

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

**MARKERI MOLECULARI DE PREDICȚIE CLINICĂ ÎN EVALUAREA TERAPIEI LA
PACIENȚII CU GLIOBLASTOM**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF.UNIV.DR. ANGHEL RODICA

Student-doctorand:

BÎZU IONELA

2020

Cuprins

Introducere	4
I. PARTEA GENERALĂ	4
1 . Date epidemiologice și factori de risc în glioblastom	4
2. Aspecte histopatologice și moleculare în glioblastom.....	5
3.Tratament	5
4. Factori de prognostic	5
5. Stresul oxidativ în glioblastom	6
II.PARTEA SPECIALĂ-CONTRIBUȚII PERSONALE	6
6. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	6
7. Metodologia generală a cercetării	7
8. Analiza și identificarea factorilor de prognostic la pacienții cu glioblastom	8
8.1 Introducere	8
8.2 Pacienți și metode.....	8
8.3 Rezultate	9
8.3.1. Caracteristicile generale ale lotului de pacienți.....	9
8.3.2 Supraviețuirea fără semne de progresie și supraviețuirea generală în lotul de pacienți cu glioblastom.....	11
8.3.3 Stabilirea factorilor de prognostic pozitiv la pacienții cu glioblastom	12
8.3.4 Stabilirea unui scor prognostic.....	22
8.4 Discuții.....	24
9. Analiza parametrilor moleculari de stres oxidativ	27
9.1 Pacienți și metode.....	27
9.2 Rezultate	29
9.2.1 Caracteristicile lotului	29
9.2.2 Supraviețuirea fără semne de progresie și supraviețuirea generală în studiul prospectiv	30
9.2.3 Determinarea parametrilor de stres oxidativ	31
9.2.4 Evaluarea relațiilor dintre parametrii de stres oxidativ	32
9.2.5 Valorile parametrilor moleculari de stres oxidativ în funcție de statusul MGMT	36
9.2.6 Rolul speciilor reactive de oxigen în evaluarea răspunsului la tratament	39
9.3 Discuții.....	40

10. Concluzii și contribuții personale.....	41
Bibliografie selectivă	43

Introducere

Glioblastomul sau astrocitomul de grad IV este cea mai frecventă și agresivă formă de cancer cerebral primar la adulți, cu o supraviețuire mediană fără tratament de numai 3 luni.[1]

În ciuda intervenției terapeutice agresive, rata de recurență rămâne ridicată cu o supraviețuire mediană de 15 luni. [2,3] Prin urmare, prognosticul pacienților cu glioblastom este în continuare prost, chiar și cu utilizarea celor mai bune opțiuni de tratament disponibile astăzi. [4]

Din cauza frecvenței și severității lor, glioblastoamele reprezintă o problemă terapeutică majoră pentru neurochirurghi, oncologi și radioterapeuți.

Motivația alegerii acestei teme de cercetare provine din lipsa datelor cu privire la relația dintre caracteristicile clinice, moleculare ale glioblastomului și evoluția și prognosticul acestei boli în România.

Mai mult decât atât, inclusiv la nivel global, există încă multe necunoscute. Eforturile susținute în dezvoltarea de noi tehnici chirurgicale, tehnici de iradiere, descoperirea de noi terapii moleculare țintite, precum și progresele în imunoterapie nu au avut rezultatele așteptate în ceea ce privește îmbunătățirea evoluției clinice. Astfel, glioblastomul rămâne în continuare o provocare atât pentru echipele multidisciplinare care îngrijesc pacienții, cât și pentru echipele de cercetare, care caută în permanență noi soluții în abordarea acestei boli. Suntem încă departe de a avea o strategie terapeutică care să crească supraviețuirea și calitatea vieții pentru acești pacienți. [5-7]

I. PARTEA GENERALĂ

Prima parte a tezei de doctorat este structurată în cinci capitole în cadrul cărora se face o trecere în revistă a literaturii de specialitate dedicate temei studiate.

1 . Date epidemiologice și factori de risc în glioblastom

Primul capitol prezintă ultimele date epidemiologice și principalii factori de risc endogeni și exogeni. Conform celui mai recent raport ce prezintă datele pentru anii de diagnostic din perioada 2012-2016 și publicat în 2019, glioblastomul multiform (GBM) este a treia cea mai frecventă formă histopatologică raportată (14.6) după meningiom (37.6%) și tumorile hipofizare (16.8).

GBM este cea mai frecventă tumoră malignă primară, deoarece reprezintă 48.3% dintre acestea și 57.3% dintre toate gliomele.[8]

Deși este cea mai frecventă formă de neoplasm cerebral la adult , incidența în Europa și America de Nord este de 2-3 cazuri recent diagnosticate la 100 000 locuitori /an.[9]

Este mai frecvent la adulții în vârstă și mai puțin frecvent la copii, deoarece această tumoră reprezintă doar 3 % din totalul tumorilor cerebrale din grupul de populație 0-19 ani. Incidența glioblastomului crește odată cu vârsta, prezentând un vârf cuprins între 75 și 84 ani (rata de incidență anuală ajustată în funcție de vârstă, pentru această grupă este de 15.29 cazuri la 100 000).

Vârsta medie la diagnostic este de 65 de ani și ratele de supraviețuire scad odată cu vârsta.

GBM este de 1.58 ori mai frecvent la bărbați decât la femei , cu o incidență anuală ajustată în funcție de vârstă de 4 cazuri (95% CI, 3.96-4.05) la 100 000 în populația de sex masculin și 2.54 cazuri (95 % CI 2.51-2.67) la 100 000 în populația de sex feminin.[8]

2. Aspecte histopatologice și moleculare în glioblastom

În capitolul al doilea este prezentată ultima clasificare a glioblastomelor, tipurile, variantele și modelele histopatologice de glioblastom, precum și principalele modificări moleculare. Clasificarea actuală a OMS 2016, în afară de cele două entități GBM IDH wild type și GBM IDH mutant, recunoaște trei variante morfologice care se încadrează în grupul GBM IDH wild type: GBM cu celule gigante, gliosarcomul și GBM epitelioid. Există de asemenea, multe alte modele histologice, care nu sunt incluse ca variante în clasificarea actuală, cum ar fi : GBM cu celule mici, GBM cu componentă oligodendrogială și GBM cu componentă neuronală primitivă.[10]

MGMT este exprimat într-o mare varietate de tumori, incluzând tumori ale colonului [11], capului și gâtului [12], cancere ale plămânului [13] și gliome [14]. MGMT este studiat mai mult în acestea din urmă, având în vedere impactul mare al expresiei sale în supraviețuire. [15,16]

3.Tratament

Acest capitol constituie o trecere în revistă a metodelor terapeutice actuale (chirurgia, radioterapia și chimioterapia). În continuare sunt prezentate noile terapii țintite și imunoterapia, investigate în prezent în cercetarea medicală.

4. Factori de prognostic

Acest capitol face referire la principalii factori de prognostic care influențează evoluția clinică și supraviețuirea pacienților cu glioblastom.

5. Stresul oxidativ în glioblastom

Ultimul capitol oferă date legate de rolul moleculelor de stres oxidativ în dezvoltarea și rezistența acestei tumori la terapia multimodală.

II.PARTEA SPECIALĂ-CONTRIBUȚII PERSONALE

6. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

GBM este cea mai frecventă tumoră cerebrală și se caracterizează prin agresivitate excepțională și rată ridicată de morbiditate și mortalitate.[17]

În prezent, tratamentul standard al GBM este un tratament multimodal care se bazează pe rezecția extinsă a tumorii și tratament adjuvant constând în asocierea chimioterapiei (TMZ) cu radioterapia, urmate de monoterapia cu temozolomidum (TMZ). În ciuda acestui tratament standardizat, pacienții cu GBM prezintă răspuns și evoluție clinică diferite. Astfel, trebuie să existe factori care să ducă la acest comportament diferit. Prin urmare, este de dorit să existe instrumente sau metode care să poată clasifica acești pacienți în subgrupuri prognostice pe baza acestor caracteristici , astfel încât să ajute clinicianul să administreze tratamentul optim pentru fiecare pacient în parte.

Obiectivele studiului

Obiective principale:

1. Identificarea unor factori clinici de prognostic și a unor markeri moleculari de evaluare a evoluției bolii (determinată prin supraviețuirea fără semne de progresie, supraviețuirea generală) și de monitorizare a eficienței radiochimioterapiei.

2. Stabilirea unui scor prognostic care să orienteze echipa multidisciplinară în practica clinică curentă în stabilirea și monitorizarea tratamentului optim.

Obiectivele secundare:

- 1.Evaluarea rezultatului tratamentului multimodal la pacienții cu GBM

- 2.Analiza beneficiilor diferitelor combinații de tratament la pacienții cu GBM recurent.

7. Metodologia generală a cercetării

Pentru atingerea obiectivelor am realizat doua studii observaționale nerandomizate , unul retrospectiv și unul prospectiv, în cadrul Spitalului Oncofort și Institutului Oncologic “Alexandru Trestioreanu” București.

Toți pacienții înrolați au urmat tratament multimodal constând în intervenție chirurgicală, radiochimioterapie cu TMZ și chimioterapie adjuvantă cu TMZ.

Data intervenției chirurgicale a fost luată ca referință inițială pentru a cuantifica toate urmărirea și pentru a caracteriza timpii de recidivă, progresie și deces.

Supraviețuirea fără semne de progresie -PFS (luni) - intervalul de timp de la intervenția chirurgicală până la confirmarea radiologică a progresiei tumorii sau decesul survenit din orice cauză.

Supraviețuirea generală- OS(luni)- intervalul de timp de la intervenția chirurgicală până la ultima consultație, deces din orice cauză sau pierderea urmăririi.

Supraviețuirea post-progresie (luni) - intervalul de timp de la data confirmării radiologice a progresiei, până la ultima consultație, deces din orice cauză sau pierderea urmăririi.

În momentul internării pentru tratamentul oncologic, toți pacienții au fost evaluați clinic, neurologic și biologic, iar pe parcursul tratamentului au fost monitorizați săptămânal sau la nevoie. Pentru evaluarea stării clinice generale a pacientului s-a folosit indicele Karnofsky.

Parametrii clinici, neuro-imagistici și patologici au fost colectați din foile de observație și incluși într-o bază de date, în vederea efectuării analizelor statistice. În imaginile preoperatorii, RMN sau CT, localizarea anatomică a leziunii a fost verificată și catalogată după cum urmează: localizare lobară, localizare centrală medială (ganglionii bazali) și leziuni multiple. Când tumora s-a întins în mai mulți lobi, s-a ales întotdeauna lobul cel mai afectat. Lateralitatea leziunii a fost definită: dreapta, stânga, medială și leziuni multiple. Pentru descrierea dimensiunii tumorii, s-a folosit diametrul cel mai mare al leziunii.

Analiza statistică

Centralizarea și analiza statistică a datelor colectate au fost efectuate prin utilizarea softului IBM SPSS versiunea 20 și programului Microsoft Office (Excel).

În primul rând, a fost efectuată o analiză descriptivă a variabilelor înregistrate. Analiza variabilelor calitative a fost exprimată în procente, iar cea a variabilelor cantitative s-a făcut sub

formă de indicatori de tendință centrală (medii, mediane) și dispersie (deviația standard, interval de încredere, valorile minim-maxim). Variabilele cantitative au fost analizate utilizând testul t-Student pentru datele parametrice și testul Mann Whitney U pentru datele non-parametrice.

Calculând coeficientul de corelație al lui Pearson (r) am căutat corelația dintre două variabile cantitative.

Curbele de supraviețuire au fost generate prin metoda Kaplan-Meier și ulterior, comparațiile între grupuri au fost efectuate cu teste log-rank.

O valoare $p \leq 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic.

Pentru stabilirea valorii cut-off, precum și pentru evaluarea acurateții și validarea unui model de test clinic a fost calculată aria de sub curba ROC (Receiver Operating Characteristic). Aria de sub curbă (AUC) reflectă cât de bun este testul. Astfel, cu cât AUC este mai mare și se apropie de 1 cu atât este mai bun testul. Un test cu o suprafață mai mare de 0.9 are o precizie ridicată, în timp ce 0.7-0.9 indică o precizie moderată, 0.5-0.7 precizie scăzută și 0.5 un rezultat întâmplător.

8. Analiza și identificarea factorilor de prognostic la pacienții cu glioblastom

8.1 Introducere

Scopul studiului a fost să analizeze și să identifice factorii de prognostic clinici, terapeutici și moleculari la pacienții cu glioblastom care au urmat tratament multimodal, precum și impactul acestora asupra evoluției bolii determinat prin supraviețuirea generală și supraviețuirea fără semne de progresie.

8.2 Pacienți și metode

Pentru realizarea acestui prim studiu am analizat retrospectiv datele a 68 de pacienți cu diagnosticul de GBM, tratați la Spitalul Clinic Oncofort, în perioada ianuarie 2015 - octombrie 2019, care au îndeplinit următoarele criterii de includere și niciunul dintre criteriile de excludere.

Criterii de includere

- pacienți biopsiați sau operați, parțial sau total și confirmați prin examen histopatologic
- vârsta ≥ 18 ani
- statusul de performanță Karnofsky ≥ 60

- pacienți care au primit radiochimioterapie și care au semnat consimțământul informat

- pacienți cu valori adecvate ale hemogramei și ale parametrilor biochimici sanguini

- pacienți care au primit tratament pentru boală recurentă

Criterii de excludere

- vârsta < 18 ani

- pacienți cu valori inadecvate ale hemogramei și ale parametrilor biochimici sanguini

- statusul de performanță Karnofsky < 60

- lipsa urmăririi pe termen mediu și lung

- istoric personal de iradiere cerebrală

- pacienții care au refuzat tratamentul cu radiochimioterapie

8.3 Rezultate

8.3.1. Caracteristicile generale ale lotului de pacienți

În grupul nostru de pacienți 60 au fost supuși unei intervenții chirurgicale de rezecție. În 17(25%) dintre cazuri, au fost efectuate rezecții totale și 43(63.2%) rezecții parțiale. În 8 cazuri s-a efectuat doar biopsie. Caracteristicile generale ale lotului de pacienți din studiul retrospectiv sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 8.1: Caracteristicile pacienților cu glioblastom din lotul retrospectiv

Caracteristicile pacienților	Număr pacienți=68
Sex	N(%)
Bărbați	41(60.3%)
Femei	27(39.7%)
Vârsta(medie ± deviație standard)	55.95 ± 12.05 ani
Mediu	N(%)
Urban	55(80.9)
Rural	13(19.1)

Statusul de performanță Karnofsky	N(%)
KPS 100	21(30.9%)
KPS 90	16(23.5%)
KPS 80	9(13.2%)
KPS 70	13(19.2%)
KPS 60	9(13.2%)
KPS(medie ± deviație standard)	83.97 ± 14.36
Localizarea în lobii cerebrali	N(%)
Frontal	28(41.2%)
Temporal	25(36.8%)
Parietal	11(16.2%)
Occipital	2(2.9%)
Ganglioni bazali	2(2.9%)
Localizarea tumorii	N(%)
Emisfera dreaptă	37(54.4%)
Emisfera stângă	25(36.8%)
Localizare medială	2(2.9%)
Leziuni multiple	4(5.9%)
Dimensiunea tumorii (medie ± deviație standard), (cm)	4.82 ± 1.28
Tipul histopatologic	N(%)
Glioblastom clasic	56(82.4%)
Glioblastom cu celulă gigantă	5(7.4%)
Glioblastom cu celulă mică	3(4.4%)
Gliosarcom	3(4.4%)
Glioblastom cu componentă neuronală primitivă	1(1.5%)

8.3.2 Supraviețuirea fără semne de progresie și supraviețuirea generală în lotul de pacienți cu glioblastom

Pacienții din studiu au avut o urmărire mediană de 14 luni (interval 3-34). Pentru întregul lot de pacienți, valorile mediane ale supraviețuirii generale (OS), supraviețuirii fără semne de progresie (PFS) și ale supraviețuirii post progresie (PPS) au fost de 16 luni [95%CI:14.46-17.53], 4 luni [95% CI:1.98-6.02], respectiv 8 luni [95 % CI: 5.58-10.41].

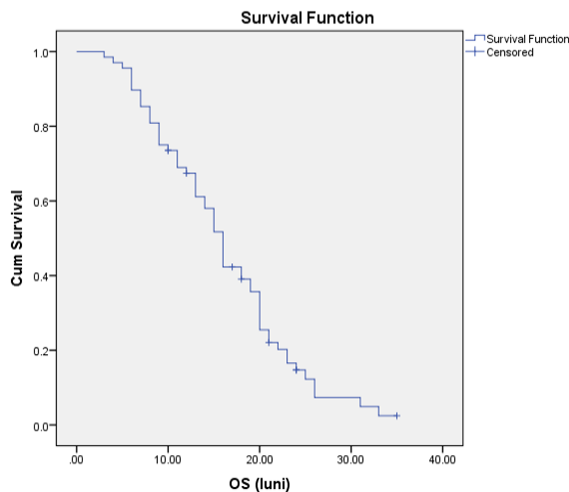


Figura 8.1: Supraviețuirea generală a întregului lot de pacienți cu glioblastom reprezentată prin curba Kaplan-Meier

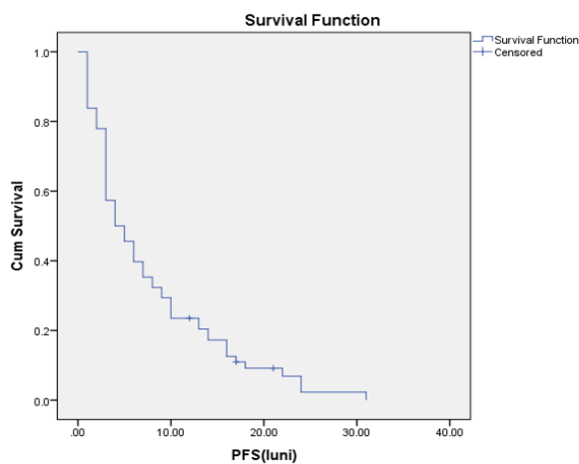


Figura 8.2: Supraviețuirea fără semne de progresie a întregului lot de pacienți cu glioblastom reprezentată prin curba Kaplan Meier

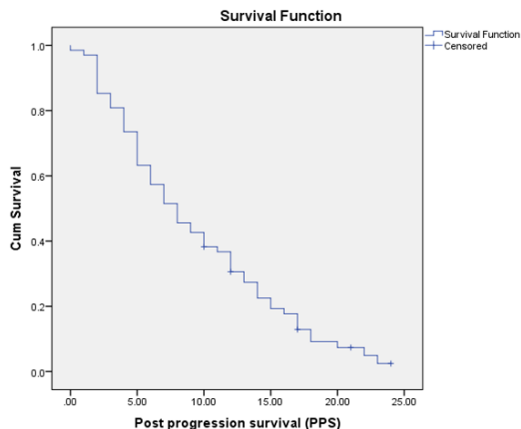


Figura 8.3: Supraviețuirea post progresie a întregului lot de pacienți cu glioblastom exprimată prin curba Kaplan Meier

8.3.3 Stabilirea factorilor de prognostic pozitiv la pacienții cu glioblastom

Este cunoscut că în ciuda tratamentului agresiv, prognosticul pacienților cu GBM este rezervat. Având în vedere acest lucru, am încercat să identificăm anumiți factori de prognostic, care pot influența pozitiv supraviețuirea. Astfel, factorii de prognostic analizați au fost: clinici (vârsta, sex, KPS), radiologici (localizarea și dimensiunea tumorii), histopatologici și moleculari (tipul histopatologic, Ki67, IDH, MGMT), terapeutici (gradul de rezecție și reintervenția chirurgicală, reiradierea)

Factorii clinici

Vârsta

Pentru a evalua influența vârstei în eșantionul nostru, pacienții au fost împărțiți în două subgrupuri. Primul se referă la pacienții tineri, cu vârsta sub 60 de ani (38), iar cel de-al doilea cuprinde pacienții vârstnici, cu vârsta peste 60 de ani (30). Supraviețuirea mediană estimată pentru pacienții tineri sub 60 de ani a fost de 20 de luni (95%CI:17.31-22.68) semnificativ mai mare în comparație cu pacienții vârstnici (13 luni , 95 %CI:10.08-15.91; log-rank test; $p=0.001$). Analiza datelor a arătat că din punct de vedere al PFS nu există diferență semnificativă statistic între cele două subgrupuri de pacienți (valoarea mediană a PFS pentru primul subgrup este de 6 luni vs.3 luni pentru subgrupul al doilea; log-rank test, $p=0.120$).

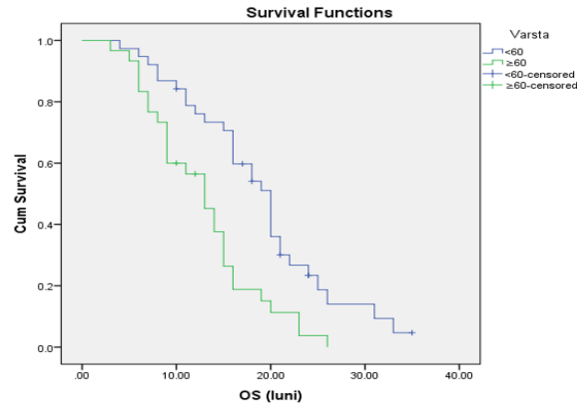


Figura 8.4: Supraviețuirea generală exprimată prin curba de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de vârstă

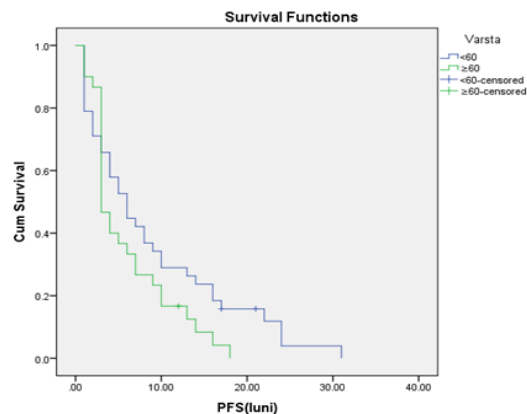


Figura 8.5: Supraviețuirea fără semne de progresie exprimată prin curba de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de vârstă

Statusul de performanță Karnofsky

În studiul nostru a fost luat în considerare KPS postoperator evaluat la momentul inițierii tratamentului adjuvant.

S-a constatat de asemenea o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește supraviețuirea generală și supraviețuirea fără progresie de boala între pacienții cu un KPS ≥ 80 la momentul inițierii tratamentului adjuvant și cei cu KPS < 80 (log rank test; $p=0.0001$). Astfel, pacienții cu status de performanță ≥ 80 au avut o supraviețuire generală estimată de 19 luni (95% CI: 16.29-21.70) vs. 8 luni la pacienții cu status de performanță < 80 (95% CI: 6.69-9.30). Supraviețuirea fără progresie de boală estimată în cazul pacienților cu status de performanță ≥ 80 ,

a fost de 8 luni(95% CI: 4.68-11.32) vs. 3 luni în cazul pacienților cu status de performanță <80 (95% CI: 2.59-3.40).

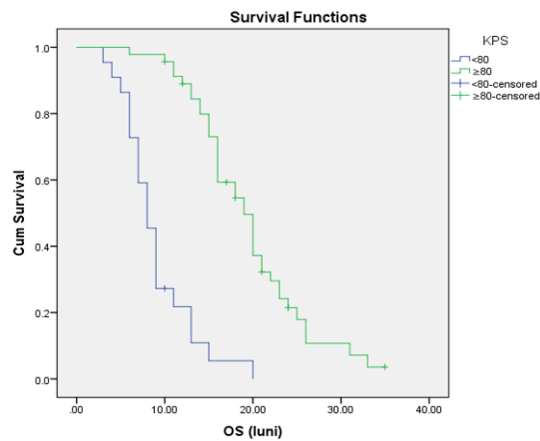


Figura 8.6: Supraviețuirea generală în funcție de statusul de performanța Karnofsky

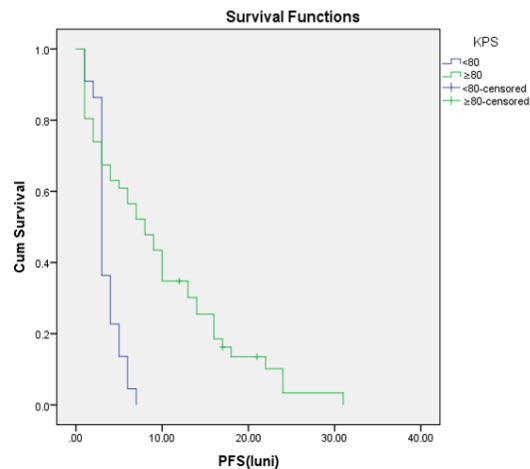


Figura 8.7: Supraviețuirea fără semne de progresie în funcție de statusul de performanță Karnofsky

Sexul

În ceea ce privește supraviețuirea fără progresie de boală și supraviețuirea generală, deși femeile au avut valori mediane mai mari (6 luni vs 3 luni ; 19 luni vs 15 luni) comparativ cu bărbații, aceste diferențe nu au fost semnificative statistic (log rank test; $p=0.146$; $p=0.150$).

Factorii radiologici

În această parte au fost evaluați doi parametri : localizarea și dimensiunea tumorii.

Localizarea tumorii

Localizarea tumorii, în funcție de lobul afectat, nu a influențat în mod semnificativ supraviețuirea generală (log rank test: $p=0.061$) și nici supraviețuirea fără progresie de boală (log rank test $p=0.063$).

De asemenea, lateralitatea tumorii nu a influențat supraviețuirea generală (log rank test $p=0.204$) și nici supraviețuirea fără progresie (log rank test $p=0.337$).

Când leziunea a fost localizată în emisfera cerebrală, supraviețuirea mediană a fost de 16 luni, comparativ cu 10 luni atunci când leziunea a fost localizată în ganglionii bazali/leziuni multiple, fără a fi semnificativă statistic (log rank test $p=0.057$). În mod similar, pacienții cu tumora localizată în emisfera cerebrală au avut o valoare mediană a supraviețuirii fără progresie de boală mai mare decât pacienții cu localizarea tumorii în ganglionii bazali/leziuni multiple (5 vs. 3 luni), dar nu au atins semnificația statistică (log rank test $p=0.159$).

Dimensiunea tumorii

În lotul nostru de studiu, a existat un avantaj semnificativ în ceea ce privește supraviețuirea generală și supraviețuirea fără progresie de boală pentru pacienții care au prezentat pe CT/RMN preoperator tumori cu dimensiuni mai mici de 4 cm. Astfel, pacienții cu tumori <4 cm au avut o supraviețuire generală mediană de 20 de luni (95% CI: 16.18-23.81) în comparație cu 15 luni, la pacienții cu tumori ≥ 4 cm (95% CI:12.82-17.17; log rank test: $p=0.019$). În mod similar, pacienții cu tumori < 4 cm au avut valoarea mediană a supraviețuirii fără progresie de boală de 10 luni (95% CI: 7.18-12.81), față de 3 luni pentru pacienții care au avut tumori pe CT/RMN preoperator ≥ 4 cm (95% CI: 2.14-3.85; log rank test $p=0.009$).

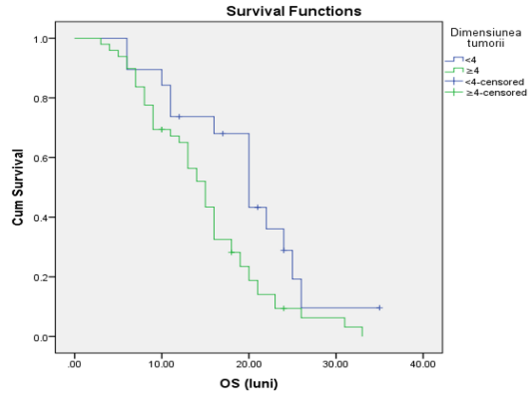


Figura 8.8: Supraviețuirea generală în funcție de dimensiunea tumorii

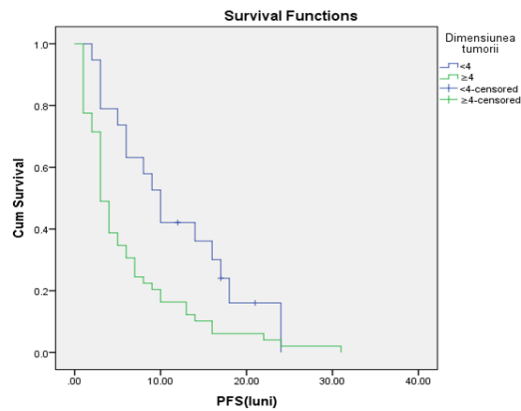


Figura 8.9: Supraviețuirea fără semne de progresie în funcție de dimensiunea tumorii

Factorii histopatologici și moleculari

Tipul histologic

Atât supraviețuirea generală (log rank test, $p=0.81$), cât și supraviețuirea fără semne de progresie (log rank test, $p=0.22$) nu au fost influențate semnificativ de către tipul histologic de GBM.

Ki 67

Este un indicator al proliferării celulare. Din cei 68 de pacienți, 48 au avut determinat indicele de proliferare Ki67. Acesta a avut o medie de 25.81% (interval 7-50%) și o valoare mediană de 25%. Folosind mediana sa ca valoare cut-off, pacienții din studiu au fost împărțiți în două grupuri, $Ki67 \leq 25\%$ și $Ki67 > 25\%$. Între cele două grupuri nu au existat diferențe

semnificative statistic în ceea ce privește supraviețuirea generală (log rank test, $p=0.77$) și supraviețuirea fără progresie de boală (log rank test, $p=0.49$).

Factorii moleculari

Dintre factorii moleculari cu implicații clinice, cei mai studiați sunt IDH și MGMT.

În prezent, sunt disponibile diferite metode pentru a determina statusul MGMT și starea mutației IDH. În lotul de studiu cei doi factori moleculari au fost evaluați prin imunohistochimie și tehnici de biologie moleculară. Astfel, 35 (51.47%) de pacienți au avut evaluări IDH și MGMT prin imunohistochimie iar prin tehnici moleculare 19 (27.94%) au avut determinare IDH și 21 (30.88%) MGMT.

În grupul pacienților cu determinare imunohistochimică a statusului IDH, mediana supraviețuirii generale a fost de 19 luni, la pacienții cu IDH pozitiv (95% CI: 11.98-26.01) vs. 16 luni la pacienții cu IDH negativ (95% CI: 13.67-18.32), iar mediana supraviețuirii generale pentru MGMT pozitiv a fost de 18 luni (95% CI: 13.71-22.28) vs. 13 luni la cei cu MGMT negativ (95% CI: 7.45-18.54), fără a atinge însă semnificația statistică pentru ambii factori moleculari (log rank test, $p=0.37$, respectiv $p=0.11$).

Valoarea mediană a supraviețuirii fără progresie de boală la pacienții cu IDH pozitiv determinat imunohistochimic nu a fost atinsă vs. 6 luni pentru pacienții cu IDH negativ, iar în cazul MGMT pozitiv a fost de 10 luni vs. mediana nu a fost atinsă la cei cu MGMT negativ (pentru cei doi factori moleculari determinați imunohistochimic, semnificația statistică nu a fost atinsă: log rank test $p=0.20$, respectiv $p=0.34$).

În grupul pacienților în care IDH și MGMT au fost determinați prin teste moleculare s-au obținut următoarele rezultate: supraviețuirea generală mediană nu a fost atinsă pentru pacienții cu IDH mutant, comparativ cu 16 luni pentru pacienții cu IDH wild type, fără a atinge însă semnificația statistică (log rank test, $p=0.195$), iar în cazul MGMT metilat a existat un avantaj în ceea ce privește supraviețuirea generală, $p=0.045$ (24 luni, 95% CI: 18.3-29.7 vs. 19 luni, 95% CI: 9.6-28.39 pentru cei cu MGMT nemetilat).

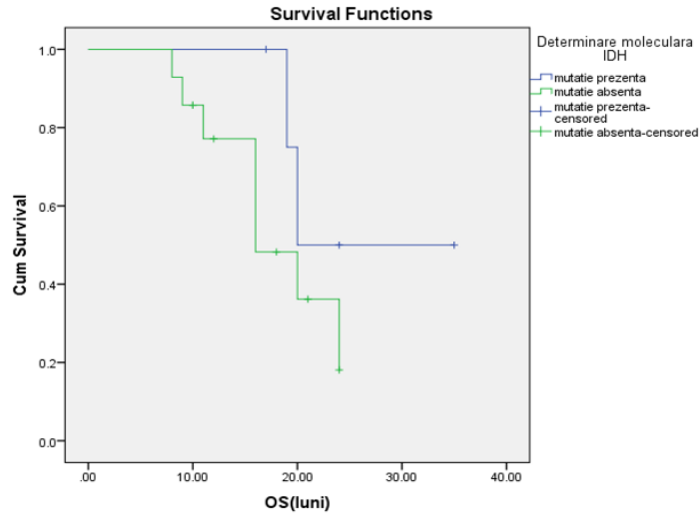


Figura 8.10: Supraviețuirea generală în funcție de IDH

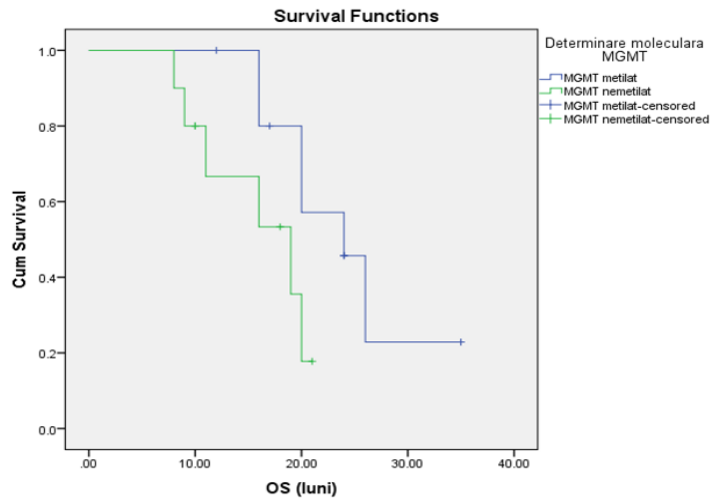


Figura 8.11: Supraviețuirea generală în funcție de MGMT

Mediana supraviețuirii fără progresie de boală, la pacienții cu IDH mutant a fost de 22 luni vs. 6 luni la cei cu IDH wild type (log rank test, $p=0.027$), iar la pacienții cu MGMT metilat a fost de 14 luni vs. 6 luni la cei cu MGMT nemetilat (log rank test, $p=0.113$).

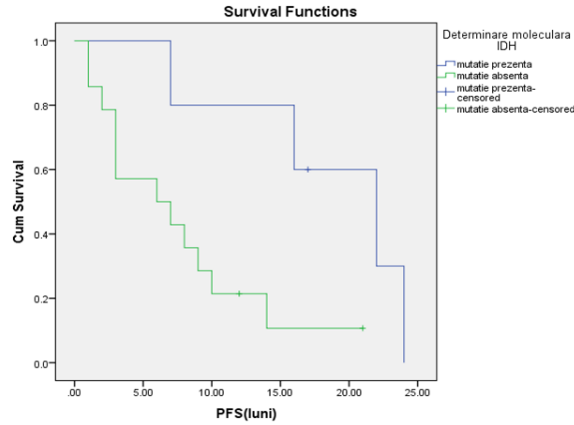


Figura 8.12: Supraviețuirea fără semne de progresie în funcție de IDH

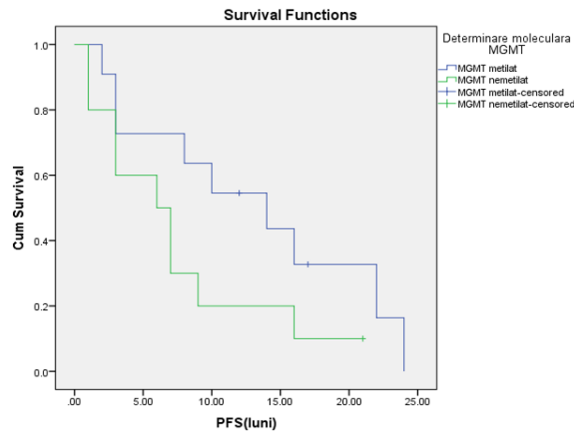


Figura 8.13: Supraviețuirea fără semne de progresie în funcție de MGMT

Factorii terapeutici

Gradul de rezecție tumorală

A fost cel mai important factor de prognostic în lotul nostru și a avut un efect semnificativ statistic în supraviețuirea generală și supraviețuirea fără progresie. Supraviețuirea generală mediană după rezecția totală a fost de 20 de luni (95% CI: 8.13-31.86), la cei cu rezecție parțială a fost de 15 luni(95% CI:13.16-16.83), iar la cei la care intervenția chirurgicală nu a putut fi efectuată și s-a făcut doar biopsie pentru stabilirea diagnosticului a fost de 9 luni (95% CI: 7.65-10.34), log rank test $p=0.001$. Pacienții din grupurile care au primit rezecție totală și rezecție parțială au avut o supraviețuire generală semnificativ mai mare decât grupul în care s-a efectuat

doar biopsie (log rank test, $p=0.002$ și respectiv $p=0.027$). De asemenea, a existat o diferență semnificativă statistic și între grupurile rezecție totală vs. rezecție parțială (log rank test, $p=0.008$).

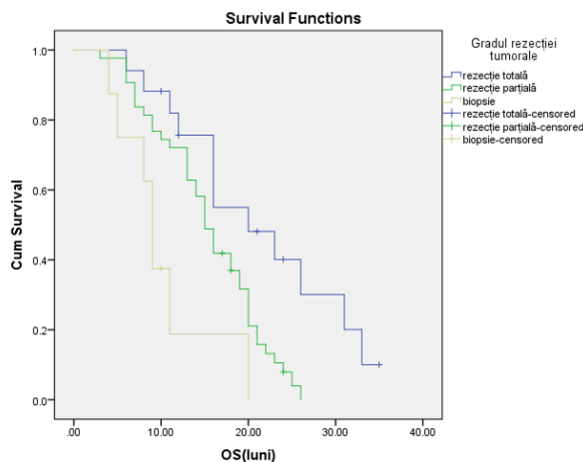


Figura 8.14: Supraviețuirea generală în funcție de gradul rezecției tumorale

În ceea ce privește valoarea mediană a supraviețuirii fără progresie de boală, aceasta a fost de 13 luni pentru pacienții cu rezecție totală (95%CI: 5.45-20.54), 4 luni pentru pacienții cu rezecție parțială (95%CIȘ 2.93-5.06) și de 3 luni pentru pacienții cu biopsie (95% CI: 2.32-3.67), log rank test, $p=0.001$.

Între grupul pacienților cu rezecție totală și al celor cu rezecție parțială / biopsie a existat o diferență semnificativă statistic (log rank test, $p=0.02$, respectiv $p=0.001$). În schimb, între grupurile pacienților cu rezecție subtotală și biopsie nu s-a înregistrat diferență semnificativă statistic (log rank test, $p=0.17$).

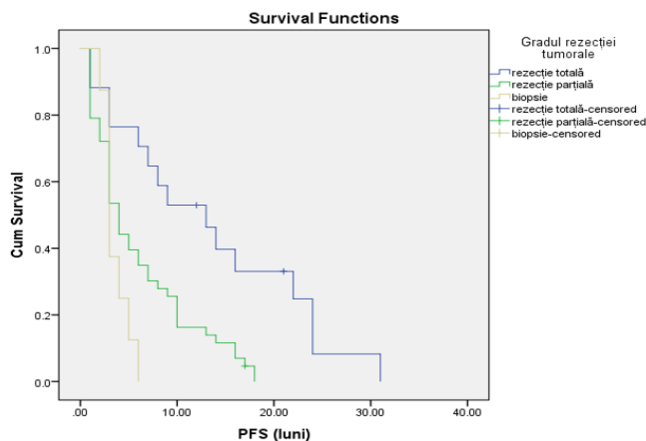


Figura 8.15: Supraviețuirea fără semne de progresie în funcție de gradul rezecției

Reintervenția chirurgicală

Pacienții care au suferit o intervenție chirurgicală pentru recidiva/progresia bolii au avut o supraviețuire mediană de 18 luni (95% CI: 14.92-21.07), în timp ce pacienții care nu au fost supuși unei noi intervenții chirurgicale au avut 15 luni (95% CI: 12.49-17.50), fără a atinge pragul semnificativ statistic (log rank test, $p=0.068$)

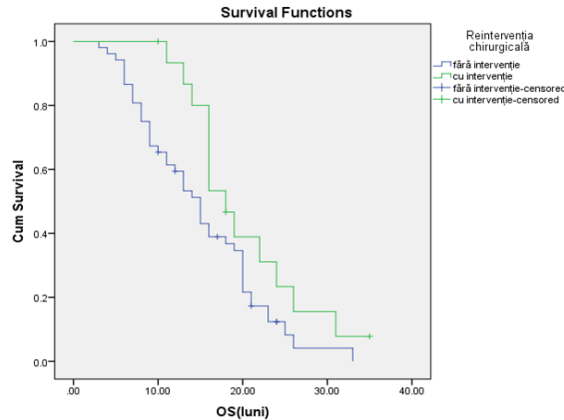


Figura 8.16: Supraviețuirea generală în funcție de reintervenția chirurgicală

Reiradierea

În subgrupul de pacienți care au fost reiradiați pentru apariția recidivei/progresiei, mediana supraviețuirii a fost de 23 de luni (95% CI:20.37-25.63) vs. 15 luni (95% CI: 13.14-16.86) pentru pacienții care nu au primit radioterapie pentru recidivă/progresie, fără a atinge semnificația statistică (log rank test, $p=0.051$).

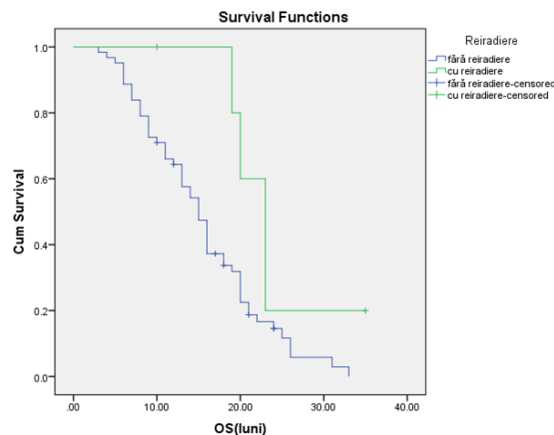
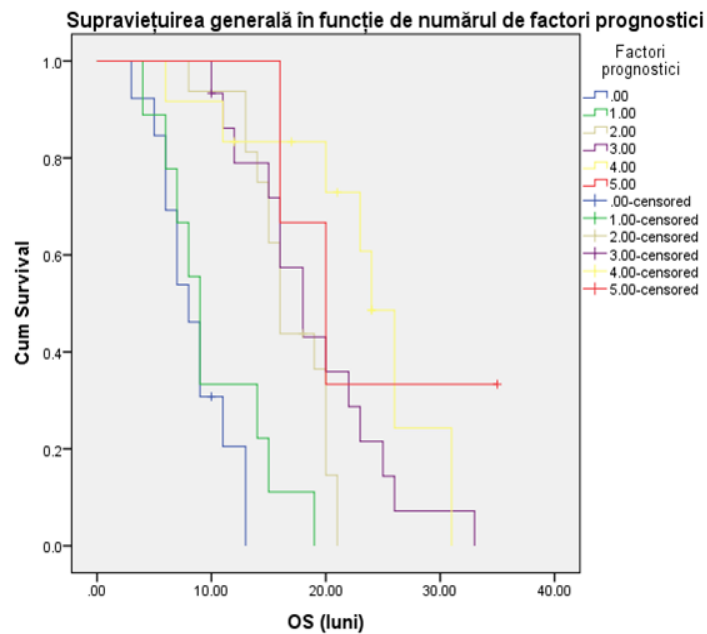


Figura 8.17:Supraviețuirea generală în funcție de reiradiere

8.3.4 Stabilirea unui scor prognostic

În urma analizei statistice detaliate, prezentată anterior am identificat 5 factori prognostici: vârsta < 60, KPS postoperator ≥ 80 , rezecția chirurgicală totală, dimensiunea tumorii < 4 cm, MGMT metilat. Aceștia au alcătuit scorul prognostic. Se constată că prin adăugarea fiecărui factor de prognostic pozitiv crește semnificativ statistic OS ($p=0.0001$) și PFS ($p=0.0001$).

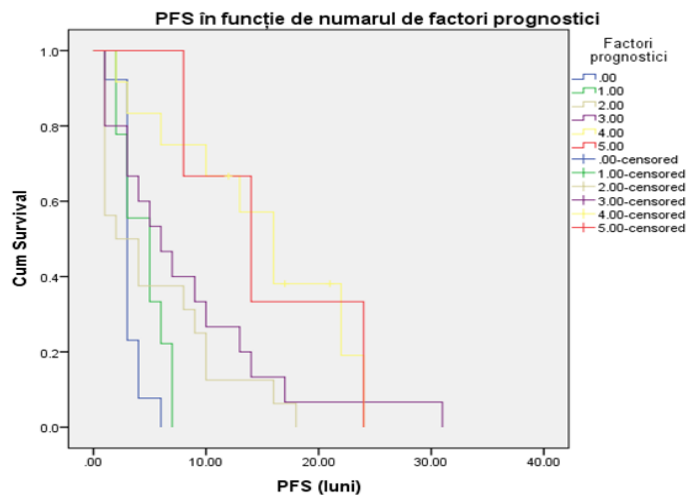


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	57.384	5	.000

Test of equality of survival distributions for the different levels of scor.

Figura 8.18: Supraviețuirea generală în funcție de scorul prognostic



Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	23.533	5	.000

Test of equality of survival distributions for the different levels of scor.

Figura 8.19: Supraviețuirea fara semne de progresie în funcție de scorul prognostic

Analiza curbelor ROC arată că scorul prognostic are o arie de sub curbă de 0.759, $p=0.013$, 95% CI: 0.569-0.949 pentru estimarea supraviețuirii generale și o arie de sub curbă de 0.885, $p=0.025$, 95% CI: 0.800-0.969 pentru estimarea supraviețuirii fără semne de progresie.

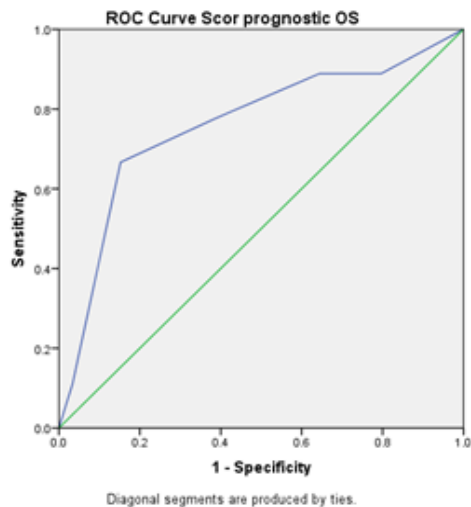


Figura 8.50: Curba ROC pentru determinarea sensibilității și specificității scorului prognostic pentru OS

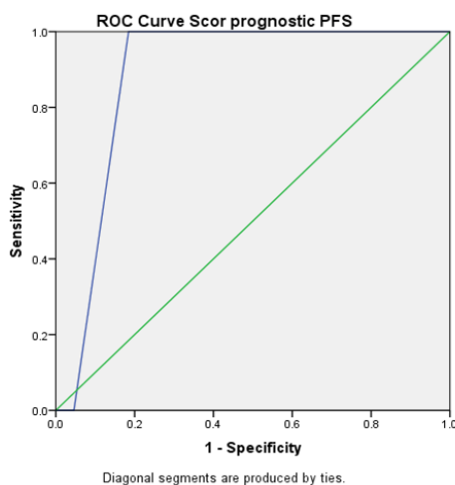


Figura 8.51: Curba ROC pentru determinarea sensibilității și specificității scorului prognostic pentru PFS

8.4 Discuții

Glioblastoamele sunt tumorii difuz infiltrative, în consecință, rezecția chirurgicală curativă este rareori posibilă.[18]

Există unele diferențe între datele noastre și cele descrise în studiile clinice, în ceea ce privește raportul dintre rezecțiile complete și rezecțiile parțiale. În studiul nostru, acest raport a fost de 25/63.2% vs. 39/44% din literatura de specialitate.[2]

Absența tehnicilor neurochirurgicale și imagistice intraoperatorii moderne în unele centre de specialitate din țara noastră ar putea fi cauza ratei de rezecție completă mai mici în România, comparativ cu cele raportate în literatură. De asemenea, raportul diferit se poate datora definiției diferite a gradului de rezecție chirurgicală dintre seriile raportate.

Radioterapia adjuvantă postoperatorie este un element principal în tratamentul pacienților cu glioblastom. Aduagarea RT la intervenția chirurgicală a îmbunătățit supraviețuirea de la 4-5 luni la 9-12 luni.[19]

În prezent, se recomandă radiochimioterapia concomitentă, urmată de chimioterapia adjuvantă cu TMZ. [2] Tratamentul multimodal poate întârzia progresia tumorii, cu toate acestea, rata de recurență este inacceptabil de mare, supraviețuirea mediană nu depășește 15-16 luni, iar supraviețuirea pe termen lung este excepțională. [2,3] În studiul de față, supraviețuirea fără semne de progresie a fost de 4 luni iar supraviețuirea generală a fost de 16 luni.

În glioblastom diferiți factori legați de pacient, tumoră și tratament afectează rezultatul. Prin urmare, este important să se analizeze impactul acestor factori (vârsta, statusul de performanță, dimensiunea și localizarea tumorii, amploarea intervenției chirurgicale, reintervenția și reiradierea, markerii moleculari) asupra rezultatului.

Studiile au raportat că supraviețuirea scăzută a fost asociată cu vârsta mai mare. [8] În mod similar în studiul nostru supraviețuirea a scăzut o dată cu creșterea vârstei. A existat o diferență semnificativă de supraviețuire între pacienții cu vârsta < 60 de ani și cei cu vârsta ≥ 60 de ani. Cu toate acestea, există serii validate recent și modele de prognostic care au valoarea cut-off de 50 ani ca punct optim pentru a stabili această diferență prognostică.[20] Această valoare cut-off nu a fost confirmată în seria noastră, probabil pentru că în cazul nostru există puțini pacienți diagnosticați sub această vârstă, doar 18 cazuri.

Studiul nostru a arătat că există o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește supraviețuirea generală dintre pacienții cu status de performanță bun ($KPS \geq 80$) la momentul inițierii radiochimioterapiei și cei cu status de performanță scăzut ($KPS < 80$). În studiile anterioare pacienții cu status de performanță Karnofsky mai mic de 70 după intervenția chirurgicală au avut o supraviețuire mai mică.[21]

Dimensiunea tumorii, evaluată imagistic pe CT/RMN-urile preoperatorii a avut valoare prognostică în lotul nostru de pacienți. Acest lucru apare și în alte serii publicate. [3]

În ceea ce privește localizarea tumorii, pacienții cu leziuni în emisfera cerebrală au avut o supraviețuire mediană mai mare, comparativ cu cei cu leziuni în ganglionii bazali sau leziuni multiple, rezultate aproape semnificative ($p=0.057$). Se pare că atât localizarea la nivelul ganglionilor bazali, cât și implicarea leziunilor multiple sunt asociate cu un număr mai mare de biopsii și rezecții parțiale, în special în cazul nostru neexistând rezecție completă. În aceste cazuri rezecțiile chirurgicale mai largi nu sunt posibile din punct de vedere tehnic. Acest lucru poate să explice evoluția mai proastă a pacienților cu localizare multiplă sau în ganglionii bazali.

În studiul nostru, supraviețuirea generală mediană după rezecția totală a fost de 20 luni, după cea parțială de 15 luni iar după biopsie de 9 luni. Pacienții care au primit rezecție completă și cei care au primit rezecție parțială au avut o supraviețuire generală semnificativ mai mare decât cei la care s-a făcut doar biopsie ($p=0.002$ și $p=0.027$). De asemenea a existat o diferență semnificativă statistic și între cei cu rezecție totală vs. rezecție parțială ($p=0.008$).

Indicele de proliferare KI67 are o capacitate prognostică și uneori și predictivă a răspunsului la tratamentul antitumoral în mai multe neoplasme, cum ar fi: cancerul de sân, tumorile neuroendocrine, sarcoame. [22-24]

Conform datelor noastre, acesta nu este un factor de prognostic relevant. În cazul glioblastomului, înțelegerea prognosticului este foarte limitată și este necesară cercetarea în ceea ce privește găsirea unor markeri prognostici noi. Progresele recente în tehnologia genomului au contribuit la noi modalități de a găsi markeri prognostici noi, de exemplu, gena izocitrat dehidrogenaza 1 sau 2 a fost indicată ca un biomarker care distinge glioblastoamele primare de cele secundare. [10] Mutațiile din aceste gene s-au dovedit de asemenea corelate cu un prognostic mai bun, dar progresele în ceea ce privește terapia nu au fost încă stabilite. [25] În studiul nostru, pacienții care au prezentat mutații în gena IDH, atât în grupul cu determinare imunohistochimică, cât și moleculară, au avut o supraviețuire mai mare comparativ cu pacienții care nu au prezentat mutații, fără să atingă semnificația statistică. Acest lucru ar putea fi explicat de numărul mic de pacienți cu determinări prin cele două metode.

Studiul realizat de Hegi și colaboratorii săi a arătat că indiferent de tratament, metilarea promotorului genei MGMT este un factor prognostic independent favorabil ($p<0.001$ conform testului log-rank; HR=0.45, 95% CI:0.32-0.61). Supraviețuirea generală mediană la pacienții cu metilare a fost de 18.2 luni (95% CI:15.5-22.0) comparativ cu 12.2 luni (95% CI: 11.4-13.5) la cei fără metilare.[26]

Statusul metilării promotorului genei MGMT prin determinări moleculare a fost un factor de prognostic pozitiv în lotul nostru retrospectiv. Pacienții cu MGMT metilat au avut o supraviețuire generală semnificativ mai mare, comparativ cu pacienții cu MGMT nemetilat (24 luni vs 19 luni, $p=0.045$).

9. Analiza parametrilor moleculari de stres oxidativ

Scopul studiului prospectiv a fost determinarea parametrilor moleculari de stres oxidativ, evaluarea corelației dintre aceștia și evoluția pacienților cu glioblastom tratați multimodal.

Ipoteza de lucru

Glioblastomul este o tumoră rezistentă la tratamentul standard actual, iar recidiva și progresia tumorii sunt cauzele principale ale prognosticului slab. În prezent, monitorizarea simptomelor pacientului și evaluările RMN/CT periodic sunt singurele modalități de a certifica recăderea.

Pentru creșterea supraviețuirii pacienților cu glioblastom, este esențială identificarea unor markeri serologici care să permită diagnosticarea precoce a recidivei și implicit, intervenția terapeutică cât mai rapidă.

Creșterea generării de ROS în cancer prin administrarea radiochimioterapiei face ca celulele maligne să depindă foarte mult de mecanismele antioxidante pentru a face față stresului oxidativ. Astfel, nivelurile crescute de antioxidanți ar putea fi cauza rezistenței la tratament.

Pornind de la aceste premise, studiul nostru își propune să determine parametrii moleculari de stres oxidativ, evaluarea corelației dintre aceștia și evoluția pacienților cu GBM (recidivă, răspuns la tratamentul standard multimodal, supraviețuire).

9.1 Pacienți și metode

Pentru realizarea acestui studiu prospectiv, observațional, nerandomizat am inclus 23 de pacienți, diagnosticați cu GBM și tratați în Spitalul Oncofort București și Institutul Oncologic “Alexandru Trestioreanu” București, între 2018 și 2019 .

Criterii de includere

- pacienți biopsiați sau operați, parțial sau total și confirmați prin examen histopatologic
- vârsta ≥ 18 ani

- statusul de performanță Karnofsky ≥ 60
- pacienți care au primit radiochimioterapie și care au semnat consimțământul informat
- pacienți cu valori adecvate ale hemogramei și ale parametrilor biochimici sanguini

Determinarea parametrilor moleculari de stres oxidativ la pacienții cu glioblastom radiochimiotratat

Pentru realizarea studiului prospectiv au fost recoltate câte 3 probe de sânge de la fiecare pacient: prima probă la inițierea tratamentului, a doua probă a fost una intermediară, iar ultima probă a fost recoltată la finalizarea radiochimioterapiei. Eprubetele au fost centrifugate, iar din serul obținut s-au determinat următorii parametrii moleculari de stres oxidativ: malondialdehida (MDA), ceruloplasmina (CP), grupări tiol albuminice (SH), oxidul nitric (NO), 8-hidroxi-2-deoxiguanozina(8-OH-dG) și antioxidanții totali (AO).

Peroxidarea lipidelor a fost cuantificată prin măsurarea MDA serice, având la bază reacția a două molecule de acid tiobarbituric cu o moleculă de MDA și formarea unui produs de reacție colorat în roșu, care a fost măsurat spectrofotometric la 532nm.

Cantitatea de CP serică a fost determinată prin metoda colorimetrica Ravin, care se bazează pe proprietatea oxidativă a acestei proteine asupra para-fenilen diamină în tampon acid acetic-acetat. Produsul colorat obținut a fost măsurat spectrofotometric, având o absorbție maximă la 540 nm.

Degradarea oxidativă a proteinelor a fost măsurată prin determinarea grupărilor tiol albuminice, utilizând reactivul Ellman. Concentrațiile grupărilor tiol albuminice din ser au fost măsurate spectrofotometric cu o absorbție maximă la 412 nm.

Oxidul nitric(NO) a fost determinat indirect, prin determinarea nitriților cu ajutorul reactivului Griess. Reacția Griess a fost măsurată spectrofotometric la o absorbție de 540 nm.

Degradarea oxidativă a acizilor nucleici evaluată prin măsurarea 8-OHdG a avut la bază metoda imunoenzimatică de tip ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, test imunisorbant legat de enzimă) ce utilizează reacția antigen - anticorp, rezultând un compus colorat măsurat spectrofotometric la o lungime de undă de 450 nm.

Determinarea antioxidanților totali a avut la bază metoda dezvoltată de Benzie și Strain, ce măsoară capacitatea antioxidantilor de a reduce fierul feric. La pH scăzut, excesul de Fe³⁺ din

amestecul de reacție (complexul tripiridil triazina ferică) este redus la forma feroasă (complexul tripiridil triazină feros), în prezența antioxidanților, dezvoltând o culoare albastru intens, cu o absorbție maximă la 593 nm; intensitatea culorii este direct legată de capacitatea de reducere a serului.

9.2 Rezultate

9.2.1 Caracteristicile lotului

Pentru acest studiu au fost înrolați 14 (60.9%) bărbați și 9 (39.1%) femei.

Vârsta medie a fost de 54.9 de ani, iar mediana vârstei a fost de 56 de ani (vârste între 31 și 73 de ani).

În ceea ce privește statusul de performanță, la inițierea studiului acesta a avut valoarea medie de 85.65 și o mediană de 90 (valori între 60 și 100).

Lobul frontal și temporal au fost cei mai afectați (10, respectiv 9 pacienți), 2 pacienți au avut tumora localizată în lobul parietal, un pacient în ganglionii bazali și un pacient a avut localizare în talamus. Dimensiunea medie a tumorii a fost de 4.76 cm iar mediana de 4.8 cm (interval 2-8.4 cm).

Rezecția chirurgicală parțială a fost cea mai frecventă (17 pacienți), 4 pacienți au avut rezecție totală și 2 pacienți au fost biopsiați.

Radioterapia cu fracționare convențională a fost administrată la 18 pacienți, iar 5 pacienți au urmat radioterapie cu hipofracționare.

Tabel 9.1: Caracteristicile pacienților din lotul prospectiv

Caracteristicile pacienților din lotul prospectiv	Număr pacienți
Sex	
Bărbați	14(60.9%)
Femei	9(39.1%)
Vârsta (medie ± deviația standard)	54.9
Statusul de performanță Karnofsky	85.65

Localizare în lobii cerebrali	
Frontal	10
Temporal	9
Parietal	2
Ganglioni bazali	1
Talamus	1
Dimensiunea tumorii(medie ± deviație standard)	4.76
Rezecția chirurgicală	
Parțială	17
Totală	4
Biopsie	2
Radioterapia	
Cu fracționare convențională	18
Cu hipofracționare	5

9.2.2 Supraviețuirea fără semne de progresie și supraviețuirea generală în studiul prospectiv

Urmărirea mediană în studiul prospectiv a fost de 14 luni (interval 3-23 luni). Supraviețuirea fără semne de progresie și supraviețuirea generală în studiul prospectiv au avut următoarele valori mediane: 5 luni (95% CI: 2.652-7.348) și respectiv 15 luni (95% CI:11.244-18.756). Rata de supraviețuire fără progresie de boală la 6 luni a fost de 47.82%, iar rata de supraviețuire generală la 6 și 12 luni a fost de 91.3% și respectiv 69.56%, date redate în figurile de mai jos.

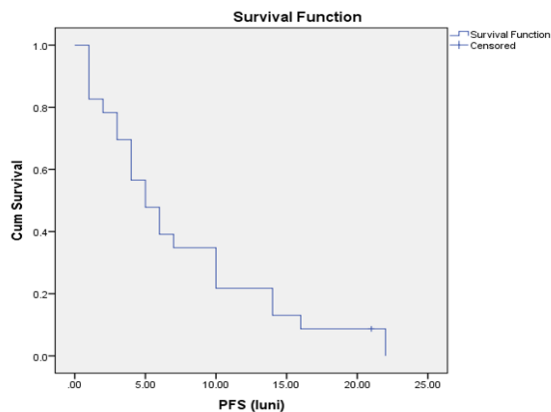


Figura 9.1: Supraviețuirea fără semne de progresie în studiul prospectiv reprezentată prin curba Kaplan Meier

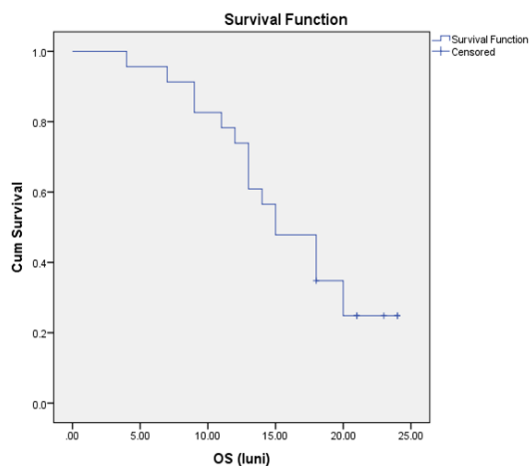


Figura 9.2: Supraviețuirea generală în studiul prospectiv reprezentată prin curba Kaplan Meier

9.2.3 Determinarea parametrilor de stres oxidativ

Pentru evaluarea stresului oxidativ au fost măsurate următorii parametri: malondialdehida (MDA), ceruloplasmina (CP), grupările tiol albuminice (SH), oxidul nitric (NO), 8-hidroxi-2-deoxiguanozina (8-OHdG) și antioxidanții totali (AO). Valorile medii și mediana acestor parametrii moleculari de stres oxidativ sunt prezentate în tabelul următor:

Tabel 9.2: Valorile parametrilor moleculari de stres oxidativ în lotul de pacienți cu glioblastom

	MDA ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$)	CP (UI)	SH (mmol/l)	NO ($\mu\text{mol}/l$)	8-OHdG (ng/ml)	AO (mmol/l)
Medie	5.73	150.92	358.29	35.95	32.53	0.99
Mediană	5.90	132	342	35.5	33.15	1.14
Deviație standard	1.18	52.59	80.3	8.01	6.03	0.5
Minimum	3.54	67	224	19	19	0.11
Maximum	10.19	290	567	52	44.21	2.85
Valoare normală	0-4	80-120	370-450	13-23	0.1-0.3	0.9-1.4

9.2.4 Evaluarea relațiilor dintre parametrii de stres oxidativ

În lotul de pacienți, analiza de corelație Pearson a identificat o corelație puternică ($r=0.766$), semnificativă statistic ($p=0.0001$) între produșii de degradare ai acizilor nucleici, determinați prin măsurarea 8-OHdG și malondialdehidă și o corelație moderată ($r=0.579$), semnificativă statistic ($p=0.004$) cu oxidul nitric. Analiza asocierilor dintre 8-OHdG și SH, CP nu a identificat corelații semnificative statistic ($r=0.006$, respectiv $r=0.269$; $p=0.980$, respectiv $p=0.214$)

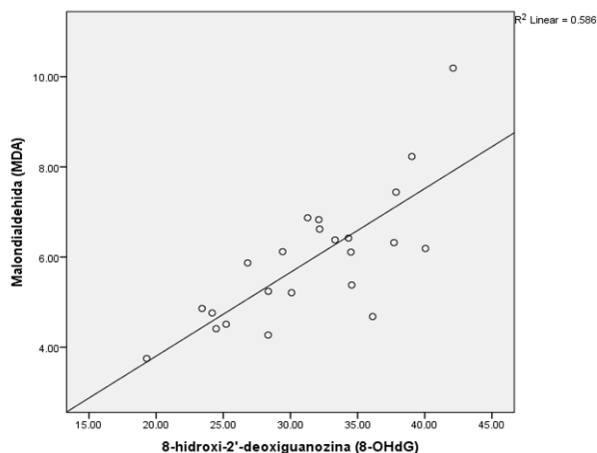


Figura 9.3: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile 8-hidroxi-2-deoxiguanozinei și malondialhidei

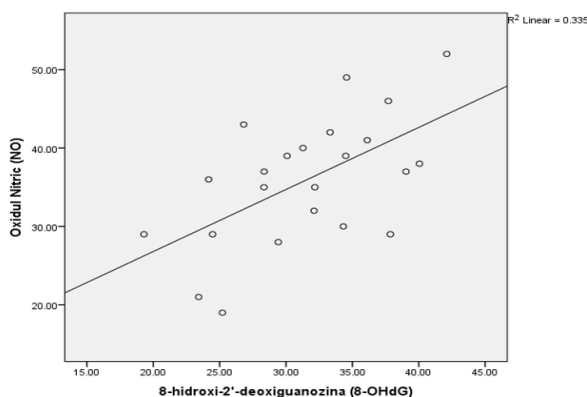


Figura 9.4: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile 8-hidroxi-2-deoxiguanozinei și Oxidului nitric

De asemenea s-a constatat o corelație moderată ($r=0.440$), semnificativă statistic ($p=0.035$) între valorile malondialhidei și ale oxidului nitric. Nu a fost găsită o corelație semnificativă statistic între valorile malondialhidei și ceruloplasminei ($r= -0.108$, $p=0.623$) precum nici între valorile malondialhidei și ale grupărilor tiol albuminice ($r=0.127$, $p=0.562$).

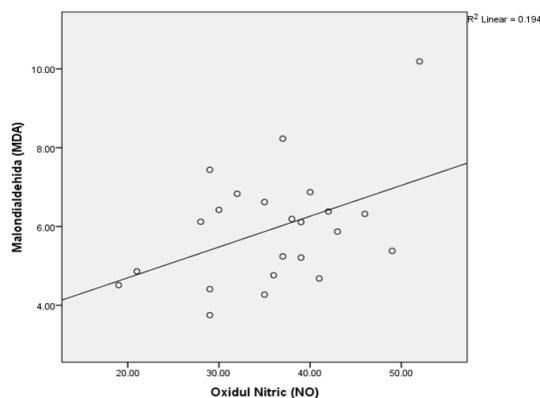


Figura 9.5: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile malodialdehidei și oxidului nitric

În ceea ce privește corelațiile dintre valorile parametrilor de stres oxidativ și ale antioxidantilor totali s-au găsit următoarele:

- corelație moderată ($r=0.578$), semnificativă statistic ($p=0.004$) între malondialdehida și antioxidanți
- corelație moderată ($r=0.474$), semnificativă statistic ($p=0.022$) între tioli și antioxidanți
- corelație moderată ($r=0.565$), semnificativă statistic ($p=0.005$) între oxidul nitric și antioxidanți
- corelație moderată ($r=0.548$), semnificativă statistic ($p=0.007$) între 8-hidroxi-2-deoxiguanozina și antioxidanți

Nu a existat o corelație semnificativă statistic între ceruloplasmină și antioxidanți ($r= -0.114$, $p=0.605$)

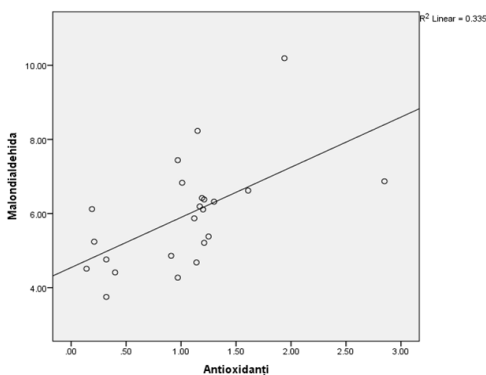


Figura 9.6: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile malodialdehidei și antioxidanților

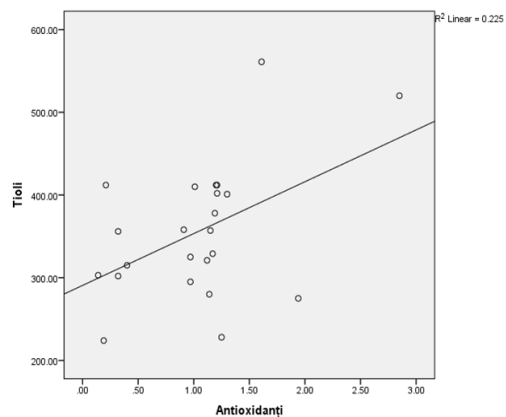


Figura 9.7: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile tiolilor albuminici și antioxidanților

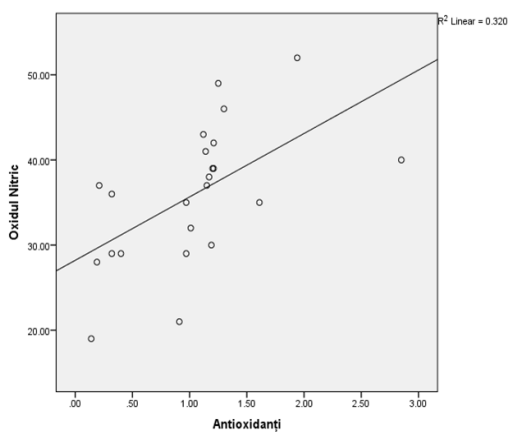


Figura 9.8: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile oxidului nitric și antioxidanților

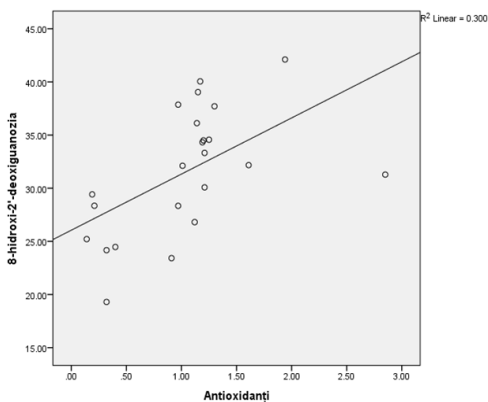


Figura 9.9: Diagrama Scatter a corelației pozitive între valorile 8-hidroxi-2'-deoxiguanozinei și antioxidanților

9.2.5 Valorile parametrilor moleculari de stres oxidativ în funcție de statusul MGMT

În cadrul lotului de pacienți din studiul prospectiv, determinarea imunohistochimică a statusului MGMT a identificat 12 pacienți cu tumori MGMT pozitiv și 11 pacienți cu tumori MGMT negativ.

Supraviețuirea generală a pacienților cu glioblastom MGMT pozitiv a fost semnificativ mai mare comparativ cu pacienții cu glioblastom MGMT negativ (18 luni, 95% CI: 14.6-21.3 vs. 12 luni, 95% CI: 9.4-14.5, $p=0.011$).

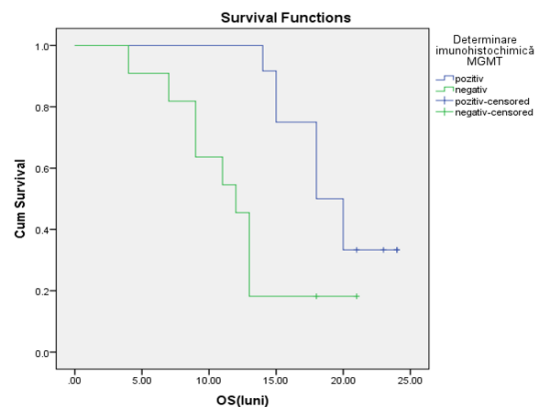


Figura 9.10:Supraviețuirea generală exprimată prin curba de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de statusul MGMT în studiul prospectiv

Supraviețuirea fără semne de progresie, la pacienții cu MGMT pozitiv fost de 10 luni (95% CI: 3.59-16.4) iar la pacienții cu MGMT negativ a fost de 5 luni (95% CI: 2.9-7.0), fără a fi semnificativă statistic ($p=0.24$).

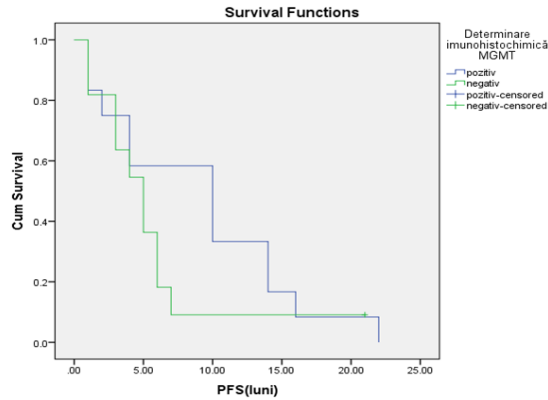


Figura 9.11: Supraviețuirea fără semne de progresie exprimată prin curba de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de statusul MGMT în studiul prospectiv

Pacienții cu glioblastom MGMT negativ au avut valori semnificativ statistic mai mari ale oxidului nitric și 8-hidroxi-2-deoxiguanozina, comparativ cu grupul de pacienți la care statusul MGMT a fost pozitiv. Astfel, valorile medii ale oxidului nitric au fost de $42.09 \pm 5.04 \mu\text{mol/l}$ pentru tumorile MGMT negativ vs. $32.25 \pm 7.58 \mu\text{mol/l}$ pentru tumorile MGMT pozitiv, $t(21) = 3.62$, $p=0.002$, iar valorile medii ale 8-hidroxi-2-deoxiguanozina au fost de $36 \pm 4.6 \text{ ng/ml}$ pentru grupul cu status MGMT negativ vs. $29.94 \pm 6.59 \text{ ng/dl}$ pentru grupul de pacienți cu status MGMT pozitiv, $t(21)=2.53$, $p=0.019$.

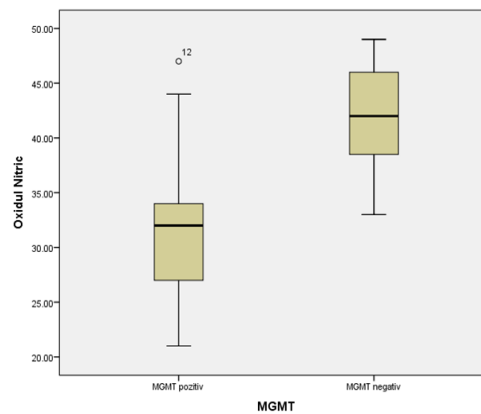


Figura 9.12: Valorile medii ale oxidului nitric la pacienții cu glioblastom MGMT negativ vs. cei cu glioblastom MGMT pozitiv.

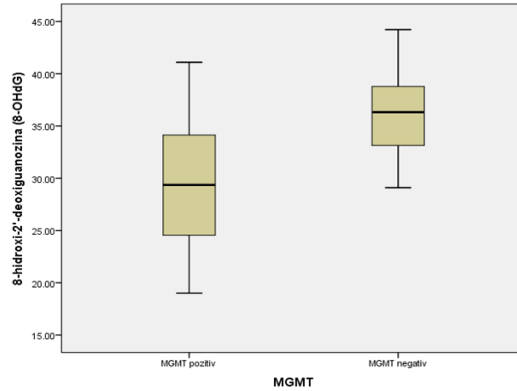


Figura 9.13: Valorile medii ale 8-hidroxi-2-deoxiguanozina la pacienții cu glioblastom MGMT negativ vs. cei cu glioblastom MGMT pozitiv

Valorile medii ale antioxidanților totali au fost semnificativ statistic mai mari în tumorile MGMT negativ, comparativ cu cele care au avut status MGMT pozitiv (1.132 ± 0.315 mmol/l vs. 0.694 ± 0.416 mmol/l, $t(21)=2.823$, $p=0.01$).

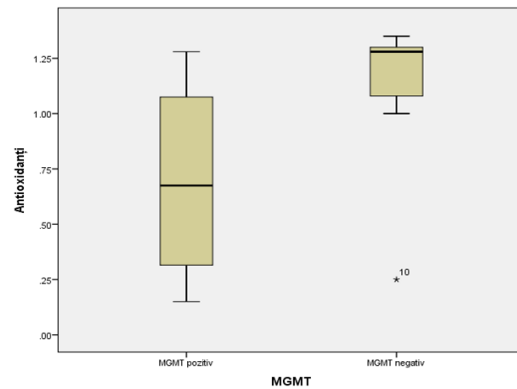


Figura 9.14: Valorile medii ale antioxidanților totali la pacienții cu glioblastom MGMT negativ vs. cei cu glioblastom MGMT pozitiv

De asemenea, valorile medii ale malondialdehidei, ceruloplasminei și grupărilor tiol albuminice au fost mai mari în subgrupul de pacienți cu MGMT negativ, comparativ cu cel cu MGMT pozitiv, fără a atinge însă semnificația statistică (6.08 ± 1.57 μ mol/100ml vs. 5.81 ± 1.36 μ mol/100 ml, $p=0.67$; 149.81 ± 43.91 UI vs. 148.75 ± 62.17 UI, $p=0.963$; 374.27 ± 90.59 mmol/l vs. 359.5 ± 78.05 mmol/l, $p=0.679$).

9.2.6 Rolul speciilor reactive de oxigen în evaluarea răspunsului la tratament

După finalizarea radiochimioterapiei 10 pacienți au avut progresie imagistică, iar 13 pacienți au avut răspuns sau boală stabilă.

În ceea ce privește răspunsul la radiochimioterapie a pacienților cu glioblastom, s-a constatat că valorile medii ale antioxidanților totali au fost semnificativ statistic mai mari la pacienții care au avut certificată progresia bolii pe RMN/CT -ul de control efectuat la 4 săptămâni de la finalizarea tratamentului (1.34 ± 0.69 mmol/l), comparativ cu pacienții fără progresie (0.79 ± 0.44 mmol/l), $t(21)=2.334$ $p=0.03$.

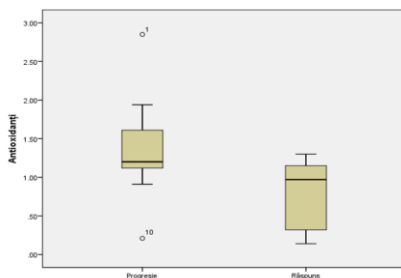


Figura 9.15: Valoriile medii ale antioxidanților totali sunt semnificativ statistic mai mari la pacienții care au avut progresie imagistică comparativ cu pacienții fără progresie imagistică după radiochimioterapie

Sensibilitatea și specificitatea antioxidanților totali în estimarea răspunsului la radiochimioterapie au fost determinate prin curba ROC, care a avut o arie de sub curbă de 0.750, $p=0.044$, 95 % CI :0.542-0.958. Pentru o sensibilitate de 80 % și o specificitate de 61 % valoarea cutt-off a antioxidanților totali a fost de 0.99 mmol/l.

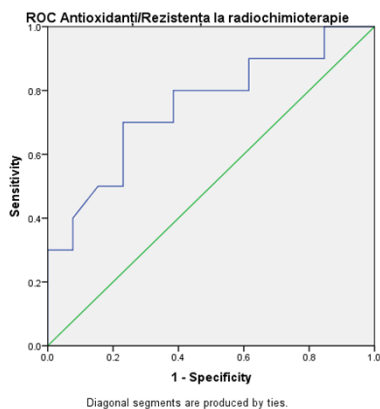


Figura 9.16: Curba ROC pentru determinarea sensibilității și specificității antioxidanților totali în evaluarea răspunsului la radiochimioterapie

9.3 Discuții

Au fost descrise mai multe mecanisme moleculare care stau la baza rezistenței la terapie. Studiile anterioare au raportat că MGMT și p53 mediază rezistența la agenții alchilanți și că rezistența poate fi asociată cu un eflux crescut de medicament, o capacitate ridicată de reparare a ADN și un conținut mai ridicat de glutatoin. Cu toate acestea, mecanismele de rezistență sunt complexe și rămân puțin înțelese. [27-29]

Citotoxicitatea TMZ rezultă în principal din metilarea ADN în poziția O6 a guaninei, în timp ce MGMT elimină grupările metil din această poziție și potențează rezistența la TMZ. Deși TMZ este un tratament standard pentru pacienții cu glioblastom, în special pentru cei cu promotor MGMT metilat, nu există opțiuni adecvate pentru pacienții cu promotor MGMT nemetat. [26,30]

Datele noastre au arătat că pacienții cu glioblastom MGMT negativ (rezistent) prezintă stres oxidativ crescut, comparativ cu pacienții cu glioblastom MGMT pozitiv (sensibil). De asemenea, am arătat că pacienții cu tumori MGMT negativ prezintă niveluri serice crescute ale antioxidanților totali, comparativ cu pacienții cu tumori MGMT pozitiv. Aceste rezultate sugerează că ROS indus de radiochimioterapie contribuie într-o mai mare măsură la moartea celulelor canceroase la pacienții cu glioblastom cu nivel scăzut al antioxidanților totali serici decât la pacienții cu nivel crescut al acestora.

Datele noastre au sugerat că celulele rezistente dezvoltă o puternică capacitate antioxidantă pentru a împiedica acțiunea terapiei. Această constatare sugerează că nivelul antioxidanților totali și MGMT reprezintă diferite mecanisme de mediere a rezistenței la radiochimioterapie, la pacienții cu glioblastom.

Majoritatea celulelor canceroase sunt metabolic active și produc niveluri ridicate de ROS, prin urmare aceste celule sunt vulnerabile la stres oxidativ suplimentar determinat de către agenții exogeni generatori de ROS. [31] Cantitățile crescute de ROS din celulele canceroase pot avea consecințe semnificative, cum ar fi stimularea proliferării celulare, promovarea mutațiilor și instabilității genetice și modificări ale sensibilității celulare la agenții farmacologici. [29,32,33]

Este logic să speculăm că modificările biochimice și moleculare cauzate de ROS pot contribui la dezvoltarea unei populații de celule canceroase heterogene și la apariția celulelor rezistente la medicamente în timpul progresiei bolii. Mai multe studii au arătat că nivelurile antioxidanților cresc în diferite tipuri de tumori și că această creștere este un factor major care

contribuie la rezistența la medicamente prin eliminarea ROS, detoxifierea medicamentelor sau participarea la procesele de reparare a ADN-ului.[29,33]

În acest studiu am observat că pacienții care au progresat după tratamentul cu radiochimioterapie au avut o capacitate antioxidantă totală mai mare comparativ cu pacienții cu boală stabilă sau răspuns la tratament. Putem afirma că celulele de GBM își dezvoltă mecanisme antioxidante eficiente pentru a evita efectele citotoxice ale terapiei antitumorale, rezultând astfel rezistența. Prin urmare, eliminarea ROS sunt unul dintre factorii importanți în protejarea celulelor împotriva leziunilor ROS, în timpul expunerii la radioterapie și TMZ.

Într-un studiu efectuat pe linii celulare de GBM uman, a fost investigat rolul potențial al enzimelor antioxidante în radiorezistență și s-a demonstrat că acești antioxidanți, cum ar fi superoxid dismutaza(SOD), catalaza, glutatión peroxidaza(GPX), glutatión reductaza(GR) au fost activați de până la 5 ori mai mult în liniile celulare izolate de GBM rezistente, comparativ cu liniile celulare părinte, după expunerea lor la radioterapie. [34]

Rezultatele noastre au arătat că antioxidanții totali mediază rezistența la terapie la pacienții cu glioblastom prin reglarea homeostaziei redox. Mai mult, antioxidanții totali sunt un predictor al răspunsului la tratament, deoarece pacienții cu nivel seric ridicat au prezentat progresia bolii în comparație cu pacienții cu nivel scăzut.

10. Concluzii și contribuții personale

Pacienții din loturile noastre reprezintă populații cu caracteristici clinice și moleculare similare cu cele descrise în literatură.

Tratamentul multimodal recomandat de ghidurile internaționale și folosit în prezent în România (chirurgia, radiochimioterapie cu TMZ, chimioterapie adjuvantă cu TMZ) oferă rezultate comparabile cu cele obținute la nivel mondial.

Glioblastomul în loturile studiate prezintă un prognostic rezervat cu o supraviețuire fără semne de progresie de 4 luni în studiul retrospectiv și 5 luni în studiul prospectiv și o mediana a supraviețuirii generale de 16 luni în studiul retrospectiv, respectiv 15 luni în studiul prospectiv.

Supraviețuirea generală și supraviețuirea fără semne de progresie, estimate statistic în cele două loturi sunt în concordanță cu cele descrise în studiile de înregistrare ale moleculelor terapeutice și alte serii clinice.

În cazul progresiei, reintervenția chirurgicală și/sau reiradierea reprezintă opțiuni terapeutice pentru o categorie de pacienți bine selectată, cu impact pozitiv în evoluția bolii.

În studiul nostru, după o analiză detaliată, am identificat mai mulți factori de prognostic care influențează evoluția bolii. Astfel, vârsta <60 de ani, statusul de performanță postoperator ≥ 80 , dimensiunea tumorii <4 cm, rezecția chirurgicală totală, metilarea promotorului MGMT au constituit factorii de prognostic pozitiv pe baza cărora am elaborat un model de scor prognostic pozitiv, care să orienteze echipa multidisciplinară în practica clinică curentă, în stabilirea și monitorizarea tratamentului optim. Scorul nostru include pentru prima dată, pe lângă factorii clinici și factori moleculari. Am validat statistic acest scor prognostic cu o sensibilitate și specificitate foarte bune, putând fi astfel utilizat în practica medicală.

Studiul prospectiv a arătat că unul dintre mecanismele chimioterapiei (TMZ) și radioterapiei este creșterea speciilor reactive de oxigen intracelular, care induce deteriorarea celulelor de GBM prin oxidarea ADN-ului, lipidelor și proteinelor. Valorile medii ale următoarelor molecule de stres oxidativ au fost mai mari decât normalul descris în literatură: malondialdehida, oxidul nitric și ceruloplasmina. Valorile antioxidantilor și grupărilor tiol albuminice au fost sub valoarea normală. Aceste date obținute relevă dezechilibrul balanței redox.

Am identificat o corelație liniară pozitivă semnificativă statistic între parametrii moleculari de stres oxidativ, precum și între aceștia și antioxidanți.

Pacienții din studiul prospectiv, la care s-a identificat MGMT pozitiv prin determinarea imunohistochimică au prezentat o supraviețuire generală mai mare comparativ cu acei pacienți la care MGMT a fost negativ. Supraviețuirea fără semne de progresie a fost mai mare la cei cu tumori MGMT pozitiv, comparativ cu cei la care tumorile au fost MGMT negativ, cu toate acestea, nu s-a atins diferența semnificativă statistic.

Glioblastoamele cu status MGMT negativ (rezistente) prezintă specii reactive de oxigen în cantități mai mari decât glioblastoamele cu status MGMT pozitiv (sensibile), dar și o capacitate antioxidantă mai mare pentru a neutraliza aceste specii reactive, având ca urmare protejarea celulelor de acțiunea citotoxică a radiochimioterapiei.

Radiochimioterapia produce ROS, care este mai eficient în cazul tumorilor cu MGMT pozitiv, deoarece acestea au prezentat niveluri de antioxidanți totali mai mici în comparație cu tumorile MGMT negativ.

De asemenea, am observat că reglarea prin creșterea nivelului antioxidanților totali, înregistrată în studiul nostru, face celula de glioblastom mai rezistentă la radiochimioterapie. Pacienții din lotul de studiu, care au înregistrat progresie certificată imagistic la finalizarea radiochimioterapiei, au avut niveluri serice semnificativ mai mari decât cei fără progresie (1.34 ± 0.69 mmol/l vs. 0.79 ± 0.44 mmol/l, $t(21)=2.334$ $p=0.03$).

Antioxidanții totali pot fi utilizați în evaluarea răspunsului la tratament. Astfel, am identificat o valoare cut-off a antioxidanților totali serici de 0.99 mmol/l, cu sensibilitate de 80% și specificitate de 61% pentru predicția rezistenței la radiochimioterapie.

Pe baza rezultatelor înregistrate în această lucrare propunem dozarea parametrilor moleculari de stres oxidativ în dinamica radiochimioterapiei la pacienții cu glioblastom. Acești markeri moleculari se dozează ușor din ser, fără costuri deosebite și pot furniza o serie de date utile clinicienilor în vederea stabilirii corecte a conduitei terapeutice.

În concluzie, este necesară elaborarea unei abordări care să exploateze la maximum moartea celulară mediată de ROS, prin combinarea terapiilor generatoare de ROS cu compuși care suprimă capacitatea antioxidantă a celulelor de GBM.

În afără de problemele metodologice asociate de obicei cu colectarea retrospectivă de date și cu diferitele tehnici utilizate pentru determinarea markerilor moleculari, ambele cauzând pierderi de informații, limitarea principală a acestei lucrări este legată de dimensiunile reduse ale populației analizate.

Având în vedere rezultatele încurajatoare obținute și lipsa datelor din literatură în ceea ce privește rolul parametrilor moleculari de stres oxidativ în evoluția clinică a pacienților cu glioblastom tratați multimodal, ne propunem pentru viitor să continuăm cercetarea prin înrolarea unui număr mai mare de pacienți.

Bibliografie selectivă

1. Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and outcome of glioblastoma. Exon Publications. 2017;143–153.
2. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005;352(10):987–996.
3. **Bizu I**, Trifanescu OG, “Al. Trestioreanu” Institute of Oncology, Bucharest, Romania, “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania, Georgescu M-T,

- “Al. Trestioreanu” Institute of Oncology, Bucharest, Romania, et al. Clinical prognostic factors in newly diagnosed glioblastoma. *Ro J Neurol*. 2019 Jun 30;18(2):71–7.
4. Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, et al. Current standards of care in glioblastoma therapy. *Exon Publications*. 2017;197–241.
 5. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*. 2012;9(3):193.
 6. Madsen H, Hellwinkel JE, Graner MW. Clinical trials in glioblastoma—designs and challenges. *Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor*. 2015;277.
 7. Perry J, Okamoto M, Guiou M, Shirai K, Errett A, Chakravarti A. Novel therapies in glioblastoma. *Neurology research international*. 2012;2012.
 8. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology*. 2019 Nov 1;21(Supplement_5):v1–100.
 9. Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blömer U. Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol*. 2005 Feb;63(2):162–9; discussion 169.
 10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. 10–341 p. (World Health Organization classification of tumours).
 11. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer research*. 2000;60(9):2368–2371.
 12. Koutsimpelas D, Pongsapich W, Heinrich ULF, Mann S, Mann WJ, Brieger J. Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncology reports*. 2012;27(4):1135–1141.
 13. Piperi C, Vlastos F, Farmaki E, Martinet N, Papavassiliou AG. Epigenetic effects of lung cancer predisposing factors impact on clinical diagnosis and prognosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5a):1495–1501.
 14. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2010;12(2):116–121.

15. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):997–1003.
16. Bady P, Sciuscio D, Diserens A-C, Bloch J, Van Den Bent MJ, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta neuropathologica*. 2012;124(4):547–560.
17. Alvarez de Eulate-Beramendi S, Álvarez-Vega MA, Balbin M, Sanchez-Pitiot A, Vallina-Alvarez A, Martino-González J. Prognostic factors and survival study in high-grade glioma in the elderly. *British journal of neurosurgery*. 2016;30(3):330–336.
18. Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Hartov A, Fan X, Ji S, et al. Glioblastoma multiforme treatment with clinical trials for surgical resection (aminolevulinic acid). *Neurosurgery Clinics*. 2012;23(3):371–377.
19. Jayabalan S, Balaji A, Rajendran K, Balaji PR, Mehtha S, Subramaniam R, et al. Single institutional study on treatment and prognosis of glioblastoma multiforme. *Interdisciplinary Neurosurgery*. 2020 Mar 1;19:100575.
20. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Patre P-LD, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6892–9.
21. Chaichana KL, Martinez-Gutierrez JC, De la Garza-Ramos R, Weingart JD, Olivi A, Gallia GL, et al. Factors associated with survival for patients with glioblastoma with poor pre-operative functional status. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2013 Jun 1;20(6):818–23.
22. Diest PJV, Wall EVD, Baak JPA. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: A review. *International Journal of STD and AIDS*. 2004 Jul 1;57(7):675–81.
23. Vilar E, Salazar R, Pérez-García J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):221–32.
24. Brownhill S, Cohen D, Burchill S. Proliferation index: a continuous model to predict prognosis in patients with tumours of the Ewing's sarcoma family. *PLoS One*. 2014;9(8):e104106.
25. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England journal of medicine*. 2009;360(8):765–773.
26. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology*. 2008;26(25):4189–4199.

27. Yi G, Huang G, Guo M, Zhang X, Wang H, Deng S, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain*. 2019 Aug;142(8):2352–66.
28. Zhu Z, Du S, Du Y, Ren J, Ying G, Yan Z. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. *J Neurochem*. 2018;144(1):93–104.
29. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*. 2010;44(5):479–496.
30. Weller M, Tabatabai G, Kästner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2015 May 1;21(9):2057–64.
31. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. 2004 Apr;7(2):97–110.
32. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;1(1):9–21.
33. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*. 127(2):415–26.
34. Lee H-C, Kim D-W, Jung K-Y, Park I-C, Park M-J, Kim M-S, et al. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med*. 2004 Jun;13(6):883–7.

Articole publicate

Bîzu Ionela, Trifănescu Oana Gabriela, Georgescu Mihai-Teodor, Gruia Maria-Iuliana, Anghel Rodica. Clinical prognostic factors in newly diagnosed glioblastoma. *Romanian Journal of Neurology* . 2019, Vol. 18 Issue 2, p71-77. 7p. ISSN 1843-8148.CNCSIS B+

https://view.publitas.com/amph/rjn_2019_2_art-03/

Bîzu Ionela, Tiut Cristina, Anghel Rodica. Extensions of TMZ maintenance therapy beyond six cycles: Two cases report with a good response. *Romanian Journal of Neurology* . 2018, Vol. 17 Issue 3, p163-167. 5p. ISSN 1843-8148.CNCSIS B+

https://view.publitas.com/amph/rjn_2018_3_art-08/

Bîzu Ionela, Georgescu Mihai, Anghel Rodica. Small Cell Glioblastoma: a Glioblastoma Subtype with a Unexpected Response. Modern Medicine. 2019, Vol. 26, Issue 2, p93-96. 4p.

ISSN 1223-0472 CNCSIS B+

<https://doi.org/10.31689/rmm.2019.26.2.93>

Mențiune

Această lucrare a beneficiat de suport financiar prin proiectul “ CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN”, Contract nr. POSDRU/159/1.5/S/135760, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial – Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.