difúzních gliálních nádorů dospělého věku dle nejnovějšího vydání WHO 2021. Upraveno podle Louis <i>et al.</i> , 2021.....	11
Obrázek 4: Snímek astrocytárního nádoru IDH mutant pořízený magnetickou rezonancí (archiv FNOL)	12
Obrázek 5: Snímek oligodendrogliálního nádoru pořízený magnetickou rezonancí (archiv FNOL)	13
Obrázek 6: Snímek glioblastomu pořízený z vyšetření magnetickou rezonancí (archiv FNOL)	15
Obrázek 7: Snímek glioblastomu pořízený z vyšetření magnetickou rezonancí (archiv FNOL)	15
Obrázek 8: Schéma chromozomální kodelece 1p/19q (Kaur, 2021)	17
Obrázek 9: Vzorek glioblastomu obsahující amplifikaci genu <i>EGFR</i> . Zvětšení 1000x (zdroj vlastní).....	18

Seznam tabulek

Tabulka 1: Základní charakteristika souboru pacientů z hlediska pohlaví	29
Tabulka 2: Rozdělení pacientů dle diagnóz	29
Tabulka 3: Hodnoty mediánů věku pacientů s určenými diagnózami	30

Seznam grafů

Graf 1: Distribuce věku pacientů a jejich diagnóz (Kruskal-Wallis test).....	30
Graf 2: Věkové rozdíly pacientů s diagnostikovanými nádory (Wilcoxonův test).....	31
Graf 3: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u glioblastomu	32
Graf 4: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u astrocytomu.....	32
Graf 5: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u oligodendrogliomu...	33
Graf 6: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u jiných nádorů	33
Graf 7: Zastoupení delece/amplifikace chromozomální oblasti 19q13.32 u jednotlivých typů gliálních nádorů.....	34
Graf 8: Zastoupení delece/amplifikace chromozomální oblasti 1p36.3 u jednotlivých typů gliálních nádorů.....	35
Graf 9: Zastoupení delece/amplifikace genu EGFR u jednotlivých typů gliálních nádorů	36
Graf 10: Zastoupení delece/amplifikace centromerické oblasti chromozomu 7 u jednotlivých typů gliálních nádorů.....	36
Graf 11: Zastoupení delece/amplifikace genu CCND1 u jednotlivých typů gliálních nádorů	37
Graf 12: Zastoupení delece/amplifikace genu PTEN u jednotlivých typů gliálních nádorů ...	38
Graf 13: Vyhodnocení vzájemné korelace mezi sledovanými geny	39

1 ÚVOD

Nádory centrální nervové soustavy představují vysoce heterogenní skupinu tumorů, které se dělí dle různých stupňů kritérií a oblastí zasažení. Z obecného hlediska jsou rozlišovány na nádory primární, jenž vznikají z mozkových buněk a struktur tvořící mozkovou tkáň a na nádory sekundární, které mohly vzniknout ze základu metastáz nádorů.

Jedná se o velmi specifické patologické procesy vzniku nádorů, speciálně pro oblast centrální nervové soustavy, kde je obzvlášť obtížný chirurgický zásah, léčba i samotná predikce onemocnění. Z hlediska lokalizace je na nádory centrální nervové soustavy pohlíženo zcela jinak. Jejich růst je omezován uzavřeným prostorem lebeční oblasti, což ve velké míře ovlivňuje terapeutické přístupy, zároveň zvyšuje ohroženost zasažení důležitých center životních funkcí uložených v mozku.

Dle epidemiologického hlediska je incidence nádorů velmi variabilní a různě kolísá v závislosti na věku, pohlaví, dle místa vzniku, či výskytu v různých světových oblastech. Studie potvrzují, že největší procentuální výskyt zaujímají neuroepiteliální nádory vznikající z gliálních podpůrných buněk mozku, gliomy neboli také difúzní gliální nádory, tvořící většinu intrakraniálních nádorů.

Diagnostické základy gliálních nádorů vycházejí z histopatologických poznatků, avšak vývoj molekulárních metod se značně začlenil mezi kritéria hodnocení a ovlivnil klasifikaci tumorů CNS.

2 CÍLE PRÁCE

Nádory centrální nervové soustavy představují nejkomplikovanější typ onemocnění v onkologii z hlediska přesnosti diagnostiky konkrétních nádorů a samotného přístupu k léčbě, který se odráží na kvalitě a délce života pacientů. Nejčastěji diagnostikovanou skupinou nádorů centrální nervové soustavy jsou difúzní gliální nádory, u kterých bývají pozorované specifické molekulární markery. Tyto markery umožňují klasifikaci typu nádoru a ulehčují samotnou predikci, prognózu a léčbu.

Jedna z metod, která je často využívána ke zpřesnění finální diagnózy, vycházející z histopatologických podkladů, je metoda fluorescenční *in situ* hybridizace. Prostřednictvím metody fluorescenční *in situ* hybridizace jsou u jednotlivých nádorů popisovány vyskytující se delece nebo amplifikace genů, představující molekulární markery jako prostředek hodnocení finálních diagnóz. Cílem této práce je zhodnocení skupiny pacientů s diagnostikovanými difúzními gliálními nádory, jedná se o oligodendrogliomy, astrocytomy a glioblastomy, na základě zjištění stavu přítomných biomarkerů 19q13.32, 1p36.3, *CCND1*, *CEP7*, *EGFR* a *PTEN*, typické pro jednotlivé nádory pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Zjištěné delece a amplifikace přítomných markerů jsou spojeny s určením progresu a malignity nádorů a mohou mít velký vliv na finální postup při určování vhodné léčby.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Epidemiologie nádorů centrální nervové soustavy

Dle lokalizace lze nádory CNS dělit na supratentoriální (mozkové hemisféry, bazální ganglia) a infratentoriální (mozeček, mozkový kmen). Supratentoriální nádory u dospělých tvoří 80–85 %. Infratentoriální nádory se nejčastěji vyskytují u dětí a u dospělých tvoří přibližně 15–20 %, z toho pouze 2,4 % se nachází v mozkovém kmeni. (Náhlovský, *et al.*, 2006).

Dalším kritériem hodnocení je věk, dle kterého jsou tumory odlišovány na nádory dětského věku a dospělých pacientů. U dětí jsou zhoubné nádory CNS diagnostikovány od narození do 14 let, s průměrným nejčastějším výskytem u pacientů ve věku 5 let. U adolescentů je období nejvyššího výskytu mozkových i jiných nádorů CNS diagnostikováno ve věku od 15 do 19 let. Z histologického hlediska mezi nejčastěji vyskytující se maligní nádory této věkové skupiny jsou diagnostikovány gliomy, naopak nejčastěji vyskytující se benigní patologické nálezy jsou nádory hypofýzy.

Nádory mozku a CNS u dospělých pacientů jsou v pořadí 8. nejrozšířenější z hlediska výskytu. Nejčastěji se vyskytující maligní typy nádorů jsou gliomy. Příklady nezhoubných tumorů, se kterými se nejčastěji pacienti potýkají jsou meningeomy a adenomy hypofýzy. (Ostrom, *et al.*, 2021).

Na tumory CNS lze také pohlížet z hlediska výskytu stejných a specifických typů nádorů napříč generacemi nebo rodinami. Tento výskyt je označován jako familiární nebo non-familiární. Typickým příkladem familiárního výskytu jsou hemangioblastomy CNS, postihující především mozeček a míchu. Jedná se o nádory, které jsou součástí Von Hippel – Lindauova syndromu. Tato choroba má autozomálně dominantní dědičnost. Rodinnou zátěž mají retinoblastomy, pro které je charakteristická mutace na chromozomu 3. Dalším příkladem familiárně vyskytujících se nádorů je meduloblastom nebo subependymom, jejichž zastoupení je v tomto případě podstatně nižší (Náhlovský, *et al.*, 2006).

3.2 Symptomatologie a klinický obraz

Klinické příznaky u mozkových nádorů mohou být v počátečních stádiích nespecifické a pacienta často přivedou k lékaři až v pokročilém stadiu onemocnění. Popis toho, jak se bude tumor projevovat, záleží na jeho lokalizaci (supratentoriální nebo infratentoriální) a chování samotného nádoru, což představuje především rychlost růstu, intratumorózní krvácení, trombotizace cév, infiltrativní růst či expanzivní chování.

Symptomy jsou dle klinického hodnocení rozdělovány na obecné a fokální (ložiskové). Obecné symptomy vychází ze zvýšeného intrakraniálního tlaku (ICP) a vedou až k projevům syndromu nitrolební hypertenze (Alomar, 2010). Vyvolaný vzestup intrakraniálního tlaku v mozkové části je řazen mezi prvotní symptomy pozorovatelné při diagnózách mozku, a to převážně u rychle rostoucích tumorů. Syndrom intrakraniální hypertenze je spojován s bolestmi hlavy, zvracením, nauzeou, poruchami vědomí, otoky či dvojitým viděním, v lékařské terminologii označováno jako diplopie. Neléčení syndromu vyvolává tlakovou herniaci mozku neboli vysunutí či výhřez části mozkové tkáně při zvýšeném intrakraniálním tlaku, v krajním případě může dojít až ke smrti (Náhlovský, *et al.*, 2006). Ložiskové příznaky vychází z uložení nádoru. Dalším typickým a často iniciálním příznakem bývá epileptický záchvat. (Amidei *et Kushner*, 2015). Při lézích čelního laloku dochází k poruchám základních kognitivních funkcí (Coomans *et al.*, 2019). U infratentoriálních nádorů dochází k parézám okohybných nervů, k senzomotorickému deficitu z postižení mozkového kmene a mozečkové symptomatologii, kde je řazena ataxie, dysmetrie, tremor nebo poruchy chůze, vycházející z postižení mozečku.

Smrt v konečných případech způsobuje vysoký vzestup intrakraniálního tlaku, komprese důležitých center mozkového kmene, nebo také blokace správné cirkulace mozkomíšního moku vedoucí k obstrukčnímu hydrocefalu, kdy dochází k abnormálnímu hromadění mozkomíšního moku v komorách a subarachnoidálním prostoru (Wong *et al.*, 2011).

3.3 Diagnostika

Diagnóza se stanovuje na základě klinického nálezu laboratorních výsledků, radiologických vyšetření a histologického vyšetření tkáně nádoru získaného při operačním výkonu. V diagnostice nádoru mozku mají dominantní postavení především zobrazovací metody (Náhlovský *et al.*, 2006).

3.3.1 Výpočetní tomografie

Rychlou lokalizaci s charakteristikami procesu kancerogeneze umožňuje vyšetření výpočetní tomografie (CT) (Huile Gao *et Jiang*, 2013). Vyšetření CT má jisté výhody, především tato metoda vyniká dobrou dostupností a rychlým získáním potřebných dat. Nádorové ložisko je detekováno změnou denzity, při vyobrazení výsledných snímků lze takto odlišit patologicky poškozenou tkáň. Při metodě CT se podávají kontrastní látky, nejčastěji intravenózně. Zdrojem této vyšetřovací metody je rentgenové záření, paprsky záření jsou zachycovány digitálními detektory a následně jsou přeneseny do počítačového zařízení, kde je poté zpracován definitivní obraz vyšetřované oblasti. (Cormode *et al.*, 2013).

3.3.2 Magnetická rezonance

V dnešní době nepostradatelnou diagnostickou metodou při zjišťování přesné diagnózy tumorózního postižení mozku je magnetická rezonance (MRI). MRI je neinvazivní zobrazovací technika, která poskytuje velmi detailní anatomické snímky. MRI neemituje žádné škodlivé ionizující záření oproti počítačové tomografii, naopak principem MRI zobrazování je využití magnetického pole. Stejně jako u CT bývají při magnetické rezonanci podávány kontrastní látky a v tomto případě je při procesu skenování klíčové udržení pacienta v nehybné poloze, pro získání co nejkvalitnějších snímků (Pope *et Brandal*, 2018). MRI metoda je vhodná pro zobrazování měkkých tělesných tkáních, konkrétně v mozku lze pomocí MRI také rozlišovat šedou a bílou hmotu, a zároveň je vzhledem k méně invazivnímu charakteru vhodná pro diagnostiku nádorů.

Příkladem speciálních MRI technik je funkční magnetická rezonance, na základě které, je možné pozorovat aktivaci oblastí mozku během kognitivních funkcí, což je využíváno pro lepší představu a pochopení organizace CNS a mozku (Villanueva-Meyer, *et al.*, 2017). Ostatní metody diagnostického charakteru využívaných při studiu CNS a mozku jsou pozitronová emisní tomografie, angiografie, elektroencefalografická diagnostika a další (Náhlovský *et al.*, 2006).

3.4 Terapie

Postupy při terapii nádorů CNS jsou značně specifické a v jistých ohledech omezené. Při chirurgickém odstraňování tumorů je důležité odebrání co největšího množství patologicky poškozené tkáně, ale zároveň dbát na bezpečnost při manipulaci v oblastech životně důležitých center. Chirurgický zásah je nadále doplňován chemoterapií, radioterapií a dalšími možnými prostředky (Perry *et al.*, 2006). U zbylých částí ložisek tumorů, které není možné odstranit vzhledem k omezenému přístupu oblasti lebeční, je snaha o co největší omezení či úplného zastavení fáze dělení nádorových buněk.

3.4.1 Chirurgická terapie

Chirurgická terapie u zhoubných nádorů, jak již bylo výše zmíněno, je velmi omezená a je nutné zařídit komplexní péči pacientů při těchto diagnózách. Klíčové je také zapojení několika lékařských specialistů v tomto oboru, pro komplexní pohled a konzultaci terapie. Chirurgické odstranění, tzv. cytoredukce je doporučována u většiny diagnóz, s hlavní snahou o zachování intaktnosti oblastí mozku, které jsou pro chod lidského organismu nenahraditelné (Bush, *et al.*, 2017).

3.4.2 Radioterapie

K chirurgicky nedostupnému léčebnému procesu či odstranění co největšího množství nádoru a zbývajících tumorózní tkáně je využívána radioterapie. Léčba ozařováním využívá ionizujícího záření za účelem poškození genetické informace rakovinotvorných buněk, které se vzápětí přestávají dělit a následně zanikají (Baskar, *et al.*, 2012). Radioterapie je aplikována dle určitých faktorů, zejména dle druhu a lokalizace nádoru. Podmínkám diagnózy je přizpůsobena i daná léčba, radioterapie je prováděna zevní a vnitřní cestou.

Obě terapie působí lokálně a cílí na konkrétní místa výskytu nádorů. Při externí terapii ozařuje paprsek z vnějšího prostředí cíleně na určité místo nálezu. Při terapii vnitřní, tzv. brachyterapie, je využíváno pevných zdrojů neboli radioterapeutických implantátů, které bývají dočasně umístěny do místa určeného k léčbě (Náhlovský *et al.*, 2006). Jako zdroje vnitřní radioterapie jsou využívány mimo jiné kapalně preparáty, které už ale působí systematicky a tkáněmi se dostávají do celého těla, kde vyhledávají zdroj rakovinových buněk, na které cílí. Kapalně preparáty jsou podávány převážně intravenózně a perorálně (Bush, *et al.*, 2017).

Mozková tkáň je schopna tolerovat dávku záření až do 60 Gray. Ozařování probíhá ve vymezených cyklech a opakovaně dle předem určeného návrhu terapie. Využití radioterapie

směřuje v nejlepších případech k úplnému vyléčení, zefektivnění další léčby či snížení rizika návratu onemocnění (Bush, *et al.*, 2017). Jestliže není možnost úplného vyléčení, terapie je využívána ke zmírnění příznaků a bolesti, v tomto případě je léčba ozařováním označována jako paliativní radioterapie.

3.4.3 Chemoterapie

Současně s chirurgickými zákroky a léčbou ozařováním je kombinována chemoterapie. Cílem je inhibice buněčné proliferace spojené s růstem nádorů a zabránění následující invazi a vytváření metastáz. Chemoterapeutická činidla primárně zasahují do makromolekulární syntézy neoplastických buněk a ovlivňují tak jejich funkci. Při úspěšné interferenci dochází k buněčné smrti a spuštění apoptózy. Speciálně při aplikaci do CNS je účinnost chemoterapeutických látek velmi limitovaná (Taal, *et al.*, 2015).

Hlavním problémem je hematoencefalická bariéra, která hraje důležitou roli v regulaci a propouštění biologických a chemických substancí. Přes hematoencefalickou bariéru prostupují molekuly limitované svou velikostí. Dochází tedy k velkému omezení používání vhodných chemoterapeutických látek vzhledem k propustnosti membrány, proto není možné většinu léčiv aplikovat takovým způsobem, aby se dostaly do hlavního místa působení (Cintron-García *et Guddati*, 2020).

Chemoterapie je považována za komplexní léčbu, konkrétně u zhoubných gliálních nádorů je ale využívána jako doplňková terapie, která obecně prodlužuje život pacientů o 1-2 měsíce. Nejrozsáhlejší využití chemoterapie je shledáváno u astrocytomů. Naopak nejčastější a zároveň nejagresivnější gliální nádory glioblastomy, jsou velmi chemorezistentní, a v léčbě glioblastomů tedy převládá provedení chirurgického výkonu v kombinaci s radioterapií.

Výsledné působení chemoterapeutik je ovlivněno stavem hematoencefalické bariéry, heterogenitą buněk, průběhem buněčného cyklu a vytvářením rezistence vůči chemoterapeutickým látkám (Náhlovský, *et al.*, 2006). Aplikaci chemoterapie doprovází nežádoucí účinky, které mohou být jak akutní, tak dlouhodobé, proto je nutné monitorování a sledování skupin pacientů, kteří jsou vystaveni vyššímu riziku komplikací (Cintron-García *et Guddati*, 2020).

3.5 Gliální nádory

Gliomy představují nejčastěji se vyskytující primární nádory CNS a způsobují rozsáhlou mortalitu a morbiditu (Ostrom, *et al.*, 2014).

Hlavním místem výskytu gliálních nádorů je mozek, konkrétně gliová tkáň složená z podpůrných gliových buněk, ze kterých se nádory posléze diferencují, ale není výjimkou, že se mimo mozek mohou gliomy vyskytovat v celé CNS (Ostrom, *et al.*, 2014). Zároveň je pro tyto nádory typický infiltrující charakter, což znamená, že velmi často dochází k prorůstání do okolních tkání a růst nádorů není ohraničen (Wank, *et al.*, 2018).

3.5.1 Neurogliální buňky

Neurogliální buňky, často zjednodušované jako tzv. gliové buňky, v mozku spolu s neurony vytváří tkáň nervové soustavy (Jessen, 2004). Neuroglie jsou od neuronů odlišné v mnoha směrech, nejenže jejich zastoupení v tkáni je mnohonásobně vyšší, ale zároveň mají v mozku a nervovém systému nenahraditelné funkce. Výrazným rozdílem je přímá neúčast gliálních buněk při synaptických interakcích a signalizaci. (Verkhratsky, *et al.*, 2019). Jejich hlavní funkcí je právě podpora a ochrana neuronů a mají zachovanou schopnost neomezeného dělení, kdežto neurony tuto vlastnost nemají.

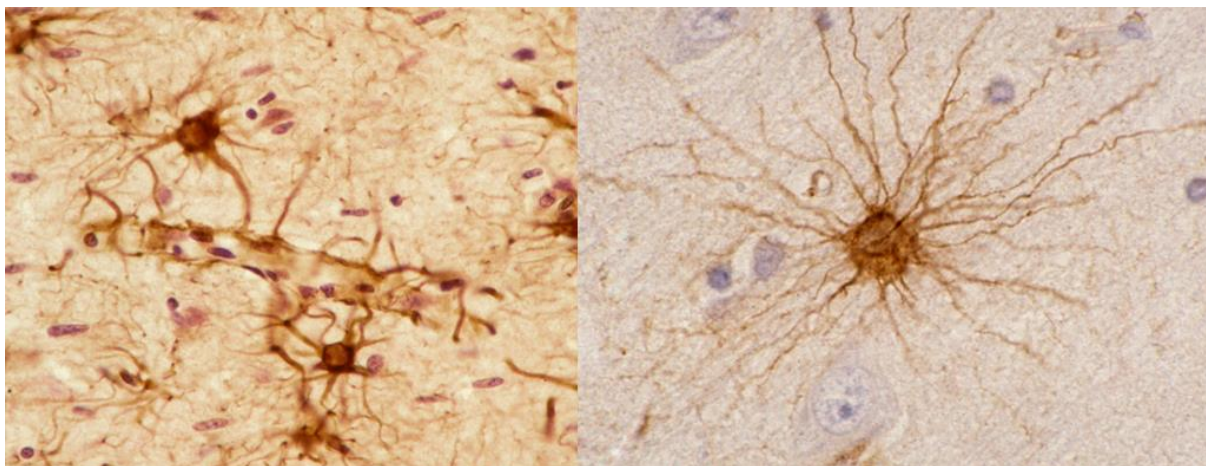
Podpůrná funkce glií napomáhá k udržování synaptických kontaktů a udržování jejich signalizačních schopností. Obecně jsou gliální buňky v mozku zastoupeny ve vyšším počtu než neurony, ale naopak ve srovnání s neurony se gliální buňky liší ve své velikosti, jsou podstatně menší a strukturně vykazují taktéž určité rozdíly (Jessen, 2004). Gliálních buněk je v CNS několik typů a gliomy vznikají nekontrolovaným dělením a maligní transformací především čtyř podtypů glií, a to konkrétně z oligodendrocytů, astrocytů, mikrogliálních buněk a ependymových buněk (Junqueira, 1992).

3.5.2 Astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a ependymové buňky

Astrocyty, často označované jako hvězdné buňky na základě jejich tvaru, jsou největší gliální buňky s dlouhými a četnými výběžky v radiálním uspořádání, které jsou opatřeny rozšířeními výběžků, tzv. vaskulární pedikly. Jádra astrocytů jsou kulatá a lokalizovaná ve středu buněk (Junqueira, 1992). Cytoplazma buněk obsahuje intermediární vlákna strukturovaná z gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). Protilátky proteinu GFAP se často používají pro imunohistochemické barvení (viz obrázek 1) a průkaz neoplastických astrocytů (Hol et Pekný, 2015).

Astrocyty se podílí na udržování vhodné stability chemického prostředí pro nervovou signalizaci a zároveň vytváří izolační bariéru, která slouží k ochraně nervového systému.

Existují dva hlavní typy astrocytů, protoplazmatické vyskytující se v šedé hmotě a míše a astrocyty fibrilární nacházející se v bílé hmotě (Sofroniew *et Vinters*, 2009).



Obrázek 1: Astrocytární buňky barvené imunobarvením GFAP (Agamanolis, 2023)

Oligodendrocyty jsou na rozdíl od astrocytů podstatně menší s kratšími a méně hojnými výběžky (Junqueira, 1992). Oligodendrocyty se podílí na vytváření myelinového obalu bohatého na lipidy, který ovlivňuje rychlost vedení akčního potenciálu (Kuhn, *et al*, 2019).

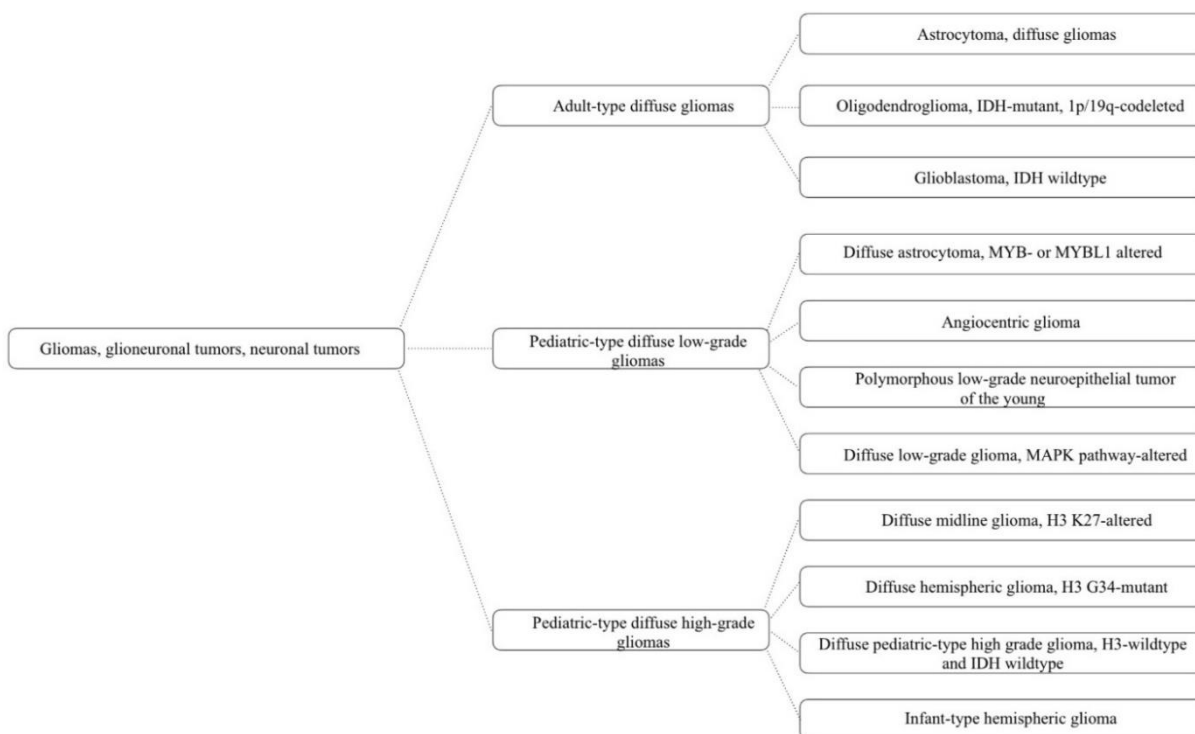
Mikroglie reprezentují mononukleární fagocytární systém v nervové soustavě a figurují jako fagocytující elementy (Colonna *et Butovsky*, 2017). Těla mikroglíí jsou malá, denzní a jejich jádra obsahují vysoce kondenzovaný chromatin. Na povrchu vysílají krátké výběžky s četnými výrůstky připomínající trnitý vzhled (Junqueira, 1992).

Buňky ependymové vystylají centrální dutiny mozku a míchy. Ependymy jsou opatřeny řasinkami, jejichž hlavní funkcí je zajištění a podpora toku mozkomíšního moku (Spassky, *et al.*, 2005).

3.6 Klasifikace gliálních tumorů centrální nervové soustavy a mozku

Klasifikace gliálních tumorů CNS prošla složitým vývojem a nejnovější formulace byly vydány v roce 2021 (viz obrázek 2) dle WHO (World health organization). Významný podíl na formulaci aktuálního systému klasifikace má vývoj molekulární diagnostiky, která přináší stále inovativní a klíčové zdroje informací, zároveň je jádro systému postaveno na klasických metodách imunohistochemie a poznatků z histologie, které tradičně přispívají k diagnostice nádorů (Louis, *et al.*, 2021). Pokročilé diagnostické technologie napomohly k představení nových typů nádorů a odlišnému přístupu k nomenklatuře. Změny v systému klasifikace vedou také k pohotovějšímu a racionálnějšímu přístupu při klinickém rozhodování a budoucích postupech.

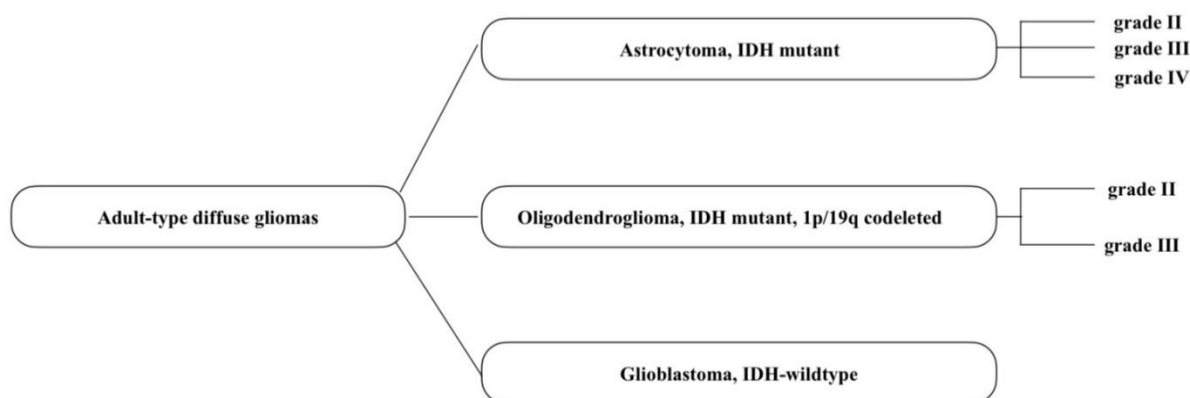
Klasifikace tumorů centrální nervové soustavy byla založena primárně na výsledcích z histologie, konkrétně na morfologických vlastnostech příslušných nádorů. Aktuálně jsou prognostická zjištění obohacena o poznatky na molekulární úrovni (Chai, *et al.*, 2022). Molekulární parametry jsou určovány stanovením přítomnosti biomarkerů, které představují důležitý nástroj jak pro samotnou klasifikaci, tak určování specifické prognózy a tzv. gradingu neboli určení stupně diferencovanosti daného typu nádoru (Reuss, 2023).



Obrázek 2: Schéma klasifikace gliálních nádorů dle nejnovějšího vydání WHO 2021. Upraveno podle Louis *et al.*, 2021

3.6.1 Difúzní gliomy dospělého věku

Difúzní gliomy u dospělých pacientů jsou nejčastěji se vyskytující maligní tumory centrální nervové soustavy a mozku. Jsou ve velké míře infiltrativní a zároveň rezistentní vůči terapiím, tudíž jsou obecně charakterizovány jako téměř neléčitelné (Whitfield *et Huse*, 2022). Klasifikace difúzních nádorů byla v roce 2021 zjednodušena a postavena na molekulárních rysech ve spojitosti s histopatologií. Významné biomarkery, na kterých byla založena molekulární charakteristika difúzních gliálních nádorů jsou mutace izocitrátdehydrogenázy (*IDH*) a kodelece 1p/19q, na základě kterých byly odvozeny tři základní typy difúzních gliálních nádorů dospělých pacientů, astrocytom *IDH* mutant, oligodendrogliom *IDH* mutant s 1p/19q kodelecí a glioblastom *IDH* - wildtype (viz obrázek 3) (Reuss, 2023).



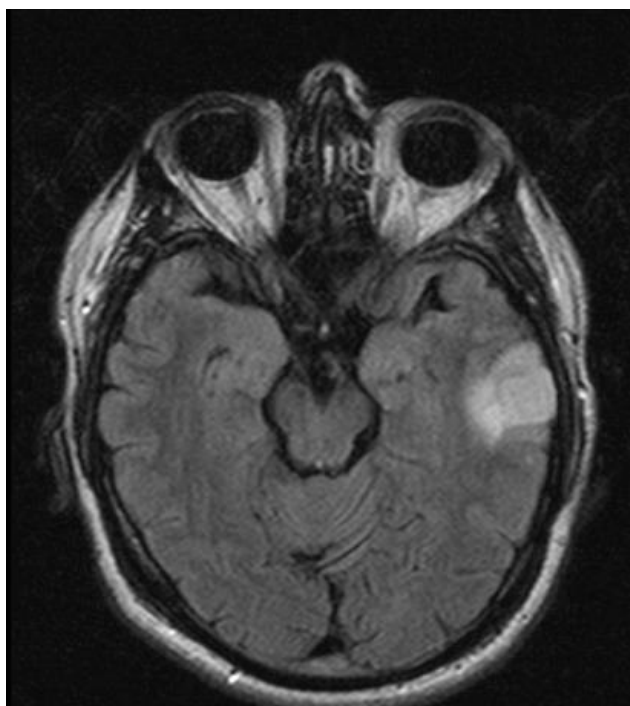
Obrázek 3: Klasifikace difúzních gliálních nádorů dospělého věku dle nejnovějšího vydání WHO 2021. Upraveno podle Louis *et al.*, 2021

3.6.2 Astrocytom, *IDH* mutant

Astrocytom (viz obrázek 4) je typ gliálního nádoru vznikající z astrocytárních buněk. Astrocytomy jsou z molekulárního hlediska specifikovány jako *IDH* mutant, na základě příslušné *IDH1* a *IDH2* mutace a s absencí 1p/19q kodelece. Pro tyto gliomy jsou také charakteristické mutace v *TP53* a *ATRX* genech (DeWitt, 2022). Zároveň jsou astrocytární nádory definovány dle stupně rychlosti šíření, rozsahu a vážnosti na grade II, III a IV. (David, *et al.*, 2023). Typickým primárním symptomem bývá epileptický záchvat, doprovázený dalšími příznaky, především silnými bolestmi hlavy nebo objevujícími se psychologickými stavy, jako jsou změny osobností (Starkweather, *et al.*, 2011). Astrocytomy jsou velmi infiltrativní, což má za následek komplikace při chirurgickém odstranění, které je ve většině případech nekompletní (DeWitt, 2022).

Z histologického pohledu jsou charakterizovány od diferencovaných nádorů s minimální mitotickou aktivitou až po značně anaplastické, proliferativní a hypercelulární. Neoplastické buňky těchto nádorů se vyznačují hranatými jádry, což je klíčové při pozorování a identifikaci nukleární morfologie (Brychtová *et al.*, 2008). U astrocytomů *IDH* mutant grade IV, je pozorovaná zvýšená mitotická aktivita, abnormální mitózy, větší míra shlukování buněk a výskyt atypických jader nebo vícejaderných nádorových buněk, což výrazně odlišuje grade III od grade II (David, *et al.*, 2023).

U *IDH* mutantních astrocytomů grade IV se vyskytují mikrovaskulární proliferace a rozsáhlé palisádové nekrózy. Z hlediska molekulárního je zde přítomná homozygotní delece *CDKN2A/B*, která je základem pro klasifikaci grade IV (Huang, 2022). V porovnání s glioblastomem *IDH* wildtype postihují astrocytomy grade IV dospělé středního věku (45 let) a mají příznivější prognózu s až dvakrát delší dobou přežití (David, *et al.*, 2023).



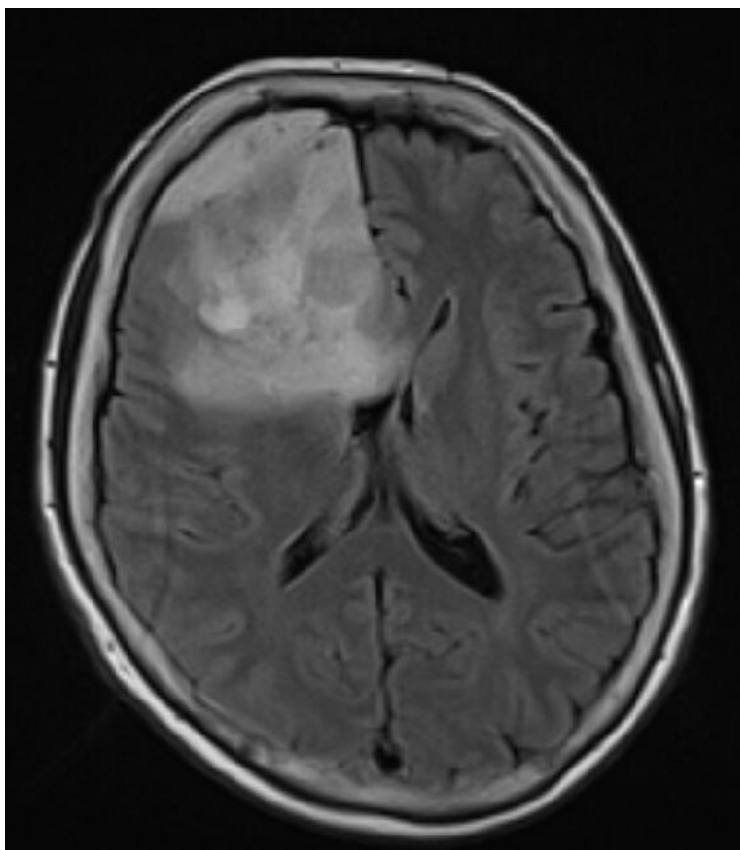
Obrázek 4: Snímek astrocytárního nádoru *IDH* mutant pořízený magnetickou rezonancí (archiv FNOL)

3.6.3 Oligodendrogliom, *IDH* mutant s kodelecí 1p/19q

Oligodendrogliální tumory (viz obrázek 5) jsou charakterizovány přítomností *IDH* mutace a kompletní delecí 1p/19q chromozomálních ramen. Postihují kortikální kůru

mozkovou a většina oligodendrogliomů je lokalizovaná v mozkových hemisférách, méně častý je výskyt v oblasti mozečku, mozkového kmene a míchy (Tork *et al.*, 2022).

Buněčné hranice oligodendrogliomů jsou tvořeny zřetelnými cytoplazmatickými membránami. Oligodendrogliomy jsou často kalcifikované a dochází k ukládání vápníku v nádorových ložiscích. Jev kalcifikace je velmi dobře patrný na rentgenových snímcích. U těchto typů nádorů často dochází k fokálnímu krvácení do mozkového parenchymu.



Obrázek 5: Snímek oligodendrogliálního nádoru pořízený magnetickou rezonancí (archiv FNOL)

Z histologického a mikroskopického hlediska jsou pro oligodendrogliomy charakteristické neoplastické oligodendrocyty s pravidelným tvarem a kulovitými jádry, jejichž chromatinová struktura připomíná zrnité uspořádání. V nádorech jsou přítomné husté a větvené kapilární sítě (David, *et al.*, 2023).

Stejně tak jako u astrocytomů jsou u oligodendrogliomů rozlišovány stupně invazivity, konkrétně grade II a grade III. U grade II jsou pozorována kulatá jádra a perinukleární vakuoly v buňkách. Nejčastěji se oligodendrogliomy grade II objevují ve frontálním a temporálním laloku. Pro grade III jsou typické výrazné atypie, vysoká mitotická aktivita a mikrovaskulární

proliferace (Tork *et al.*, 2022). Buňky jsou malé, uniformní a hustě nakupené (Brychtová *et al.*, 2008).

Na molekulární úrovni jsou oligodendrogliomy převážně charakterizovány *IDH* mutací a 1p/19q kodelecí. Homozygotní delece *CDKN2A* nebo *CDKN2B* může být přítomna u gradu III, ale obecně k ní u oligodendrogliomů dochází jen v malé míře (David, *et al.*, 2023).

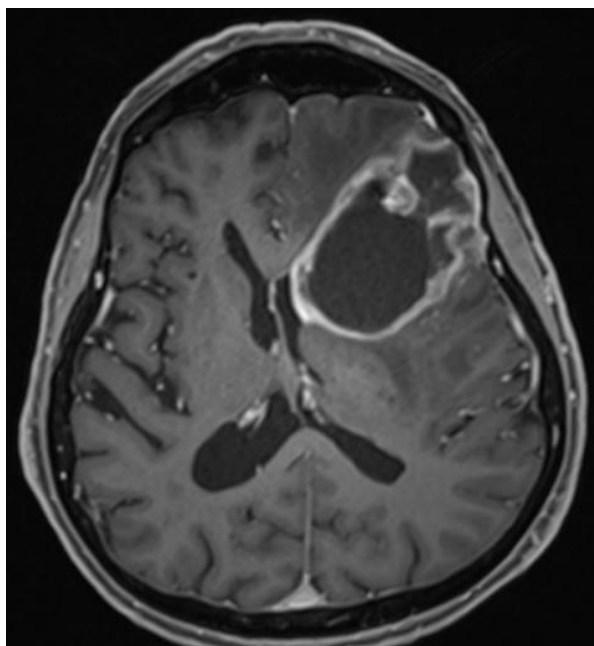
Jak již bylo zmíněno, oligodendrogliomy jsou od astrocytomů odlišovány přítomností kodelece 1p/19q, která je významná pro tyto typy tumorů. Nejběžnější metodou pro vyšetřování kodelece 1p/19q je metoda FISH, kde se k identifikaci chromozomálních ramen používají párové sondy lokalizované na chromozomech 1, v konkrétních oblastech 1p36 a 1q25 a na chromozomu 19 v oblastech 19p13 a 19q13 (Reuss, 2023).

Kromě kodelece 1p/19q jsou u oligodendrogliomů pozorovány mutace v promotoru *TERT*, který je zodpovědný za funkci kódování katalytické podjednotky enzymatického komplexu telomerázy (David, *et al.*, 2023).

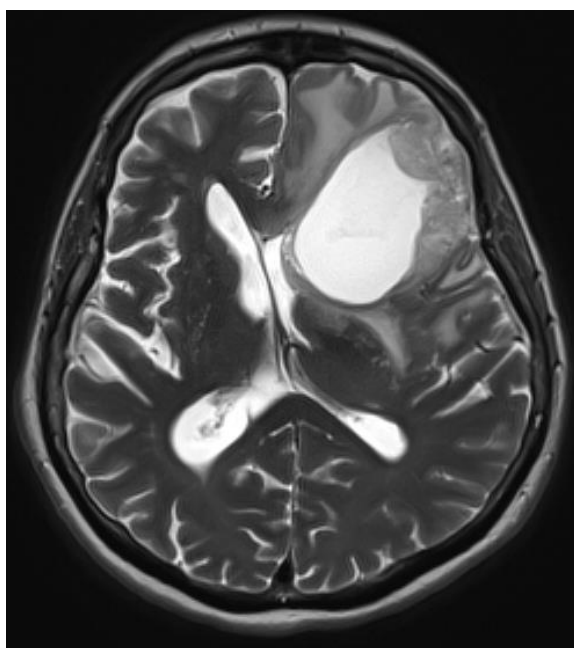
3.6.4 Glioblastom, *IDH* wild type

Glioblastomy jsou nejčastěji vyskytující se primární mozkové tumory, převážně u dospělých pacientů. Zároveň se jedná o nejagresivnější formu tumorů s relativně silnou odolností vůči terapiím, což souvisí s celkově špatnou prognózou a odpovědí na léčbu (Melhem, *et al.*, 2022).

Histologický popis glioblastomů odpovídá rozsáhlým tumorům s centrálními nekrózami zasahujícími do okolní tkáně v expanzivní míře s mikrovaskulární proliferací, rychlou mitotickou aktivitou a špatnou diferenciací (Brychtová *et al.*, 2008) (viz obrázky 6 a 7). Preference vzniku zahrnují oblasti subkortikální bílé hmoty, hluboké šedé hmoty hemisfér, ale především dominantní oblastí vzniku je spánkový lalok. Původně byly glioblastomy popisovány jako primární a sekundární, dle způsobu vzniku a vývoje (Melhem, *et al.*, 2022). V dnešní době převažuje molekulární diagnostika, která glioblastomy klasifikuje jako *IDH* wildtype. Molekulárně jsou glioblastomy popisovány amplifikací genu *EGFR*, přítomností mutace promotoru *TERT* nebo vyskytujícími se změnami v počtu kopií chromozomů 7 a 10, konkrétně zisk chromozomu 7 a ztráta chromozomu 10. Dalším pozorovaným biomarkerem je methylace promotoru *MGMT* (David, *et al.*, 2023).



Obrázek 6: Snímek glioblastomu pořízený z vyšetření magnetickou rezonancí (archiv FNOL)



Obrázek 7: Snímek glioblastomu pořízený z vyšetření magnetickou rezonancí (archiv FNOL)

3.7 Molekulární charakteristika difúzních gliálních nádorů

Vývoj gliálních nádorů je zapříčiněn genetickými a epigenetickými změnami, které vedou k poruchám regulačních mechanismů, jako je ztráta funkce tumor supresorových genů nebo nadměrná exprese některých onkogenů. Tumor supresorové geny kódují proteiny regulující proces buněčného dělení a zajišťují jeho kontrolovaný a správný průběh. Mutace tumor supresorových genů mají dopad na kódované proteiny, a v takových případech dochází

k nekontrolovanému dělení buněk a následnému potenciálnímu vývoji nádorů (Nussbaum, *et al.*, 2004).

3.7.1 Molekulární markery difúzních gliálních nádorů

Molekulární diagnostika gliálních difúzních nádorů je postavena především na sekvenačních, cytogenetických a imunohistochemických metodách. Nedílnou součástí je metoda fluorescenční *in situ* hybridizace, která přispívá diagnostice přesnou lokalizací konkrétních genů představující molekulární markery, jejichž míra výskytu vede k určení přesnějších diagnóz a prognóz pro budoucí terapii (Ruichao, *et al.*, 2022).

U nádorů postihujících CNS jsou metodou FISH obvykle vyšetřovány kodelece 1p/19q chromozomálních ramen, amplifikace genu *EGFR*, delece genu *CDKN2A/B*, vyšetření ztráty chromozomu 10 v kombinaci se ziskem chromozomu 7, aberace genů *PTEN* a *CCND1* (Raposo, *et al.*, 2021).

3.7.2 *CDKN2A*

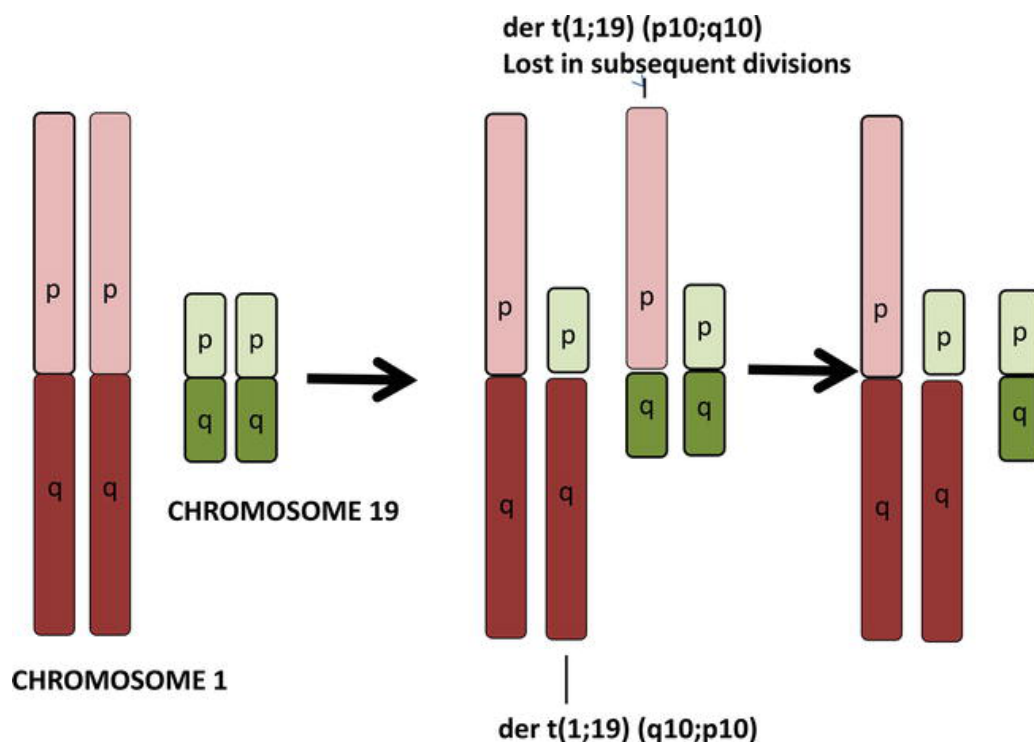
Gen pro *CDKN2A* (cyklin dependent kinase inhibitor 2A) je tumor supresorový gen, nacházející se na chromozomu 9p21. Tento gen kóduje transkripty regulující buněčný cyklus, konkrétně blokaci abnormálního buněčného růstu a proliferace zprostředkované vazbou komplexů cyklin-dependentních kináz a cyklinu D. (Foulkes, *et al.*, 1997). Dochází tak k inhibici kinázové aktivity enzymu a následnému zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Huang, 2022).

Homozygotní delece *CDKN2A/B* se vyskytuje u mnoha typů nádorů a jeho přítomnost je spojována se špatnou prognózou. Delece *CDKN2A/B* bývá nalezena u oligodendrogliomů a astrocytomů gradu 4 (David, *et al.*, 2023).

3.7.3 Kodelece chromozomálních ramen 1p/19q

Kodelece chromozomálních ramen 1p/19q (viz obrázek 8) je popisována jako jeden z prvních neuroonkologických markerů. Termínem kodelece je vyjádřena ztráta genetického materiálu chromozomálních ramen 1p a 19q, způsobená nebalancovanou translokací (Chamberlain *et Born*, 2015).

Tento typ kodelece je spojován s příznivou prognózou, relativně efektivní odpovědí na chemoterapii a radioterapii, a celkově delším přežitím onkologického pacienta bez výrazné progrese nádoru (David *et al.*, 2023). Prakticky se v laboratořích kodelece 1p/19q vyšetřuje metodou FISH, kde se pomocí fluorescenčních sond stanovují poměry signálů konkrétních chromozomálních oblastí 1p/1q a 19q/19p (Pinkham, *et al.*, 2015).

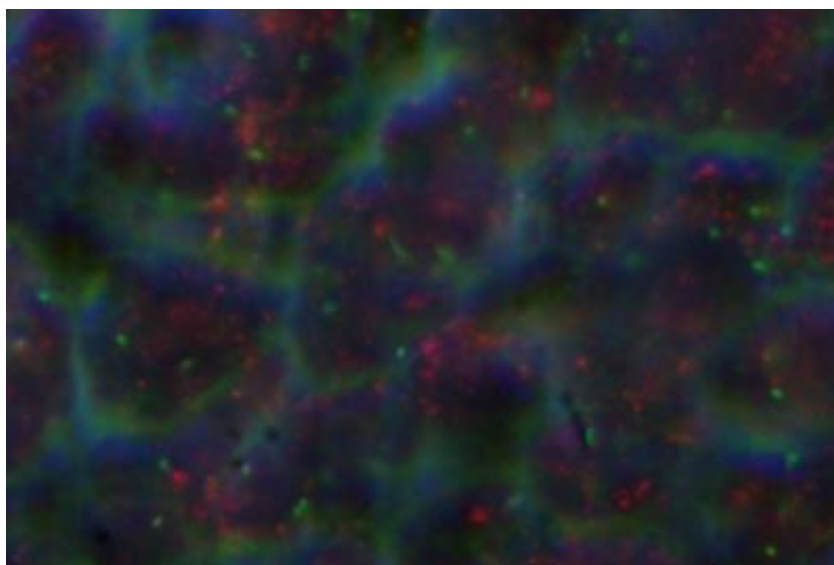


Obrázek 8: Schéma chromozomální kodelece 1p/19q (Kaur, 2021)

3.7.4 EGFR

EGFR je receptor epidermálního růstového faktoru a je ve velké míře exprimován a pozorován jako molekulární marker u několika typů nádorů. Nadměrná exprese a amplifikace *EGFR* je typická pro glioblastomy (Hongsheng XU, *et al.*, 2017).

Problémem souvisejícím s nadměrnou amplifikací EGFR u glioblastomů je pozorovaná rezistence v léčbě terapii, konkrétně v chemoterapii a radioterapii. S overexpresí EGFR je zároveň spojována proliferace a invaze těchto typů nádorů do okolní tkáně. Mechanismů aktivace signální dráhy EGFR je popisováno více, přičemž významný mechanismus aktivace nastává při zvýšené produkci ligandů, nadměrné expresi nebo amplifikaci či mutaci daného receptoru (Oprita, *et al.*, 2021).



Obrázek 9: Vzorek glioblastomu obsahující amplifikaci genu *EGFR*. Zvětšení 1000x (zdroj vlastní)

3.7.5 *PTEN*

Homolog fosfatázy a tenzinu (*PTEN*), je tumor supresorový gen. Aberace genu *PTEN* jsou spojovány s celou řadou nádorových onemocnění jako je rakovina plic, prsu, prostaty, močového měchýře a mozku. *PTEN* je lokalizován v oblasti chromozomálních ramen 10q23. Jako tumor supresorový gen je součástí regulace buněčné proliferace, invaze a adheze související s programovanou buněčnou smrtí a opravami poškozené DNA (Yang *et al.*, 2020).

Ztráta exprese genu *PTEN* je typická pro počáteční gliomogenezi, a má určitý vliv při progresi maligních gliálních nádorů. Nejčastějším typem aberace genu *PTEN* ve vývoji glioblastomů jsou delece chromozomálního ramene 10q. Význam aberací *PTEN* v korelaci s dobou přežití a celkovou prognózou je stále předmětem studia, obecně však míra aberací bývá spojená s kratší dobou přežití (Benitez, *et al.*, 2021).

3.7.6 *CCND1*

CCND1 je gen lokalizovaný v chromozomální oblasti 11q13 a jeho kódovaným produktem je cyklin D1, který je klíčový v progresi buněčného cyklu, kde reguluje přechod z G1 do S fáze. Cyklin D1 je vázán s cyklin-dependentními kinázami CDK4 a CDK6, kdy po navázání následně dochází k fosforylaci retinoblastomového proteinu Rb1 během fáze G1 (Moreno-Bueno, *et al.*, 2003).

Cyklin D1 je nadměrně exprimován a pozorován u gliomů, zároveň je overexprese tohoto proteinu pozorována u dalších typů nádorů, konkrétně například u rakoviny prsu. Nadměrná exprese CCND1 způsobuje rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapeutické léčbě (Zhang D., *et al.*, 2018).

3.7.7 IDH

Isocitrátdehydrogenázy (IDH) jsou enzymy katalyzující oxidativní dekarboxylaci isocitrátu a jsou nezbytnými složkami pro fungování Krebsova cyklu a udržování buněčné homeostázy. Geny, které kódují IDH bývají často mutovány a projevy těchto mutací jsou ve velké míře spojovány s gliomogenezí. (Han, *et al.*, 2020).

Existují 3 izoformy těchto enzymů, IDH1, IDH2 a IDH3, přičemž mutace izoformem IDH1 i IDH2 jsou pozorovány u řady diagnostikovaných nádorových onemocnění. U většiny gliomů je pozorována heterozygotní bodová mutace v IDH1, kdy dochází k substituci argininu za histidin (IDH1 R132H). Mutací dochází k narušení metabolické přeměny isocitrátu na alfa-ketoglutarát a dochází k produkci D-2-hydroxyglutarátu (2-D-HG), který v tomto případě figuruje jako onkometabolit a celkově podporuje proces gliomogeneze (Miller, *et al.*, 2023).

Jako *IDH* mutantní gliomy jsou označovány astrocytomy a oligodendrogliomy. Mutace *IDH1/2* jsou charakteristikou gliomů nižšího stupně a jsou spojovány s příznivými výsledky prognóz ve srovnání i *IDH* wildtype gliomy. Velký význam ve studiích mají selektivní mutantní inhibitory IDH, které cílí na terapii pacientů s mutantními *IDH* gliomy, prostřednictvím inhibice *IDH*-mutantních enzymů s hlavním cílem snížení hladin D-2-HG (Miller, 2022).

3.7.8 TERT

Telomerázová reverzní transkriptáza (TERT) je součástí katalytické podjednotky enzymu telomerázy. TERT má význam při prodlužování telomer a její exprese je specifická pro vývoj rakovinotvorných buněk. U nádorových onemocnění, včetně gliomů, bývají v oblasti promotoru *TERT* (pTERT) nalézány dvě mutace, C228T a C250T, kdy dochází k náhradě cytosinu za thymidin (Hasanau, *et al.*, 2022). Mutacemi dochází ke zvýšení exprese a aktivity telomérazy, která je klíčová pro imortalizaci buněk a tumorigenezi (Olympios, *et al.*, 2021).

Mutace v oblasti promotoru *TERT* byly identifikovány u řady nádorových onemocnění, včetně gliálních nádorů mozku a jejich výskyt je spojován se špatnou prognózou a kratší dobou přežití. S přítomností pTERT současně korelují i jiné biomarkery, například amplifikace *EGFR*, mutace *IDH1/2*, *MGMT* a 1p/19q, a to nejčastěji u glioblastomů (Powter, *et al.*, 2021).

3.8 Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace je laboratorní technika využívaná při molekulární a cytogenetické diagnostice a mapování genů. Hlavním cílem je detekce specifické sekvence DNA nebo celých chromozomálních úseků pomocí sond. Výsledkem metody je odhalení genetických změn a aberací v biologických vzorcích (O'Connor, 2008).

Principem metody FISH je proces hybridizace jednořetězcové DNA sondy (próby) ke komplementárním studovaným sekvencím DNA. Sonda neboli próba, je klonovaná molekula RNA nebo DNA, která je značena detekovatelnými indikátory a hybridizací dochází k navázání sond a následné identifikaci komplementárních sekvencí (Levsky *et* Singer, 2003). Přípravované vzorky pro metodu FISH bývají imobilizovány a fixovány na sklech mikroskopických preparátů, DNA je v tomto případě denaturována tzv. „na místě“, tedy *in situ*.

Sondy typické pro metodu FISH jsou značeny fluorescenčními barvivy a jejich detekce a odečítání probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu s vícenásobnými filtry. Dochází tak k identifikaci chromozomální přestavby nebo abnormálního počtu chromozomů, co se týče přítomnosti, absence nebo lokalizace určitého genu. Sondy mohou být genově nebo lokusově specifické (Nussbaum, *et al.*, 2004). Metoda FISH je důležitou součástí klasické molekulární cytogenetiky a její role v rutinním vyšetřování vzorků je nenahraditelná.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Vyšetřované tkáně byly fixované ve formalinu a zalité do parafinu (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded). Takto připravené tkáňové bloky byly následně krájeny na mikrotomu a fixovány na pozitivně nabitých podložních sklech.

Pro přípravu sond byly použity bakteriální klony RP11-105H7 (značeno SpectrumOrange) pro 19q13, RP11-815E8 (značeno SpectrumGreen) pro 19q13 a RP11-300/6 (značeno SpectrumOrange) pro *CCND1*.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Xylén (Mikrochem)
- 96% ethanol (Fagron)
- 70% ethanol (Fagron)
- Isopropanol (Lach-Ner)
- Deionizovaná sterilní voda (Ambion)
- Octan sodný (Lach-Ner)
- Formaldehyd 36-38% (Lach-ner)
- Cot-1 DNA-FISH grade Cot (Kreatech)
- Hybridization solution (Cytocell)
- DAPI Antifade (Vysis)
- Formamid (Ambion)
- 35-38% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
- Thiokyanát sodný (Sigma-Aldrich)
- Citrát sodný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)

- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich)
- TRIS (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Pepsin (Sigma-Aldrich)
- NP-40 (Vysis)
- LB Broth base (Invitrogen)
- Kaučukový cement (Marabu)
- NaOH (Penta)
- Ampicilin (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Použité soupravy

- Platinum Bright Nucleic Acid Labeling kit (Kreatech™)
- Plasmid Mega kit 25 (QIAGEN)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

LB médium: 4,7 g NaCl přidat k 20 g LB broth base, doplnit vodou do 1 l a sterilizovat autoklávováním.

TE pufr: ke 200 µl 0,05 ml/l EDTA přidat 200 µl 0,5 ml/l TRIS, následně přidat 9,6 ml deionizované vody.

Zásobní roztok 20x SSC: k 88 g citrátu sodného přidat 175 g NaCl a doplnit do 1 l deionizovanou vodou (pH 5,3).

Promývací pufr (WB): 100 ml 20x SSC do 1 l doplnit deionizovanou vodou (pH 7,0).

10% formalín: ke 100 ml zásobního PBS (10x) přidat 40 ml formaldehydu do 0,5 l doplnit deionizovanou vodou, uchovávat ve tmě.

Formamid: ke 7 ml deionizované vody přidat 24,5 ml formamidu, 3,5 ml zásobního SSC (20x) a upravit pH na 7,0-7,8.

Promývací roztok I: ke 3 ml NP-40 přidat 20 ml zásobního SSC (20x), do 1 l doplnit deionizovanou vodou, upravit na pH 7.

Promývací roztok II: k 1 ml NP-40 přidat 100 ml zásobního roztoku SSC (20x) a do 1 litru doplnit deionizovanou vodou, upravit na pH 7.

Proteázový pufr: roztok NaCl o koncentraci 0,9 %, upravit na pH 2.

10x zásobní roztok PBS: navážit 2 g KCl, následně přidat 80 g NaCl, 30,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 a do 1 litru doplnit deionizovanou vodou.

4.2.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Laminární box Herasafe KS12 (Thermo Fisher Scientific)
- Digestor N1200 (Merci)
- Lednice s mrazákem (Gorenje, Liebherr)
- Inkubátor (Mettler)
- Centrifuga Smart 15 (Hamil)
- Minicentrifuga miniSpin plus (Eppendorf)
- Chlazená centrifuga Rotina 420R (Hettich)
- Hybridizér Hot-Brite (Vysis)
- Sonifikační přístroj Bioruptor (Diagenode)
- Třepačka Lab dancer (IKA), C24 – (New Brunswick)
- Vakuový rotační koncentrátor Concentrator 2301 (Eppendorf)
- Výrobník ledu GB 902 (Brema)
- Míchačka Arec-x (Velp scientific)
- Mikroskop Olympus BX51 (Olympus)
- Váhy ED4235 (Sartorius)
- Termoblok BSH200 (Benchmark Scientific)
- Vodní lázeň TW8 (Julabo), ED5 (Julabo)

4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Distribuce věku pacientů vzhledem k typu nádoru byla sumarizována pomocí kvantilových charakteristik (medián, minimum, maximum, resp. 1, 3. kvartil), graficky prezentována prostřednictvím boxplotu a statisticky hodnocena pomocí Kruskalova-Qallisova testu s následným testováním párovým Wilcoxonovým testem s Bonferroniho korekcí p-hodnot. Korelace copy number (CN) hodnot mezi lokusy byla hodnocena pomocí Spearmannova korelačního koeficientu, jehož nulovost byla vždy testována. Výsledky, tj. hodnota Spearmannova korelačního koeficientu a p-hodnota příslušného testu (nad diagonálou), spolu s distribucemi hodnot (diagonála) a bodovými grafy pro dvojice lokusů (pod diagonálou) byly prezentovány pomocí pairplot grafu. Fisherův exaktní test byl použit pro hodnocení výskytu aberací jednotlivých lokusů vzhledem k typu nádoru. Za tímto účelem byly spojitě CN hodnoty kategorizovány: del = $CN < 1,8$, amp = $CN > 2,5$, normal = $1,8 \leq CN \leq 2,5$. Podíl výskytu delecí a amplifikací byl prezentován pomocí četností a skládaných sloupcových grafů. Pro všechny výpočty byl využit software R, ver. 4.2.0.

4.3.1 Kultivace bakterií a izolace plazmidu

1. Bakteriální linie s plazmidem obsahující inzert genu byly inokulovány v 1 litru LB média s 50 mg ampicilinu.
2. Médium s bakteriemi bylo kultivováno přes noc na vyhřáté třepačce při 37 °C.
3. Médium bylo centrifugováno 15 minut při 4 °C a 6000 g.
4. Bakteriální pelet byl rozsuspendován v 50 ml pufru P1.
5. K roztoku bylo přidáno 50 ml pufru P2, následně mícháno převrácením, poté zůstal roztok stát při laboratorní teplotě 5 minut.
6. K roztoku bylo přidáno 50 ml pufru P3, promícháno převrácením, následně byl roztok inkubován na ledě 30 minut.
7. Roztok byl centrifugován při 4 °C a 2000 g po dobu 30 minut.
8. Kolona QIAGEN-tip byla umístěna na 1000 ml sběrné nádobě a promyta 35 ml QBT pufrem.
9. Kolona byla promyta supernatantem.

10. Kolona byla promyta 200 ml pufrem QC, proteklá tekutina byla vylita do odpadu a kolona přenesena a upevněna na čistou sběrnou nádobu.
11. DNA byla eluována promytím 35 ml pufru QF.
12. DNA byla precipitována přidáním 24,5 ml isopropanolu při laboratorní teplotě, roztok byl zamíchán a přelit do nové centrifugační falkony, centrifugován 30 minut při 4 °C při 15000 g.
13. Vzniklý supernatant byl vylit do odpadu a k sedimentu přidán 70% ethanol při laboratorní teplotě.
14. Roztok byl opětovně zcentrifugován při 15000 g při 4 °C po dobu 10 minut.
15. Supernatant byl vylit do odpadu.
16. Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 10 ml TE pufru.

4.3.2 Příprava a značení sondy na FISH

Pomocí Platinum Bright Nucleic Acid Labelling kitu Kreatech byly připraveny a naznačeny sondy pro zkoumané geny za využití vyizolovaných plazmidů.

1. 1 litr deionizované vody byl vychlazen ve velké nádobě s ledem.
2. 1 µl DNA vyizolovaného plazmidu bylo naředěno do 100 µl sterilní deionizované vody do 0,2 ml mikrozkušavky určené pro bioruptor, lehce zvortexováno a stočeno, naředěná DNA se nechala 15 minut vychladit.
3. Vychlazená voda s ledem byla nalita do sonikátoru a následně spuštěn program na 20 cyklů, 1 cyklus na 30 sekund sonikace a 90 sekund bez sonikace.
4. Po sonikaci byl vzorek vložen do vakuové odparky a ponechán odpařit na 16 µl, zhruba 50 minut při 60 °C.
5. K 1 µg plazmidové DNA v 16 µl vody bylo přidáno 2 µl ULS dye barviva a 2 µl 10x labeling solution, promícháno pipetováním, před použitím byly reagenty zvortexovány.
6. Vzorky byly inkubovány 30 minut v 85 °C ve vodní lázni, kde probíhalo značení a poté byly vzorky uloženy na led.
7. Pomocí vortexování byla rozsuspendována náplň kolon k přečištění a kolony umístěny do nových prázdných mikrozkušavek.
8. Kolony byly zcentrifugovány 20000 g na 1 minutu, proteklá tekutina vylita do odpadu.

9. Na kolonu bylo naneseno 300 μl vody a znovu centrifugováno 1 minutu na 20000 g, proteklá tekutina spolu s mikrozkuřavkou byla vyhozena do odpadu a kolona přenesena na novou mikrozkuřavku.
10. Na kolonu byl nanesen vzorek inkubovaný na ledu a centrifugován 20000 g 1 minutu.
11. Proteklým vzorkem po centrifugaci byla značená DNA, pro lokusově specifické sondy se přidalo 10 μl Cot-1 DNA, pro centromerickou sondu se nepřidávalo nic.
12. Vzorek se nechal odpařit ve vakuové odparce zhruba 50 minut při 60 °C.
13. Vzniklá peleta byla naředěna 20 μl hybridizačním puřrem a prohřáta v termostatu na 37 °C na 5 minut, následně byl vzorek zvortexován, zcentrifugován a vložen do vodní lázně na 30 minut při 37 °C.
14. Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace bylo verifikováno atestovaným cytogenetikem vazebné místo a kvalita hybridizace připravené sondy.

4.3.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

1. Mikroskopická skla s fixovanými tkáněmi formalínem a zalité v parafínu byla promyta po dobu 3 minut třikrát po sobě v xyléně.
2. Skla se nechala vysušit.
3. Mikroskopická skla byla promyta v 96% ethanolu na 5 minut.
4. Skla byla následně vložena do roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 20 minut a následně byla vložena do deionizované vody na 3 minuty.
5. Skla byla vložena na 3 minuty do promývacího puřru.
6. Následně byla skla umístěna do 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrovaného roztoku thiokyanatanu sodného ve vodní lázni o teplotě 80 stupňů na 20 minut.
7. Skla byla promyta deionizovanou vodou po dobu 1 minuty.
8. Skla byla promyta dvakrát v promývacím puřru po dobu 5 minut.
9. Skla byla umístěna do 50 ml přehřátého proteázového puřru na 45 °C s přidaným pepsinem o hmotnosti 50 mg a výsledné koncentraci 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, poté se nechaly inkubovat 30 minut v termostatu.
10. Následně skla byla dvakrát po sobě promyta v promývacím puřru po dobu 5 minut.
11. Skla byla umístěna na 10 minut do 10% formalínu.
12. Skla byla promyta dvakrát po 5 minutách v promývacím puřru a následně deionizovanou vodou na pět minut.
13. Skla se nechala vysušit.

14. Diamantovým hrotem na skle byla označena plocha fixované tkáně a v rozsahu plochy bylo pipetováno zhruba 5 až 10 μ l sondy vzhledem k velikosti tkáně a přikryto krycím sklíčkem, následně byly vytlačeny všechny vytvořené vzduchové bubliny a krycí sklíčko zalepeno kaučukovým cementem.
15. Skla byla vložena do hybridizátoru a byl nastaven program pro parafiny, teplota denaturace na 80 °C na 2 minuty a teplota hybridizace na 37 °C na 12 až 24 hodin.
16. Po provedené hybridizaci byla skla vložena do roztoku II zhruba na 2 minuty a následně byla odebrána krycí sklíčka a skla byla opět vložena do roztoku II.
17. Skla byla vložena na minutu a 45 sekund do roztoku I předeřátém na 73 °C.
18. Následně byla skla vložena do roztoku II při laboratorní teplotě na 30 sekund, poté se bez oplachu nechala zaschnout.
19. Na tkáň bylo napipetováno zhruba 5 μ l barviva DAPI a přiloženo krycí sklíčko.
20. Mikroskopická skla byla vložena do mikroskopu a byly odečítány světelné signály.

4.3.4 ReFISH

Metoda ReFISH byla využita pro vzorky, které při mikroskopování nejevily světelné signály a neproběhla u nich úspěšně hybridizace sond.

1. Podložní skla byla ponořena na 3 minuty do 96% ethanolu, poté byla oddělena krycí skla a opětovně byla skla na 3 minuty ponořena do 96% ethanolu.
2. Následně byla skla ponořena na pět minut do roztoku s 24,5 ml formamidem, 7 ml deionizované vody a 3,5 ml 20x SSC při stálé teplotě 73 °C ve vodní lázni.
3. Skla byla postupně namáčena do ethanolové řady pokaždé na 1 minutu, do 75% ethanolu, 80% ethanolu a 96% ethanolu.
4. Skla se nechala zaschnout na vyhřívané plotně zhruba na 3 minuty při 49 °C.
5. Na tkáň bylo pipetováno dle velikosti 5-10 μ l sondy a bylo přiloženo krycí sklo, byly odstraněny vzniklé vzduchové bubliny a krycí sklo oblepeno.
5. Skla byla vložena do hybridizéru, kde byl nastaven program hybridizace, teplota denaturace na 85 °C na 1 minutu a následně teplota hybridizace na 37 °C na 12-24 hodin, přes noc.
6. Po hybridizaci byla skla vložena do roztoku II zhruba na 2 minuty následně odebrána krycí skla a skla byla vložena opět do roztoku II.
7. Skla byla vložena na minutu a 45 sekund do roztoku I předeřátém na 73 °C.
8. Následně byla skla vložena do roztoku II při laboratorní teplotě na 30 sekund, poté se bez oplachu nechala zaschnout.

9. Na tkáň bylo napipetováno zhruba 5 μ l barviva DAPI a následně bylo přiloženo krycí sklíčko.
10. Mikroskopická skla byla vložena do mikroskopu, kde proběhlo odečítání světelných signálů.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyšetření souboru pacientů

Vzorky pacientů (FFPE) byly vyšetřovány metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. Vyšetřované geny a chromozomální oblasti byly *EGFR*, *CEP7*, *CCND1*, *PTEN*, 1p36.3 a 19q13.32. Pro určení průměrného počtu kopií signálů genů bylo odečteno minimálně 50 až 100 buněčných jader. Počet kopií sledovaných genů nebo chromozomálních oblastí u jednotlivých buněk byl zapsán do laboratorního deníku. Vyhodnocení proběhlo výpočtem průměrného počtu signálů pro každý zkoumaný gen. Jestliže byly signály špatně odečitatelné, nebo v případě neúspěšné hybridizace byla provedena metoda reFISH a vzorky byly opětovně odečítány.

5.2 Vyšetřovaný soubor pacientů a jeho charakteristika

Vyšetřovaný soubor se skládal z 39 pacientů, z toho 15 mužů a 24 žen (viz tabulka 1). Pro provedení statistické analýzy byly pacienti rozděleni do skupin dle příslušných diagnostikovaných nádorů, tedy glioblastomy, astrocytomy, oligodendrogliomy a jiné (viz tabulka 2).

Tabulka 1: Základní charakteristika souboru pacientů z hlediska pohlaví

Pohlaví	Počet pacientů	Procentuální zastoupení	Celkový počet
Muži	15	38,50 %	39
Ženy	24	61,50 %	

Tabulka 2: Rozdělení pacientů dle diagnóz

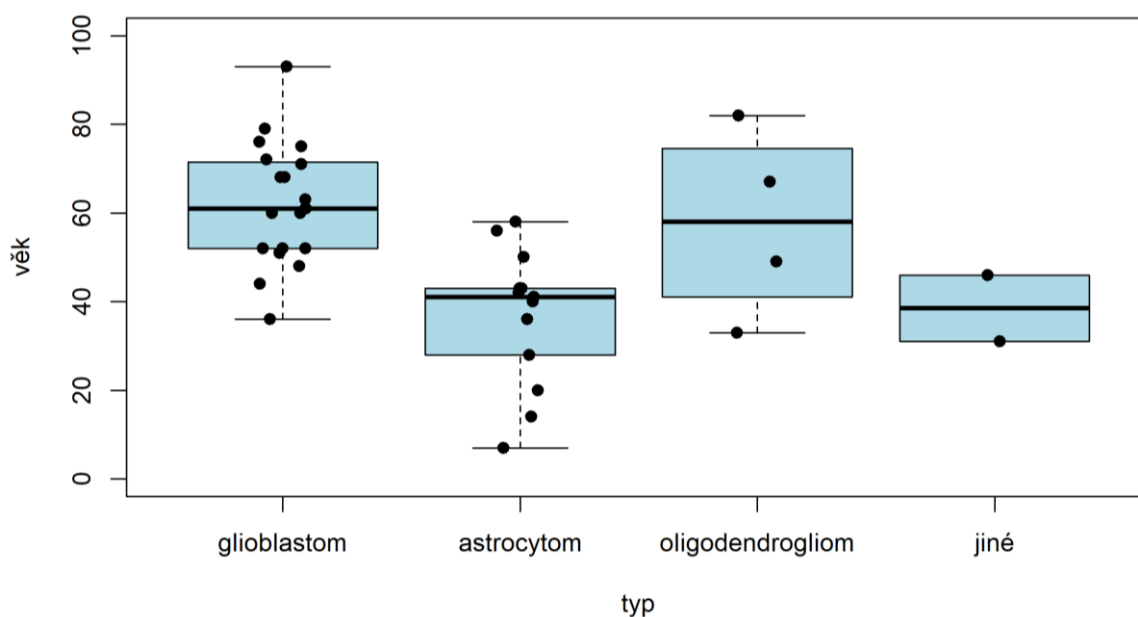
diagnóza	počet pacientů	medián věku	IDH mutovaný	IDH wildtype
glioblastom	20	61	0	20
astrocytom	13	41	7	0
oligodendrogliom	4	58	3	1
jiné	2	38,5	0	0

Medián věku pacientů u všech diagnóz celkově byl 52 let (viz tabulka 3). Konkrétně u glioblastomu byla hodnota mediánu věku 61 let, u astrocytomu 41 let, u oligodendrogliomu 58 let a u jiných typů nádorů v souboru byl medián věku 38,5.

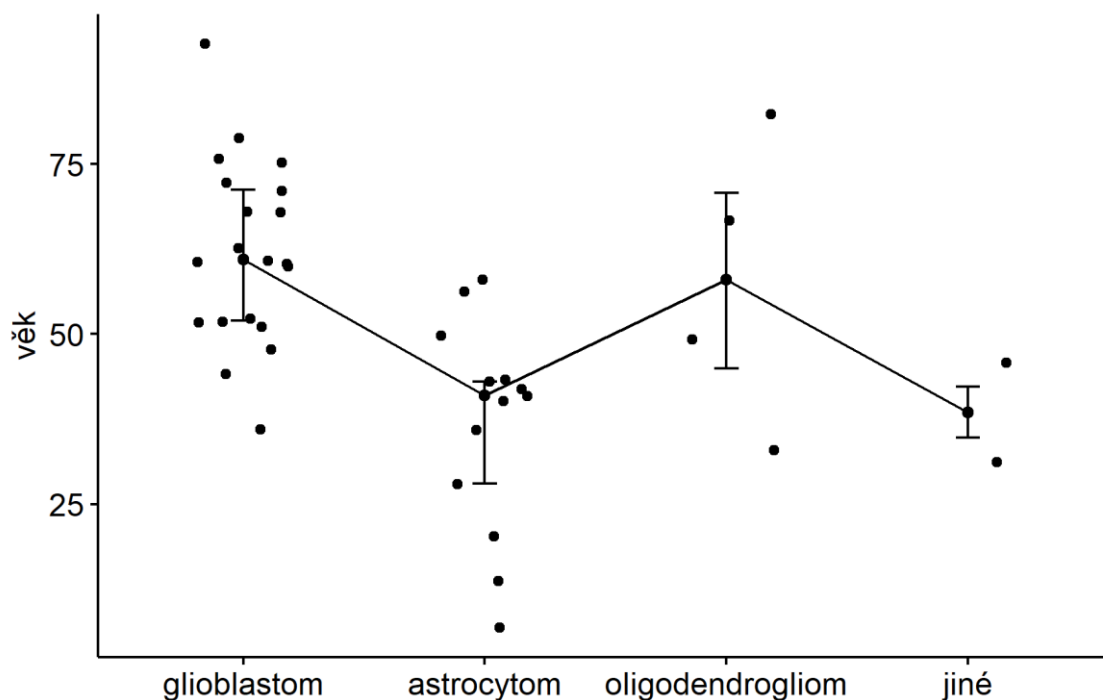
Tabulka 3: Hodnoty mediánů věku pacientů s určenými diagnózami

	Medián (min - max)	Medián (1. kvartil - 3. kvartil)
Glioblastom	61 (36-93)	61 (52-71.25)
Astrocytom	41 (7-58)	41 (28-43)
Oligodendrogliom	58 (33-82)	58 (45-70.75)
Jiné	38.5 (31-46)	38.5 (34.75-42.25)
Celkem	52 (7-93)	52 (41.5-65)

Distribuce věku pacientů u jednotlivých diagnóz se statisticky významně lišila jak lze porovnat v grafu 1 (Kruskal-Wallis test, $p < 0,001$) a grafu 2 (párový Wilcoxonův test, $p < 0,001$). Velké rozdíly byly pozorovány především u glioblastomu a astrocytumu. U oligodendrogliomů a jiných nádorů v datovém souboru byl výsledek distribuce věku pacientů nesignifikantní, především v důsledku nízkého zastoupení těchto typů nádorů.



Graf 1: Distribuce věku pacientů a jejich diagnóz (Kruskal-Wallis test)

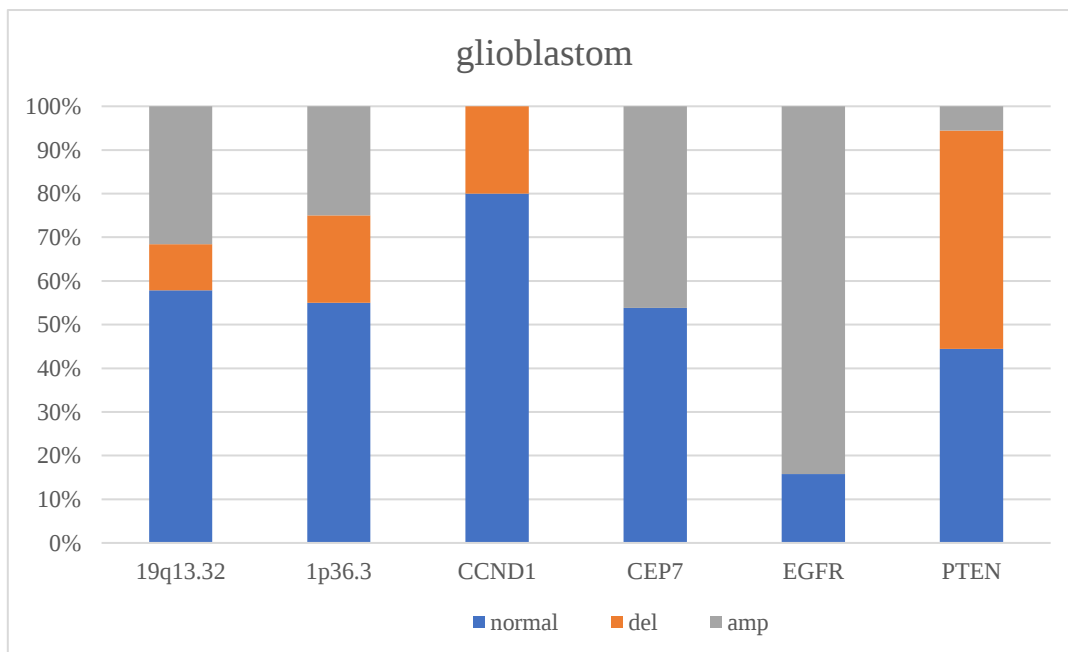


Graf 2: Věkové rozdíly pacientů s diagnostikovanými nádory (Wilcoxonův test)

5.3 Cytogenomické změny u sledovaného souboru pacientů

U pacientů byly u jednotlivých vzorků nádorů glioblastomů, astrocytomů, oligodendrogliomů a ostatních vyšetřovány metodou FISH geny/chromosomální oblasti 19q13.32, 1p36.3, CCND1, CEP7, EGFR a PTEN. Byl hodnocen průměrný počet kopií a přítomnost delece a amplifikace. Celkový soubor pacientů zahrnoval 20 vzorků glioblastomů, 13 vzorků astrocytomů, 4 vzorky oligodendrogliomů a 2 vzorky jiných nádorů nezapadajících do klasifikačního schématu difúzních gliálních nádorů.

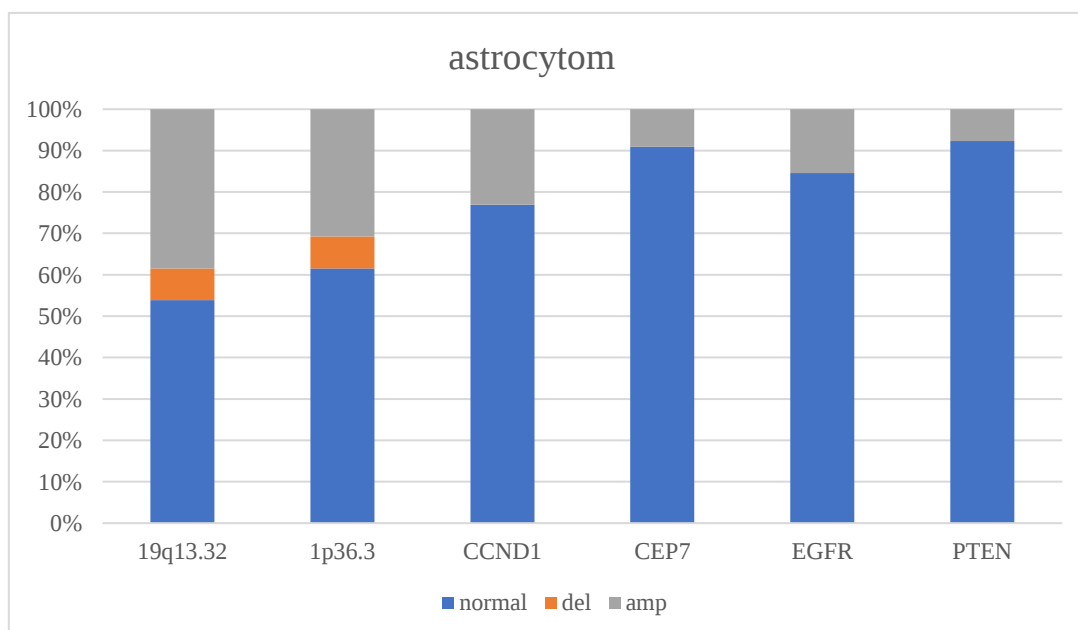
U glioblastomů (20/39) byla nejčastěji pozorovaná amplifikace genu *EGFR* s procentuálním zastoupením 84,2 % (viz graf 3) spolu s amplifikací centromerické oblasti chromozomu 7 (CEP7) u 46,2 % případů. Druhá nejčastěji pozorovaná změna byla delece genu *PTEN* (50 %). Byly zde také pozorovány v malé míře delece genů *CCND1* (20 %) a delece chromosomálních oblastí 19q13.32 (10,5 %) a 1p36.3 (20 %).



Graf 3: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u glioblastomu

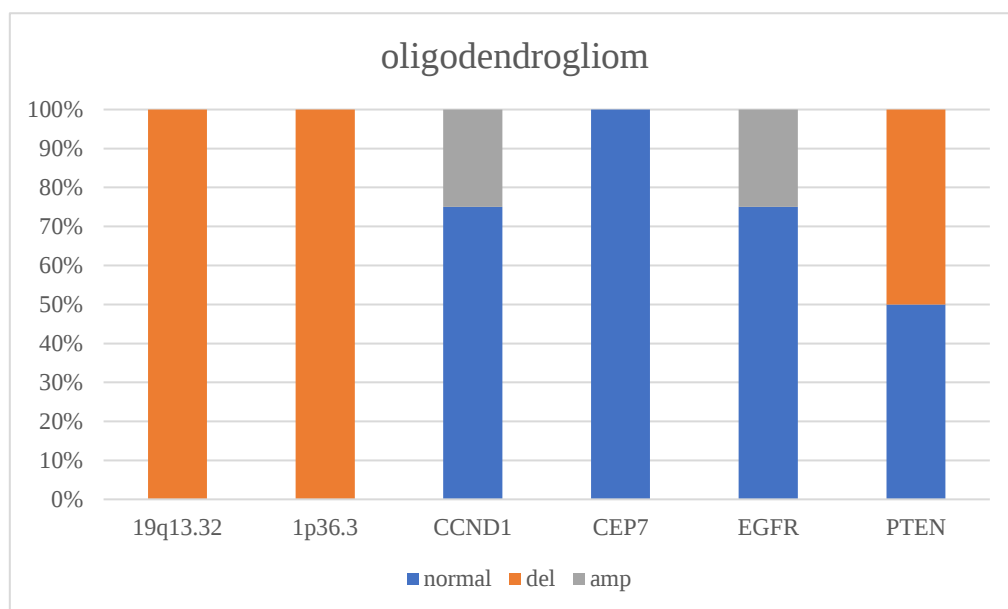
Legenda: del – delece, amp – amplifikace, normal – normální/fyziologický stav

V astrocytárních nádorech (13/39) bylo pozorováno velmi malé procento výskytu delecí, pouze v oblastech 19q13.32 a 1p36.3 a to v obou případech u 7,7 % případů. Vyšší procento výskytu bylo naopak pozorováno u amplifikace oblastí 19q13.32 u 38,5 % a 1p36.3, konkrétně u 30,8 % případů (viz graf 4). U 23,1 % případů byla pozorována amplifikace genu CCND1.



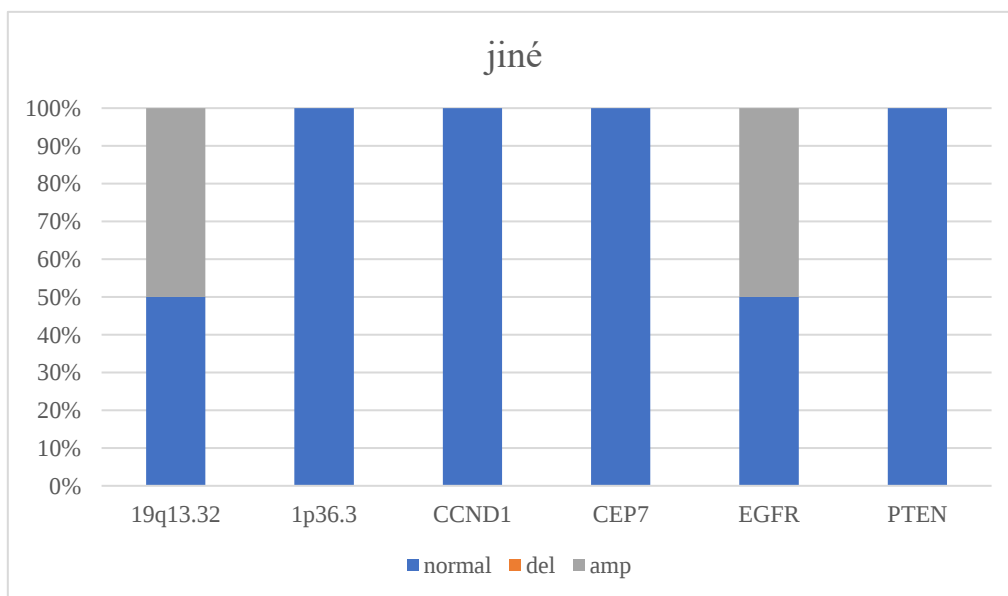
Graf 4: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u astrocytomu

U oligodendrogliomů (4/39) byla ve vyšetřovaných vzorcích pozorována delece chromozomálních ramen 19q13.32 a 1p36.3 ve všech sledovaných případech (4/4; 100 %). U 50 % případů byla nalezena delece genu *PTEN* (viz graf 5). U 25 % případů byla pozorována amplifikace genů *EGFR* a *CCND1*.



Graf 5: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u oligodendrogliomu

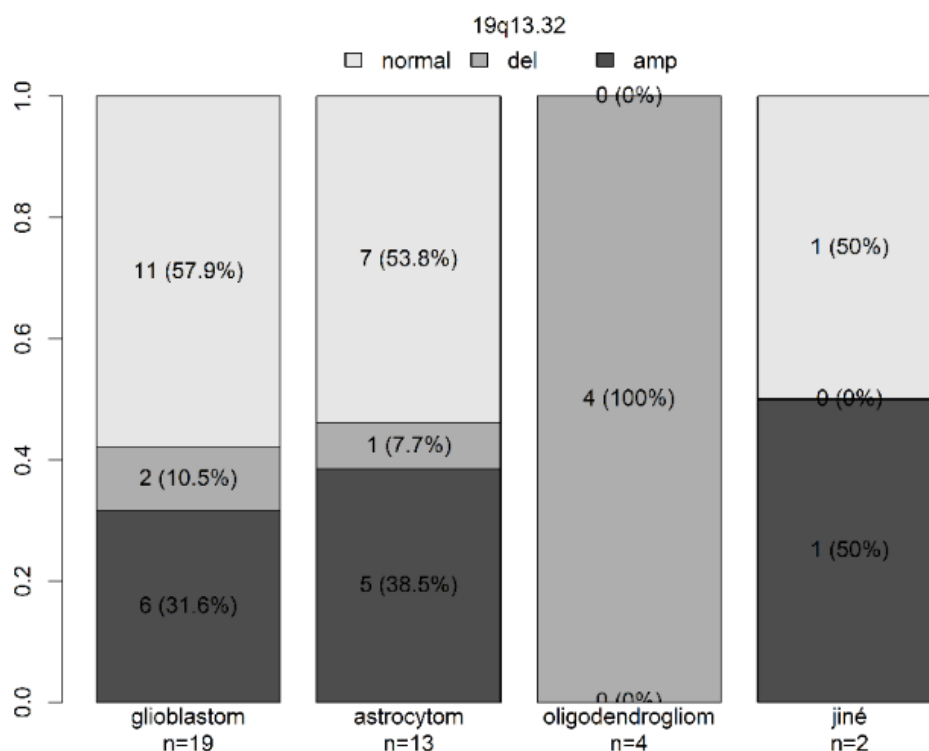
U zbylých dvou vzorků, které nebyly dle klasifikačních schémat charakterizovány jako difúzní gliální nádory, byla nalezena amplifikace genu *EGFR* v 50 % (1/2) případech. Taktéž ve stejné procentuální bilanci byla u vzorků pozorována amplifikace 19q13.32 (viz graf 6).



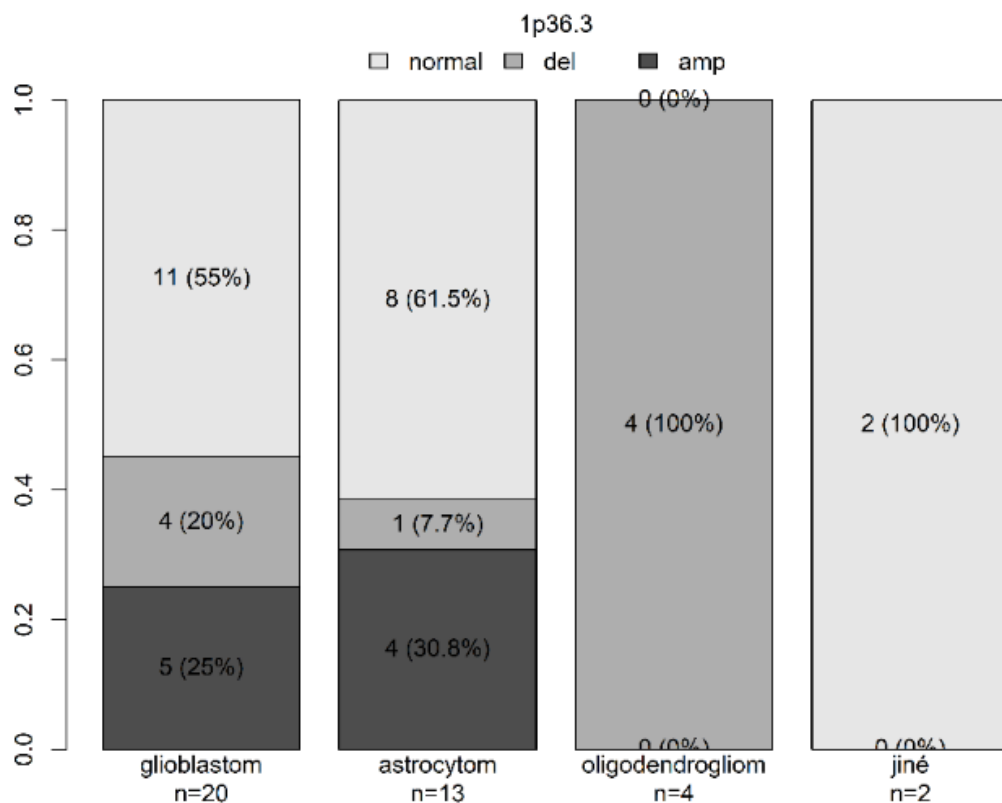
Graf 6: Procentuální zastoupení sledovaných cytogenetických změn u jiných nádorů

5.4 Shrnutí výsledků pozorování jednotlivých markerů a jejich výskyt

Pomocí Fisherova exaktního testu bylo porovnáno zastoupení amplifikace/delece jednotlivých pozorovaných markerů u čtyř skupin diagnóz. Graf 7 dle Fisherova exaktního testu popisuje oblast 19q13.32, kde je dominantním výsledkem 100 % delece chromozomálních ramen u oligodendrogliomů (p-value = 0,014), s tímto výsledkem koreluje také 100 % delece chromozomální oblasti 1p36.3, taktéž u oligodendrogliálních nádorů (p-value = 0,027), popsané v grafu 8.

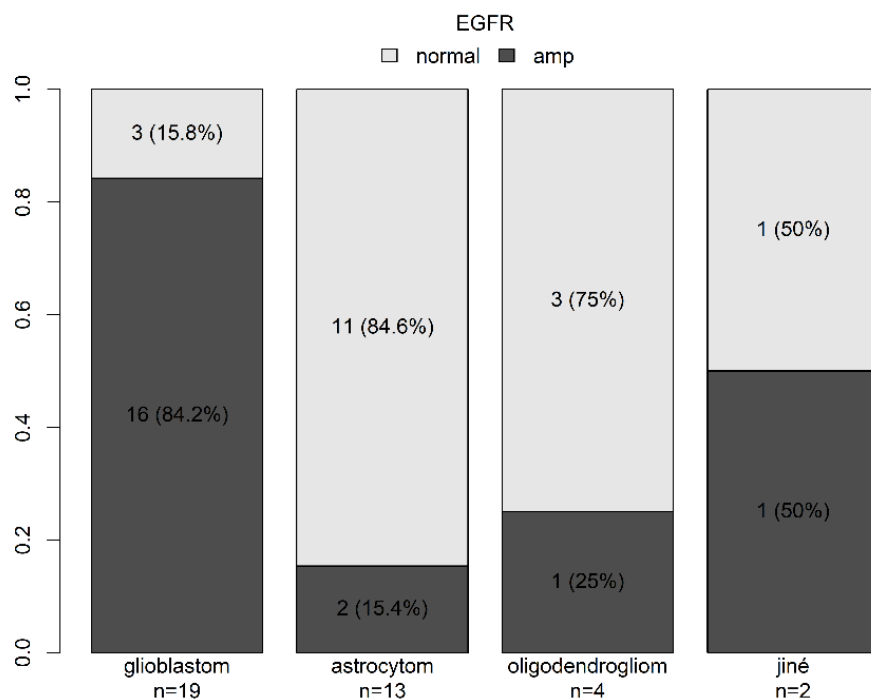


Graf 7: Zastoupení delece/amplifikace chromozomální oblasti 19q13.32 u jednotlivých typů gliálních nádorů

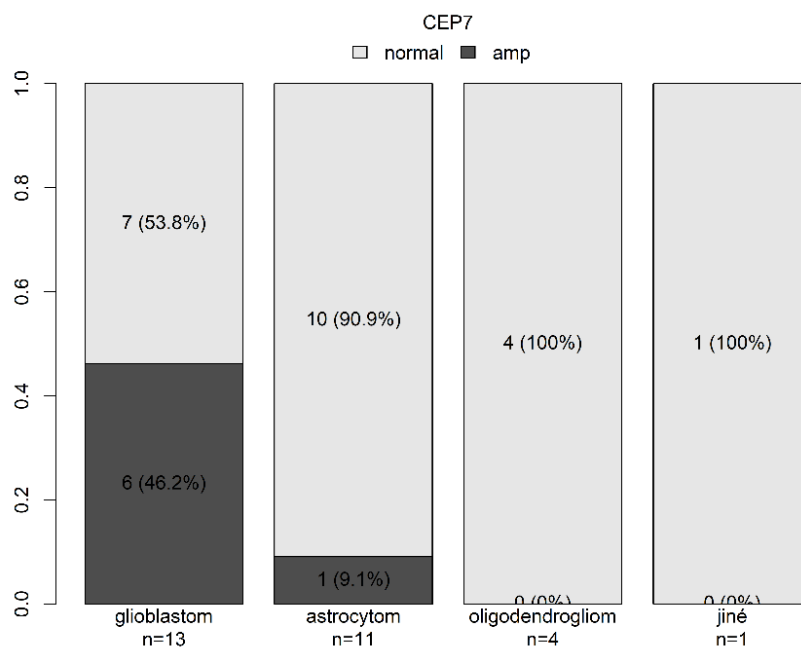


Graf 8: Zastoupení delece/amplifikace chromozomální oblasti 1p36.3 u jednotlivých typů gliálních nádorů

Amplifikace genu *EGFR* výrazně převažovala u glioblastomu (p value $< 0,001$), jak lze vidět v grafu 9. U glioblastomů byla rovněž nalezena častější amplifikace centromerické oblasti chromozomu 7 (CEP 7), rozdíl však nebyl statisticky významný (p value = 0,118), jak lze pozorovat v grafu 10.

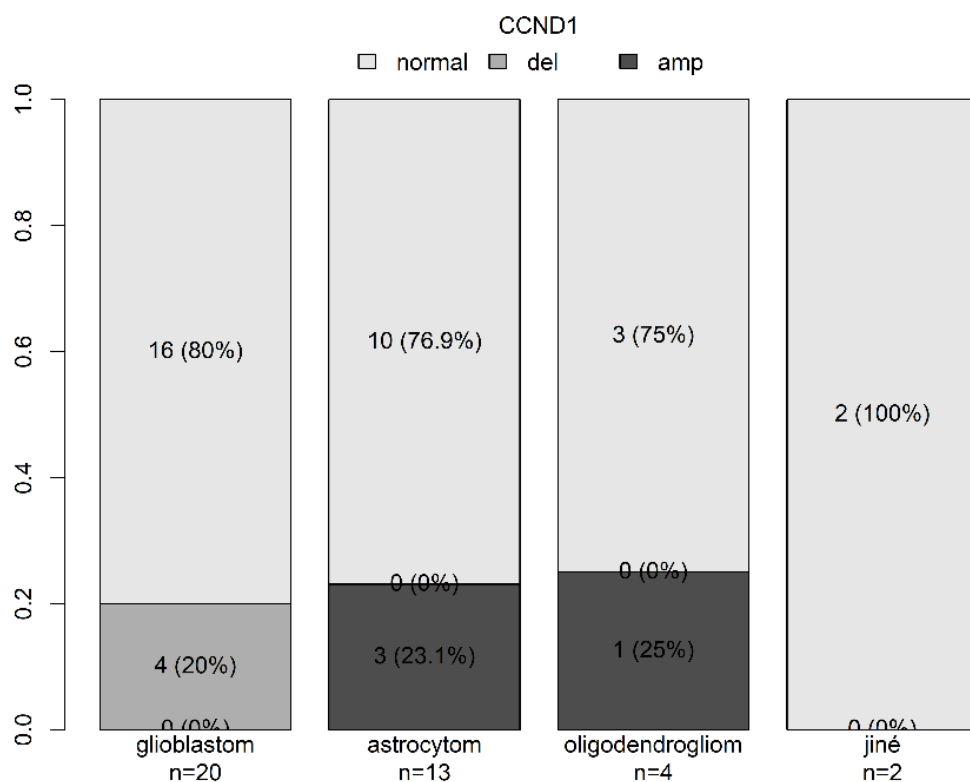


Graf 9: Zastoupení delece/amplifikace genu EGFR u jednotlivých typů gliálních nádorů

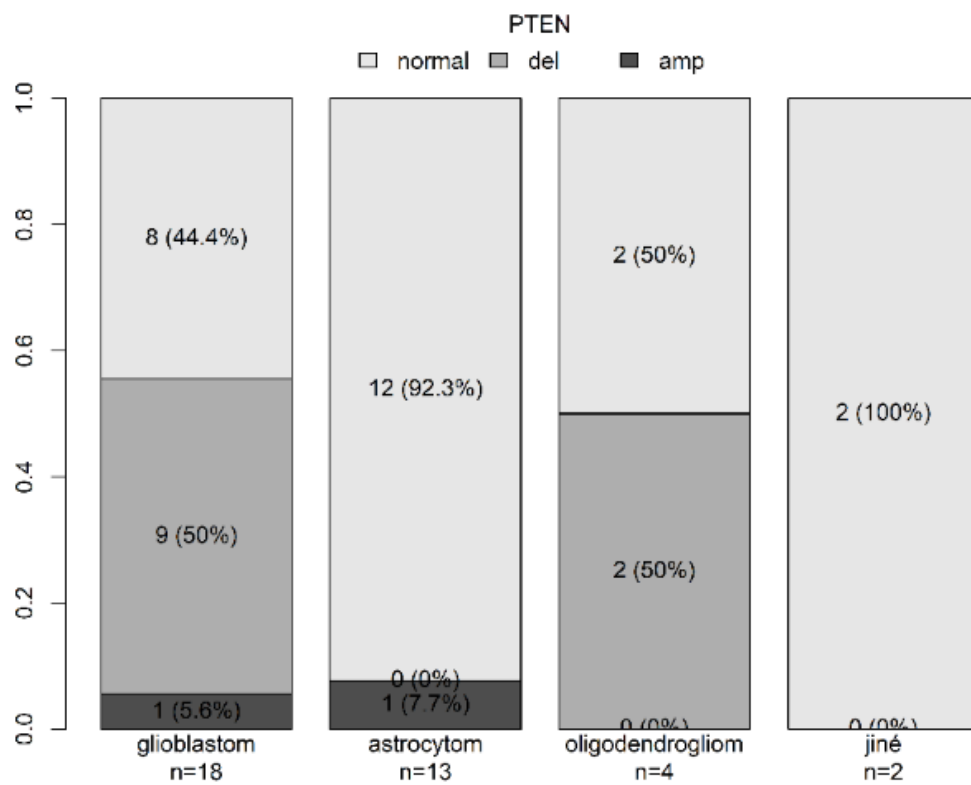


Graf 10: Zastoupení delece/amplifikace centromerické oblasti chromozomu 7 u jednotlivých typů gliálních nádorů

Gen *CCND1* byl amplifikován u 25 % oligodendrogliomů a u 23,1 % astrocytomů. Naopak delece genu *CCND1* byla pozorována u 20 % vzorků glioblastomů (p-value = 0,122), vyobrazeno v grafu 11. U genu *PTEN* (graf 12), byly popsány delece v 50 % případů oligodendrogliomů a taktéž glioblastomů (p-value = 0,014)

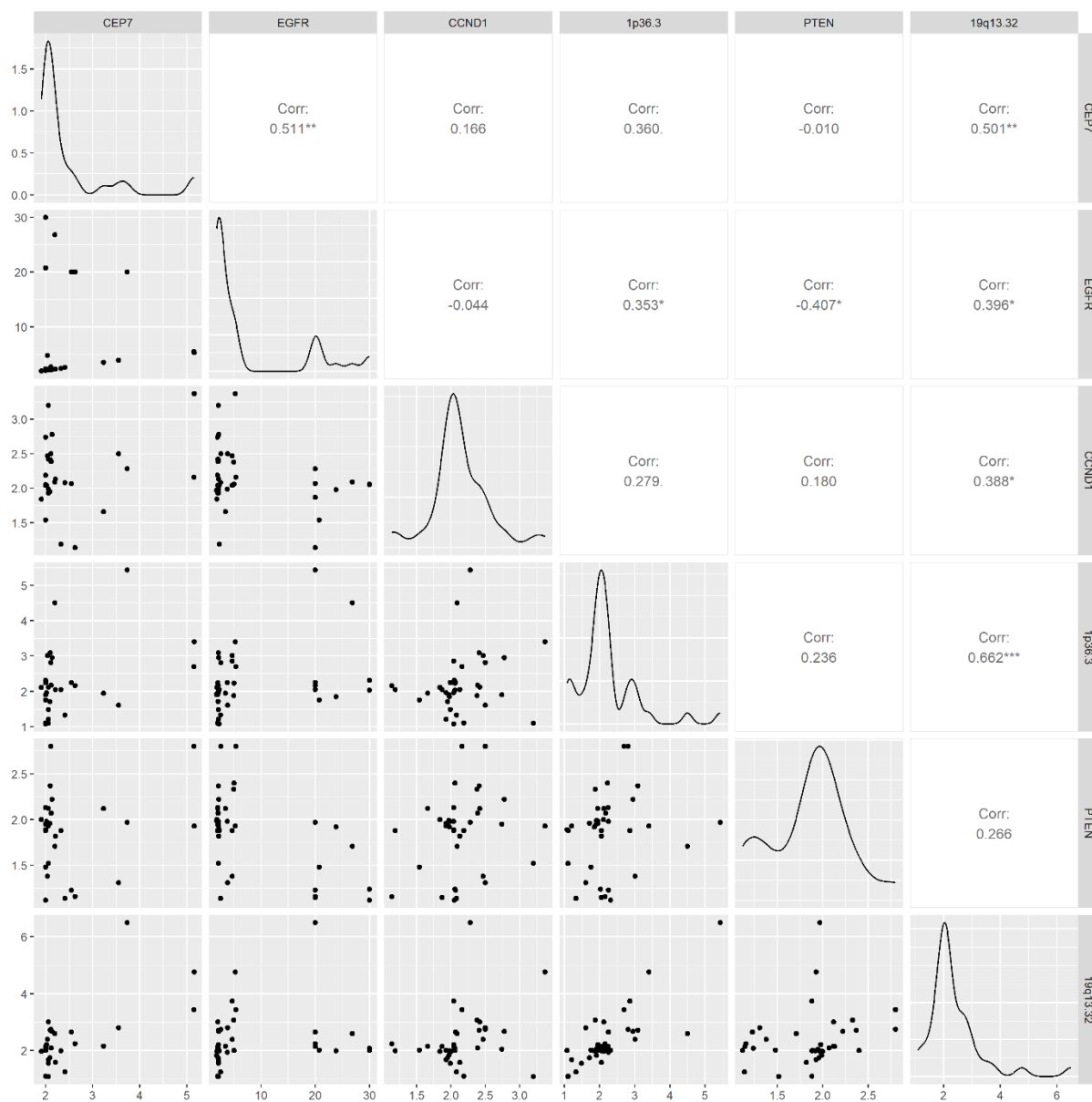


Graf 11: Zastoupení delece/amplifikace genu *CCND1* u jednotlivých typů gliálních nádorů



Graf 12: Zastoupení delece/amplifikace genu PTEN u jednotlivých typů gliálních nádorů

Pomocí korelační analýzy byla ověřena vzájemná korelace mezi sledovanými cytogenetickými změnami. Korelace byla nalezena mezi chromozomálními oblastmi 19q13.32 a 1p36.3 (viz graf 13), kde nabýval Spearmanův korelační koeficient nejvyšší hodnoty ($r=0,662$), přičemž tato hodnota byla vyhodnocena jako významně odlišná od nuly ($p<0,001$). U dalších sledovaných cytogenetických změn nebyla korelace prokázána.



Graf 13: Vyhodnocení vzájemné korelace mezi sledovanými geny

6 DISKUSE

Hlavní náplní experimentální části této práce bylo molekulárně-genetické hodnocení skupiny pacientů, u nichž byly diagnostikovány nádory centrální nervové soustavy. Soubor pacientů byl hodnocen dle několika kritérií, přičemž nejvýznamnější bylo kritérium hodnocení pomocí molekulárních markerů vyšetřovaných metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. Soubor pacientů byl popsán rovněž z hlediska epidemiologického, a to z pohledu hodnocení zastoupení jednotlivých typů nádorů a věkové distribuce.

Zkoumaný soubor tvořilo 39 pacientů, z toho 24 žen a 15 mužů. Vyšetřovány byly hlavní tři typy nádorů s následujícím zastoupením, glioblastom (20 vzorků), astrocytom (13 vzorků), oligodendrogliom (4 vzorky) a diagnózy, které nezapadaly do klasifikačních schémat této práce, označeny jako jiné (2 vzorky). Zjištěný medián věku pacientů v čase diagnózy byl celkově 52 let, přičemž nejmladší pacient byl diagnostikován v 7 letech a nejstarší pacient v 93 letech. Pro konkrétní diagnózy ze souboru pacientů byly zjištěny mediány věku, pro glioblastom 61 let, astrocytom 41 let, oligodendrogliom 58 let a jiné diagnózy 38,5 roku. Dle srovnání s obecnými epidemiologickými poznatky se věkový průměr a medián věku při stanovení diagnózy nejvíce přibližoval glioblastomům, kdy uváděný průměrný věk diagnózy je 65 let. Z hlediska četnosti zastoupení diagnóz byla nejčastěji vyzorována diagnóza glioblastomu, což odpovídá obecnému faktu, že glioblastomy jsou nejčastěji se vyskytujícími gliálními nádory (Pellerino, *et al.*, 2022).

Distribuce věku se výrazně lišila dle typu nádoru, což bylo potvrzeno pomocí Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu (viz graf 1 a 2). Největší věkové rozdíly u pacientů byly pozorovány u glioblastomů a astrocytomů, kdy u glioblastomu byl nejstarší pacient diagnostikován ve věku 93 let, naopak u astrocytárního nádoru to byl pacient ve věku 7 let.

Hlavní náplní práce bylo hodnocení molekulárních markerů charakteristických pro jednotlivé nádory metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. Pomocí hybridizačních sond navržených pro sledované geny a chromozomální úseky, byl odečten počet kopií jednotlivých genů/chromozomálních oblastí ve vzorcích tkání nádorů (FFPE). Hodnocena byla amplifikace/delece 6 genů/chromozomálních oblastí, konkrétně 19q13.32, 1p36.3, *CCND1*, *CEP7*, *EGFR* a *PTEN*.

Glioblastomy jsou na molekulární úrovni charakterizovány výraznými molekulárními změnami zahrnující genovou amplifikaci receptoru epidermálního růstového faktoru (*EGFR*) a ztrátou tumor supresorového genu *PTEN* (Sareen, *et al.*, 2022). Výsledky cytogenetické

analýzy sledovaného souboru pacientů odpovídaly v literatuře pospaným molekulárním charakteristikám. Amplifikace genu *EGFR* byla u glioblastomů u 84,2 % případů, amplifikace centromerické oblasti chromozomu 7 (CEP7), byla nalezena u 46,2 % glioblastomů. Delece tumor supresorového genu *PTEN* byla nalezena u 50 % glioblastomů. Nalezené aberace plně odpovídají změnám, které jsou u glioblastomů popsány v literatuře (Hatanpaa, *et al.*, 2010), (Kalita, *et al.*, 2021).

Astrocytární nádory od oligodendrogliálních nádorů na molekulární úrovni odděluje přítomnost či nepřítomnost kombinované delece chromozomálních ramen 1p a 19q, neboli kodelece 1p/19q (Tesileanu, *et al.*, 2022). Při hodnocení astrocytárních vzorků nádorů v této práci byla detekována kodelece 1p/19q u jednoho pacienta, což odpovídá obecným kritériím molekulárního hodnocení. Naopak zde byly pozorovány amplifikace těchto chromozomálních ramen (30-38 %) a amplifikace počtu kopií *CCND1* (23,1 %).

U oligodendrogliálních nádorů je nejvýnamnější markerem detekce kodelece 1p/19q (Wong, *et al.*, 2022). Na základě tohoto molekulárního rysu jsou oligodendrogliomy charakterizovány a odlišovány od ostatních typů gliálních nádorů (Hu N, *et al.*, 2016). Z výsledné analýzy vzorků oligodendrogliálních nádorů byla pozorována 100 % delece chromozomálních ramen 1p36.3 a 19q13.32. Byla zde také pozorována 50 % delece genu *PTEN*. Výsledky mohly být ovlivněny malým počtem zastoupených vzorků oligodendrogliomů (celkový počet 4), avšak přítomnost typické kodelece 1p/19q byla jasně prokazatelná. U chromozomálních oblastí 1p36.3 a 19q13.32 (viz graf 13), byla také pozorována vzájemná statistická korelace ($r=0,662$).

Kromě standardně vyšetřovaných glioblastomů, astrocytomů a oligodendrogliomů, klasifikovaných jako difúzní gliální nádory (David, *et al.*, 2023), byly ve vyšetřovaném souboru zahrnuty dva vzorky, které nezapadaly do klasifikačních kritérií této práce. Stěžejní a finální diagnostika nádorů je prováděna právě pomocí molekulárních technik (Molinaro, *et al.*, 2019), a v tomto případě, byly vzorky po histopatologickém posouzení zhodnoceny a vyloučeny na molekulární úrovni z klasifikačních kritérií pro gliální nádory. I přesto zde byla pozorována 50% amplifikace genu *EGFR* a chromozomální oblasti 19q13.32.

Molekulární charakteristika významně přispěla ke klasifikaci, a především charakterizaci jednotlivých nádorů. Poznatky molekulárních technik obohatily histopatologické popisy nádorů, které tvoří základ stanovení diagnózy. Role molekulární diagnostiky v klinické

praxi je nenahraditelná, a na základě přesnějších popisů a výsledků, které tyto metody zprostředkovávají, je určování diagnóz a prognózy pacienta rychlejší, přesnější a efektivnější.

7 ZÁVĚR

Molekulární a cytogenetické metody jsou významnou součástí při hodnocení převážně onkologických diagnóz v klinické praxi. Molekulární charakteristika ve velké míře napomáhá k zjištění přesné diagnózy a následné prognózy onemocnění, pro výběr vhodné léčby a predikci budoucího vývoje onemocnění. Gliální nádory jsou charakterizovány jako nejčastěji se vyskytující nádory centrální nervové soustavy s vysokou mortalitou. Skupinu difúzních gliomů dospělých pacientů zastupují tři hlavní typy tumorů, glioblastomy, oligodendrogliomy a astrocytomy, lišící se histopatologickým charakterem a molekulárním profilem.

Cílem této práce bylo zhodnotit soubor pacientů, u nichž byly diagnostikovány gliální nádory, a ověřit rozsah a souvislost molekulárních markerů (19q13.32, 1p36.3, *CCND1*, *CEP7*, *EGFR* a *PTEN*) charakteristických pro jednotlivé tumory. Výsledky metody fluorescenční *in situ* hybridizace potvrdily přítomnost delecí a amplifikací některých genů a chromozomálních oblastí u konkrétních nádorů. Na základě již existujících studií byly potvrzeny výsledky analýz experimentální části této práce.

Nejčastěji se vyskytujícím gliálním nádorem byl z hlediska zastoupení glioblastom, který je zároveň charakterizován jako nejzávažnější typ gliálního tumoru. Výsledky molekulární analýzy zároveň potvrdily výskyt amplifikace *EGFR* a delece tumor supresorového genu *PTEN*, jako dominující markery typické pro glioblastom. Medián věku pacientů s diagnostikovaným glioblastomem, byl také v souladu s obecnými epidemiologickými studiemi.

Přítomnost delece chromozomálních ramen 1p a 19q vytvořila základ pro nejnovější klasifikaci oligodendrogliálních nádorů. Zároveň je kodelece 1p/19q klíčovým znakem pro odlišení oligodendrogliomu a astrocytomy. U vyšetřovaných vzorků pacientů s diagnostikovaným oligodendrogliomem byla přítomnost delece chromozomálních oblastí 1p36.3 a 19q13.32 zjištěna u všech vzorků, čímž byl potvrzen i její signifikantní význam při klinickém rozhodování o tomto typu nádoru.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Alomar SA., (2010): Clinical manifestation of central nervous system tumor. *Seminars in diagnostic pathology* 27(2):97-104.

Amidei C., Kushner D.S. (2015): Clinical implications of motor deficits related to brain tumors. *Neurooncology practice* 2(4):179-184.

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW (2012): Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences* 9(3):193-9.

Brychtová S., a Hlobilková A. (2008): *Histopatologický atlas*. Garda, Praha.

Bush NA, Chang SM, Berger MS (2017): Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical review* 40(1):1-14.

Benitez JA, Finlay D, Castanza A, Parisian AD, Ma J, Longobardi C, Campos A, Vadla R, Izurieta A, Scerra G, Koga T, Long T, Chavez L, Mesirov JP, Vuori K, Furnari F. (2021): PTEN deficiency leads to proteasome addiction: a novel vulnerability in glioblastoma. *Neuro-oncology* 23(7):1072-1086.

Chamberlain MC, Born D. (2015): Prognostic significance of relative 1p/19q codeletion in oligodendroglial tumors. *Journal of neuro-oncology* 125(2):249-51.

Chai R, Fang S, Pang B, Liu Y, Wang Y, Zhang W, Jiang T. (2022): Molecular pathology and clinical implications of diffuse glioma. *Chinese medical journal* 135(24):2914-2925.

Cintrón-García J., Guddati K. A. (2020): Management of CNS toxicity of chemotherapy and targeted agents. *American journal of cancer research* 10(8): 2617–2620.

Colonna M, Butovsky O. (2017): Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual review of immunology* 26;35:441-468.

Coomans MB, van der Linden SD, Gehring K, Taphoorn MJB (2019): Treatment of cognitive deficits in brain tumour patients: current status and future directions. *Current opinion in oncology* 31(6):540-547.

Cormode DP, Naha PC, Fayad ZA (2014): Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. *Contrast media and molecular imaging* 9(1):37-52.

Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK (1997): The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular medicine* 3(1):5-20.

Gao H, Jiang X (2013): Progress on the diagnosis and evaluation of brain tumors. *Cancer Imaging* 13(4):466-81.

Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C (2020): IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British journal of cancer* 122(11):1580-1589.

Hasanau T, Pisarev E, Kisil O, Nonoguchi N, Le Calvez-Kelm F, Zvereva M (2022): Detection of *TERT* Promoter Mutations as a Prognostic Biomarker in Gliomas: Methodology, Prospects, and Advances. *Biomedicines* 10(3):728.

Hol EM, Pekny M. (2015): Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology* 32:121-30.

Huang LE. (2022): Impact of *CDKN2A/B* Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. *Biomedicines* 10(2):246.

Nan Hu, Rachel Richards, Randy Jensen (2016): Role of chromosomal 1p/19q co-deletion on the prognosis of oligodendrogliomas: A systematic review and meta-analysis. *Interdisciplinary Neurosurgery* 5:58-63.

Jessen KR (2004): Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(10):1861-7.

Junqueira, Luiz Carlos Uchoa, José Carneiro a Robert O. Kelley (1997): *Základy histologie*. H & H, Jinočany.

Kalita O, Sporikova Z, Hajduch M, Megova Houdova M, Slavkovsky R, Hrabalek L, Halaj M, Klementova Y, Dolezel M, Drabek J, Tuckova L, Ehrmann J Jr, Vrbkova J, Trojanec R, Vaverka M. (2021): The Influence of Gene Aberrations on Survival in Resected *IDH* Wildtype Glioblastoma Patients: A Single-Institution Study. *Current oncology* 28(2):1280-1293.

Kaur K (2022): Molecular Classification of Diffuse Gliomas. Central Nervous System Tumors. IntechOpen.

Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y (2019): Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. Cells 8(11):1424.

Levsky JM, Singer RH (2003): Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. Journal of cell science 116(Pt 14):2833-8.

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW (2021): The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro oncology 23(8):1231-1251.

Melhem JM, Detsky J, Lim-Fat MJ, Perry JR (2022): Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 19(6):1705-1723.

Miller JJ, Gonzalez Castro LN, McBrayer S, Weller M, Cloughesy T, Portnow J, Andronesi O, Barnholtz-Sloan JS, Baumert BG, Berger MS, Bi WL, Bindra R, Cahill DP, Chang SM, Costello JF, Horbinski C, Huang RY, Jenkins RB, Ligon KL, Mellinghoff IK, Nabors LB, Platten M, Reardon DA, Shi DD, Schiff D, Wick W, Yan H, von Deimling A, van den Bent M, Kaelin WG, Wen PY (2023): Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant gliomas: A Society for Neuro-Oncology (SNO) consensus review on diagnosis, management, and future directions. Neuro oncology 25(1):4-25.

Miller JJ. (2022): Targeting IDH-Mutant Glioma. Neurotherapeutics: the journal of the America Society for Experimental NeuroTherapeutics 19(6):1724-1732.

Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR (2019): Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. Nature reviews. Neurology 15(7):405-417.

Moreno-Bueno G, Rodríguez-Perales S, Sánchez-Estévez C, Hardisson D, Sarrió D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu X, Palacios J. (2003): Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. Oncogene 22(38):6115-8.

Náhlovský, J. (2006): Neurochirurgie. Galén, Praha.

Neuropathology. [online] [navštíveno 14.4. 2023] Dostupné z <https://neuropathology-web.org/agamanolis.html>

Nussbaum, Robert L., Roderick R. McCines a Huntington F. Willard. (2004): *Klinická genetika*. Triton, Praha.

O'Connor, C. (2008): Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1):171.

Olympios N, Gilard V, Marguet F, Clatot F, Di Fiore F, Fontanilles M. (2021): *TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review*. *Cancers (Basel)* 13(5):1147

Oprita A, Baloi SC, Staicu GA, Alexandru O, Tache DE, Danoiu S, Micu ES, Sevastre AS. (2021): Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma. *International journal of molecular sciences* 8;22(2):587

Ostrom QT, Francis SS, Barnholtz-Sloan JS. (2021): Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Current neurology neuroscience reports* 21(12):68.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. (2014): The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro oncology* 16(7):896-913.

PathologyOutlines [online] [navštíveno 14.4. 2023] Dostupné z <https://www.pathologyoutlines.com/topic/CNSTumorgliomasastrocytomasIDHmutant.html>

Pellerino, A., Caccese, M., Padovan, M., Cerretti, G., Lombardi, G. (2022): Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clinical and Translational Imaging* 10, 467–475.

Perry A, Schmidt RE. (2006): Cancer therapy-associated CNS neuropathology: an update and review of the literature. *Acta Neuropathologica* 111(3):197-212.

Pinkham MB, Telford N, Whitfield GA, Colaco RJ, O'Neill F, McBain CA (2015): FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clinical oncology: a journal of the Royal College of Radiologists (R Coll Radiol)* 27(8):445-53.

Pope B. W., Brandal G. (2018): Conventional and advanced magnetic resonance imaging in patients with high-grade glioma. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging* : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutical Chemistry and Biology 62(3): 239–253.

Powter B, Jeffreys SA, Sareen H, Cooper A, Brungs D, Po J, Roberts T, Koh ES, Scott KF, Sajinovic M, Vessey JY, de Souza P, Becker TM. (2021): Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 147(4):1007-1017.

Rapôso C, Vitorino-Araujo JL, Barreto N. (2021): Molecular Markers of Gliomas to Predict Treatment and Prognosis: Current State and Future Directions. Exon Publications Chapter 10.

Reuss DE. (2023): Updates on the WHO diagnosis of IDH-mutant glioma. *Journal of neuro-oncology*.

Ruichao Ch., Shengyu F., Bo P., Yuqing L., Yongzhi W., Wei Z., Tao J., Jinjiao L., Yuanyuan J. (2022): Molecular pathology and clinical implications of diffuse glioma. *Chinese Medical Journal* 2914-2925.

Sareen H, Ma Y, Becker TM, Roberts TL, de Souza P, Powter B. (2022): Molecular Biomarkers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences* 23(16):8835.

Sofroniew MV, Vinters HV. (2010): Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119(1):7-35.

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2005): Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(1):10-8.

Starkweather AR, Sherwood P, Lyon DE, McCain NL, Bovbjerg DH, Broaddus WC. (2011): A biobehavioral perspective on depressive symptoms in patients with cerebral astrocytoma. *The journal of neuroscience nursing: journal of the American Association of Neuroscience Nurses* 43(1):17-28.

Taal W, Bromberg JE, van den Bent MJ. (2015): Chemotherapy in glioma. *Central nervous system oncology* 4(3):179-92.

Tesileanu CMS, Vallentgoed WR, French PJ, van den Bent MJ. (2022): Molecular markers related to patient outcome in patients with IDH-mutant astrocytomas grade 2 to 4. A systematic review. *European Association for Cancer Research* 175:214-223.

Tork CA, Atkinson C. (2022): Oligodendroglioma. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Verkhatsky A, Ho MS, Zorec R, Parpura V. (2019): The Concept of Neuroglia. *Advances in experimental medicine and biology* 1175:1-13.

Villanueva-Meyer JE, Mabray MC, Cha S. (2017): Current Clinical Brain Tumor Imaging. *Neurosurgery* 81(3):397-415.

Wank M, Schilling D, Schmid TE, Meyer B, Gempt J, Barz M, Schlegel J, Liesche F, Kessel KA, Wiestler B, Bette S, Zimmer C, Combs SE. (2018): Human Glioma Migration and Infiltration Properties as a Target for Personalized Radiation Medicine. *Cancers (Basel)* 10(11):456.

Whitfield BT, Huse JT. (2022): Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology* 32(4):e13062.

Wong TT, Liang ML, Chen HH, Chang FC. (2011): Hydrocephalus with brain tumors in children. *Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 27(10):1723-34.

Wong D, Lee TH, Lum A, Tao VL, Yip S. (2022): Integrated proteomic analysis of low-grade gliomas reveals contributions of 1p-19q co-deletion to oligodendroglioma. *Acta neuropathologica communications* 10(1):70.

Han F, Hu R, Yang H, Liu J, Sui J, Xiang X, Wang F, Chu L, Song S. (2016): PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy* 9:3485-92.

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. (2010): Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia: an international journal for onkology research* 12(9):675-84.

Huang LE. (2022): Impact of *CDKN2A/B* Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. *Biomedicines* 10(2):246.

Yang J., Yin Y. (2020): PTEN in Chromatin Remodeling. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 10(2): a036160.

Zhang D., Dai D., Zhou M., Li Z., Wang Ch., Lu Y., Li Y., Wang J. (2018): Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cellular Physiology and Biochemistry* 51 (6): 2496–2508.

Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, He X, Du H, Cao L. (2017): Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncology letters* 14(1):512-516.