



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

ΜΑΡΙΑ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

ΜΑΡΙΑ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γιαννακοπούλου Μαρίας: 05-12-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 795α/14-02-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Γαλάνη Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Στεφάνου Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-02-2017

«Μελέτη της έκφρασης του χιμαιρικού γονιδίου TMPRSS2-ERG σε τομείς παραφίνης ως βιολογικός δείκτης για τον καρκίνο του προστάτη»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 975^α/27-7-2021

Επιβλέπων:

Αλεξίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γαλάνη Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλλαγή Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: Γ.Σ. 975^α/27-7-2021

«Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης και του μηχανισμού της Σιδερόλης στο γλοιοβλάστωμα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1159α/28-07-2025

1. Αλεξίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γαλάνη Βασιλική, Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Λάζαρη Διαμάντω, Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
5. Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σιόκα Χρύσα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κυρίτσης Αθανάσιος, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-07-2025

Ιωάννινα 14-11-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Αναπληρώτρια Γραμματέας του Τμήματος

[Signature]
Ιωάννα Ντούβλη

Στον σύζυγό μου Χρήστο & στον γιο μου Φίλιππο

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και συγκεκριμένα στο Νευροχειρουργικό Ινστιτούτο, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ανατομίας – Ιστολογίας – Εμβρυολογίας. Στόχος ήταν η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης της σιδερόλης σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, καθώς και ο μηχανισμός δράσης της. Επιπλέον, ερευνήθηκε πιθανή συνεργιστική δράση της σιδερόλης με το χημειοθεραπευτικό Τεμοζολομίδη και με ακτινοβολία. Τέλος, μελετήθηκε η τοξικότητα της ουσίας σε κυτταρική σειρά φυσιολογικών ινοβλαστών.

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής κλείνει ένας απ' τους πιο σημαντικούς κύκλους στην ζωή μου. Ήταν ένα όνειρο που ξεκίνησε πριν 4 χρόνια και πλέον ολοκληρώνεται δίνοντας μου την χαρά και την ικανοποίηση ότι κατάφερα να πετύχω έναν απ' τους στόχους μου.

Σ' αυτό το ταξίδι υπήρξαν δύο άνθρωποι που όχι μόνο μου έδωσαν την ευκαιρία να κάνω το όνειρό μου πραγματικότητα αλλά με στήριξαν σε κάθε μου βήμα και τους οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη. Ο κ. Γεώργιος Αλεξίου, Αναπληρωτής καθηγητής Νευροχειρουργικής και η κ. Βασιλική Γαλάνη, Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ήταν οι δύο άνθρωποι που πίστεψαν σε εμένα απ' την αρχή και με βοήθησαν σε ό,τι χρειάστηκα. Μετά από τόσα χρόνια συνεργασίας τους νιώθω δικούς μου ανθρώπους και τους ευχαριστώ πολύ για όλα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής, την κ. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, τον κ. Βούλγαρη Σπυρίδωνα, Καθηγητή Νευροχειρουργικής, την κ. Σιόκα Χρύσα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής, τον κ. Κυρίτση Αθανάσιο, Ομότιμο Καθηγητή Νευρολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και την κ. Λάζαρη Διαμάντω, Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την στήριξη και την βοήθεια τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν ηθικά και πρακτικά όλα αυτά τα χρόνια και ήταν δίπλα μου να μου δίνουν δύναμη κάθε στιγμή. Στον σύζυγό μου Χρήστο, στους γονείς μου Θωδωρή και Βασιλική, Αριστογείτων και Ιφιγένεια και στον αδελφό μου Άγγελο που πίστευαν σε έμένα από την πρώτη στιγμή ακόμα και τις στιγμές που δεν πίστευα εγώ η ίδια ότι θα τα καταφέρω. Το πιο μεγάλο και σημαντικό ευχαριστώ το χρωστάω στον γιο μου Φίλιππο, που ήρθε στην ζωή μου κατά την διάρκεια αυτού του ταξιδιού και μου έδωσε ακόμα περισσότερη δύναμη να καταφέρω να το ολοκληρώσω!!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	6
1.1.1 Ανατομία & δομή νευρικού συστήματος.....	6
1.1.2 Οργάνωση του ΚΝΣ.....	9
1.2 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ ΚΝΣ.....	10
1.2.1 Ταξινόμηση γλοιωμάτων.....	10
1.2.2 Γλοιοβλάστωμα.....	16
1.2.3 Γενετικοί παράγοντες κινδύνου.....	17
1.2.4 Μοριακές μεταλλάξεις γλοιωμάτων.....	20
1.2.5 Μοριακές μεταλλάξεις στο γλοιοβλάστωμα.....	22
1.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ.....	29
1.3.1 Κύριες τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	29
1.3.2 Σύγχρονες θεραπευτικές τεχνικές.....	36
1.3.3 Τα φυτικά εκχυλίσματα στην θεραπεία του GBM	39
1.3.4 Η σιδηρόλη ως πιθανή θεραπεία του GBM.....	47
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
2.1 Κυτταρικές σειρές & συνθήκες ανάπτυξης.....	50
2.2 Φυτικά εκχυλίσματα & χημειοθεραπευτικές ουσίες.....	51
2.3 Μελέτη κυτταρικής βιωσιμότητας.....	51
2.4 Χρώση κυττάρων με Crystal Violet.....	52
2.5 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής.....	53
2.6 Μελέτη κυτταρικής μεταναστευτικότητας.....	54
2.7 Μελέτη της συνδυαστικής θεραπείας σιδηρόλης & TMZ.....	54
2.8 Μελέτη της συνδυαστικής θεραπείας σιδηρόλης & ακτινοθεραπείας.....	55
2.9 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας ινοβλαστών.....	55
2.10 Στατιστική Ανάλυση.....	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1 Κυτταρική βιωσιμότητα μετά την θεραπεία με σιδηρόλη & υπολογισμός IC50.....	57
3.2 Κυτταρική βιωσιμότητα μετά την θεραπεία με TMZ & υπολογισμός IC50.....	58

3.3	Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μετά από επώαση με σιδερόλη.....	59
3.4	Η επίδραση της σιδερόλης στην κυτταρική μεταναστευτικότητα.....	61
3.5	Η συνεργιστική δράση σιδερόλης & TMZ στις δύο κυτταρικές σειρές GBM.....	63
3.6	Η συνδυαστική δράση σιδερόλης & ακτινοβολίας στην T98 κυτταρική σειρά GBM.....	66
3.7	Κυτταρική βιωσιμότητα της σειράς NIH/3T3 μετά την θεραπεία με σιδερόλη.....	67
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	73
6.	ABSTRACT.....	75
7.	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΚΝΣ Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΠΝΣ Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
ΕΝΥ Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
BBB Blood Brain Barrier
GBM Glioblastoma
ΠΟΥ Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
IDH Isocitrate Dehydrogenase
H3 Histone 3
MRI Magnetic Resonance Imaging
GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein
LFS Li–Fraumeni Syndrome
NF1 Neurofibromatosis type 1
FAMMM Familial Atypical Multiple Mole Melanoma
WHO World Health Organization
MGMT O6-methylguanine–DNA methyltransferase
TMZ Temozolomide
CML Chronic Myelogenous Leukemia
TCGA The Cancer Genome Atlas
NIH National Institutes of Health
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
ICGC International Cancer Genome Consortium
Rb Retinoblastoma
RTKs Receptor Tyrosine Kinases
DIPG Diffuse Intrinsic Pontine Glioma
TME Tumor Microenvironment
ΦΘΕ Φλεβική Θρομβοεμβολή
CT Computed Tomography
RT Radiotherapy
ROS Reactive Oxygen Species
FDA Food and Drug Administration

MMR Mismatch Repair

BER Base Excision Repair

ATP Adenosine Triphosphate

DC Dendritic Cells

IMI Individualised Multimodal Immunotherapy

APCs Antigen-Presenting Cells

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptors

PKC Protein Kinase C

HDAC Histone Deacetylases

CDK Cyclin-Dependent Kinases

TKI Tyrosine Kinase Inhibitors

CAR Chimeric Antigen Receptors

MMP Matrix Metalloproteinases

EGCG Epigallocatechin Gallate

RES Resveratrol

HGF Hepatocyte Growth Factor

PDGF Platelet-Derived Growth Factor

MTT 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS Fetal Bovine Serum

DMSO Dimethyl Sulfoxide

PBS Phosphate-Buffered Saline

PI Propidium Iodide

EMA European Medicines Agency

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ & ΔΟΜΗ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το Νευρικό Σύστημα διαιρείται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Τα δύο συστήματα είναι λειτουργικά συνυφασμένα, παρ' όλο που είναι ανατομικά ανεξάρτητα,. Το ΚΝΣ αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, τα κύρια κέντρα στα οποία επιτελείται η συσχέτιση και ολοκλήρωση των νευρικών πληροφοριών. Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός περιβάλλονται από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) και προστατεύονται από τα οστά του κρανίου, την σπονδυλική στήλη και από περιβλήματα συνδετικού ιστού, τις μήνιγγες. Το ΠΝΣ αποτελείται από τα εγκεφαλικά και τα νωτιαία νεύρα, τα νευρικά γάγγλια (αισθητικά και αυτόνομα), τους υποδοχείς και τις τελικές κινητικές πλάκες. Τα εγκεφαλικά και τα νωτιαία νεύρα του ΠΝΣ εξαπλώνονται παντού, μεταφέροντας πληροφορίες προς και από το ΚΝΣ. Το ΠΝΣ συνδέει το ΚΝΣ με τους αισθητικούς υποδοχείς αλλά και με τα εκτελεστικά όργανα. (1) **(Σχήμα 1)** Ο νευρικός ιστός είναι κυτταροβριθής και αποτελείται από δύο κυτταρικούς τύπους, τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες) και την νευρογλοία (γλοιακά κύτταρα). Ο εγκέφαλος ενήλικα περιέχει stem κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες. Τα νευρικά κύτταρα επιτελούν τις βασικές λειτουργίες του ΚΝΣ. Χρησιμοποιούν για την πρόσληψη, αγωγή και μεταβίβαση των διεγέρσεων και αποτελούν το κύριο συστατικό της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα υπάρχουν περίπου 10^{10} νευρικά κύτταρα. Οι νευρώνες είναι ειδικοί στο να μεταφέρουν πληροφορίες από το ένα μέρος του σώματος στο άλλο. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι νευρώνων αλλά οι πλείστοι έχουν κοινά ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά: Κυτταρικό σώμα (soma), μία ή περισσότερες, λεπτές αποφυάδες (νευράξονες/δενδρίτες), μία περιοχή εισόδου (δενδρίτες /soma), μία περιοχή αγωγής-μεταφοράς (νευράξων), μία εκκριτική (output) περιοχή, την έξοδο με τελικά άκρα. (2) **(Σχήμα 2)**

Η δομική ταξινόμηση των νευρώνων βασίζεται στον αριθμό των αποφυάδων του κυτταρικού σώματος. Είναι οι πολύπολοι με πολλούς δενδρίτες και έναν νευράξονα

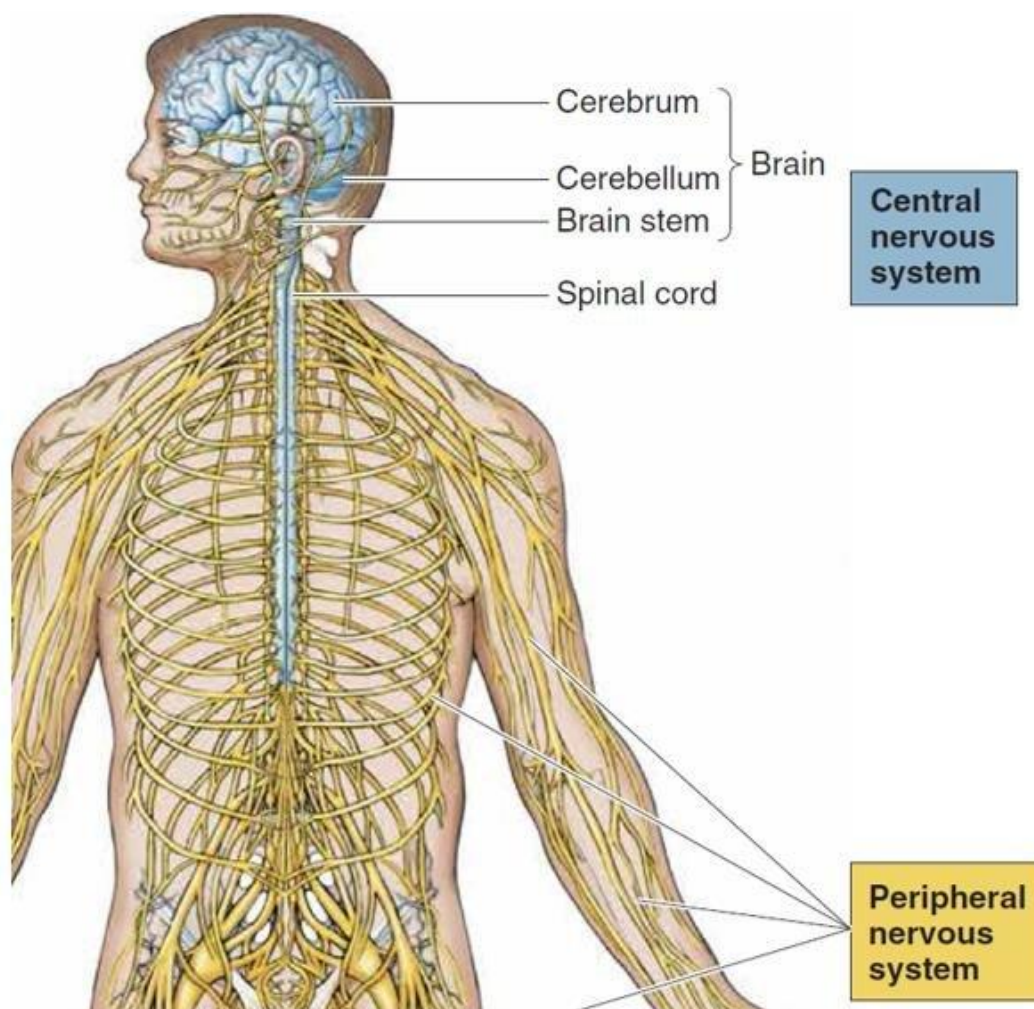
όπου είναι ο πιο κοινός τύπος κυττάρου στον εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό. Οι δίπολοι νευρώνες με ένα κύριο δενδρίτη και έναν νευράξονα. Είναι ασυνήθιστοι και συναντώνται σε κοχλιακό γάγγλιο, αιθουσαίο γάγγλιο, οσφρητικό βλεννογόνο και αμφιβληστροειδή. Οι μονόπολοι νευρώνες με μία αποφυάδα, είναι αισθητικοί μόνο (αφής, έκτασης). Αναπτύσσονται από έναν δίπολο νευρώνα στο έμβρυο, ο άξονας και ο δενδρίτης συγχωνεύονται και στη συνέχεια διακλαδώνονται σε δύο διακλαδώσεις κοντά στο σώμα. Και οι δύο έχουν τη δομή των νευραξόνων. Ο άξονας που προεξέχει προς την περιφέρεια είναι ο δενδρίτης. Επιπλέον αναφέρονται στην δομική ταξινόμηση και άλλοι νευρώνες όπως τα κύτταρα Purkinje στην παρεγκεφαλίδα, τα Renshaw στο Νωτιαίο Μυελό, τα πυραμιδικά κ.α., σύμφωνα με τους Ιστολόγους που πρώτοι τα περιέγραψαν από την εμφάνισή τους. (3)

Η Νευρογλοία (glial) είναι υποστηρικτικά κύτταρα, μικρότερα από τους νευρώνες και 5 έως 50 φορές περισσότερα σε αριθμό. Δεν παράγουν ηλεκτρικές ώσεις και διαιρούνται με μίτωση. Υπάρχουν τέσσερις τύποι στο ΚΝΣ. Τα αστροκύτταρα (Astrocytes), τα μεγαλύτερα γλοιακά κύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα (Oligodendrocytes) που παράγουν το έλυτρο μυελίνης το οποίο εξασφαλίζει την ηλεκτρική μόνωση στο ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά που δρουν σαν μακροφάγα (Microglia) και τα επενδυματικά κύτταρα (Ependymal) τα οποία σχηματίζουν επιθηλιακή μεμβρανική επένδυση στις εγκεφαλικές κοιλότητες (κοιλίες) και κεντρικά. Επιπλέον παράγουν και διευκολύνουν την κυκλοφορία του ΕΝΥ που βρίσκεται στις κοιλίες του εγκεφάλου. (4)

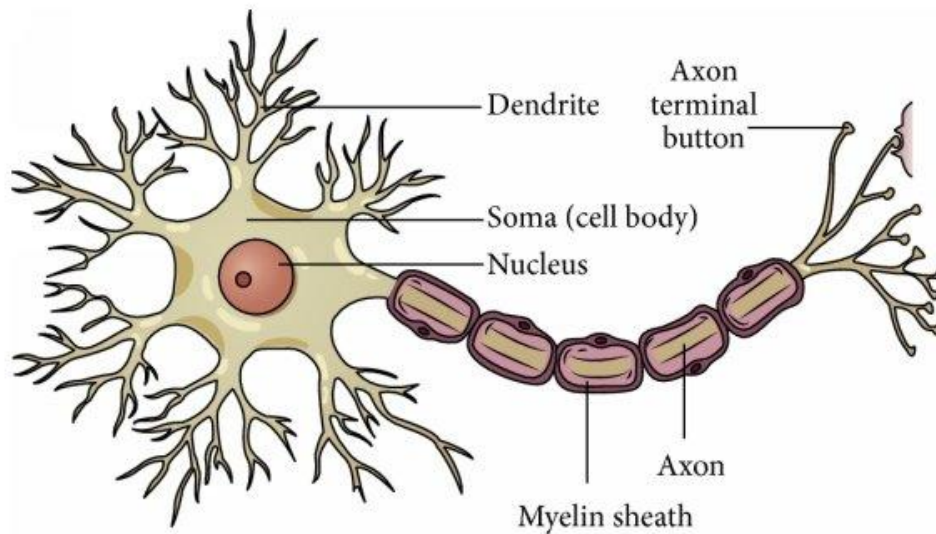
Στο ΠΝΣ συναντάμε δύο τύπους γλοίας. Τα Δορυφόρα κύτταρα, ομάδες κυττάρων που περιβάλλουν τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων κυρίως στα γάγγλια, καθώς και τα κύτταρα Schwann που σχηματίζουν έλυτρα μυελίνης γύρω από τις μεγάλες νευρικές ίνες. Η νευρογλοία χρησιμεύει για την στήριξη, την απομόνωση και την θρέψη των νευρώνων. Βοηθάει στον σχηματισμό και την διατήρηση του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (BBB), προσδίδει δομική στήριξη στους νευρώνες, διατηρεί το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη γένεση των νευρικών ερεθισμάτων (δυναμικών ενέργειας) και από αριθμητικής πλευράς υπερέχει των νευρώνων. (5)

Η φαιά ουσία αποτελεί περιοχή σχετικά πλούσια σε νευρικά κύτταρα μαζί με τα εγγύς τμήματα των αποφυάδων τους, και τα γλοιακά κύτταρα τα οποία περιβάλλουν και στηρίζουν τα νευρικά κύτταρα. Η λευκή ουσία αποτελείται κυρίως από εμύελες νευρικές ίνες (νευράξονες) και νευρογλοία. (6) Το Νευρικό σύστημα διαιρείται στο

σωματικό και το αυτόνομο σύστημα. Και οι δύο λειτουργικές διαιρέσεις έχουν τμήματα στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα, το οποίο νευρώνει όργανα των οποίων η λειτουργία δεν εξαρτάται από την βούλησή μας, υποδιαιρείται σε δύο τμήματα, το Συμπαθητικό και το Παρασυμπαθητικό σύστημα. Το καθένα απ' αυτά έχει από ένα κεντρικό μέρος, τους πυρήνες, και ένα περιφερικό μέρος, τα νεύρα και τα γάγγλια, με προσαγωγές και απαγωγές νευρικές ίνες. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα εξυπηρετεί την ανταπόκριση του σώματος, την ετοιμότητά του σε αυξημένες απαιτήσεις ενώ το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα την εξοικονόμηση και αποθήκευση ενέργειας. (7)



Σχήμα 1. Κύρια τμήματα του Νευρικού Συστήματος (Lamine, Houssein. (2016). *Contribution to the development of an experimental device based on a robotic platform for gait rehabilitation.*)



Σχήμα 2. Σχηματικό διάγραμμα ενός πολύπολου νευρώνα (ο πιο συνηθής). (Pu, Dong-Mei & Gao, Da-Qi & Yuan, Yu-Bo. (2014). *A Primal Analysis System of Brain Neurons Data*. *TheScientificWorldJournal*. 2014. 348526. 10.1155/2014/348526.)

1.1.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΝΣ

Το ΚΝΣ απαρτίζεται από επτά ευδιάκριτους σχηματισμούς. Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, τον διάμεσο εγκέφαλο με τα βασικά γάγγλια, τον μέσο εγκέφαλο, την γέφυρα, τον προμήκη μυελό, την παρεγκεφαλίδα και τον νωτιαίο μυελό. (8)

Το νευρικό σύστημα αναπτύσσεται από το εμβρυϊκό εξώδερμα κατά το τέλος της 3^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας. Γενικά, το ΚΝΣ προέρχεται από τον νευρικό σωλήνα και το μεγαλύτερο μέρος του ΠΝΣ από την νευρική ακρολοφία. Από την νευρική ακρολοφία προέρχονται και τα κύτταρα του Schwann (τροποποιημένα ολιγοδενδροκύτταρα του ΠΝΣ), τα μελανοκύτταρα και οι μήνιγγες.

Την 3^η εβδομάδα της εμβρυϊκής διάπλασης σχηματίζεται η νευρική (μυελική) πλάκα από την ραχιαία μέση γραμμή του εξωδέρματος η οποία αυξάνεται και παχύνεται. Αναπτύσσεται κεντρικά η νευρική αύλακα και τα περιφερικά χείλη σχηματίζουν τις νευρικές πτυχές. Οι νευρικές πτυχές συμπλησιάζουν με την περαιτέρω ανάπτυξη και ενώνονται στην μέση γραμμή. Έτσι, η νευρική αύλακα μετατρέπεται στον νευρικό σωλήνα. Η συνένωση των νευρικών πτυχών αρχίζει περίπου από την μεσότητα της

αύλακας και επεκτείνεται προς το κεφαλικό και ουραίο άκρο, τα οποία είναι ανοιχτά (πρόσθιοι και οπίσθιοι νευροπόροι). Οι νευροπόροι συγκλείνονται πριν το τέλος της 4^{ης} εμβρυικής εβδομάδας. Τα κύτταρα στα πλάγια χείλη της νευρικής πλάκας αποχωρούν και σχηματίζουν μια λωρίδα, μεταξύ του νευρικού σωλήνα και του επιφανειακού εξωδέρματος, την νευρική ακρολοφία. Την 4^η εβδομάδα, το άνω στέλεχος του νευρικού σωλήνα, έχει πάχος περίπου όσο ένα κύτταρο. Κατά την διάρκεια της μεταμόρφωσης του νευρικού σωλήνα στο ΚΝΣ γίνεται αύξηση αλλά και κυτταρική διαφοροποίηση. Το κεφαλικό άκρο του νευρικού σωλήνα διευρύνεται και σχηματίζονται τα τρία πρωτογενή εγκεφαλικά κυστίδια: το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο εγκεφαλικό κυστίδιο. Το υπόλοιπο οπίσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα επιμηκώνεται και θα αποτελέσει τον νωτιαίο μυελό. Η κοιλότητα μέσα στον νευρικό σωλήνα σχηματίζει τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού και τις κοιλίες του εγκεφάλου. Τα αισθητικά γάγγλια των εγκεφαλικών και νωτιαίων νεύρων και τα γάγγλια του αυτόνομου νευρικού συστήματος προέρχονται από την νευρική ακρολοφία. Μέχρι την 5^η εμβρυική εβδομάδα, τα τρία πρωτογενή εγκεφαλικά κυστίδια συμπληρώνουν την διαμόρφωσή τους. Γίνεται η υποδιαίρεση του πρόσθιου εγκεφαλικού κυστιδίου σε δύο δευτερογενή κυστίδια (τελικός εγκέφαλος και διάμεσος εγκέφαλος) και του οπίσθιου εγκεφαλικού κυστιδίου (μετεγκέφαλος και μυελεγκέφαλος). Κάθε εγκεφαλικό ημισφαίριο αρχίζει να διαπλάθεται κατά την 5^η εμβρυική εβδομάδα και ταυτόχρονα αυξάνεται και διογκώνεται ταχέως. Λόγω της μεγάλης εξάπλωσής τους, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια ξεπερνούν και επικαλύπτουν τον μέσο και τον οπίσθιο εγκέφαλο. (9)

1.2 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ ΚΝΣ

1.2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Στον εγκέφαλο και το ΚΝΣ εμφανίζονται περισσότεροι από 100 ιστολογικά διακριτοί τύποι πρωτοπαθών όγκων. Οι πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ αναφέρονται σε μια ετερογενή ομάδα όγκων που προέρχονται από κύτταρα εντός του ΚΝΣ και μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι κακοήθεις πρωτοπαθείς όγκοι του εγκεφάλου παραμένουν απ' τους πιο δύσκολους στην θεραπεία καρκίνους, με συνολική πενταετή

επιβίωση όχι μεγαλύτερη από 35%. (10) Παρ' όλο που οι πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ αντιπροσωπεύουν μόνο το 2% όλων των πρωτοπαθών καρκίνων, προκαλούν το 7% των θανάτων από καρκίνο για άτομα ηλικίας κάτω των 70 ετών. (11) Οι πιο συχνοί κακοήθεις πρωτοπαθείς όγκοι εγκεφάλου στους ενήλικες είναι τα γλοιώματα. Το γλοίωμα είναι ένας ευρύς όρος που περιγράφει νευροεπιθηλιακούς όγκους που προέρχονται από τα νευρογλοιακά κύτταρα ή τα υποστηρικτικά κύτταρα του ΚΝΣ. Τα νευρογλοιακά κύτταρα, ο πιο άφθονος τύπος κυττάρων στο ΚΝΣ, περιβάλλουν, μονώνουν και παρέχουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στους νευρώνες. Τα γλοιώματα περιλαμβάνουν το αστροκύτωμα [συμπεριλαμβανομένου του γλιοβλαστώματος (GBM)], το ολιγοδενδρογλοίωμα, το επενδύωμα, το ολιγοαστροκύτωμα (μεικτό γλοίωμα) και μερικές άλλες σπάνιες ιστολογίες. (12)

Η συντριπτική πλειοψηφία των νευρογλοιακών νεοπλασμάτων σε ενήλικες ασθενείς είναι τα διάχυτα γλοιώματα. Αυτά τα γλοιώματα χαρακτηρίζονται από διάχυτη διηθητική ανάπτυξη εντός του παρεγχύματος του ΚΝΣ, με τα καρκινικά κύτταρα να εισβάλλουν μεμονωμένα ή ως ομάδες κυττάρων που σχηματίζουν ένα δίκτυο. Μόνο λίγα ακόμα νεοπλάσματα μπορούν να εμφανίσουν το χαρακτηριστικό αυτό μοτίβο διάχυτης κυτταρικής εισβολής, όπως ειδικά λεμφώματα και σπάνια παραδείγματα μικροκυτταρικού νευροενδοκρινικού καρκινώματος ή μελανώματος. (13)

Η πιο κοινή ομάδα πρωτοπαθών όγκων του ΚΝΣ είναι τα αστροκυτταρικά γλοιώματα, τα οποία αντιπροσωπεύουν έως και τα δύο τρίτα όλων των όγκων γλοιακής προέλευσης. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), που ταξινομεί τους όγκους του ΚΝΣ, αναγνωρίζει συνολικά επτά διακριτές ιστολογικές οντότητες αστροκυτταρικών νεοπλασμάτων. Συγκεκριμένα, το διάχυτο αστροκύτωμα, το αναπλαστικό αστροκύτωμα, το GBM, την εγκεφαλική γλοιωμάτωση, το πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα, το πλειομορφικό ξανθοαστροκύτωμα και το υποεπενδυμικό γιγαντιαίο αστροκύτωμα. (14) Αυτές μπορούν να χωριστούν χονδρικά σε δύο μεγάλες ομάδες: α) οι διάχυτα διεισδυτικοί αστροκυτταρικοί όγκοι, που περιλαμβάνουν το διάχυτο αστροκύτωμα, το αναπλαστικό αστροκύτωμα και το GBM και αποτελούν την πιο κοινή ομάδα καθώς και β) η λιγότερο συχνή ομάδα αστροκυτταρικών όγκων που εμφανίζουν πιο περιορισμένη ανάπτυξη και περιλαμβάνει το πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα, το πλειομορφικό ξανθοαστροκύτωμα και το υποεπενδυμικό γιγαντιαίο αστροκύτωμα. Η εγκεφαλική γλοιωμάτωση προστέθηκε το 2007 στην ομάδα αστροκυτταρικών όγκων επειδή δεν θεωρείται ως

διακριτή οντότητα αλλά ως παραλλαγή του διάχυτα αναπτυσσόμενου αστροκυτταρικού γλοιώματος με ασυνήθιστα εκτεταμένη διήθηση μεγάλων τμημάτων του εγκεφάλου και περιστασιακά ακόμη και του νωτιαίου μυελού. (15) Ο Γερμανός παθολόγος Rudolf Virchow (1821–1902) ήταν ο πρώτος που διαχώρισε τα γλοιώματα από άλλους πρωτοπαθείς όγκους του εγκεφάλου, όπως τα μηνιγγιώματα, τα μελανώματα και τους σαρκωματοώδεις όγκους του ΚΝΣ. Η πρώτη συστηματική ταξινόμηση των γλοιωμάτων σύμφωνα με καθορισμένα ιστολογικά κριτήρια χρονολογείται το 1926, με την θεμελιώδη δημοσίευση των Bailey and Cushing. (16)

Τα ολιγοδενδρογλοιώματα και τα ολιγοαστροκυττώματα έχουν ομαδοποιηθεί ως ολιγοδενδρογλοιακά νεοπλάσματα και αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% των διάχυτων γλοιωμάτων. Οι ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι εμφανίζονται συχνότερα στον μετωπιαίο λοβό και συνήθως περισσότεροι στους άνδρες απ' ό,τι στις γυναίκες, με την μέγιστη επίπτωση σε ηλικίες μεταξύ 50 και 60 ετών. Οι περισσότεροι ασθενείς με ολιγοδενδρογλοιώματα παρουσιάζουν επιληπτικές κρίσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ασθενείς που εμφάνιζαν γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις είχαν συχνότερα μεγαλύτερο βαθμό αλλοίωσης στις μετωπιαίες περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του φλοιού. Αντίθετα ασθενείς με λιγότερες κρίσεις εμφάνιζαν τα ολιγοδενδρογλοιώματα πιο ουραίο-πλάγια στο κόγχιο μετωπιαίο και στους κροταφικούς λοβούς. Οι ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι είναι σημαντικές κυτταρικές βλάβες σε κεντρικές περιοχές, με στενά συνδεδεμένα μικρά κύτταρα. Σε περιοχές με λιγότερα κύτταρα, όπως στην περιφέρεια του όγκου, η διάχυτη διηθητική ανάπτυξη εκτιμάται εύκολα, καθώς υπάρχει εμφανής σχηματισμός δευτερογενούς δομής, όπως συσσώρευση καρκινικών κυττάρων γύρω από υπάρχοντες νευρώνες, φλοιώδη μικρά αγγεία και κάτω απ' την επιφάνεια του πτερυγίου. (17)

Τα επενδυμώματα είναι νευροεπιθηλιακοί όγκοι που μπορεί να προκύψουν από τα επενδυματικά κύτταρα των εγκεφαλικών κοιλιών, τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού ή τα φλοιώδη εξαρτήματα. Ως εκ τούτου μπορεί να εμφανιστούν είτε στον εγκέφαλο, είτε στον νωτιαίο μυελό. Τα σπονδυλικά επενδυμώματα είναι λιγότερα συχνά και εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τα ενδοκρανιακά. (18) Σύμφωνα με το Central Brain Tumor Registry των ΗΠΑ, η ετήσια εμφάνιση επενδυμωμάτων κυμαίνεται από 0,29 έως 0,6 ανά 100.000 άτομα. (19) Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν το 1,6-1,8% όλων των πρωτοπαθών όγκων του ΚΝΣ και είναι αναλογικά πιο συχνοί στα παιδιά απ' ό,τι στους ενήλικες. Επιπλέον, εμφανίζονται

ελαφρώς συχνότερα στα αρσενικά απ' ότι στα θηλυκά άτομα. Η εντόπιση του όγκου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία του ασθενούς, καθώς περίπου το 90% των επενδυωμάτων σε παιδιά εντοπίζονται ενδοκρανιακά, και το 65% των ενηλίκων εντοπίζονται στον νωτιαίο μυελό. (20) Σε πρόσφατη μοριακή ταξινόμηση διακρίνονται 9 υποομάδες επενδυωμάτων που φαίνεται να αντικατοπτρίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την βιολογική, κλινική και ιστοπαθολογική ετερογένεια, τις ηλικιακές ομάδες και τους βαθμούς των όγκων. (21)

Αν και τα γλοιώματα εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στους τέσσερις λοβούς του εγκεφάλου [μετωπιαίο (23,6%), κροταφικό (17,4%), βρεγματικό (10,6%) και ινιακό (2,8%)], ένα μικρό ποσοστό μπορεί να εμφανιστεί στο εγκεφαλικό στέλεχος, στην παρεγκεφαλίδα και στον νωτιαίο μυελό. (22) Οι κακοήθεις όγκοι του εγκεφάλου είναι πιο συχνοί στους άνδρες, ενώ τα μηνιγγιώματα και άλλοι μη κακοήθεις όγκοι είναι πιο συχνοί στις γυναίκες. Επιπρόσθετα, οι πρωτοπαθείς όγκοι εμφανίζονται πιο συχνά στους λευκούς απ' ότι σε άλλες φυλές. Η μέση ηλικία διάγνωσης για όλους τους όγκους εγκεφάλου και ΚΝΣ είναι τα 59 έτη. Τα ποσοστά επίπτωσης των γλοιωμάτων ποικίλουν ανάλογα με την ιστολογία, με τα πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα να εμφανίζονται περισσότερο σε παιδιά και εφήβους, τα ολιγοδενδρογλοιώματα χαμηλού βαθμού να κορυφώνονται στις ηλικίες 30 έως 40, και το GBM σε άτομα ηλικίας 60 και 70 ετών. (23) Στον **Πίνακα 1** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά επιλεγμένων γλοιωμάτων.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά γλοιωμάτων (Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. *Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. Ann Transl Med.* 2015 May;3(7):95)

WHO GRADE		ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ (ΚΑΤΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ)	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΗ 5ΕΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (%)
Low grade	I	Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα	5.1	• Πιο συχνό στον εγκέφαλο, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί στις οδούς του οπτικού νεύρου, στην παρεγκεφαλίδα και στο εγκεφαλικό στέλεχος	98

				• Αργή ανάπτυξη, συνήθως καλοήγη, συχνά κυστική • Εμφανίζεται συχνότερα σε παιδιά και εφήβους	
	II	Ολιγοδενδρογλοίωμα (5%) Αστροκύττωμα (17.4%) Ολιγοαστροκύττωμα (5.6%)	28.0	• Σπάνια αναπτύσσονται εκτός εγκεφάλου • Τείνουν αναπτύσσονται αργά • Συχνή σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 20 έως 50	50
High grade	III	Αναπλαστικό αστροκύττωμα Αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα Αναπλαστικό ολιγοαστροκύττωμα	6.7	• Αναπτύσσεται ταχύτερα και πιο επιθετικά απ' του βαθμού II • Τείνουν να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς • Πιο συχνή στις ηλικίες 30 έως 50 • Πιο συχνή στους άνδρες απ' ότι στις γυναίκες	30
	IV	Γλοιοβλάστωμα	55	• Μπορεί να αναπτυχθεί άμεσα (de novo) ή να εξελιχθεί από όγκο χαμηλού βαθμού • Ιδιαίτερα επεμβατική στον εγκέφαλο • Πιο συχνή σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας από παιδιά και σε άνδρες απ' ότι σε γυναίκες	<5

Τα τελευταία χρόνια, οι μοριακοί δείκτες έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία στη διάγνωση και την ταξινόμηση των γλοιωμάτων, κυρίως επειδή έχει αποδειχθεί ότι προβλέπουν τη βιολογική συμπεριφορά αυτών των όγκων καθώς και την πρόγνωσή τους. Στην ταξινόμηση του 2016, ο ΠΟΥ συνέστησε την ενσωμάτωση της αξιολόγησης των μοριακών δεικτών στην έρευνα ορισμένων όγκων του ΚΝΣ. Στην πιο πρόσφατη ταξινόμηση του (2021), η σύσταση αυτή επεκτάθηκε ώστε να συμπεριλάβει νέους βιοδείκτες. Για τα γλοιώματα, οι βασικές διαφορές ήταν η διαίρεση μεταξύ γλοιωμάτων ενηλίκου και παιδιατρικού τύπου, ο συνδυασμός

ιστολογικών και μοριακών ευρημάτων στην ταξινόμηση των νεοπλασμάτων της γλοίας, η αναγνώριση νέων νεοπλασματικών οντοτήτων και η αναθεώρηση της ονοματολογίας, συμπεριλαμβανομένης της κατάργησης όρων ταξινόμησης όπως αναπλαστικό. Τα γλοιώματα ενηλίκου και παιδιατρικού τύπου αναμένεται να εμφανίζονται συχνότερα, αν και όχι αποκλειστικά, στις αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες. Παρ' όλα αυτά, τα γλοιώματα ενηλίκου τύπου σπάνια επηρεάζουν παιδιατρικούς ασθενείς και αντίστροφα. Επιπλέον, η ταξινόμηση του ΠΟΥ του 2021 κατέργησε τη χρήση λατινικών αριθμών στην ιστολογική ταξινόμηση των όγκων, συνιστώντας τη χρήση αραβικών αριθμών προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση μεταξύ των βαθμών II και III, ειδικά επειδή αυτή η νέα ταξινόμηση κατέργησε επίσης τη χρήση ορισμένων όρων που τροποποιούσαν την ιστολογική ταξινόμηση (24)

Η νέα ταξινόμηση του ΠΟΥ (2021) περιλαμβάνει μόνο τρεις κατηγορίες διάχυτων γλοιωμάτων ενήλικου τύπου. Αυτές είναι το αστροκύτωμα με μετάλλαξη ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH-mutant astrocytoma), το ολιγοδενδρογλοίωμα με μετάλλαξη 1p/19q ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH-mutant 1p/19q-codeleted oligodendroglioma) και το GBM άγριου τύπου IDH (IDH wild-type glioblastoma). Όσον αφορά τα διάχυτα γλοιώματα παιδιατρικού τύπου, αυτά διακρίνονται σε χαμηλού και υψηλού βαθμού, τα οποία διαφέρουν σημαντικά ως προς την κλινική προσέγγιση, τη χειρουργική αντιμετώπιση και την πρόγνωση. Η νέα ταξινόμηση περιλαμβάνει τέσσερις οντότητες στην ομάδα των διάχυτων γλοιωμάτων χαμηλού βαθμού παιδιατρικού τύπου. Το διάχυτο αστροκύτωμα με τροποποίηση MYB/MYBL1 (MYB/MYBL1-altered diffuse astrocytoma), το αγγειοκεντρικό γλοίωμα (angiocentric glioma), ο πολύμορφος χαμηλού βαθμού νευροεπιθηλιακός όγκος των νέων (polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young) και το διάχυτο χαμηλού βαθμού γλοίωμα με τροποποίηση της οδού πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνο (mitogen-activated protein kinase pathway-altered diffuse low-grade glioma). Τα παιδιατρικά διάχυτα γλοιώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας περιλαμβάνουν μεθυλίωση της ιστόνης 3 (H3) σε διάχυτο γλοίωμα μέσης γραμμής με αλλοίωση της λυσίνης 27 (H3K27) [methylation of histone 3 (H3) on lysine 27 (H3K27)-altered diffuse midline glioma], διάχυτο ημισφαιρικό γλοίωμα με μετάλλαξη στην γλυκίνη 34 της H3 (H3G34) [glycine 34 of H3 (H3G34)-mutant diffuse hemispheric glioma], διάχυτο παιδιατρικό γλοίωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας άγριου τύπου H3, IDH (H3 wild-type, IDH wild-type pediatric-type

diffuse high-grade glioma) και ημισφαιρικό γλοίωμα παιδιατρικού τύπου (pediatric-type hemispheric glioma). Αυτή η ομάδα όγκων έχει επιθετική συμπεριφορά και κακή πρόγνωση. Τέλος, μια σημαντική αλλαγή στην νέα ταξινόμηση είναι ότι ο όρος GBM αναφέρεται μόνο στο διάχυτο αστροκυτταρικό γλοίωμα άγριου τύπου IDH ενηλίκων και δεν ισχύει πλέον για τα γλοιώματα παιδιατρικού τύπου. (25) Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζεται η ταξινόμηση γλοιωμάτων του ΠΟΥ του 2021.

Πίνακας 2. Κατάταξη Γλοιωμάτων του ΠΟΥ 2021. (NA = not assigned) (Komori, Takashi. (2022). *The 2021 WHO classification of tumors, 5th edition, central nervous system tumors: the 10 basic principles. Brain Tumor Pathology.* 39. 10.1007/s10014-022-00428-3.)

GLIOMAS	WHO GRADE
Adult-type diffuse gliomas	
• Astrocytoma, IDH-mutant	2/3/4
• Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted	2/3
• Glioblastoma, IDH-wildtype	4
Pediatric-type diffuse low-grade gliomas	
• Diffuse astrocytoma, MYB-or MYBL1-altered	1
• Angiocentric glioma	1
• Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	1
• Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered	NA
Pediatric-type diffuse high-grade gliomas	
• Diffuse midline glioma, H3 K27-altered	4
• Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant	4
• Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype	4
• Infant-type hemisph	NA

1.2.2 ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

Το GBM είναι ένα γλοίωμα 4^{ου} βαθμού, σύμφωνα με την κατάταξη του ΠΟΥ, και μία απ' τις πιο επιθετικές κακοήθειες του ΚΝΣ. Πρόκειται για τον πιο κοινό κακοήγη πρωτοπαθή όγκο του ΚΝΣ. Το GBM ευθύνεται για περίπου τους μισούς κακοήθεις όγκους του ΚΝΣ με 5ετή επιβίωση περίπου 7,2%. (26) Η συχνότητα εμφάνισης του

GBM αυξάνεται με την ηλικία και είναι μεγαλύτερη στους άνδρες παρά στις γυναίκες. Επιπλέον το GBM εμφανίζεται πιο συχνά στους Καυκάσιους απ' ό,τι σε άλλες εθνότητες. Η εξάπλωση του όγκου πέρα από το ΚΝΣ είναι σπάνια. Οι πιο συχνές θέσεις εξωκρανιακής μετάστασης είναι οι πνεύμονες και ο υπεζωκότας. (27) Έχει διαπιστωθεί ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία και τα καθορισμένα γενετικά σύνδρομα είναι οι μόνοι παράγοντες κινδύνου που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα για το GBM.

Ο ακτινογραφικός χαρακτηρισμός του GBM γίνεται με μαγνητική τομογραφία (MRI), η οποία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την διάγνωση και την διαχείριση μετά την θεραπεία. Το μέγεθος του όγκου την στιγμή της διάγνωσης είναι συνήθως γύρω στα 4cm. (28) Η οριστική διάγνωση βασίζεται σε ιστοπαθολογικές αναλύσεις του διεγχειρητικά αφαιρεθέντος όγκου ή των τμημάτων του, χρησιμοποιώντας παραδοσιακές ιστολογικές, κυτταρολογικές και ιστοχημικές μεθόδους. Όταν η νευροχειρουργική εκτομή της βλάβης είναι αδύνατη, πραγματοποιείται βιοψία αναρρόφησης με λεπτή βελόνα. (26)

Η ινώδης όξινη πρωτεΐνη των γλοιακών ινών (GFAP) είναι μέρος της οικογένειας κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και εκφράζεται ευρέως σε αστρογλοιακά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα GBM. Η απώλεια της έκφρασης του GFAP υποδεικνύει σημαντικά αδιαφοροποίητα κύτταρα όγκου, αλλά δεν καθορίζει την εξέλιξη και την ανάπτυξη του όγκου. Μπορεί, συνεπώς, να προκύψει το συμπέρασμα ότι η GFAP ορού αποτελεί διαγνωστικό βιοδείκτη για το GBM. (29)

1.2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Παρ' όλο που τα γλοιώματα στην πλειονότητά τους εμφανίζονται σποραδικά χωρίς κάποια υποκείμενη οικογενειακή διαταραχή, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γλοιωμάτων και κάποιων σπάνιων κληρονομικών συνδρόμων. Η αναγνώρισή τους έχει σημαντικές επιπτώσεις στην διαχείριση και την πρόγνωση του ασθενούς. Οι ασθενείς με κακοήθειες του ΚΝΣ που σχετίζονται με κάποιο σύνδρομο εμφανίζουν συχνά πολλαπλούς όγκους, είτε περιορισμένους σε μία περιοχή είτε κατανεμημένους σε όλο το σώμα, με παρόμοια ή διαφορετική ιστολογία. (30)

Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται οικογενή σύνδρομα που σχετίζονται με τα γλοιώματα, καθώς και το γονίδιο που σχετίζεται με κάθε σύνδρομο. Τα βασικότερα σύνδρομα

είναι της φακωμάτωσης, το Li-Fraumeni Syndrome (LFS), της εγchonδρωμάτωσης, και το Polyposis. (31)

Το σύνδρομο της φακωμάτωσης είναι μια ομάδα νευροδερματικών διαταραχών, στις οποίες εμπλέκονται δομές που προέρχονται από το εμβρυϊκό εξώδερμα. Οι διαταραχές αυτές προκύπτουν από μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και κληρονομούνται με αυτοσωμικό τρόπο. Η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF1) είναι η πιο κοινή ασθένεια φακωμάτωσης και το πιο κοινό οικογενές σύνδρομο που σχετίζεται με όγκους του ΚΝΣ. (32)

Η κονδυλώδης σκλήρυνση, γνωστή και ως νόσος του Bourneville, είναι το δεύτερο πιο κοινό σύνδρομο φακωμάτωσης μετά το NF1. Είναι μια αυτοσωμική διαταραχή που προδιαθέτει την ανάπτυξη καλοήθων βλαβών σε διάφορα όργανα του σώματος, κυρίως στον εγκέφαλο, την καρδιά, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το δέρμα και τους νεφρούς. Τα υποεπενδυματικά γιγαντοκυτταρικά αστροκυτώματα είναι χαρακτηριστικοί όγκοι που εμφανίζονται στο 10-20% των ασθενών με σύμπλεγμα κονδυλώδους σκλήρυνσης. Αυτοί οι όγκοι συνήθως αναπτύσσονται αργά αλλά η εξέλιξη τους οδηγεί τελικά στην απόφραξη των τρημάτων του Monro, με επακόλουθη αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση και υδροκεφαλία. (33)

Το σύνδρομο LFS είναι μια σπάνια αυτοσωμική επικρατούσα νόσος που προκαλείται από μία μετάλλαξη στο χρωμόσωμα p53. Οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ενός μεγάλου φάσματος όγκων, συμπεριλαμβανομένων των γλοιωμάτων και του GBM. Το 50% των ασθενών με LFS θα αναπτύξουν καρκίνο πριν από την ηλικία των 30. (34)

Άλλα σπάνια σύνδρομα, όπως το Rubinstein-Taybi και οι διαταραχές της εγchonδρωμάτωσης συνδέονται επίσης με την ανάπτυξη γλοιωμάτων. Το Rubinstein-Taybi είναι μία σπάνια, συγγενής, νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από κρανιοπροσωπικούς δυσμορφισμούς, σκελετικές δυσπλασίες και καθυστέρηση της ανάπτυξης και έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καλοήθων και κακοήθων όγκων του ΚΝΣ. (35)

Το οικογενές άτυπο σύνδρομο μελανώματος πολλαπλών σπίλων (familial atypical mole melanoma syndrome) (FAMMM) είναι ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από πολλαπλούς δυσπλαστικούς σπίλους, κακοήγη μελάνωμα, αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο παγκρέατος και σε ορισμένες περιπτώσεις όγκους του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων των αστροκυτωμάτων. (36) Τέλος, η νόσος Ollier όσο

και το σύνδρομο Maffucci είναι σπάνιες σκελετικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ανώμαλη ανάπτυξη οστών. Η νόσος Ollier έχει υψηλό κίνδυνο κακοηθειών του εγκεφάλου, οι οποίες εμφανίζονται στο 25% περίπου των ασθενών. (37) Το σύνδρομο Maffucci χαρακτηρίζεται από εγχονδρώματα (καλοήθεις όγκους των οστών που προέρχονται από χόνδρο) και αιμαγγειώματα, που εμφανίζονται συνήθως στα χέρια και πόδια. Οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο είναι επιρρεπείς στην ανάπτυξη άλλων κακοήθων βλαβών, όπως το γλοιώμα. (38)

Πίνακας 3: Οικογενή σύνδρομα σχετιζόμενα με γλοιώματα (Vijapura, Charmi, et al. "Genetic syndromes associated with central nervous system tumors." *Radiographics* 37.1 (2017): 258-280.)

ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ	ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ	ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟ ΓΛΟΙΩΜΑ
Νευροϊνωμάτωση	<i>NF1 (17q11.2)</i>	Αστροκύττωμα, γλοιώμα οπτικού νεύρου
Οζώδης σκλήρυνση (TSC)	Το 80% - 90% των μεταλλάξεων συμβαίνουν εντός του <i>TSC2 (16p13.3)</i> , το 10% - 20% στο <i>TSC1 (9q34)</i>	Γιγαντοκυτταρικό αστροκύττωμα
LFS	<i>P53(17p13.1)</i>	GBM, άλλα γλοιώματα
Σύνδρομο Lynch	Γονίδια επιδιόρθωσης DNA (<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>)	GBM, άλλα γλοιώματα
FAMMM syndrome	<i>P16/CDKN2A (9p21.3)</i>	Γλοιώμα
Διαταραχές εγχονδρομάτωσης : Νόσος Ollier / Σύνδρομο Maffucci	<i>IDH1/IDH2 (2q33.31/15q26.1)</i>	Γλοιώμα
Σύνδρομο Rubinstein-Taybi	<i>CREBBP</i>	Ολιγοδενδρογλοιώμα

1.2.4 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Τα γλοιώματα χαρακτηρίζονται, σε μεγάλο βαθμό, από τεράστια ετερογένεια. Σε αυτό οφείλεται η ανεπαρκής επιτυχία της θεραπείας τους αλλά και της συνολικής πρόγνωσης τους. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, και τα ανοσοκύτταρα είναι πολύ ετερογενείς κυτταρικοί πληθυσμοί και αλληλεπιδρούν με το μικροπεριβάλλον του όγκου, ευνοώντας την επιβίωσή του από οποιαδήποτε θεραπεία. Αλλάζουν το προφίλ γονιδιακής έκφρασης, την πλαστικότητα καθώς και την ανταπόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. (39) Καθώς αναπτύσσεται ο όγκος, οι εγγενείς ιδιότητες των κυττάρων βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του. Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα αφενός με την άμεση επικοινωνία κυττάρου- κυττάρου, αφετέρου μέσω χημειοκινών, κυτοκινών ή εξωκυτταρικών κυστιδίων. Αυτό προάγει την εξέλιξη και την εισβολή του όγκου, καθώς και την ανοσολογική διαφυγή, αλλά και την αντίσταση στην θεραπεία.

Τα γλοιώματα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες βάσει του βαθμού διεισδυτικότητας στον περιβάλλοντα εγκεφαλικό ιστό. Τα «διάχυτα γλοιώματα», όπου υπάρχει διάχυτη διήθηση του εγκεφαλικού παρεγχύματος, και τα γλοιώματα με πιο οριοθετημένη αναπτυξιακή συμπεριφορά. Τα διάχυτα γλοιώματα, λόγω της ικανότητάς τους να διεισδύουν στο περιβάλλον φυσιολογικό παρέγχυμα του εγκεφάλου, αναπόφευκτα επανεμφανίζονται ακόμα και μετά από ολική εκτομή. (40)

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των διάχυτων γλοιωμάτων είναι ότι οι χαμηλού βαθμού όγκοι, όπως βαθμού II του ΠΟΥ, με την πάροδο του χρόνου όχι μόνο υποτροπιάζουν αλλά τείνουν να εξελιχθούν σε υψηλού βαθμού (αναπλαστικά) γλοιώματα, βαθμού III του ΠΟΥ, και τελικά σε δευτεροπαθή GBM, βαθμού IV του ΠΟΥ, οδηγώντας σε ταχεία κλινική επιδείνωση.

Μέχρι πρότινος, τα γλοιώματα ταξινομούσαν κυρίως με βάση τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους ενώ κατά καιρούς λαμβάνονταν υπόψη και κλινικά ή/και ακτινολογικά χαρακτηριστικά των όγκων. Η ταξινόμηση του ΠΟΥ βασίζεται κυρίως στα ιστολογικά χαρακτηριστικά, και ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες (βαθμούς). Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα (1^ο βαθμού), Αστροκύτωμα, επενδύωμα, ολιγοδενδρογλοίωμα (2^ο βαθμού), Αναπλαστικό αστροκύτωμα (3^ο βαθμού) και GBM (4^ο βαθμού).

Τα τελευταία χρόνια, μελέτες του μοριακού προφίλ του γενετικού γονιδιώματος αποκάλυψαν χαρακτηριστικές γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους γλοιομάτων. Η εμφάνιση αυτών των μοριακών χαρακτηριστικών παρουσιάζει μια αλλαγή στον τρόπο προσέγγισης της διάγνωσης και της θεραπείας των κακοηθειών. Τα χαρακτηριστικά αυτά είτε περιγράφουν θεμελιώδη βιολογική συμπεριφορά είτε σχετίζονται κλινικά με την έκβαση του ασθενούς, μετά την χορήγηση κυτταροτοξικών ή μοριακά στοχευμένων παραγόντων. Σήμερα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την ταξινόμηση των γλοιομάτων, να οδηγήσουν σε εξατομικευμένη θεραπεία και να βελτιώσουν την πρόγνωση του ασθενούς. Με αυτή την συνθήκη, οι όγκοι ταξινομούνται, όχι μόνο με βάση μια στατική ιδέα για το πως «φαίνονται» στο μικροσκόπιο, αλλά με την ενσωμάτωση μοριακών δεικτών σχετικών με τις τρέχουσες θεραπευτικές μεθόδους.

Συνεπώς, η ταξινόμηση των όγκων του ΠΟΥ για το ΚΝΣ αναθεωρήθηκε το 2016 για να ενσωματώσει μοριακούς βιοδείκτες μαζί με τα κλασσικά ιστολογικά χαρακτηριστικά σε μια ολοκληρωμένη διάγνωση, προκειμένου να προσδιοριστούν οι τύποι των γλοιομάτων όσο το δυνατόν ακριβέστερα.

Στους σημαντικότερους μοριακούς βιοδείκτες περιλαμβάνονται:

Η **μετάλλαξη του γονιδίου *IDH1/IDH2*** που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 και κωδικοποιεί την human cytosolic NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase, ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος ως ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA και προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από καρκινογόνα αφαιρώντας αλκυλομαδες από το DNA. Πρόκειται για διαγνωστικό δείκτη για τα διάχυτα αστροκυττώματα 2^{ου} και 3^{ου} βαθμού κακοήθειας (WHO grade II) καθώς και για δευτεροπαθή GBMs. Επιπλέον, είναι ένας καλός προγνωστικός δείκτης ως προς την ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία.

Η **απώλεια *1p/19q*** (διαγραφή των χρωμοσωματικών σκελών) εμφανίζεται σε πάνω από 80% των ολιγοδενδρογλοιομάτων 2^{ου} βαθμού κακοήθειας κατά ΠΟΥ και σε περίπου 60% των αναπλαστικών ολιγοδενδρογλοιομάτων 3^{ου} βαθμού κακοήθειας κατά ΠΟΥ. Είναι κι αυτός ένας καλός προγνωστικός δείκτης με καλύτερη ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία.

Η **υπερμεθυλίωση του ενζύμου επιδιόρθωσης MGMT** (O6-μεθυλογουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση). Η μεθυλτρανσφεράση είναι υπεύθυνη για την άμεση

αποκατάσταση της βλάβης 06-meG. Η επιγενετική σίγαση, λόγω μεθυλίωσης προαγωγέα του γονιδίου *MGMT* εμποδίζει την σύνθεση αυτού του ενζύμου και ως συνέπεια καθιστά τα κύτταρα του GBM ή του αναπλαστικού ολιγοδενδρογλιώματος εξαιρετικά ευαίσθητα στην θεραπεία με τον αλκυλιωτικό παράγοντα Τεμοζολομίδη (TMZ).

Άλλοι σχετικοί βιοδείκτες που συμβάλουν στην διάγνωση των γλοιωμάτων περιλαμβάνουν την απώλεια έκφρασης του πυρηνικού *ATRX*, τη μετάλλαξη του προαγωγέα *TERT*, τη γονιδιακή σύντηξη *KIAA1549-BRAF*, και τις μεταλλάξεις *BRAF-V600E* και *H3F3A-G34*. Ενώ αντίστοιχες προσεγγίσεις που στοχεύουν σε θεραπείες αφορούν μεταλλαγμένο *EGFR* σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (41), καρκίνο μαστού ενισχυμένο με *HER2* (42), καρκίνο πνεύμονα που φιλοξενεί την μετατόπιση *EML4-ALK* (43), χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML) που φιλοξενεί την μετατόπιση *BCR-ABL* (44) και η μετάλλαξη *BRAF* στο μελάνωμα (45). Οι μοριακοί βιοδείκτες ενσωματώνονται όλο και πιο τακτικά στην ιστοπαθολογική διάγνωση, όπου ενδείκνυται, και έχουν διευκολύνει αρκετά την λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, μειώνοντας προοδευτικά το χρονικό πλαίσιο από την ανακάλυψη του στόχου έως την θεραπεία. Μια σημαντική πρωτοβουλία που συνέβαλε στην περιγραφή θεμελιωδών πτυχών των βιολογικών υποστρωμάτων του GBM και των γλοιωμάτων κατωτέρου βαθμού είναι «ο Άτλαντας του Γονιδιώματος του Καρκίνου (TCGA)» (46). Το έργο TCGA ξεκίνησε απ' το National Institutes of Health (NIH) και είναι μία ολοκληρωμένη και συντονισμένη προσπάθεια που εφαρμόζει πολλαπλά καινοτόμα εργαλεία γονιδιωματικής ανάλυσης για την κατανόηση της γενετικής και της επιγενετικής του καρκίνου. Περισσότεροι από 20 τύποι καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων περισσότερων από 10.000 δειγμάτων, υποβάλλονται σε λεπτομερή γονιδιωματικό χαρακτηρισμό και ενσωματώνονται περαιτέρω με στοιχεία βιοπληροφορικής και ανάλυσης δεδομένων. Αυτό επιτρέπει στους ερευνητές να εφαρμόζουν αυτές τις πληροφορίες για την πρόληψη, την διάγνωση και την θεραπεία του καρκίνου.

1.2.5 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

Το GBM χωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, το πρωτογενές και το δευτερογενές GBM. Το πρωτογενές GBM εμφανίζεται χωρίς γνωστή κλινική πρόδρομη κακοήθεια,

ενώ το δευτερογενές είναι αποτέλεσμα μοριακής εξέλιξης και αυξημένου βαθμού κακοήθειας ενός κατώτερου βαθμού γλοιώματος με την πάροδο του χρόνου. Η μετάλλαξη του κατασταλτικού ογκογονιδίου *PTEN*, η μετάλλαξη του προαγωγέα *TERT* και η υψηλού επιπέδου γονιδιακή ενίσχυση ορισμένων πρώτο-ογκογονιδίων, συνηθέστερα το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*EGFR*), είναι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στα πρωτογενή GBM, ενώ οι μεταλλάξεις του *IDH1/2*, *TP53* και *ATRX* είναι συχνά σε δευτερεύοντα GBM. (47) Στον **Πίνακα 4** συνοψίζονται οι βασικοί μοριακοί παράγοντες του GBM καθώς και το πως επηρεάζουν την εξέλιξη του όγκου.

Σε αρκετές πλέον μελέτες χρησιμοποιούνται γονιδιωματικές, επιγονιδιωματικές και μεταγραφικές προσεγγίσεις για τον λεπτομερή μοριακό χαρακτηρισμό των γλοιωμάτων. (46, 48) Ο εντοπισμός διακριτών και εξαιρετικά επαναλαμβανόμενων μοριακών αλλαγών έχει αρχίσει αφενός να αποσαφηνίζει μέρος της ποικιλομορφίας των γλοιωμάτων και αφετέρου να εισάγει νέες έννοιες στην ταξινόμηση των όγκων. Επιπλέον, αυτές οι μελέτες παρέχουν πληροφορίες για την βελτίωση των τρεχουσών θεραπευτικών στρατηγικών και την ανάπτυξη νέων για την διαχείριση αυτής της κακοήθειας.

Το μοριακό προφίλ διάχυτων γλοιωμάτων έχει μελετηθεί σε μεμονωμένα εργαστήρια, σε εθνικό επίπεδο στις ΗΠΑ από το δίκτυο TCGA (49) και σε διεθνές επίπεδο στο πλαίσιο της International Cancer Genome Consortium (ICGC). (50) Το GBM ήταν ένας από τους πρώιμους τύπους όγκων που διερευνήθηκε από το TCGA και ο χαρακτηρισμός του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος αυτών των όγκων παρείχε μια λεπτομερή εικόνα του γονιδιωματικού τους προφίλ και αποκάλυψε τις κύριες μοριακές αλλοιώσεις που μπορεί να συμβάλλουν στην βιοπαθολογία και την εξέλιξη της νόσου. (46,49)

Οι γνώσεις που αποκτήθηκαν απ' τα δεδομένα του έργου TCGA βασίζονται εν μέρει στην ικανότητα ενσωμάτωσης δεδομένων από διάφορες μοριακές πλατφόρμες (mRNA, miRNA, δεδομένα μεταλλάξεων, αριθμός αντιγράφων DNA, έκφραση πρωτεϊνών, μεθυλίωση DNA) για ένα εστιασμένο σύνολο δειγμάτων όγκων. Όπως άλλες αναλύσεις μεγάλης κλίμακας, έτσι και το TCGA, έχουν δείξει ότι το GBM είναι ένας ετερογενής τύπος όγκου σε μοριακό επίπεδο συνεπώς μπορεί να υποταξινομηθεί σε διακριτές ομάδες βάσει της μοριακής παθογένειας και τις βλάβες που απαιτούνται για την δημιουργία και εξέλιξη της νόσου.

Παρ' όλο που τέτοιες μελέτες είναι πολύ χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση του όγκου, δεν θα πρέπει να παραβλέπουμε το γεγονός ότι υπάρχουν πειραματικοί περιορισμοί στην εξαγωγή συμπερασμάτων. Για παράδειγμα, οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες αυτές δεν εντοπίστηκαν ομοιόμορφα. Ωστόσο, απ' αυτές τις μελέτες προκύπτουν σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες και υπάρχει μεγάλη ζήτηση για ακόμα περισσότερους και πιο αξιόπιστους που θα βελτιώσουν την θεραπεία της ασθένειας και πιθανόν θα συμβάλουν σε πιο εξατομικευμένη φροντίδα.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχει εντοπιστεί στα γλοιώματα, και ιδιαίτερα στο GBM, ένας μεγάλος αριθμός επαναλαμβανόμενων μοριακών αλλοιώσεων που επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό των γλοιωμάτων και την καλύτερη κατανόηση των οδών που διαταράσσονται. Αρχικά στο TCGA, συνδυάστηκαν η αλληλούχηση κατά Sanger με πλατφόρμες βασισμένες σε συστοιχίες για την ανάλυση μεταλλάξεων σε 601 γονίδια από 91 δείγματα. Στην μελέτη αυτή διερευνήθηκαν η γονιδιακή έκφραση, ο αριθμός αντιγράφων DNA, η μεθυλίωση του DNA και το προφίλ έκφρασης κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών RNA. Η μελέτη αυτή καθώς και μελέτες μεμονωμένων εργαστηρίων έχουν αποκαλύψει έναν αριθμό γενετικών μεταλλάξεων και συγκεκριμένων μοτίβων που υποδηλώνουν την συμμετοχή συγκεκριμένων μοριακών και σηματοδοτικών μονοπατιών στην ανάπτυξη και εξέλιξη των νευρογλοιακών όγκων. Αυτά περιλαμβάνουν την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα *CDKN2A*, *RBI* και *TP53*, καθώς και αλλαγές σε γονίδια που εμπλέκονται σ' αυτές τις οδούς ή ρυθμίζονται απ' αυτές τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες. (51, 52, 53)

Επιπλέον, μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1*, *p53* και *ATR**X* παρουσιάζονται σε διάχυτα και αναπλαστικά αστροκυτώματα (βαθμού II και III του ΠΟΥ), καθώς και δευτερογενών GBM. (54,55) Μεταλλάξεις στο *TP53* εμφανίζονται σε όλες σχεδόν τις παραλλαγές GBM. (56)

Γονιδιωματικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι στην πλειονότητα των GBMs διαταράσσονται οι λειτουργίες των οδών p53 και ρετινοβλαστώματος (Rb), είτε από μεταλλάξεις γονιδίων είτε από αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου. Επιπρόσθετα, ένα γνωστό χαρακτηριστικό των γλοιωμάτων είναι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ανοδικούς ρυθμιστές του Rb, αλλά όχι απαραίτητα στο ίδιο το γονίδιο *RBI*. (49) Για παράδειγμα, σε κάποια αναπλαστικά γλοιώματα και ιδιαίτερα στο GBM, το γονίδιο *CDKN2A* διαγράφεται ομόζυγα. Το γονίδιο αυτό

κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Ink4A και Arf, οι οποίες είναι σημαντικοί ενεργοποιητές των Rb και p53, αντίστοιχα. (57,58)

Επιπλέον, αυτό που παρατηρείται σε κάποιες κατηγορίες GBM είναι ότι καταστολείς των οδών σηματοδότησης p53 και Rb, όπως το *Cdk4* που φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί το Rb, και το *Mdm2* που είναι αναστολέας του p53, συχνά ρυθμίζονται ανοδικά από γονιδιακή ενίσχυση. Αυτό υποδηλώνει την συμμετοχή και εναλλακτικών μηχανισμών για την διακοπή της σηματοδότησης των μονοπατιών αυτών. (59)

Εκτός απ' τις μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά μονοπάτια, η ενεργοποίηση ογκογόνων οδών, όπως αυτές που περιλαμβάνουν υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs), είναι ευρέως γνωστό ότι είναι απ' τις πιο κοινές γενετικές αλλοιώσεις στα κακοήγη γλοιώματα. Όπως σε ενήλικες με GBM όπου αυξημένη γονιδιωματική ενίσχυση (~40%) εμφανίζεται στο γονίδιο *EGFR*, συχνά μαζί με μεταλλάξεις της πρωτεΐνης αυτής κυρίως μέσω διαγραφής της παραλλαγής III (vIII). (60,61) Αν και οι αλλαγές που οδηγούν στην μετάλλαξη EGFRvIII είναι πολύπλοκες και ετερογενείς, κατά βάση θεωρούνται αποτελέσματα μετά από την ενίσχυση του *EGFR*. Συνολικά, η EGFRvIII ανευρίσκεται σε περίπου 30-50% των περιπτώσεων γλοιώματος στις οποίες υπάρχει ενίσχυση του *EGFR*.

Σε μικρότερο ποσοστό GBM ενηλίκων (~13%) έχει ανιχνευθεί αυξημένη ενίσχυση του γονιδίου *PDGFRA*, άλφα υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια. (59) Η ενίσχυση του γονιδίου αυτού φαίνεται να είναι μια γονιδιωματική αλλαγή σε μονοπάτι RTK. Αντίθετα στα παιδιατρικά GBMs καθώς στο Diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) φαίνεται να ασκεί σημαντικό αντίκτυπο. (58, 62)

Αν και ακόμα πιο σπάνιο, έχει επίσης ανιχνευθεί σε GBM αυξημένη ενίσχυση του πρωτο-ογκογονιδίου *MET*. (59)

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα είναι ότι γενετικές αλλαγές μπορεί να συμβούν ταυτόχρονα σε πολλαπλά RTKs σε ένα GBM, με διακριτούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς που περιέχουν ενισχυμένα γονίδια υποδοχέα. (63, 64). Αυτό υποδηλώνει ότι η στόχευση ενός μεμονωμένου RTK στην προσπάθεια εξουδετέρωσης της ογκογόνου σηματοδότησης πιθανόν να αποδειχθεί αναποτελεσματική. Αντίθετα, τα φάρμακα που στοχεύουν πολλαπλά RTKs που έχουν ενεργοποιηθεί σε GBM μπορεί να προσφέρουν αποτελεσματικότερη θεραπεία.

Αντίστοιχα, η έλλειψη επιτυχίας σε δοκιμές θεραπείας του GBM που στοχεύουν στο *EGFR* μπορεί να οφείλεται εν μέρει στον υψηλό βαθμό ετερογένειας και πολυπλοκότητας της βιολογίας των RTKs στα γλοιώματα.

Άλλες σημαντικές οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται στην πλειονότητα των GBMs είναι οι PI3K–AKT–mTOR και RAS–MAPK, οι οποίες θεωρούνται κοινές ογκογόνες αλλοιώσεις στους όγκους αυτούς. Οι απορρυθμιστικές μεταλλάξεις σε αυτές τις οδούς περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν είτε τις καταλυτικές (*PIK3CA*) είτε τις ρυθμιστικές (*PIK3R1*) περιοχές του *PI3K*, οι οποίες με την σειρά τους επάγουν την δραστηριότητα αυτών των ενζύμων. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται περίπου στο 15% των GBMs ενηλίκων. Επιπλέον, μεταλλάξεις που επάγουν διαγραφή ή σίγαση στο γονίδιο *PTEN*, τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή της σηματοδοτικής οδού PI3K–AKT εμφανίζονται περίπου στο 30% των περιπτώσεων. Πέρα από τις γενετικές μεταλλάξεις στο *PTEN* έχει περιγραφεί, σε διάχυτα γλοιώματα κυρίως βαθμού II και III του ΠΟΥ (50-60%), πρόσθετη επιγενετική και βασισμένη σε miRNA ρύθμιση της καταστολής του *PTEN*. (65, 66, 67, 68)

Μεταλλάξεις στον *NF1*, ανταγωνιστή της πρωτεΐνης Ras, θεωρείται ότι είναι η αιτία για την εμφάνιση της NF1, ενός συνδρόμου προδιάθεσης για καρκίνο που χαρακτηρίζεται κυρίως από συχνά νευροϊνώματα και αστροκυτώματα. (69, 70) Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μετάλλαξη ή διαγραφή του γονιδίου *NF1* εμφανίζεται και στο 15-18% των πρωτογενών GBMs (49) το οποίο ενισχύει την προσπάθεια του TCGA να επιδείξει μια σχέση μεταξύ μετάλλαξης του γονιδίου *NF1* και του μεσεγχυματικού GBM.

Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* (ισοκιτρική αφυδρογονάση I & II) αναγνωρίζονται στα γλοιώματα και έχουν συμβάλει στην κατανόηση της βιολογίας των όγκων αυτών καθώς και στην μοριακή τους ταξινόμηση. (57) Τέτοιες μεταλλάξεις εμφανίζονται συνήθως στα διάχυτα γλοιώματα βαθμού II και III του ΠΟΥ (70-90%) και στα δευτερογενή GBMs (85%), αλλά σπάνια εντοπίζονται σε ασθενείς με πρωτογενή GBMs (5%). Αρχικά η διάκριση μεταξύ πρωτογενών και δευτερογενών GBMs βασίστηκε στο διαφορετικό κλινικό ιστορικό. Πλέον έχει καταστεί σαφές ότι τα δύο είδη είναι μοριακά διακριτές οντότητες, με την παρουσία ή την απουσία μεταλλάξεων *IDH1/2* να είναι ο πιο σημαντικός μοριακός παράγοντας διάκρισης. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις *IDH1/2* βρέθηκε να σχετίζονται θετικά με άλλες

γενετικές αλλοιώσεις που είναι κοινές στα διάχυτα γλοιώματα, όπως οι μεταλλάξεις *TP53* και *ATRX* στο αστροκύτωμα και η απώλεια *1p/19q* σε ολιγοδενδρογλοιακούς όγκους. Ενώ εμφανίζουν αντίστροφη συσχέτιση με την ενίσχυση *EGFR* και την μονοσωμία του χρωμοσώματος 10, αλλοιώσεις που εμφανίζονται συχνότερα στα πρωτογενή GBMs. (71) Συμπερασματικά, οι μοριακές οδοί που οδηγούν στην ανάπτυξη γλοιωμάτων χαμηλού βαθμού και δευτερογενών GBMs διαφέρουν από εκείνες που προκαλούν πρωτογενή GBMs.

Πίνακας 4: Σύνοψη μοριακών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του όγκου στο GBM. (Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, Hetze S. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Mar;41(1):53-75. doi: 10.1007/s10555-021-09997-9. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34687436; PMCID: PMC8924130)

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ GBM
<i>EGFR</i>	• Επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων του γλοιώματος • Μειώνει τη φλεγμονώδη απόκριση • Προκαλεί διήθηση μακροφάγων & επάγει την νεοαγγειογένεση • Αυξάνεται σε υποξικό περιβάλλον
<i>EGFRvIII</i>	• Υποστηρίζει την επιβίωση των κυττάρων του γλοιώματος και την εισβολή • Έχει ιδιότητες πυροδότησης φλεγμονών • Έχει αυξημένη ευαισθησία στην TMZ • Προκαλεί διήθηση μακροφάγων & επάγει τη νεοαγγειογένεση
<i>IDH</i>	• Προωθεί τα λεμφοκύτταρα που διεισδύουν στον όγκο • Προκαλεί μειωμένη απόκριση των T-κυττάρων κατά του όγκου • Αυξάνει την έκφραση του <i>PD-L1</i>
<i>IDH1mut</i>	• Ευνοεί την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία • Συμβάλει σε μειωμένη έκφραση των <i>IFN-γ</i> και <i>CD8</i> • Προκαλεί αυξημένη αντικαρκινική απόκριση T-κυττάρων

<i>ATRX</i>	• Μετάλλαξη: σταθεροποιεί τα κύτταρα του γλοιώματος • Διαγραφή: επάγει την έκφραση της ιντερφερόνης (τύπου I)
<i>KIAA1549-BRAF fusion</i>	• Η ενεργοποίηση <i>BRAF</i> επάγει την προκαρκινογόνο γήρανση μέσω της οδού p16 (<i>INK4a</i>) & το προκαρκινογόνο TME (tumor microenvironment) μέσω του άξονα <i>CCL2/CCR2</i>.
<i>NF1</i>	• Ανικανότητα <i>NF1</i>: μειωμένη ομοιογένεια των καρκινικών κυττάρων • Ενισχυμένη έκφραση <i>NF1</i>: μειωμένη δραστηριότητα μικρογλοίας • Απενεργοποίηση <i>NF1</i>: αυξημένη ενεργοποίηση μακροφάγων
<i>PTEN</i>	• Μετάλλαξη <i>PTEN</i>: επάγει ανοσοκαταστολή μέσω TME, αύξηση της έκφρασης <i>PDL-1</i> και αυξημένη απόπτωση T-κυττάρων παρουσία κυττάρων γλοιοβλαστώματος με ανεπάρκεια <i>PTEN</i> • Απουσία <i>PTEN</i>: επάγει την ανοσολογική αντίσταση • Ανεπάρκεια <i>PTEN</i>: συμβάλει στην προώθηση της διασύνδεσης πρωτεϊνών και υποστηρίζει <i>VEGF</i> αναστολείς
<i>MGMT</i>	• Υπερμεθυλίωση: καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία, που προάγεται από την υποξική TME • Μειωμένη έκφραση λόγω αναστολής της δράσης του Wnt • Οι μεθυλίώσεις φαίνεται να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση
<i>P53</i>	• Δυσλειτουργία: κυτταρική εισβολή και μετανάστευση κυττάρων γλοιώματος και υποστήριξη φλεγμονωδών διεργασιών • Απώλεια: προκαρκινογόνες δραστηριότητες του SASP, με αποτέλεσμα ανοσοκατασταλτικό TME • Ενεργοποίηση: ενίσχυση του ανοσοποιητικού
<i>CDK4/6</i>	• Δυσλειτουργία: προάγει τη φωσφορυλίωση του <i>RBI</i>, με αποτέλεσμα τη διαίρεση των κυττάρων του γλοιώματος.

	• Επάγει την έλλειψη του <i>CDK4</i> και εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων του γλοιώματος
<i>RB1</i>	• Μετάλλαξη: αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων γλοιώματος
<i>HIF</i>	• Επάγει την ενεργοποίηση του <i>VEGF</i> και της <i>IL-8</i> • Υποστηρίζει την παρουσία βλαστοκυττάρων • Προκαλεί μείωση της <i>IFN-γ</i> και του <i>TNF</i>

1.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

1.3.1 ΚΥΡΙΕΣ ΤΡΕΧΟΥΣΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η πρώτη γραμμής θεραπεία του GBM περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Ωστόσο, μετά την θεραπεία υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης υποκλώνων καρκινικών κυττάρων, με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση σφαλμάτων στο DNA κ.α. Περίπου το 10% των GBMs που υποτροπιάζουν μετά από θεραπεία με TMZ εμφανίζουν σημαντικά υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων. (72) Μετά από θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες DNA μπορεί να προκληθεί «υπερμετάλλαξη» του DNA, η οποία σχετίζεται με αλλοιώσεις βλαστικής σειράς στα γονίδια. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεπεράσουν την έλλειψη πόρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, είναι η ενίσχυση ογκογονιδίου σε εξωχρωμοσωμικό DNA. Αυτό είναι συχνό σε σποραδικό GBM ενηλίκων. (73, 74)

Οι μεταλλάξεις ενίσχυσης *PIK3CA*, *TERT* και *EGFR* που εντοπίζονται κυρίως στον πρωτοπαθή όγκο συνήθως διατηρούνται και στον υποτροπιάζοντα όγκο. Οι πιο συχνές γενετικές αλλαγές που εμφανίζονται σε υποτροπιάζοντες όγκους περιλαμβάνουν μεταλλάξεις *TP53*, *EGFR*, *PTEN* και φωσφατάσης. Οι διαφορές αυτές στις μοριακές αλλαγές μεταξύ αρχικών και επανεμφανιζόμενων όγκων ενδέχεται να επηρεάσουν τον σχεδιασμό κλινικών δοκιμών για τα υποτροπιάζοντα GBMs. Επιπλέον, οι νέες τεχνολογίες αλληλούχισης προσθέτουν ένα ακόμα επίπεδο

λεπτομέρειας στην κατανόηση μας για την ενδοογκική ετερογένεια και την εξέλιξη του όγκου στο GBM.

Το γονιδιωματικό προφίλ του όγκου έχει βελτιώσει σημαντικά την κατανόηση μας για την μοριακή παθογένεση του GBM και έχει δημιουργήσει νέες ευκαιρίες ανάπτυξης θεραπειών που κατευθύνονται από τον γονότυπο του ασθενούς. Ωστόσο, ακόμα τα αποτελέσματα της θεραπείας για ασθενείς με GBM δεν έχουν βελτιωθεί σημαντικά, παρά τις νέες αυτές γνώσεις.

Όσον αφορά την διαχείριση των ασθενών με GBM, αυτή περιλαμβάνει χορήγηση κορτικοστεροειδών, κατά προτίμηση δεξαμεθαζόνης, για την μείωση του συμπτωματικού οιδήματος γύρω απ' τον όγκο. Επιπλέον, η δεξαμεθαζόνη ανακουφίζει και νευρολογικά προβλήματα καθώς και σημεία αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, όπως κεφαλαλγία και υπνηλία. (75)

Κατά την εμφάνιση της νόσου, επιληπτικές κρίσεις επηρεάζουν το 23% των ασθενών με GBM, ενώ ένα επιπλέον 20% επηρεάζεται στην μετέπειτα πορεία της νόσου. Η χρήση, των νεότερων παραγόντων, όπως η λεβετιρακετάμη και η λακοσαμίδη, ως αντι-επιληπτικών φαρμάκων, εμφανίζει ευνοϊκότερα προφίλ παρενεργειών, μειωμένες απαιτήσεις εργαστηριακής παρακολούθησης και έλλειψη αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-φαρμάκου. Κατά την περιεγχειρητική περίοδο υπάρχει υψηλός κίνδυνος φλεβικής θρομβοεμβολής (ΦΘΕ), ο οποίος παραμένει πολύ περισσότερο, με επίπτωση ενός έτους περίπου 20%. Τα οφέλη της αντιπηκτικής αγωγής είναι ακόμα υπό μελέτη. (76) Επιπλέον, τα γνωστικά ελλείμματα, οι αλλαγές της προσωπικότητας και οι διαταραχές της διάθεσης είναι σημαντικές συννοσηρότητες για ασθενείς με GBM. (77) Η συχνή παρουσία κόπωσης και διαταραχής ύπνου καθώς και η κλινική κατάθλιψη εμφανίζονται σε αυτούς τους ασθενείς. Η τακτική άσκηση, η υιοθέτηση μιας υγιεινής διατροφής, η αποφυγή της υπεργλυκαιμίας και η συμμετοχή της παρηγορητικής φροντίδας συμβάλουν σημαντικά στην έκβαση της νόσου. (78)

Παρά τις προόδους που έχουν γίνει όσον αφορά την κατανόηση της βιολογίας του γλοιώματος, η πρόγνωση των ασθενών με GBM παραμένει κακή. Η συνολική επιβίωση, σε καλά επιλεγμένους ασθενείς σε κλινικές δοκιμές, είναι περίπου 15-18 μήνες και η 5ετής επιβίωση είναι μικρότερη από 10%. (79,80). Η θεραπεία πρέπει να προσαρμόζεται στο άτομο με βάση την ηλικία, την λειτουργική κατάσταση, τους στόχους φροντίδας κ.ο.κ.

Όσον αφορά την χειρουργική επέμβαση, αν και οι περιγραφές για επεμβάσεις γλοιωμάτων χρονολογούνται από το 1800, η εκτομή των βλαβών αυτών καθιερώθηκε μόνο μετά το 1900. (81) Μεταξύ 1884 και 1899 αναφέρθηκαν περίπου 600 επεμβάσεις για όγκους εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων και των μη νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Με τις διαγνωστικές, χειρουργικές και θεραπευτικές τεχνολογίες υπήρξε σημαντική βελτίωση στην θεραπεία του όγκου του εγκεφάλου γενικά, και ειδικότερα του GBM. Κάποιες απ' αυτές τις τεχνολογίες περιλαμβάνουν την εισαγωγή της κοιλιογραφίας στην κλινική πράξη το 1918, την κρυσταλλογραφία ακτινών X το 1920, την βελτιωμένη χειρουργική τεχνική την δεκαετία του 1930, την θεραπεία με στεροειδή στις αρχές της δεκαετίας του 1960, την βελτιωμένη εστιακή ακτινοθεραπεία το 1970, το διεγχειρητικό υπερηχογράφημα την δεκαετία του 1980, την υπολογιστική πλοήγηση και διεγχειρητική απεικόνιση την δεκαετία του 1990 και την χημειοθεραπεία από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 και μετά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χημειοθεραπεία εξελίχθηκε στο πέρας των ετών σε κατευθυνόμενη από βιοδείκτες. (82)

Η μεγαλύτερη πρόοδος στην θεραπεία του GBM προήλθε από την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων, με κύρια την αξονική τομογραφία (CT) και την MRI.

Η CT εισήχθη στην ιατρική διαγνωστική από τον Godfrey Hounsfield τη δεκαετία του 1960 και συγκεκριμένα το 1967. Το 1971 εγκαταστάθηκε σε νοσοκομείο της Αγγλίας ο πρώτος κλινικός αξονικός τομογράφος ενώ η CT εισήλθε σε ευρεία κλινική χρήση στην βόρεια Αμερική το 1973. (83) Για την ανίχνευση GBM σε ασθενείς, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1981 και έγινε ευρέως διαθέσιμη στην Βόρεια Αμερική μετά το 1988. (84)

Πλέον πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει την σημασία της ολικής εκτομής στην βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με GBM. Σημαντικές πρόοδοι έχουν γίνει σε χειρουργικά εργαλεία και τεχνικές όπως η διεγχειρητική απεικόνιση, οι φθορίζοντες παράγοντες και οι λειτουργικές ακολουθίες απεικόνισης κι αυτό έχει συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη αναγνώριση των ορίων του όγκου και του ζωτικού εύρωστου φλοιού και κατ' επέκταση στην πιο ασφαλή και πλήρη εκτομή. Επιπλέον, η ικανότητα ακριβούς οριοθέτησης της χειρουργικής εκτομής έχει συμβάλει στην ανάπτυξη νέων ελάχιστα επεμβατικών τεχνικών για την θεραπεία του GBM. Στην χειρουργική επέμβαση είναι υψίστης σημασίας να επιτυγχάνεται η μέγιστη εκτομή του όγκου και παράλληλα να προστατεύεται ο φυσιολογικός ιστός. Ένας μεγάλος

αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι τα ανατομικά ορόσημα είναι ανεπαρκή για την αναγνώριση του φυσιολογικού υγιούς φλοιού, δεδομένης της φυσιολογικής διακύμανσης μεταξύ των ασθενών και της παραμόρφωσης.

Η χρήση φθορίζοντων παραγόντων για την διάκριση των ορίων μεταξύ υγιούς ιστού και όγκου έχει μελετηθεί από την δεκαετία του 1940. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν βρει ευρύτερη αποδοχή δύο παράγοντες, η φλουορεσκεΐνη και το 5-ALA. Η φλουορεσκεΐνη επισημαίνει τον κακοήγη ιστό με παθητική διάχυση και η χρώση συσχετίζεται με τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται στην ιστολογική ανάλυση. (85)

Παρά τις προόδους που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια στην καλύτερη εκτομή των όγκων του GBM, αυτό παραμένει εξαιρετικά διεισδυτικό με αποτέλεσμα να μην μπορεί να θεραπευτεί μόνο με χειρουργική επέμβαση. Θα πρέπει να αναπτυχθούν άλλοι παράγοντες και τεχνικές για την θεραπεία των μικροσκοπικών υπολειμμάτων του όγκου. Επιπρόσθετα, οι χειρουργικές επεμβάσεις θα πρέπει να προσαρμόζονται σε μεμονωμένους ασθενείς, λαμβάνοντας υπόψη τις ενδείξεις, την αναλογία κινδύνου-οφέλους και τον προγνωστικό αντίκτυπο για κάθε ασθενή.

Μία άλλη θεραπευτική προσέγγιση, τα τελευταία χρόνια, για το GBM είναι η ακτινοθεραπεία (RT). Η RT προκαλεί βλάβη στο DNA είτε άμεσα με ιονισμό είτε έμμεσα μέσω της δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). (86) Η RT χρησιμοποιείται για την θεραπεία συμπαγών όγκων, για πάνω από 100 χρόνια, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του δέρματος, του προστάτη και του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία της λευχαιμίας, των γλοιωμάτων και του λεμφώματος. Οι περισσότερες τυπικές προσεγγίσεις συνιστούν την παροχή RT στην περιοχή των 60 Gy σε 30 κλάσματα των 2 Gy, με βάση τους στόχους που επιλέγονται χρησιμοποιώντας την άμεση μετεγχειρητική MRI. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι η επιταχυνόμενη RT αυξάνει τη συνολική επιβίωση των ασθενών και τον τοπικό έλεγχο των όγκων, ιδιαίτερα του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. (87, 88)

Αν και η RT παραμένει η πιο αποτελεσματική μη χειρουργική τεχνική στην θεραπεία κακοηθών όγκων, οι διάφορες παρενέργειες που επηρεάζουν διάφορα όργανα όπως το δέρμα, η τοξικότητα της ακτινοβολίας σε φυσιολογικούς ιστούς και η ανάπτυξη σημαντικής ραδιοαντίστασης στα καρκινικά κύτταρα περιορίζουν την αποτελεσματικότητά της. (89) Η ανάπτυξη ραδιοαντίστασης σχετίζεται με

διαφορετικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποίησης των οδών σηματοδότησης επιβίωσης ή των επιγενετικών αλλοιώσεων. (86)

Όσον αφορά τους φυσιολογικούς ιστούς, η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβη κυρίως μέσω της άμεσης εναπόθεσης ενέργειας σε ζωτικά μακρομόρια ή της δημιουργίας δραστικών ελεύθερων ριζών. (90) Οι ρίζες αυτές αντιδρούν με βιομόρια, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια, και τους προκαλούν οξειδωτική βλάβη. (91)

Μεγάλη προσοχή δίνεται στον περιορισμό της έκθεσης δομών όπως των οφθαλμικών και οπτικών δομών, του εγκεφαλικού στελέχους, του αυχενικού λώρου, του κοχλίου και, όπου είναι εφικτό, των κροταφικών λοβών και/ ή του ιππόκαμπου. (92)

Παρ' όλο που η RT έχει γίνει ασφαλέστερη από πριν λόγω των βελτιωμένων μεθόδων, εξακολουθεί να απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να επιτευχθεί καταστολή του όγκου χωρίς την πιθανότητα βλάβης φυσιολογικού ιστού. Δύο στρατηγικές κλινικής σημασίας είναι η ραδιοευαισθητοποίηση καρκινικών κυττάρων χωρίς την ευαισθητοποίηση φυσιολογικών καθώς και η ραδιοπροστασία των φυσιολογικών. Η ραδιοευαισθητοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με μόρια που θα ενισχύσουν την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από την ακτινοβολία. (93, 94)

Η TMZ είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χημειοθεραπεία για ασθενείς με GBM, παρά το γεγονός ότι περίπου οι μισοί ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία έχουν αντοχή στην TMZ και τελικά η θεραπεία αποτυγχάνει. (95) Η TMZ, μία από του στόματος χημειοθεραπεία, είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας προφαρμάκου, για τον οποίο η αντικαρκινική δράση ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1787 (96) και έχει εφαρμοστεί ευρέως ως αποτελεσματικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας πρώτης γραμμής για την θεραπεία ασθενών με GBM από τότε που ο FDA ενέκρινε την αποτελεσματικότητά του, τον Μάρτιο του 2005. (97, 98) Πρόκειται για έναν λιπόφιλο παράγοντα ο οποίος μπορεί εύκολα να διεισδύσει στον BBB. Η TMZ προκαλεί κυτταροτοξικότητα προσθέτοντας μια ομάδα μεθυλίου στην γουανίνη του DNA, στις θέσεις O6 και N7, και στην αδενίνη, στην θέση N3 κατά την αντιγραφή του μορίου. Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός κυτταροτοξικών O6-μεθυλγουανίνης, N7-μεθυλγουανίνης και N3-μεθυλαδενίνης. Αυτές οι κυτταροτοξικές ομάδες αποτελούνται από αταίριαστα ζεύγη βάσεων με αποτέλεσμα το σπάσιμο της αλυσίδας του DNA στον έναν ή/και στους δύο κλώνους της και την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M, οδηγώντας τελικά το κύτταρο σε απόπτωση. (99, 100, 101)

Ωστόσο, περίπου το 55% των ασθενών με GBM είναι ανθεκτικοί στην TMZ καθώς τα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα ανακάμπτουν από τις αλλοιώσεις που προκαλεί η ουσία. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο σημαντικότερος παράγοντας που δημιουργεί αντίσταση στην TMZ είναι το MGMT. Το ένζυμο MGMT μεταφέρει την ομάδα μεθυλίου από την γουανίνη, επιδιορθώνοντας έτσι το κατεστραμμένο DNA και εξουδετερώνοντας τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της TMZ στα καρκινικά κύτταρα. (102) Άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι η αντίσταση στην TMZ οφείλεται και σε μεταβολές της οδού καταστολής όγκου p53, ενώ η επανενεργοποίηση της οδού αυτής θα μπορούσε να είναι μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση κατά του GBM. (103) Άλλα συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως το MMR (Mismatch repair) και το BER (Base excision repair) φαίνεται πως διαδραματίζουν, επίσης, κάποιο ρόλο στην αντίσταση των κυττάρων στην TMZ, καθώς και ο μηχανισμός της αυτοφαγίας.

Το MMR είναι ένα σύστημα που διορθώνει τις αναντιστοιχίες βάσεων νουκλεοτιδίων που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία σύνθεσης DNA. Η Ο6-μεθυλγουανίνη (Ο6-MeG), που προκαλείται από την αγωγή με TMZ, παρουσιάζει λανθασμένη ζεύξη με τη θυμίνη κατά την αντιγραφή του DNA. Το σύστημα MMR αναγνωρίζει το λανθασμένο Ο6-MeG/T και αποκόπτει τον νεοσυντιθέμενο κλώνο, αφήνοντας τον γονικό κλώνο με το Ο6-MeG ανέπαφο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Η απώλεια της λειτουργίας του MMR και η μη ανταπόκριση στην λανθασμένη σύζευξη που προκαλείται από την TMZ μπορεί να συσχετιστεί με αντίσταση στις κυτταροτοξικές επιδράσεις της TMZ. Η ικανότητα του MMR επηρεάζεται από τη μετάλλαξη των γονιδίων MMR, όπως η μελανοκυτταροτρόπος ορμόνη 2 (MSH2), η MSH6, το ομόλογο mutL 1 (MLH1) και το *Saccharomyces cerevisiae* 2 (PMS2). Οι σωματικές μεταλλάξεις MSH6 εντοπίστηκαν περισσότερο σε υποτροπιάζοντα GBM με μεσολάβηση της TMZ σε σύγκριση με πρωτογενή GBM χωρίς θεραπεία με TMZ. (104, 105, 106, 107)

Το σύστημα BER εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλάβης του DNA που προκαλείται από οξειδωτικό παράγοντα, ιονίζουσα ακτινοβολία ή αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η μεθυλίωση της N7-γουανίνης και της N3-αδενίνης αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% της συνολικής μεθυλίωσης που προκαλείται από την TMZ και επιδιορθώνονται γρήγορα από το BER, έτσι ώστε να προωθηθεί η επιβίωση του GBM.

Όταν ένα ή περισσότερα συστατικά του BER μεταλλάσσονται, αυτό οδηγεί σε ανεπάρκεια της ικανότητας του να επιδιορθώνει τη βλάβη του DNA, συμβάλλοντας επιπλέον στην κυτταροτοξικότητα της TMZ στο GBM. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι βλάβες N3 είναι θανατηφόρες εάν δεν επιδιορθωθούν, σε αντίθεση με τις βλάβες N7. Μεταξύ των συστατικών του BER, η πολυ (ADP-ριβόζη) πολυμεράση-1 (PARP-1) είναι το πιο σημαντικό ένζυμο με διπλή δράση. Η αναστολή του PARP-1 οδηγεί στη συσσώρευση σπασμένου DNA στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα η υπερ-ενεργοποίηση του PARP-1, που δημιουργείται από βλάβη του DNA, οδηγεί σε μείωση του δινουκλεοτιδίου νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD⁺) και της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που ακολουθείται από κυτταρικό θάνατο. Έτσι, η ρύθμιση της δραστηριότητας του BER συμβάλει στη θεραπεία του GBM που είναι ανθεκτικό στην TMZ. (104, 108, 109) Μελέτες έδειξαν ότι ο ρόλος του BER στην αντίσταση της TMZ είναι λιγότερο σημαντικός από το MGMT και το MMR. (110)

Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός διατήρησης της ομοιόστασης καθώς και επιβίωσης των κυττάρων και πραγματοποιείται μέσω της αποδόμησης και της ανακύκλωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών, των οργανιδίων και άλλων κυτταρικών συστατικών. Η αυτοφαγία συνήθως ρυθμίζεται από διάφορα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των καταστάσεων υποξίας, πείνας, ύπαρξης ακτινοβολίας ή/και παθογόνων καθώς και βλαβών του DNA. Εδώ και δεκαετίες η έρευνα του καρκίνου περιλαμβάνει το πως η αυτοφαγία εμπλέκεται στις συμπεριφορές των καρκινικών κυττάρων καθώς και τις επιπτώσεις της στην θεραπεία του καρκίνου.(111) Μελέτες που διερεύνησαν την σχέση της αυτοφαγίας με κύτταρα γλοιώματος που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με TMZ έχουν δείξει ότι προκαλείται αυτοφαγία μετά την θεραπεία. Ωστόσο, η δραστηριότητα της αυτοφαγίας μειώνεται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά τους για να διατηρηθεί η δυνατότητα ενεργοποίησης της αυτοαμυντικής αυτοφαγίας. Ο ρόλος της αυτοφαγίας είναι πρωταρχικά προστατευτικός και η επαγωγή της θεωρείται μηχανισμός χημειοανθεκτικότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικοί αναστολείς ή ρυθμιστές αυτοφαγίας παίζουν διαφορετικούς ρόλους σε διαφορετικά στάδια της επαγόμενης από την TMZ αυτοφαγίας για να προκαλέσουν δυνητικά διαφορετικά αποτελέσματα.(112)

Όσο προχωράει ο τομέας της ογκολογίας προστίθενται αρκετοί νέοι μηχανισμοί αντίστασης στην TMZ, όπως η εμπλοκή των miRNAs, των μεταφορέων εκροής

φαρμάκων, της δραστηριότητας του gap junction, καθώς και η εμφάνιση βλαστοκυττάρων γλοιώματος. (113)

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα για την θεραπεία του GBM είναι ότι όταν συνδυάστηκε η θεραπεία TMZ με θεραπεία RT σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην διάμεση περίοδο επιβίωσης, δηλαδή 2ετής επιβίωση, χωρίς εξέλιξη της νόσου και με βελτιωμένη ποιότητα ζωής σε σύγκριση με μεμονωμένη RT. (98)

1.3.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Άλλες σύγχρονες θεραπευτικές τεχνικές που μελετώνται για την θεραπεία του GBM περιλαμβάνουν ανοσοθεραπεία, θεραπεία με χρήση ιών, στοχευμένη μοριακή θεραπεία κ.α

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου είναι η διαδικασία κατά την οποία ο οργανισμός ενεργοποιεί το δικό του ανοσοποιητικό σύστημα για να καταπολεμήσει τα υπάρχοντα καρκινικά κύτταρα. Για αρκετούς καρκίνους, όπως το κακοήθες μελάνωμα, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του πνεύμονα, μερικά είδη ανοσοθεραπειών έχουν ενσωματωθεί στις τυπικές θεραπείες. (114) Οι τρέχουσες ανοσοθεραπείες περιλαμβάνουν εμβόλια δενδριτικών κυττάρων (DC), πεπτιδικά εμβόλια, όπως η θεραπεία EGFRvIII, αντιγονική θεραπεία όγκων και αντιγονική θεραπεία NK-T. Επιπρόσθετα αναφέρονται και κύτταρα που προέρχονται από αίμα ομφάλιου λώρου, θεραπεία ογκολυτικού ιού και θεραπεία γονιδιακής μεταφοράς. (115) Η έκθεση αποτελεσματικών αντιγόνων σε T κύτταρα θα ήταν ένα ουσιαστικό βήμα για την δημιουργία και την διατήρηση ανοσολογικών αποκρίσεων στα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες σε ανοσοθεραπείες έδειξαν σημαντικά αποτελέσματα κατά του γλοιώματος σε περιπτώσεις υψηλής αντοχής στην TMZ (116).

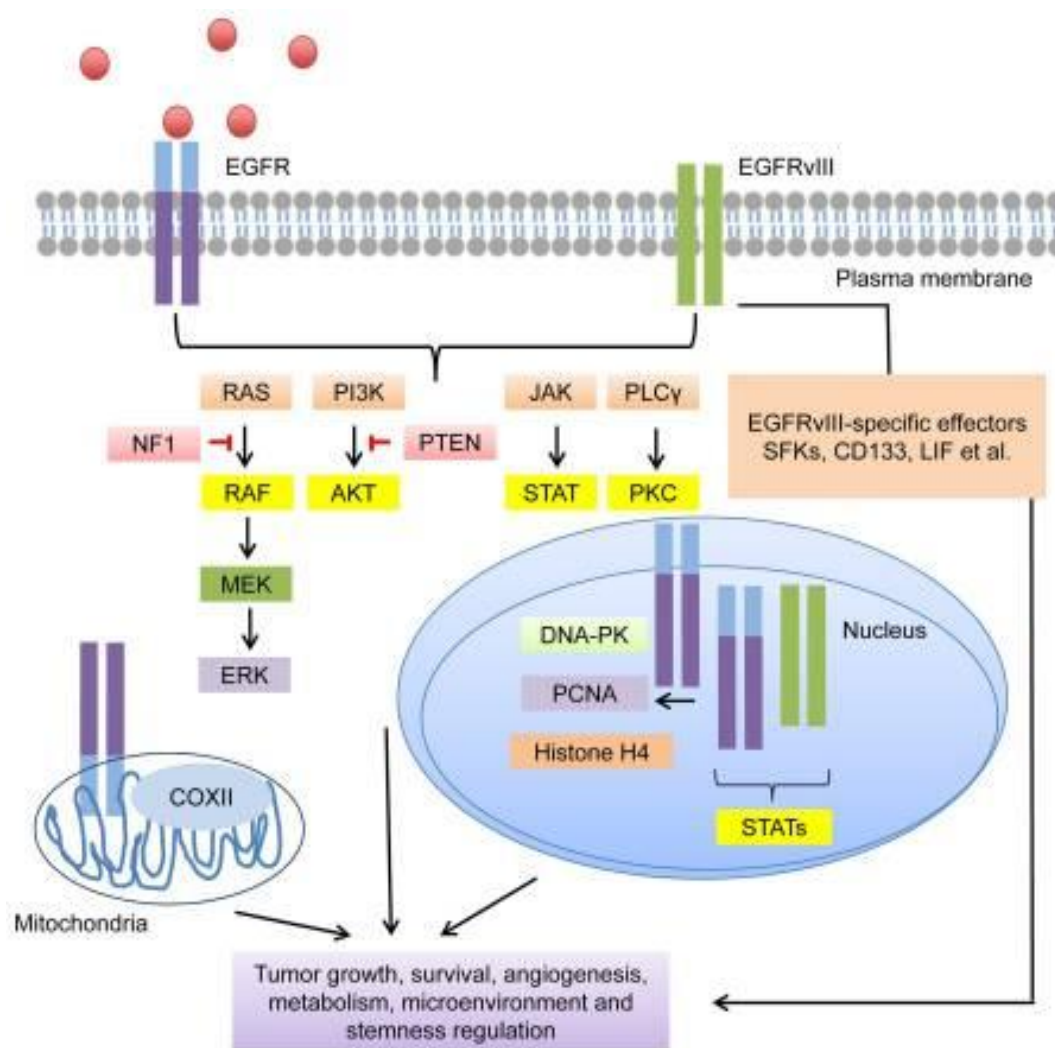
Η σύγχρονη ογκολογική ιατρική χρησιμοποιεί εξαιρετικές προοδευτικές θεραπευτικές μεθόδους, όπως την εξατομικευμένη ανάλυση των ιδιοτήτων ενός όγκου και τη στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς μικρών μορίων. Η εξατομικευμένη ανάλυση καλύπτει ολόκληρο τον ασθενή (όγκο και ξενιστή) στο πλαίσιο της ανοσοθεραπείας. Ένα παράδειγμα είναι η εξατομικευμένη πολυτροπική ανοσοθεραπεία [individualised multimodal immunotherapy (IMI)], η οποία βασίζεται σε εξατομικευμένες ανοσολογικές αλληλεπιδράσεις όγκου-ξενιστή. Επιπλέον, η IMI βασίζεται στην

έννοια του ανοσογενούς κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων που προκαλείται από ογκολυτικό ιό. (117)

Οι ογκολυτικοί ιοί αναπαράγονται επιλεκτικά και παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς «σκοτώνουν» τα καρκινικά κύτταρα όχι μέσω άμεσης ιογενούς ογκολύσεως αλλά επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο του όγκου (απόπτωση). Η επαγωγή κυτταρικού θανάτου επιτρέπει την στρατολόγηση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) η οποία έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της ωρίμανσης τους και την αλληλεπίδρασή τους με θνησιγόνα κύτταρα, στα οποία γίνεται φαγοκυττάρωση. Επιπλέον, τα APCs μεταναστεύουν και αλληλεπιδρούν με τα Τ κύτταρα. (118) Ωστόσο, ο BBB μπορεί να περιορίσει τους ικούς φορείς, θέτοντας σε σημαντικό κίνδυνο την ογκολυτική τους αποτελεσματικότητα. (119) Ένας ακόμα περιοριστικός παράγοντας μπορεί να είναι η αντοχή στην ιοθεραπεία που προσδίδουν τα βλαστοκύτταρα του γλοιώματος και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που σχετίζονται με το γλοίωμα. (120, 121)

Τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της καλύτερης κατανόησης των μοριακών αρχών και των σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται στο GBM, αναπτύσσονται συνεχώς στοχευμένες θεραπείες. Οι στοχευμένοι παράγοντες στρέφονται έναντι συγκεκριμένων ογκογονικών οδών, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, των μεταλλαγμένων σηματοδοτικών οδών και των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ή του ανοσοποιητικού συστήματος, και ως εκ τούτου μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικοί με λιγότερες συστηματικές παρενέργειες από τις παραδοσιακές χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, έχουν σχεδιαστεί φάρμακα για να στοχεύουν τον EGFR, τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), τον mTOR, και άλλα ζωτικά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά συστατικά όπως το πρωτεάσωμα, τις ιστονικές δεακετυλάσες (HDAC), τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDK) και την φωσφατιδυλνινοσιτόλη-3 κινάση (PI3K). (122) Ο EGFR είναι ένας αρκετά μελετημένος στόχος για την θεραπεία του GBM. Στο GBM εμφανίζεται ενίσχυση του υποδοχέα και του ενεργού μεταλλαγμένου του EGFRvIII. (123) Οι οδοί σηματοδότησης που διαμεσολαβούνται από τον EGFR συνοψίζονται στο **Σχήμα 3**. Η σηματοδότηση του EGFR μπορεί να ταξινομηθεί με βάση τον εντοπισμό του. Η πρώτη ομάδα σηματοδοτικών μονοπατιών διαμεσολαβείται από τη σηματοδότηση του EGFR από την πλασματική μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένης της οδού RAS/RAF/MEK/ERK, της οδού PI3K/AKT, της οδού JAK/STAT και της οδού PKC.

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τη σηματοδότηση που καθοδηγείται από τον εντοπισμό του EGFR σε διαμερίσματα εκτός πλασματικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού (τα μόρια σηματοδότησης περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες DNA-PK, PCNA, Histone H4 και STATs) και μιτοχονδριακού (τα μόρια σηματοδότησης περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες COXII) εντοπισμένου EGFR. Ο τρόπος με τον οποίο ο EGFR στέλνει σήματα σε αυτούς τους στόχους δεν έχει χαρακτηριστεί επαρκώς. Ο EGFRvIII μοιράζεται οδούς σηματοδότησης με τον EGFR, αλλά εμφανίζει και μοναδικά χαρακτηριστικά. Στο GBM συχνά μεταλλάσσονται μόρια σηματοδότησης του EGFR/EGFRvIII, γεγονός που τονίζει τη σημασία ανακάλυψης φαρμάκων που θα στοχεύουν αυτά τα μόρια. Οι τρέχουσες θεραπείες κατά του EGFR/EGFRvIII περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μικρού μοριακού βάρους tyrosine kinase inhibitors (TKI), αντισώματα EGFR/EGFRvIII, εμβόλια Anti- EGFRvIII, T κύτταρα χημειοαντιγονικού υποδοχέα (CAR) και θεραπείες που βασίζονται σε RNA. (124)



Σχήμα 3. Οι οδοί σηματοδότησης που διαμεσολαβούνται από τον EGFR και EGFRvIII. (An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. *Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies*. *Oncogene*. 2018 Mar;37(12):1561-1575. doi: 10.1038/s41388-017-0045-7. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29321659; PMCID: PMC5860944.)

1.3.3 ΤΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ GBM

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της αποτυχίας κλασσικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων να αποτελέσουν αποτελεσματική θεραπεία για το GBM, το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει στραφεί στην μελέτη φυτικών ενώσεων, οι οποίες είναι λιγότερο τοξικές και έχουν την δυνατότητα να δρουν ως παράγοντες θεραπείας του GBM. (125) Αυτά τα φυσικά προϊόντα μπορεί να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου ή να προκαλέσουν θάνατο των κυττάρων GBM. Στον **Πίνακα 5** συνοψίζονται κατηγορίες

φυτικών ουσιών που έχουν μελετηθεί για το GBM και τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά για την δράση τους.

Πίνακας 5. Φυτικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία GBM καθώς και η δράση τους στα κύτταρα. (Zoi, V., Giannakopoulou, M., Alexiou, G.A., Kyritsis, A.P., Sioka, C. (2023). *Natural Compounds in Glioma Therapy*. In: Rezaei, N. (eds) *Challenges in Solid Tumors and Other Cancers: An Interdisciplinary Approach*. *Interdisciplinary Cancer Research*, vol 21. Springer, Cham.)

	ΦΥΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΥΣΙΑΣ
1	Κουρκουμινοειδή • Curcumin	Απόπτωση – Επαγωγή αυτοφαγίας Αναστολή κυτταρικού κύκλου Αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και στην μοριακή σηματοδότηση
2	Κουμαρίνες • Osthole • Umbelliferone, • Esculin • 4-hydroxycoumarin • 5-methoxypsoralen	Απόπτωση – Επαγωγή αυτοφαγίας Αναστολή κυτταρικού κύκλου Αναστολή της οδού σηματοδότησης
3	Αλκαλοειδή • Moschamine • N-(p-coumaroyl) serotonin	Μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας Πρόκληση κυτταρικού θανάτου Αναστολή κυτταρικού κύκλου
4	Φλαβονοειδή • Quercetin	Επαγωγή απόπτωσης Αναστολή κυτταρικού κύκλου Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας Αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης Αναστολή της αγγειογένεσης

5	Άλλα • Carotenoids • Terpenes • Tannins	Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας Αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης Επαγωγή απόπτωσης Αναστολή κυτταρικού κύκλου
---	---	--

Κουρκουμινοειδή

Τα κουρκουμινοειδή είναι φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από τον κουρκουμά. Ο κουρκουμάς (*Curcuma longa*) είναι μέλος της οικογένειας του τζίντζερ. Η κουρκουμίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του και χρησιμοποιείται εδώ και πολλές δεκαετίες ως τροφή αλλά και στην παραδοσιακή ιατρική της Νότιας Ασίας. Αρκετές προκλινικές μελέτες έχουν καταδείξει τις αντικαρκινικές επιδράσεις της κουρκουμίνης και άλλων κουρκουμινοειδών σε διάφορους τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος. (126) Η κουρκουμίνη προκάλεσε πολλαπλές κυτταροτοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της αυτοφαγίας, της αναστολής του κυτταρικού κύκλου καθώς και των αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση και στη μοριακή σηματοδότηση. (127)

Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι, επίσης, μια κατηγορία ενώσεων προερχόμενες από φυτά. Συντίθενται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και ο κύριος ρόλος τους είναι να βοηθούν στην πρόσληψη σιδήρου όταν η διαθεσιμότητά του είναι χαμηλή. Είναι λακτόνες, δομικά κατασκευασμένες από έναν βενζολικό δακτύλιο συγχωνευμένο με έναν δακτύλιο α-πυρόνης. Οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί εκτενώς ως φαρμακευτικοί παράγοντες για τη θεραπεία διαφόρων τύπων ασθενειών. Η ισχυρή φαρμακολογική δράση, η χαμηλή τοξικότητα και η υψηλή βιοδιαθεσιμότητα είναι ιδιότητες που καθιστούν την κουμαρίνη να κατέχει σημαντική θέση στη φαρμακευτική χημεία. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών, αντineυροεκφυλιστικών και αντικαρκινικών παραγόντων με βάση την κουμαρίνη. (128) Οι Osthole, Umbelliferone, Esculin, 4-

hydroxycoumarin και 5-methoxypsoralen είναι κουμαρινικές ενώσεις που έχουν διερευνηθεί ως πιθανή θεραπεία στο GBM. Τα αποτελέσματα έδειξαν επαγωγή απόπτωσης στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος που εξετάστηκαν. Επιπλέον, η 5-methoxypsoralen προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, αυτοφαγία και αναστολή της οδού σηματοδότησης. (129)

Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι μια κατηγορία βασικών φυσικών οργανικών ενώσεων, που περιέχουν τουλάχιστον ένα άτομο αζώτου. Προέρχονται από αμινοξέα και μπορούν να συντεθούν από φυτά και ορισμένα ζώα ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα αλκαλοειδή εμφανίζουν σημαντικές επιδράσεις στους ανθρώπινους οργανισμούς, όπως αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αναλγητική, τοπική αναισθητική δράση και ανακούφιση από τον πόνο, νευροφαρμακολογική, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιασική και πολλές άλλες δράσεις. (130) Όσον αφορά το GBM, υπάρχουν αλκαλοειδή που έχουν διερευνηθεί για την αντικαρκινική τους δράση. Η μοσχαμίνη είναι ένα αλκαλοειδές ινδόλης, αναστολέας της κυκλοξυγενάσης, με σεροτονινεργική δράση. Η θεραπεία με μοσχαμίνη μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος που εξετάστηκαν, ενώ επιβεβαιώθηκε η πρόκληση κυτταρικού θανάτου και η αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, υπήρξε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση στην έκφραση των δεικτών CD24 και CD44. (131)

Η N-(p-coumaroyl) serotonin είναι επίσης ένα αλκαλοειδές ινδόλης με αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. Η θεραπεία με αυτή την ένωση προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και S στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στη δραστηριότητα της κασπάσης-8 και δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην έκφραση των δεικτών CD15 και CD71. (132)

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που συντίθενται από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Κύριοι ρόλοι τους είναι να προστατεύουν τα φυτά απ' την υπερϊώδη ακτινοβολία και να προσελκύουν έντομα για επικονίαση. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών, όσον αφορά το GBM, είναι ότι

μπορούν να διαπεράσουν τον BBB. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω διακυτταρικής διάχυσης, διακυτταρικής μεταφοράς με φορέα ή παρακυτταρικής διάχυσης μέσω στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων του BBB. (133) Και στους δύο τύπους διάχυσης, τα μικρότερα φλαβονοειδή είναι προτιμότερα λόγω του μοριακού τους μεγέθους. Η Quercetin είναι το πιο καλά μελετημένο κατά του GBM φλαβονοειδές. Η θεραπεία με Quercetin προκάλεσε απόπτωση στα κύτταρα ενεργοποιώντας τις κασπάσες 3 και 9, καθώς και αναστολή της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων και της αγγειογένεσης. Επιπλέον, οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αποτέλεσμα την μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. (134)

Άλλες φυτικές ενώσεις

Τα καροτενοειδή, τα τερπένια και οι τανίνες είναι επίσης φυτικές ενώσεις που έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανή θεραπεία στο GBM. Η ασταξανθίνη και η φουκοξανθίνη έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων σε κυτταρικές σειρές GBM (135, 136). Τα φυσικά τερπένια εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες προκαλώντας απόπτωση και αναστολή του κυτταρικού κύκλου (137). Η σιδερόλη είναι ένα διτερπενοειδές εντοκαουρανίου που απομονώθηκε από το γένος *Sideritis* και έχει διερευνηθεί για την αντικαρκινική της δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του GBM. (138) Όσον αφορά τις τανίνες, το ταννικό οξύ προκάλεσε αντιγλοιωματική δράση, με αναστολή της βιωσιμότητας των κυττάρων, επαγωγή απόπτωσης και αναστολή του κυτταρικού κύκλου (139).

Οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν στην πλειοψηφία τους οι φυτικές ενώσεις κατά του GBM είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, η πρόκληση απόπτωσης, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής μεταναστευτικότητας καθώς και η μείωση της αγγειογένεσης.

Στο GBM, η ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων και χημειοκινών προκαλεί πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι φυτικές ενώσεις μπορούν να υπορυθμίσουν αποτελεσματικά τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς που προάγουν τον πολλαπλασιασμό αυτό και κατ' επέκταση να μειώσουν την κυτταρική ανάπτυξη. (140) Ο NF-κΒ είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνήθως υπερεκφράζεται στο GBM. Ρόλος του είναι να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με

σημαντικές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων. Τα υψηλά επίπεδα NF-κB έχουν συσχετιστεί με την απορρύθμιση τόσο της σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR όσο και της σηματοδότησης EGFR που προάγει τον όγκο.(141) Σε μελέτες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη ρυθμίζει αρνητικά την οδό NF-κB μέσω της μείωσης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL. (142) Επιπλέον, η κουρκουμίνη μπορεί να ενεργοποιήσει την προ-αποπτωτική μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Smac/Diablo και έτσι να καταστείλει τόσο την οδό NF-κB όσο και τους αναστολείς απόπτωσης. (143) Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τις επιδράσεις της κουρκουμίνης στην απόπτωση σε κύτταρα GBM. Η κουρκουμίνη αυξάνει τη δραστηριότητα της κασπάσης 3/7, μειώνει την Bcl2 και την survivin και αυξάνει την αναλογία BAX/Bcl-2. (144) Επιπλέον, μπορεί να ενισχύσει την απόπτωση σε κύτταρα GBM ανθεκτικά στην TMZ και, ως εκ τούτου, να δράσει ως χημειοευαισθητοποιητικός παράγοντας. (145) Παρόμοιες χημειοευαισθητοποιητικές επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί όταν διαφορετικά φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένης της icariin, της quercetin and της rutin, έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες για τη θεραπεία του GBM. Ένα εξαιρετικό παράδειγμα είναι η icariin που ενισχύει τις αποπτωτικές επιδράσεις της TMZ και αναστέλλει την οδό πολλαπλασιασμού που προκαλείται από NF-κB σε κύτταρα GBM in vitro. (146) Επιπλέον, όταν η TMZ χορηγείται σε συνδυασμό με εκχύλισμα Marcela που περιέχει ένα μείγμα φλαβονοειδών, παρατηρείται αύξηση στις διασπασμένες κασπάσες που οδηγεί στην προώθηση της απόπτωσης. (147)

Όσον αφορά τον κυτταρικό κύκλο στο GBM, η ανεξέλεγκτη εξέλιξή του προκαλεί αυξημένο πολλαπλασιασμό και διαίρεση των κυττάρων. Οι φυτικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο σε διαφορετικά σημεία ελέγχου και, ως εκ τούτου, να σταματήσουν την εξέλιξη και να οδηγήσουν τα κύτταρα σε απόπτωση. Έχει αποδειχθεί ότι η καφεΐνη προκαλεί αναστολή της φάσης G0/G1 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στις κυτταρικές σειρές GBM U87MG. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την καταστολή του συμπλόκου CdkD/Cdk4,6 και την απενεργοποίηση του Rb.(148) Επιπλέον, όταν η καφεΐνη χορηγήθηκε σε συνδυασμό με TMZ σε κύτταρα U87MG, παρατηρήθηκε αύξηση στην αναλογία των κυττάρων στη φάση G2, οδηγώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο αυτό ήταν ο κύριος λόγος πίσω από την συνεργιστική δράση καφεΐνης και TMZ. (149) Επιπρόσθετα, η

κουρκουμίνη καθώς και τρία άλλα φυσικά ανάλογα (δισδεμεθοξυκουρκουμίνη, δεμεθοξυκουρκουμίνη και διμεθοξυκουρκουμίνη) έχουν διερευνηθεί για τις επιδράσεις τους στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Έχει διαπιστωθεί ότι και οι τέσσερις ενώσεις μπορούν να σταματήσουν αποτελεσματικά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και να οδηγήσουν τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω της επαγωγής αναστολής τόσο της υπο-G1 όσο και της G2/M σε κύτταρα GBM. (150) Σε μια άλλη μελέτη, η δεμεθοξυκουρκουμίνη πυροδότησε αναστολή του κυτταρικού κύκλου G2/M σε κύτταρα U87MG μέσω της αποικοδόμησης της CDC25C και της κυκλίνης B1. (151) Τα φλαβονοειδή είναι μια ακόμα ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών ενώσεων με επιβεβαιωμένες αντιγλοιοματικές επιδράσεις, μερικές εκ των οποίων σχετίζονται στενά με την αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Η Chrysin έχει βρεθεί ότι σταματά τα κύτταρα γλοιώματος C6 στη φάση G1 μέσω της αναστολής της πρωτεασωματικής δραστηριότητας ή της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης p38/MAPK. (152) Η Genistein είναι ένα άλλο φλαβονοειδές που έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει αντιγλοιοματικές επιδράσεις σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές GBM μέσω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου G1 και G2/M. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την ανοδική ρύθμιση των αναστολέων CDK, συμπεριλαμβανομένου του p21. (153)

Ένας ακόμα σημαντικός μηχανισμός δράσης των φυτικών ενώσεων είναι η αναστολή της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων GBM καθώς και η αποτροπή της εισβολής και της μετάστασης τους. Νανοςωματίδια φορτωμένα με κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων GBM *in vitro*, μέσω της εξαρτώμενης από mTOR διέγερσης ATG. (154) Μια άλλη οδός που σχετίζεται με τις αντιμεταναστευτικές επιδράσεις της κουρκουμίνης είναι η σηματοδότηση JAK/STAT3. Η κουρκουμίνη και η δεμεθοξυκουρκουμίνη καταστέλλουν τη μετανάστευση και τη μετάσταση των κυττάρων GBM μέσω της αναστολής της οδού JAK/STAT3. (155) Επιπλέον, αρκετά φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων των quercetin, myricetin και baicalein, έχουν διερευνηθεί για την ικανότητά τους στην αναστολή της μετάστασης. Οι αντιμεταναστευτικές τους επιδράσεις έχουν συσχετιστεί με την αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας MMP-9. (156) Σε αρκετούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του GBM, έχει βρεθεί ότι αυξημένα επίπεδα MMPs προάγουν τόσο τη μετανάστευση όσο και την εισβολή κακοήθων κυττάρων. (157) Σημαντικές φυσικές πολυφαινόλες, όπως η

Epigallocatechin gallate (EGCG) και η Resveratrol (RES), έχουν, επίσης, διερευνηθεί για τις αντιμεταναστευτικές τους επιδράσεις και τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι και οι δύο αυτές φυτικές ενώσεις μπορούν να καταστείλουν την εισβολή και τη μετάσταση των κυττάρων GBM *in vitro* και *in vivo*. Συγκεκριμένα, η EGCG προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη μείωση στην έκφραση των MMP-2 και MMP-9, ενώ η RES καταστέλλει κυρίως την έκφραση της MMP-2 μέσω της αναστολής της μεταγωγής σήματος PI3K/Akt/NF-κB. (158, 159)

Η αγγειογένεση, η ανάπτυξη νέων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου. Στο GBM, αυτή η σύνθετη διαδικασία ρυθμίζεται από διάφορους αγγειογενετικούς παράγοντες, με τους πιο σημαντικούς να είναι ο VEGF, ο ηπατοκυττάριος αυξητικός παράγοντας (HGF), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και οι αγγειοποιητίνες (Angs). (160) Αρκετές φυτικές ενώσεις εμφανίζουν ισχυρές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών. Η Apigenin, για παράδειγμα, είναι μια φλαβόνη που μπορεί να μειώσει σημαντικά την αγγειογένεση του GBM τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ο μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει την καταστολή της έκφρασης τόσο του VEGF όσο και του παράγοντα που προκαλεί υποξία HIF-1α, καθώς και την αναστολή της δράσης διαφόρων MMPs (όπως MMP-1 και MT1-MMP) μαζί με την αύξηση της έκφρασης των αναστολέων MMP. (161) Η κουρκουμίνη είναι μια άλλη φυσική ένωση που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά ολόκληρη τη διαδικασία της αγγειογένεσης στα κύτταρα GBM. Ένας μηχανισμός περιλαμβάνει την καταστολή των κύριων MMPs, όπως οι MMP-1, -3, -9 και -14 σε κύτταρα GBM μέσω της αναστολής της MAPK (p38, JNK, ERK). (162) Η κουρκουμίνη μπορεί επίσης να μειώσει την έκφραση παραγόντων προαγγειογένεσης, συμπεριλαμβανομένων των VEGF και bFGF ή να αναστείλει την οδό VEGF/Ang-2/TSP-1. (163)

Οι φυτικές ενώσεις κερδίζουν συνεχώς έδαφος στη θεραπεία διαφόρων χρόνιων παθήσεων όπως το GBM. Οι προσπάθειες των ερευνητών έχουν επικεντρωθεί σε αυτές λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, την χαμηλή τοξικότητα και την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Αυτές οι ενώσεις έχουν ήδη επιδείξει σημαντική αντικαρκινική δράση έναντι του GBM *in vitro*.

1.3.4 Η ΣΙΔΕΡΟΛΗ ΩΣ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ GBM

Η Σιδερόλη είναι ένα διτερπενοειδές που απομονώνεται από το γένος *Sideritis* (είδος *S. Scardica*). Είναι γνωστό και ως «σιδηρόχορτο» και «τσάι του βουνού». Ο σιδερίτης είναι ένα γένος ανθοφόρων φυτών γνωστών για τη χρήση τους ως φυτικά φάρμακα, ιδιαίτερα στην Ελλάδα, την Τουρκία, την Αλβανία, τη Βουλγαρία και άλλες χώρες. Είναι ξηροφυτικοί θάμνοι ή βότανα ύψους μεταξύ 8 και 90 cm. Συνήθως αναπτύσσονται σε άνυδρες πλαγιές, ασβεστολιθικές πλαγιές και ορεινές περιοχές μεγάλου υψομέτρου (650-1400 m). Η πλήρης άνθιση συμβαίνει συνήθως τον Ιούλιο. (164) Οι μίσχοι, τα φύλλα και τα άνθη του *S. Scardica* χρησιμοποιούνται ευρέως είτε ως εκχυλίσματα μέσω βρασμού είτε γίνονται έγχυμα για την παρασκευή τσαγιού βοτάνων (εναέρια μέρη). Αυτό το φυτικό φάρμακο χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες για τη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, την υποστήριξη του πεπτικού συστήματος και τη μείωση των συμπτωμάτων πολυάριθμων παθήσεων, όπως του κοινού κρυολογήματος, της αλλεργίας, της ιγμορίτιδας και της γρίπης. Χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό για τον πόνο και το ήπιο άγχος. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, ο σιδερίτης έχει ευεργετική επίδραση σε πολλές κοινές ασθένειες, καθώς πρόκειται για ένα φυτό με σημαντικές αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι κύριες δραστικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτό το γένος είναι τα διτερπενοειδή και τα φλαβονοειδή. (165, 166)

Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, τα εκχυλίσματα *S. scardica* ασκούν δόσοεξαρτώμενες αντιφλεγμονώδεις και γαστροπροστατευτικές δράσεις. Το κλειδί για την διαχείριση της φλεγμονής είναι ο έλεγχος των προφλεγμονωδών μεσολαβητών (NF-B, TNF-, IL-1 και IL-6). (167) Μελέτες έχουν δείξει ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του *S. scardica* έχει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που είναι συγκρίσιμες με εκείνες του μη στεροειδούς αντιφλεγμονώδους φαρμάκου ινδομεθακίνη. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα παρασκευάσματα του *S. scardica* έχουν αντιβακτηριακή δράση έναντι ορισμένων τυπικών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς και του ζυμομύκητα *Candida albicans* (168). Τα εκχυλίσματα *Sideritis* έχουν, επίσης, αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν τις ROS να βλάπτουν το DNA, να μειώνουν την ποσότητα βλάβης που προκαλείται και να αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. (169)

Όσον αφορά την χρήση εκχυλισμάτων *Sideritis* ως θεραπεία κατά διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του ήπατος και του παχέως εντέρου, τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα. (170) Η υψηλή συγκέντρωση αρκετών φαινολικών ενώσεων, ιδιαίτερα μερικών φλαβονοειδών, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων. (168)

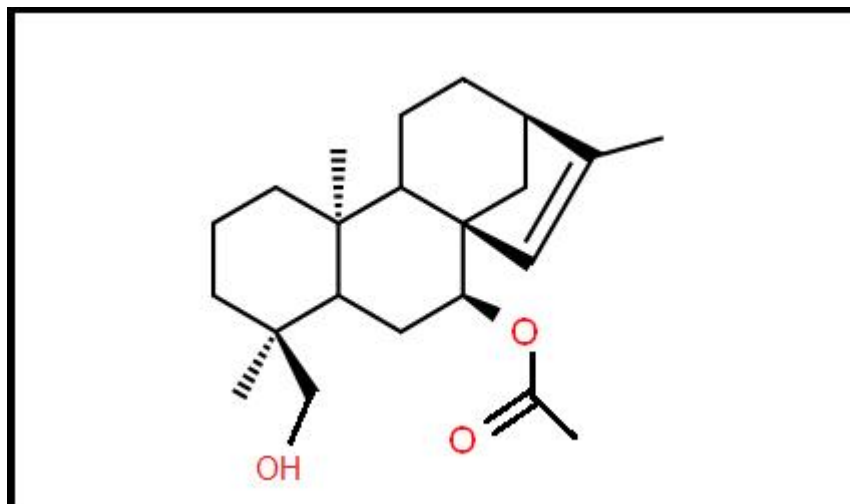
Μεθανολικά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα μέρη των λουλουδιών και των φύλλων του είδους *Sideritis ozturkii* έχουν δοκιμαστεί έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέως εντέρου DLD-1 (colorectal cancer) για να επιβεβαιωθεί η κυτταροτοξικότητά τους. Οι μετρήσεις κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν με την χρήση 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) και οι δείκτες κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα Elisa Reader. Το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι τα εκχυλίσματα άνθεων και φύλλων που ελήφθησαν από το είδος *Sideritis ozturkii* εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα DLD-1 με τρόπο δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο. Επιπλέον, πιστεύεται ότι τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν θα μπορούσαν να είναι ευεργετικά ως φυσικός αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας. (164)

Σε άλλη μελέτη έχουν χρησιμοποιηθεί οι ανθρώπινες καρκινικές σειρές DLD-1, HeLa (cervical cancer) και A549 (adenocarcinoma) όπου, επίσης, με την μέθοδο MTT υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀, $26,4 \pm 3,7$, $44,7 \pm 7,2$ και $46,0 \pm 4,9$ μM , αντίστοιχα. (171)

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί η κυτταροτοξική δράση διαφόρων εκχυλισμάτων *S. scardica* έναντι της σειράς C6 του γλοιώματος αρουραίου, τα δεδομένα που ελήφθησαν αποκάλυψαν ότι τα εκχυλίσματα άσκησαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση. Το εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα προκάλεσε αύξηση στην παραγωγή ROS, οδηγώντας σε αποπτωτικό και αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και αυτοφαγία. Σημαντικό εύρημα είναι ότι κανένα από τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν δεν ήταν κυτταροτοξικό για τα αστροκύτταρα αρουραίου σε πρωτογενή καλλιέργεια. (172)

Όλα τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύουν ότι η σιδερόλη θα μπορούσε να εμφανίσει σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων GBM και να αποτελέσει μια νέα πιθανή θεραπεία κατά του GBM, και μάλιστα λιγότερη τοξική συγκριτικά με τις κλασσικές χημειοθεραπείες. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της σιδερόλης για

την χρήση της ως θεραπεία κατά του GBM είναι ότι το μοριακό βάρος της είναι 346,5 Daltons, γεγονός που επιτρέπει σε αυτόν τον παράγοντα να διαπεράσει τον BBB. (Σχήμα 4)



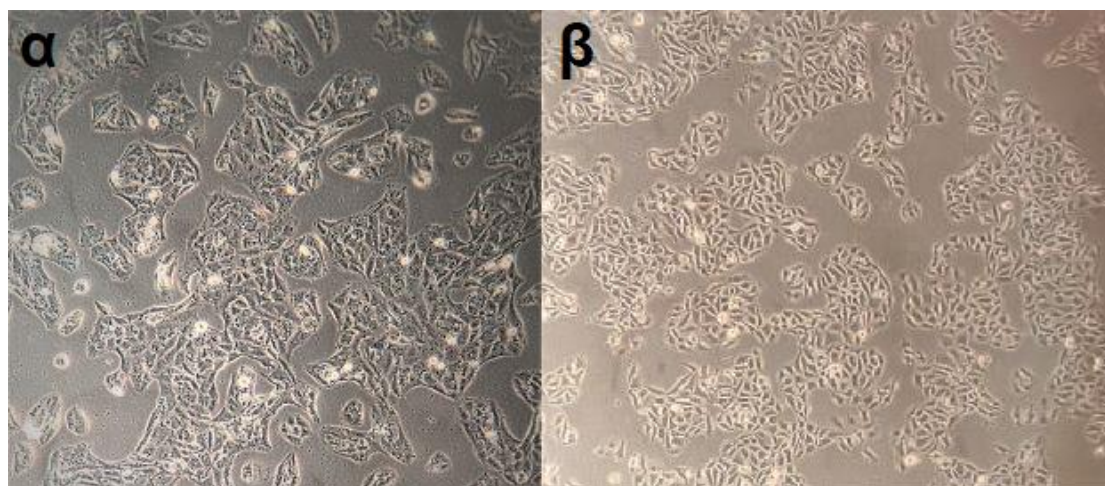
Σχήμα 4. Μοριακή δομή της Σιδερόλης

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ & ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι σειρές ανθρώπινου γλοιώματος U87 και T98 (Σχήμα 5), τις οποίες προμηθευτήκαμε απ' τον Dr W.K. Alfred Yung (Department of Neuro-Oncology, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) και το ATCC (Manassas, VA, USA)

αντίστοιχα. Η κυτταρική σειρά U87 έχει επιθηλιακή μορφολογία. Απομονώθηκε από μία γυναίκα 44 ετών, στο πανεπιστήμιο της Ουψάλα το 1966. Είναι IDH-wild type ενώ υπάρχουν μεταλλάξεις και στα γονίδια *NF1*, *TP53*, *PTEN*, *TERT*, *MGMT*. (173) Η κυτταρική σειρά T98 μοιάζει μορφολογικά με ινοβλάστες. Απομονώθηκε από τον εγκέφαλο άνδρα ασθενή, 61 ετών, με GBM. Είναι IDH-wild type και υπάρχουν μεταλλάξεις στα γονίδια *PARD3*, *PTEN*, *TP53*, *MGMT*. (174) Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NIH/3T3. Η κυτταρική σειρά αυτή αποτελεί μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές στη βιοϊατρική έρευνα, από την πρώτη της καθιέρωση το 1962. Απομονώθηκε αρχικά από εμβρυϊκούς ινοβλάστες *Mus musculus f. domestica* («ελβετικό ποντίκι»), οι οποίοι προήλθαν από το μεσόδερμα και το εξώδερμα του και μετατράπηκαν σε αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά. (175) Και οι τρεις κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), το οποίο έχει εμπλουτιστεί με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL). Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε υγρές συνθήκες σε 5% CO₂ στους 37°C.



Σχήμα 5. Απεικόνιση των κυτταρικών σειρών GBM T98 (α) και U87 (β).

2.2 ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ & ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η σιδερόλη απομονώθηκε από εκχύλισμα εξανίου, από καλλιεργημένο *Sideritis scardica*. (138) Αραιώθηκε σε Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και αποθηκεύτηκε στους

-80 °C. Η TMZ προμηθεύτηκε από την Sigma Aldrich, αραιώθηκε σε DMSO και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Πριν από κάθε πείραμα, η σιδερόλη και η TMZ αραιώνονταν από το αρχικό διάλυμα στην τελική συγκέντρωση με DMEM.

2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους. Την μέθοδο MTT και την μέθοδο Trypan blue.

Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Τα εξαρτώμενα από NAD(P)H ένζυμα κυτταρικής οξειδοαναγωγής μπορούν, υπό καθορισμένες συνθήκες, να αντικατοπτρίζουν τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που υπάρχουν. Αυτά τα ένζυμα είναι ικανά να ανάγουν τη χρωστική τετραζολίου MTT, η οποία είναι χημικά βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, στην αδιάλυτη φορμαζάνη της, η οποία έχει μωβ χρώμα. (176) Για την μέθοδο MTT (Sigma Life Sciences), στρώθηκαν περίπου 5.000 κύτταρα σε 96-well τρυβλίο και επωάστηκαν για 24 ώρες. Στην συνέχεια προστέθηκε η σιδερόλη σε συγκεντρώσεις 10-300μM. Μετά από 72 ώρες προστέθηκε το MTT. Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (TECAN, infinite M200 PRO), με ποσοτική αξιολόγηση του σχηματισμού MTT-φορμαζάνης σε μήκος κύματος φωτός 540nm και μήκος κύματος αναφοράς 740nm.

Η χρώση με τρυπανικό κυανό (Trypan blue) είναι μια βασική τεχνική στην κυτταρική βιολογία, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η χρήση του Trypan blue επιτρέπει στους ερευνητές να διακρίνουν μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων με βάση την ακεραιότητα της μεμβράνης. (177) Για την μέθοδο Trypan Blue στρώθηκαν 20.000 κύτταρα σε 12-well τρυβλίο και επωάστηκαν για 24 ώρες. Στην συνέχεια προστέθηκε η σιδερόλη σε συγκεντρώσεις 10-60μM. Μετά από 72 ώρες πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Trypan blue. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επεξεργασία με TMZ, και στις δύο κυτταρικές σειρές, αξιολογήθηκε με την μέθοδο Trypan Blue. Στα κύτταρα T98 προστέθηκε TMZ σε συγκεντρώσεις 100-600 μM για 72 ώρες και στα κύτταρα U87 σε συγκεντρώσεις 20-100 μM για 72 ώρες. Κάθε μέθοδος πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα

εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Επίσης, σε κάθε πείραμα υπήρχαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism (έκδοση 6).

2.4 ΧΡΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ CRYSTAL VIOLET

Στη βιοϊατρική έρευνα, το κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet) χρησιμοποιείται για τη χρώση των κυττάρων που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, ώστε να διατηρηθούν και να γίνουν εύκολα ορατά, καθώς τα περισσότερα κύτταρα είναι άχρωμα. Το Crystal violet είναι μία τριαρυλομεθανική χρωστική η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθούν τα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας ύστερα από την επίδραση κυτταροτοξικών παραγόντων. (178) Για την παρασκευή της διαλύονται 0,2 g σκόνης (Crystal Violet Powder, MERCK) σε μίγμα 80ml ddH₂O και 20ml μεθανόλης.

Για την χρώση κυττάρων με Crystal Violet, 100.000 κύτταρα στρώθηκαν σε 6-well τρυβλία και μετά από 24 ώρες προστέθηκε σιδερόλη σε συγκεντρώσεις IC₅₀ και διπλάσια τιμή IC₅₀. 72 ώρες αργότερα τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε 1ml απ' το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (0,2% Crystal Violet) σε κάθε well. Το τρυβλίο αναδεύτηκε κυκλικά για 1 min και αφού απορρίφθηκε το διάλυμα, ξεπλύθηκε με νερό και παρέμεινε σε απορροφητικό χαρτί όλη νύχτα.

2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου ενός πληθυσμού κυττάρων. Συγκεκριμένα, αναλύεται η σκέδαση του φωτός και η εκπομπή φθορισμού από τα κύτταρα, όταν αυτά έχουν χρωματιστεί με την κατάλληλη χρωστική ουσία. Τα δεδομένα αναλύονται σε μορφή ιστογραμμάτων, στικτογραμμάτων και πυκνογραμμάτων. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε μία απ' τις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, συγκεκριμένα στη φάση ηρεμίας (G₀/G₁), στη φάση αντιγραφής του DNA (S) ή/και στη φάση μίτωσης (G₂/M) καθώς και των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση απόπτωσης (subG₀/G₁). Τα κύτταρα επωάζονται με μια φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται στο

DNA τους και μετά από ανάλυση μετράται η ένταση του φθορισμού, η οποία αντανακλά το περιεχόμενο DNA. (179) Στην παρούσα μελέτη, η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι το ιωδιούχο προπίδιο (PI).

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου DNA, στρώθηκαν περίπου 20.000 κύτταρα σε 12-well τρυβλίο και μετά από 24 ώρες επώαστηκαν με σιδερόλη σε συγκεντρώσεις IC50 και διπλάσια τιμή IC50 για άλλες 72 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS), συλλέχθηκαν μετά από επώαση με θρυψίνη και διατηρήθηκαν στους 37 °C για 20 λεπτά με διάλυμα PI (50 g/mL PI, 20 mg/mL RNase A και 0,1% Triton X-100). Τα δεδομένα φθορισμού PI συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο ροής (Omnicyt, Cytognos S.L.) και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism (έκδοση 6) και το λογισμικό MedCalc (δοκιμαστική έκδοση). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Επίσης, σε κάθε πείραμα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση.

2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για την μελέτη της κυτταρικής μεταναστευτικότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσομοίωσης δι' αμυχής. Στην μέθοδο αυτή δημιουργούμε μια αμυχή στην κυτταρική καλλιέργεια, χαράζοντας τον πάτο του τρυβλίου, και αξιολογούμε την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων, δηλαδή την ικανότητα των κυττάρων για την επούλωση του τραύματος. (180) Στρώθηκαν 100.000 κύτταρα σε 6-well τρυβλίο και επώαστηκαν έως ότου αναπτυχθούν κατά 70-80% στο τρυβλίο. Στην συνέχεια, επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο DMEM με 1% FBS, προστέθηκε σιδερόλη σε συγκεντρώσεις IC50 και μισή τιμή IC50, ενώ χαράκτηκε (scratched) ο πάτος του τρυβλίου με χρήση 200μl pipette tip. Η μεταναστευτική απόσταση αξιολογήθηκε σε 0, 24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη σιδερόλης χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism (έκδοση 6). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Επίσης, σε κάθε πείραμα υπήρχαν δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση.

2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ & TMZ

Για να αξιολογηθεί εάν υπάρχει συνεργιστική δράση στην συνδυαστική θεραπεία σιδερόλης και TMZ, οι κυτταρικές σειρές T98 και U87 υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιδερόλη, TMZ και διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών. 10.000 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 24-well τρυβλία και μετά από 24 ώρες προστέθηκαν σιδερόλη, TMZ και ο συνδυασμός τους σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μεταξύ μισής και διπλάσιας τιμής IC₅₀. Στα κύτταρα T98 προστέθηκε σιδερόλη σε συγκεντρώσεις 9 μM , 13,5 μM , 18 μM , 27 μM και 36 μM , ενώ TMZ σε συγκεντρώσεις 165 μM , 247 μM , 330 μM , 495 μM και 660 μM . Στα κύτταρα U87 προστέθηκε σιδερόλη σε συγκεντρώσεις 6,5 μM , 9,75 μM , 13 μM , 19,5 μM και 26 μM , και TMZ σε συγκεντρώσεις 25 μM , 37,5 μM , 50 μM , 75 μM και 100 μM . Οι συγκεντρώσεις των ουσιών συνδυάστηκαν αναλογικά από τη χαμηλότερη στην υψηλότερη. Μετά από 72 ώρες, η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο Trypan blue. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Επίσης, σε κάθε πείραμα υπήρχαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό CompuSyn.

2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ & ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Για να αξιολογηθεί εάν υπάρχει συνεργιστική δράση στην συνδυαστική θεραπεία σιδερόλης και ακτινοβολίας, η κυτταρική σειρά T98 υποβλήθηκε μεμονωμένα σε ακτινοθεραπεία και σε αγωγή με σιδερόλη καθώς και σε συνδυασμό αυτών. Δύο 12-well τρυβλία καλλιεργήθηκαν με 20.0000 κύτταρα/well και μετά από 24 ώρες ακτινοβολήθηκαν με 2Gy και 4Gy αντίστοιχα. Μετά από 1 ώρα προστέθηκε σιδερόλη σε συγκεντρώσεις 9 μM , 13,5 μM , 18 μM , 27 μM και 36 μM και τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 ώρες. Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο Trypan blue. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Σε

κάθε πείραμα υπήρχαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό CompuSyn.

2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ

Η μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων NIH/3T3 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο MTT. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 96-well τρυβλία και αφού επωάστηκαν για 24 ώρες προστέθηκε σιδερόλη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, 1μM έως 150μM. Μετά από 72 ώρες προστέθηκε το MTT. Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (TECAN, infinite M200 PRO), με ποσοτική αξιολόγηση του σχηματισμού MTT-φορμαζάνης σε μήκος κύματος φωτός 540nm και μήκος κύματος αναφοράς 740nm. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Επίσης, σε κάθε πείραμα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση.

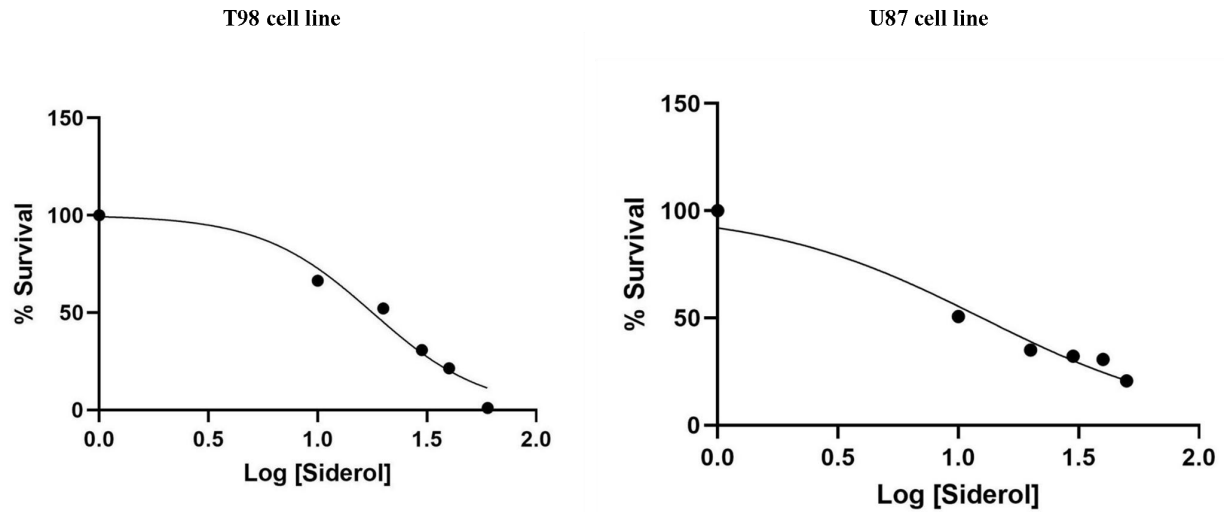
2.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση. Χρησιμοποιήθηκε το p-test για πολλαπλές συγκρίσεις για να εξεταστεί η σημασία των διαφορών μεταξύ των αποτελεσμάτων διαφόρων πειραματικών συνθηκών. Μια διαφορά θεωρήθηκε σημαντική όταν η τιμή p ήταν μικρότερη από 0,05.

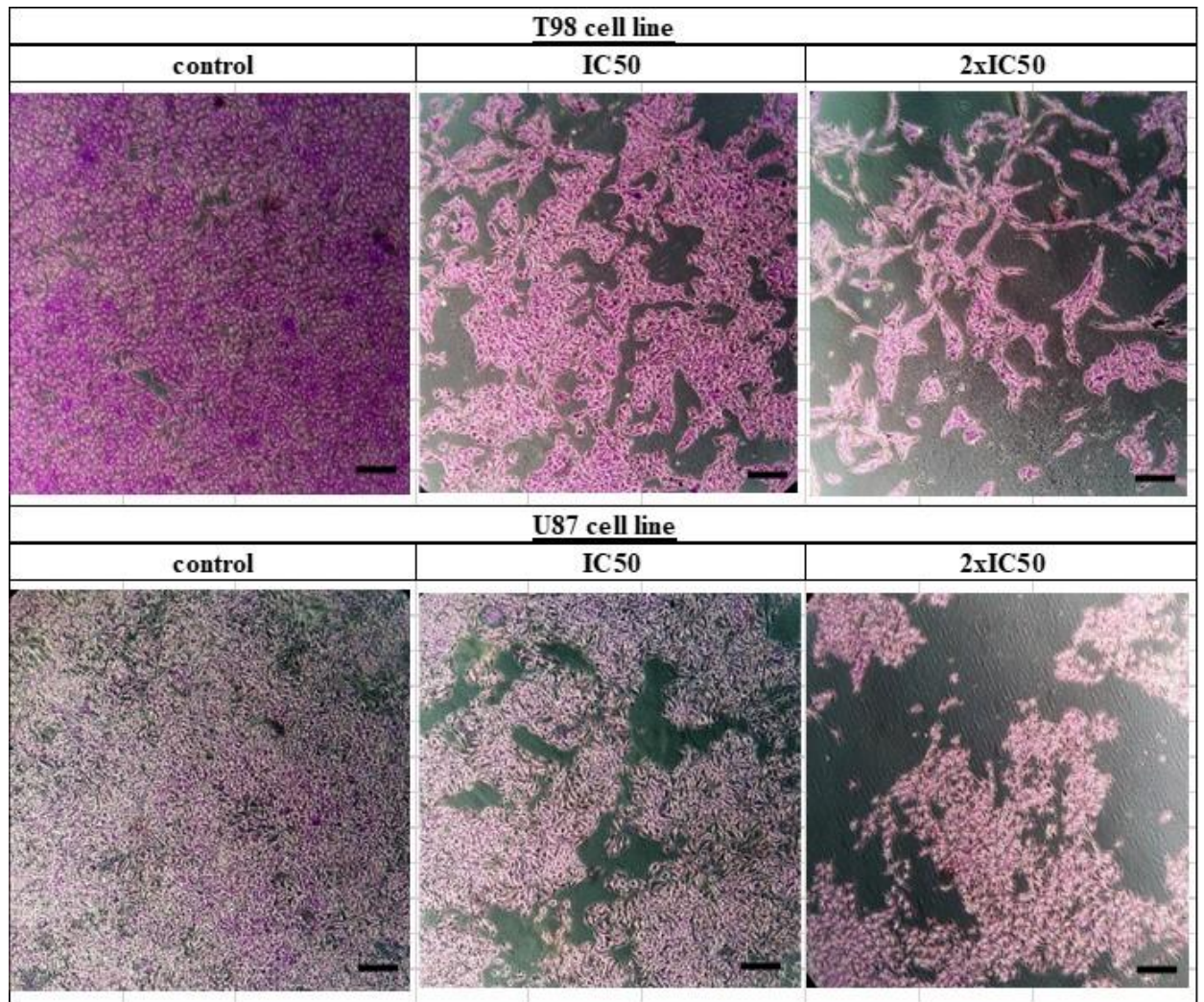
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΣΙΔΕΡΟΛΗ & ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ IC50

Οι δύο κυτταρικές σειρές T98 και U87 καλλιεργήθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σιδερόλης για 72 ώρες για να ελεγχθεί η ευαισθησία των κυττάρων GBM στη σιδερόλη. Και οι δύο κυτταρικές σειρές ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με σιδερόλη με ποικίλους βαθμούς ευαισθησίας. Οι τιμές IC50 της σιδερόλης που υπολογίστηκαν ήταν 18 μM στα κύτταρα T98 και 13 μM στα κύτταρα U87. **(Σχήμα 6)**. Όταν αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις σιδερόλης, τα κύτταρα υπέστησαν αλλαγές όπως συρρίκνωση και θάνατο, κάτι που ήταν ορατό στο μικροσκόπιο **(Σχήμα 7)**.



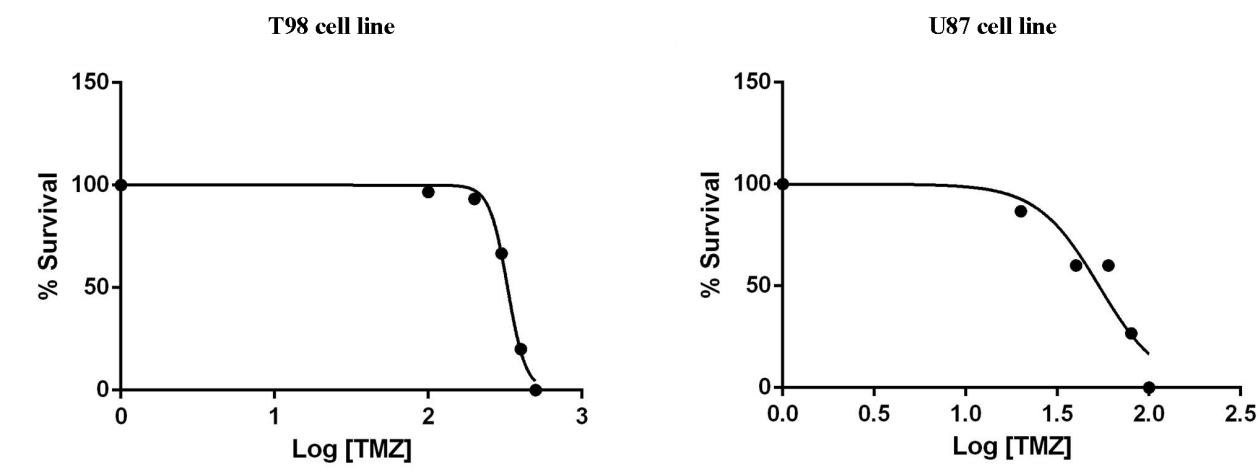
Σχήμα 6. Η κυτταροτοξική δράση της Σιδερόλης στα T98 και U87 κύτταρα, με 72 ώρες επώαση. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι κανονικοποιημένες σε μη επεξεργασμένα κύτταρα. Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο non-linear regression analysis του GraphPad Prism (έκδοση 6).



Σχήμα 7. Χρώση των κυττάρων T98 και U87 με *Crystal Violet* (0,2%). Οι εικόνες καταγράφηκαν σε μεγέθυνση 10x. Scales bars = 100μM.

3.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ TMZ & ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ IC50

Για να υπολογίσουμε την τιμή IC50 για την TMZ στις κυτταρικές σειρές T98 και U87, τα κύτταρα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας για 72 ώρες. Οι τιμές IC50 που υπολογίστηκαν ήταν 330μM στα T98 κύτταρα και 50μM στα U87 κύτταρα (Σχήμα 8).



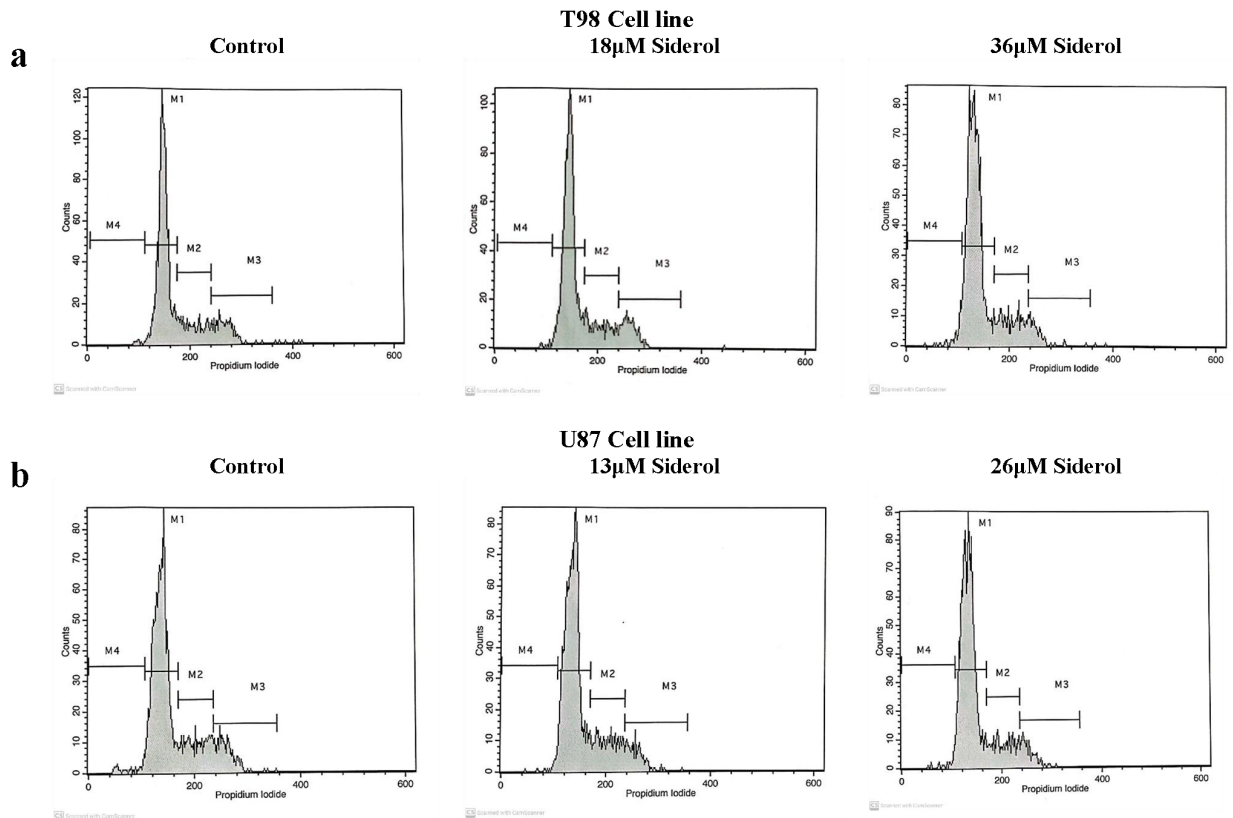
Σχήμα 8. Η κυτταροτοξική δράση της TMZ στις κυτταρικές σειρές T98 και U87, μετά από 72 ώρες επώαση. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι κανονικοποιημένες σε μη επεξεργασμένα κύτταρα. Οι τιμές IC_{50} προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο *non-linear regression analysis* του GraphPad Prism (έκδοση 6).

3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΣΙΔΕΡΟΛΗ

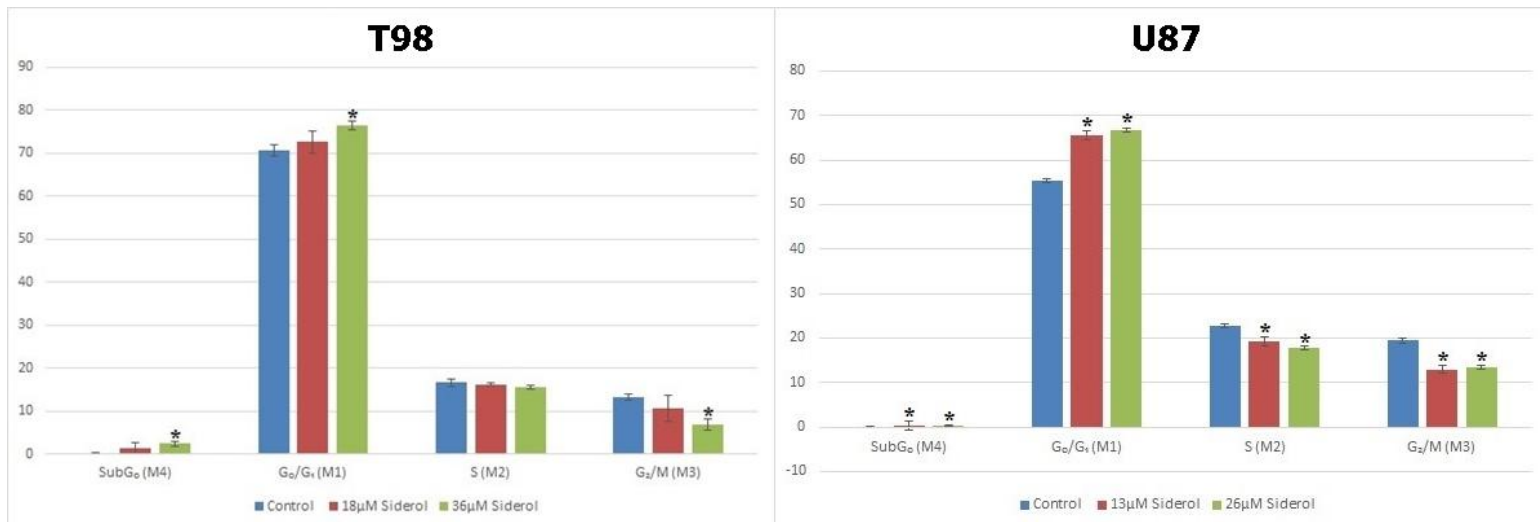
Για την διερεύνηση των επιδράσεων της σιδερόλης στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στις κυτταρικές σειρές T98 και U87, τα κύτταρα επώαστηκαν με την ουσία σε συγκέντρωση IC_{50} και διπλάσια τιμή IC_{50} για 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σιδερόλη προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1 και στις δύο κυτταρικές σειρές με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (**Πίνακας 6, Σχήμα 9, Σχήμα 10**).

Πίνακας 6. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98 (a) και U87 (b) μετά από επώαση με σιδερόλη. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές και οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) σημειώνονται με αστερίσκο.

	Treatment	SubG ₀ (M4)	G ₀ /G ₁ (M1)	S (M2)	G ₂ /M (M3)
a	Control	0.26 ± 0.1	70.64 ± 1.3	16.58 ± 0.8	13.19 ± 0.7
	18 μM Siderol	1.3 ± 1.2	72.5 ± 2.5	16.24 ± 0.4	10.6 ± 3.1
	36 μM Siderol	2.4 ± 0.6 *	76.37 ± 1.1 *	15.57 ± 0.4	6.86 ± 1.2 *
	Treatment	SubG ₀ (M4)	G ₀ /G ₁ (M1)	S (M2)	G ₂ /M (M3)
b	Control	0 ± 0.01	55.4 ± 0.5	22.7 ± 0.4	19.4 ± 0.7
	13 μM Siderol	0.23 ± 0.03 *	65.47 ± 0.59 *	19.13 ± 0.74 *	12.97 ± 0.12 *
	26 μM Siderol	0.3 ± 0.15 *	66.7 ± 0.5 *	17.8 ± 0.44 *	13.5 ± 0.44 *



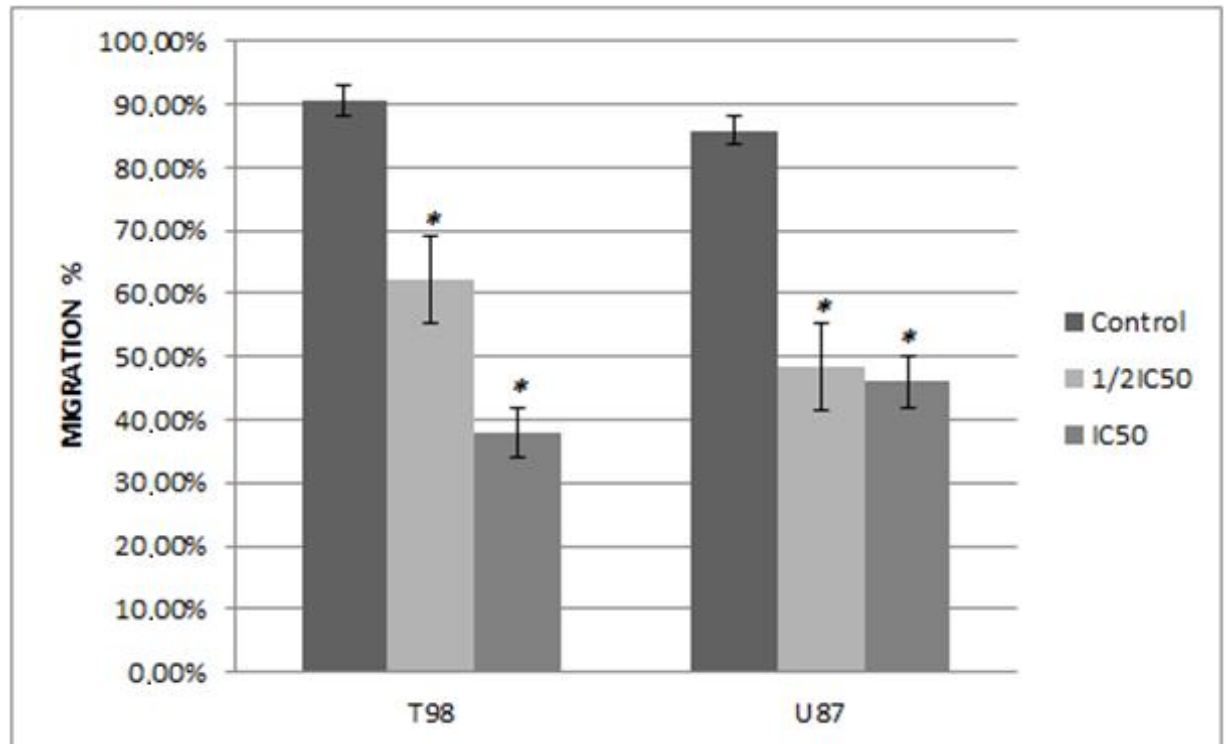
Σχήμα 9. Ιστογραμμική αναπαράσταση της κατανομής του κυτταρικού κύκλου στις κυτταρικές σειρές T98 (a) και U87 (b) μετά από επώαση με σιδερόλη σε συγκεντρώσεις IC₅₀ και διπλάσιες τιμές IC₅₀ για 72 ώρες.



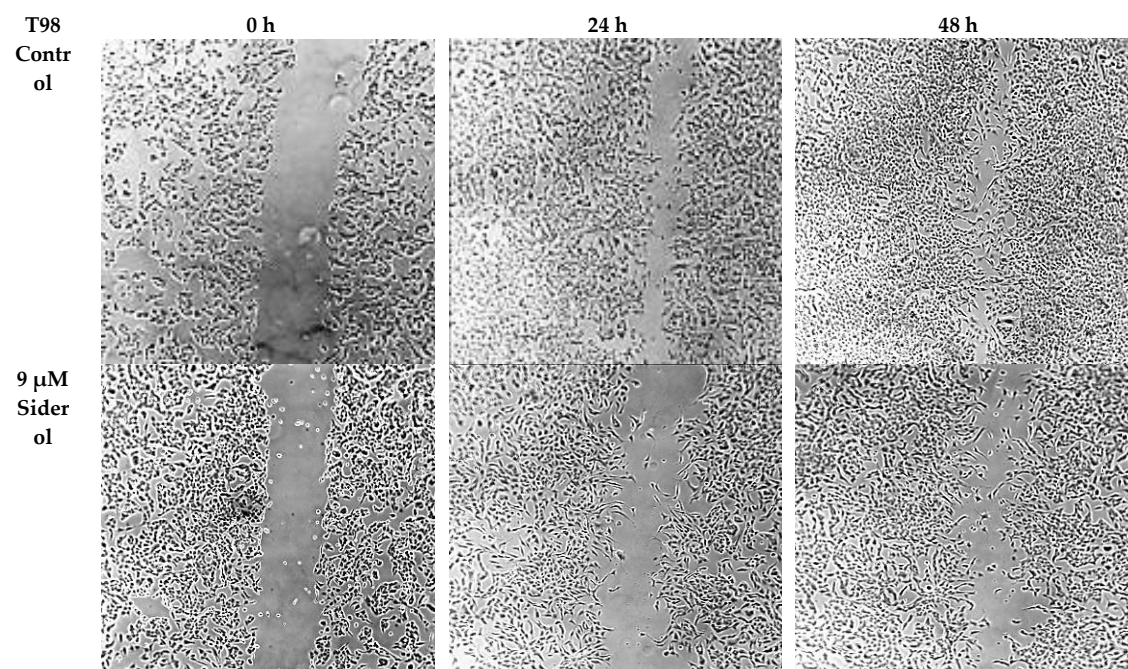
Σχήμα 10. Γραφική αναπαράσταση της κατανομής του κυτταρικού κύκλου και στις δύο κυτταρικές σειρές μετά από επεξεργασία με σιδερόλη σε IC₅₀ και διπλάσιες συγκεντρώσεις IC₅₀. Χρησιμοποιείται αστερίσκος για να υποδείξει σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

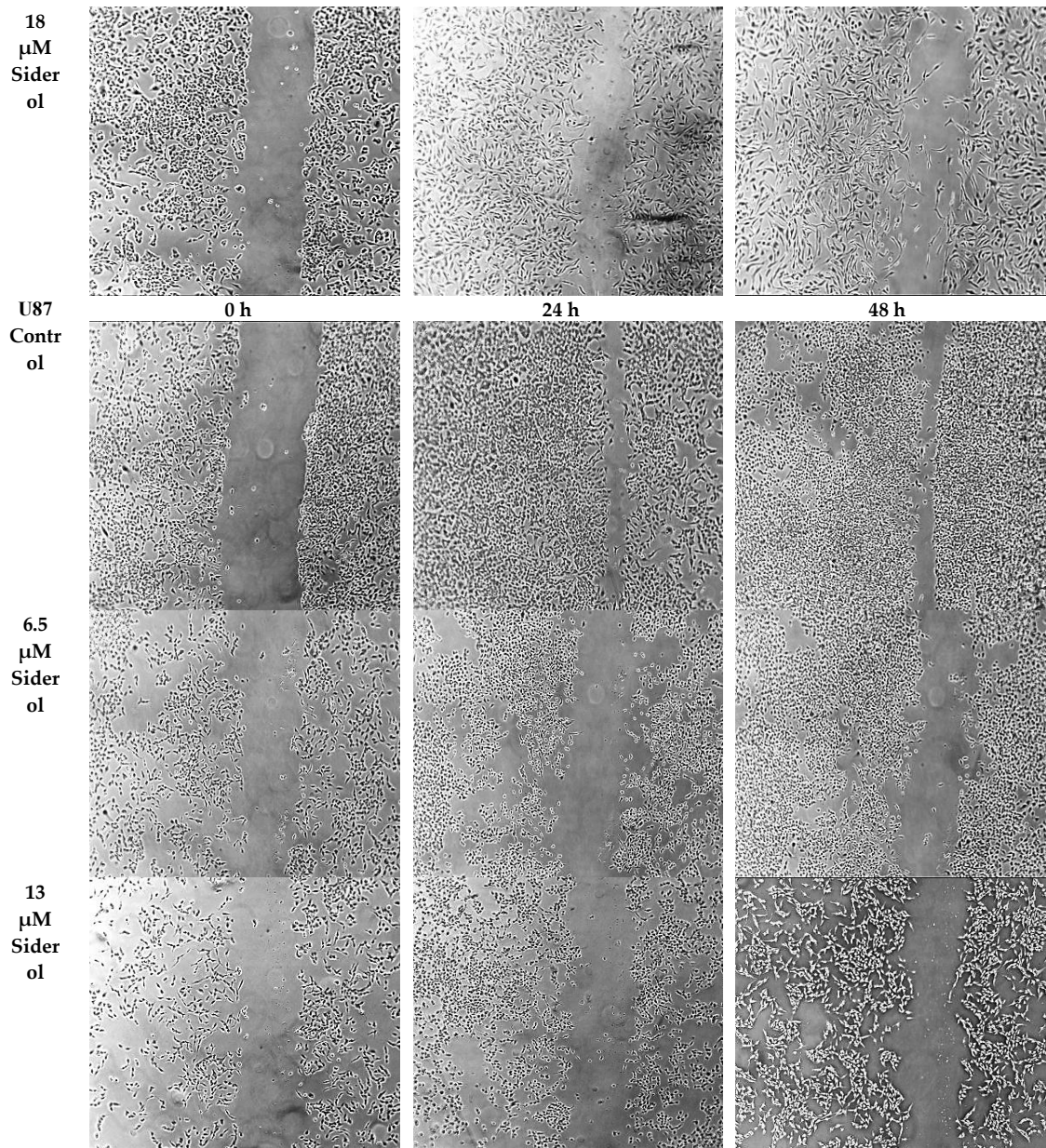
3.4 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟΤΗΤΑ

Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν η σιδερόλη θα μπορούσε να επηρεάσει την μεταναστευτική ικανότητα των κυτταρικών σειρών T98 και U87, τα κύτταρα επωάστηκαν με την ουσία σε συγκεντρώσεις IC₅₀ και μισή τιμή IC₅₀ και μελετήθηκαν τα αποτελέσματα σε χρόνους 0, 24 και 48 ώρες. (Σχήμα 11, Σχήμα 12).



Σχήμα 11. Η επίδραση της σιδερόλης στην μεταναστευτική ικανότητα των κυτταρικών σειρών GBM T98 και U87 μετά από 48 ώρες επώαση. Πλάτος μετανάστευσης = Πλάτος 0h – Πλάτος 48h. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά μετανάστευσης και στις 0 ώρες το πλάτος ορίστηκε ως 0%. Χρησιμοποιείται αστερίσκος για να υποδείξει τις διαφορές που είναι σημαντικές ($p < 0,05$).





Σχήμα 12. Η επίδραση της σιδερόλης στην μεταναστευτική ικανότητα των κυτταρικών σειρών T98 και U87 στις 0, 24 και 48 ώρες επώασης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την ουσία σε συγκεντρώσεις IC50 και μισή τιμή IC50. Οι εικόνες καταγράφηκαν σε μεγέθυνση 5x. Scales bars = 200μM.

3.5 Η ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ & TMZ ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ GBM

Η δράση της σιδερόλης σε συνδυασμό με την TMZ, στις δύο κυτταρικές σειρές GBM, καθώς και οι συγκεντρώσεις κάθε ουσίας που χορηγήθηκαν, συνοψίζονται στους

Πίνακες 7 και 8. Και στις δύο κυτταρικές σειρές η σιδερόλη και η TMZ έχουν συνεργιστική δράση στην πλειονότητα των συνδυασμών που δοκιμάστηκαν. Στα κύτταρα T98 η υψηλότερη συνέργεια παρατηρήθηκε όταν η σιδερόλη και η TMZ χορηγήθηκαν μεταξύ των συγκεντρώσεων IC50 και μισή τιμή IC50 (13,5 μ M σιδερόλη και 247 μ M TMZ), ενώ παρατηρήθηκε ανταγωνιστική δράση μόνο στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα στα κύτταρα U87, παρατηρήθηκε ανταγωνιστική δράση μόνο στις υψηλότερες συγκεντρώσεις σιδερόλης και TMZ (Σχήμα 13, Σχήμα 14).

Πίνακας 7. Αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της TMZ σε κύτταρα T98. Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κάθε ουσίας, η δράση (% θνησιμότητα) και η τιμή CI (Combination Index) για κάθε συνδυασμό. Η τιμή CI επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων, όπου $CI < 1$, $=1$ και >1 υποδηλώνει συνέργεια, αθροιστική δράση και ανταγωνισμό, αντίστοιχα. Τα δεδομένα προσδιορίστηκαν με το λογισμικό CompuSyn.

Siderol (μ M)	Temozolomide (μ M)	Effect	CI	Conclusion
9	165	0.57	1.08150	Antagonism
13.5	247	0.70	0.99326	Synergism
18	330	0.82	0.80500	Synergism
27	495	0.86	0.97489	Synergism
36	660	0.96	0.58721	Synergism

Πίνακας 8. Αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της TMZ σε κύτταρα U87. Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κάθε ουσίας, η δράση (% θνησιμότητα) και η τιμή CI (Combination Index) για κάθε συνδυασμό. Η τιμή CI επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων, όπου $CI < 1$, $=1$ και >1 υποδηλώνει συνέργεια, αθροιστική δράση και ανταγωνισμό, αντίστοιχα. Τα δεδομένα προσδιορίστηκαν με το λογισμικό CompuSyn.

Siderol (μ M)	Temozolomide (μ M)	Effect	CI	Conclusion
6.5	25	0.77	0.61869	Synergism
9.75	37.5	0.77	0.92803	Synergism
13	50	0.89	0.71018	Synergism
19.5	75	0.91	0.90397	Synergism

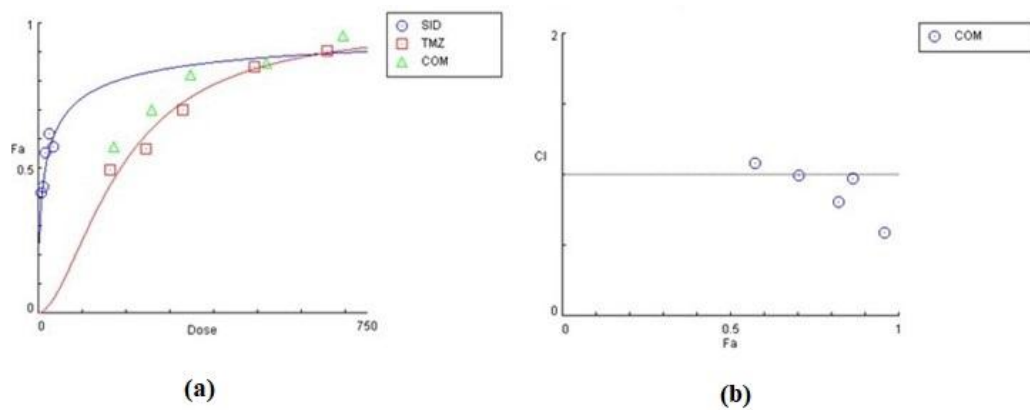
26

100

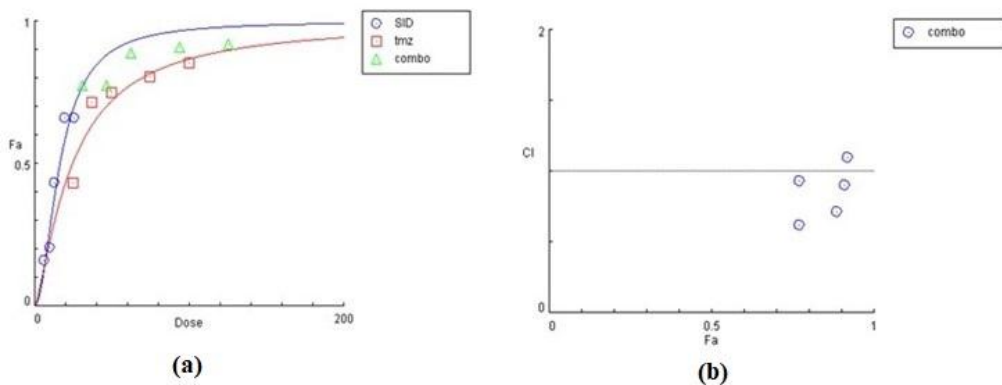
0.92

1.0944

Antagonism



Σχήμα 13. Γραφική αναπαράσταση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της TMZ στην κυτταρική σειρά T98, από την έκθεση αποτελεσμάτων του λογισμικού CompuSyn. Η καμπύλη δόσης-δράσης (Dose-Fa) (α) για κάθε ουσία, όπως και για τον συνδυασμό τους. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τις συγκεντρώσεις των ουσιών και ο άξονας y την δράση τους (% θνησιμότητα). Το διάγραμμα Δείκτη Συνδυασμού (CI) (β) αντιπροσωπεύει τους συνδυασμούς όπου $CI < 1$, $=1$ ή >1 .



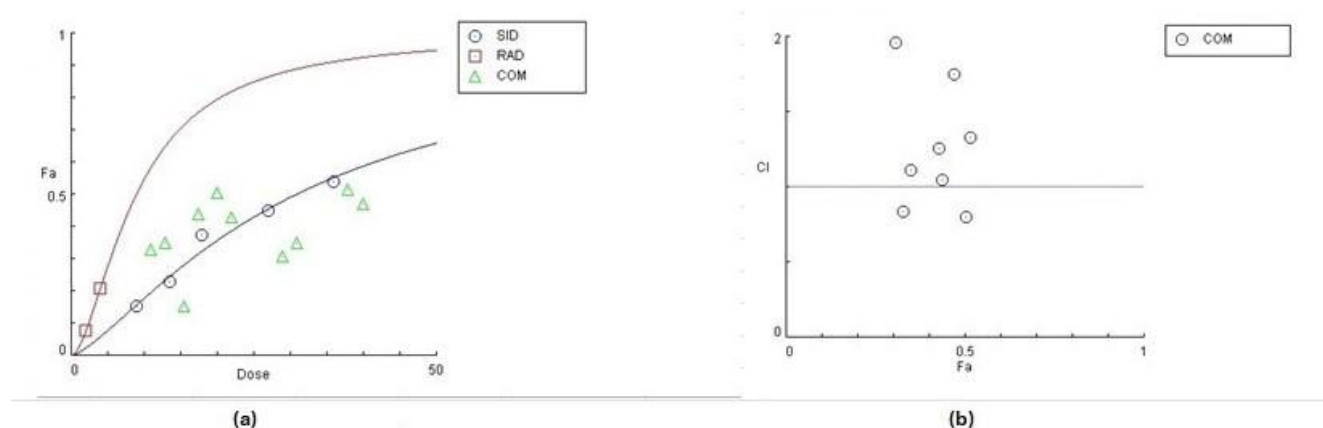
Σχήμα 14. Γραφική αναπαράσταση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της TMZ στην κυτταρική σειρά U87, από την έκθεση αποτελεσμάτων του λογισμικού CompuSyn. Η καμπύλη δόσης-δράσης (Dose-Fa) (α) για κάθε ουσία, όπως και για τον συνδυασμό τους. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τις συγκεντρώσεις των ουσιών και ο άξονας y την δράση τους (% θνησιμότητα). Το διάγραμμα Δείκτη Συνδυασμού (CI) (β) αντιπροσωπεύει τους συνδυασμούς όπου $CI < 1$, $=1$ ή >1 .

3.6 Η ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΙΔΕΡΟΛΗΣ & ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ T98 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ GBM

Η δράση της σιδερόλης σε συνδυασμό με την ακτινοβολία, στην κυτταρική σειρά T98, καθώς και οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χορηγήθηκαν, συνοψίζονται στον **Πίνακα 9**. Η σιδερόλη και η ακτινοβολία φαίνεται να έχουν ανταγωνιστική δράση στην πλειονότητα των συνδυασμών που δοκιμάστηκαν. Παρ' όλα αυτά υπήρχαν δύο συνδυασμοί που προκάλεσαν συνεργιστική δράση (**Σχήμα 15**). Περαιτέρω μελέτη της συνδυαστικής αυτής δράσης είναι απαραίτητη.

***Πίνακας 9.** Αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της ακτινοβολίας σε κύτταρα T98. Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της σιδερόλης, οι δόσεις ακτινοβολίας, η δράση (% θνησιμότητα) και η τιμή CI (Combination Index) για κάθε συνδυασμό. Η τιμή CI επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων, όπου $CI < 1$, $=1$ και >1 υποδηλώνει συνέργεια, αθροιστική δράση και ανταγωνισμό, αντίστοιχα. Τα δεδομένα προσδιορίστηκαν με το λογισμικό CompuSyn.*

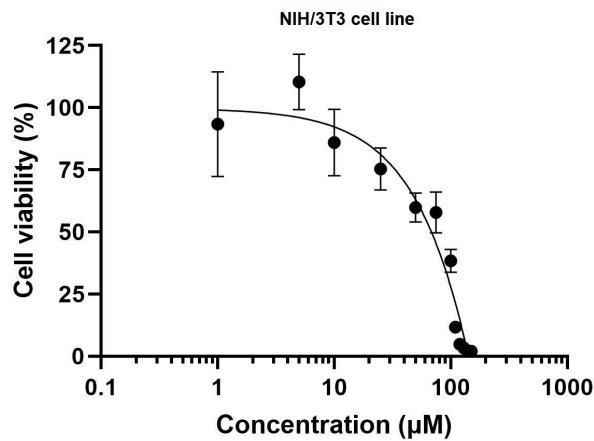
Siderol (μM)	Radiation (Gy)	Effect	CI	Conclusion
9	2	0.33	0.83828	Synergism
9	4	0.35	1.10919	Antagonism
13.5	2	0.15	2.16828	Antagonism
13.5	4	0.44	1.04648	Antagonism
18	2	0.51	0.79886	Synergism
18	4	0.43	1.25919	Antagonism
27	2	0.31	1.96222	Antagonism
27	4	0.35	2.02824	Antagonism
36	2	0.52	1.33288	Antagonism
36	4	0.47	1.75179	Antagonism



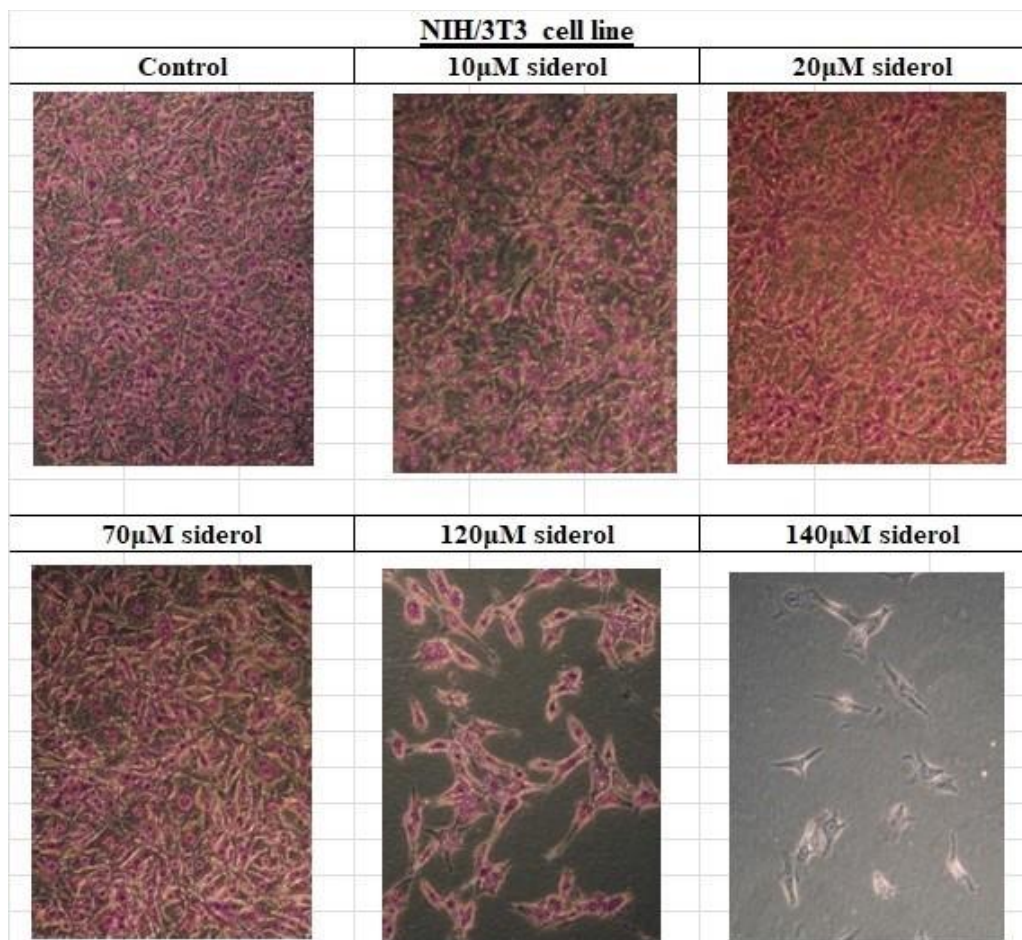
Σχήμα 15. Γραφική αναπαράσταση της συνδυαστικής δράσης της σιδερόλης και της ακτινοβολίας στην κυτταρική σειρά T98, από την έκθεση αποτελεσμάτων του λογισμικού CompuSyn. Η καμπύλη δόσης-δράσης (Dose-Fa) (α) για κάθε ουσία, όπως και για τον συνδυασμό τους. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τις συγκεντρώσεις των ουσιών και ο άξονας y την δράση τους (% θνησιμότητα). Το διάγραμμα Δείκτη Συνδυασμού (CI) (β) αντιπροσωπεύει τους συνδυασμούς όπου $CI < 1$, $=1$ ή >1 .

3.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ NIH/3T3 ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΣΙΔΕΡΟΛΗ

Η επίδραση της σιδερόλης στην βιωσιμότητα των κυττάρων NIH/3T3 παρουσιάζεται στα **Σχήματα 16 και 17**. Η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων σιδερόλης σε κυτταροκαλλιέργειες NIH/3T3 για 72 ώρες έδειξε υποτοξική επίδραση στις αρχικές δοσολογίες 10μM και 20μM και κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50% (IC50) στα 70μM. Υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας, 120μM και 140μM, προκάλεσαν σημαντική τοξική επίδραση με αλλοιώσεις στην μορφολογία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της συρρίκνωσης και του εκτεταμένου κυτταρικού θανάτου.



Σχήμα 16. Η κυτταροτοξική δράση της σιδερόλης στα NIH/3T3 κύτταρα, με 72 ώρες επώαση. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι κανονικοποιημένες σε μη επεξεργασμένα κύτταρα. Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο non-linear regression analysis του GraphPad Prism (έκδοση 6).



Σχήμα 17. Χρώση των κυττάρων NIH/3T3 με Crystal Violet (0,2%). Οι εικόνες καταγράφηκαν σε μεγέθυνση 10x. Scales bars = 100μM.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το GBM είναι ο πιο επιθετικός πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου. Η χειρουργική επέμβαση, η RT και η χημειοθεραπεία είναι οι πιο συχνές θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά του GBM, αλλά η μέση διάρκεια επιβίωσης των ασθενών παραμένει σύντομη. (181) Επιπλέον, τόσο η αντοχή στην RT όσο και στην χημειοθεραπεία αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για την επιτυχή θεραπεία του GBM. Οι φυσικές ενώσεις αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο, καθώς οι περισσότερες απ' αυτές τις ουσίες είναι πολύ χαμηλής τοξικότητας. (182) Νέα προϊόντα από φυσικές ενώσεις προστατεύουν τα νευρογλοιακά κύτταρα μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και την νευροφλεγμονή. Επίσης, περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιώντας τις οδούς απόπτωσης και αναστέλλοντας τα προ-ογκογονικά συμβάντα. (183,184) Αυτά τα προϊόντα θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών που θα βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών και θα παρατείνουν την επιβίωσή τους. (185) Ακόμα, πολλές φυσικές ουσίες έχουν διερευνηθεί και για την συνεργιστική τους δράση με την TMZ ή/και την RT και τα αποτελέσματα φαίνονται ενθαρρυντικά. (186)

Η σιδερόλη είναι ένα διτερπενοειδές που λαμβάνεται από το εκχύλισμα εξανίου του καλλιεργημένου *Sideritis scardica* (Lamiaceae). (187) Ο σιδερίτης περιλαμβάνει περίπου 150 είδη, πολλά από τα οποία είναι δημοφιλή φυτικά φάρμακα στη μεσογειακή λαϊκή ιατρική (188) «Σιδερόχορτο» είναι η κοινή ονομασία για τα υπέργεια μέρη διαφόρων ειδών φυτών σιδερίτης. Σύμφωνα με τον European Medicines Agency (EMA), τα παρασκευάσματα σιδερόχορτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακούφιση του βήχα που σχετίζεται με το κρυολόγημα και για την ανακούφιση από ήπια στομαχική και εντερική δυσφορία. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι έχουν χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τουλάχιστον 30 χρόνια, αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία από κλινικές δοκιμές. Σε προηγούμενες μελέτες, τα εκχυλίσματα σιδερίτη έχουν διερευνηθεί για τις ενδιαφέρουσες βιολογικές τους δράσεις, όπως τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντινευροπαθητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες που έχουν. (189, 190, 191, 192) Έχει αξιολογηθεί η ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από ROS, να περιορίζουν την προκαλούμενη βλάβη και να βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών

επιδιόρθωσης του DNA. (193, 194) Επιπλέον, τα φυτά αυτού του γένους, που είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή, μπορούν να έχουν θεραπευτικό αποτέλεσμα μειώνοντας τα συμπτώματα φλεγμονωδών διεργασιών. Η διαχείριση της φλεγμονής και του νευροπαθητικού πόνου επιτυγχάνεται κυρίως με τη διαχείριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών (NF-κB, TNF-α, IL-1β και IL-6). (195, 196) Άλλες μελέτες έχουν καταδείξει την αντιγηραντική δράση των εκχυλισμάτων Sideritis, μέσω της αντι-υαλουρονικής δράσης (197, 198) και των αντιμικροβιακών δράσεων. (199)

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων Sideritis. Έχουν διερευνηθεί οι κυτταρικές σειρές DLD1 (ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου), HL60 (ανθρώπινη προμυελοκυτταρική λευχαιμία) και ARH77 (ανθρώπινο μύελωμα), μετά από επεξεργασία με μεθανολικά εκχυλίσματα του είδους Sideritis. Τα δεδομένα αποκάλυψαν ότι τα χρησιμοποιημένα εκχυλίσματα είχαν κυτταροτοξική δράση έναντι όλων των εφαρμοζόμενων τύπων καρκινικών κυττάρων με τρόπο που εξαρτάται από τη δόση και τον χρόνο. Ο κυτταρικός θάνατος συμβαίνει με απόπτωση. Η επίδραση των εκχυλισμάτων Sideritis στο επίπεδο έκφρασης του προ-αποπτωτικού γονιδίου CASPASE 3, αξιολογήθηκε και βρέθηκε να έχει θετική επίδραση. (200, 201, 202) Άλλα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στον αποπτωτικό μηχανισμό των κυττάρων, όπως τα BAX, BCL2, p53 και TNF, έχουν επίσης διερευνηθεί σε κυτταρικές σειρές DLD1 και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι τα εκχυλίσματα Sideritis οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση. (203) Επιπλέον, στην κυτταρική σειρά MCF-7 (ανθρώπινος καρκίνος του μαστού), αποδείχθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από θεραπεία με εκχυλίσματα μεθανόλης Sideritis. (204)

Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε την κυτταροτοξική δράση της σιδερόλης, ενός διτερπενοειδούς που απομονώθηκε από το εκχύλισμα εξανίου καλλιεργημένου Sideritis scardica, σε κυτταρικές σειρές GBM, και συγκεκριμένα στις T98 και U87 κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σιδερόλη προκάλεσε σημαντική αναστολή της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, και οι τιμές IC50 και στις δύο εφαρμοζόμενες κυτταρικές σειρές είναι σχετικά χαμηλές.

Επιπλέον, η σιδερόλη προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την

αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων εμποδίζοντας την ανάπτυξη του κυτταρικού κύκλου. (205)

Ένα άλλο σημαντικό αποτέλεσμα της έρευνάς μας είναι ότι η σιδερόλη ανέστειλε την μετανάστευση των κυττάρων. Η μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων αποτελεί σημαντική αιτία αποτυχίας στις θεραπείες GBM. Ακόμα και μετά από μια επιτυχημένη χειρουργική επέμβαση, τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν ήδη μεταναστεύσει, μπορούν να αναδημιουργήσουν έναν νέο όγκο. (206) Η σιδερόλη ανέστειλε την μεταναστευτική ικανότητα των κυτταρικών σειρών T98 και U87 με τρόπο που εξαρτάται από τη δόση και τον χρόνο και υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Όσον αφορά τη συνδυασμένη θεραπεία με σιδερόλη και TMZ, τα πειράματα απέδειξαν συνεργιστική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα T98 είναι ανθεκτικά στην TMZ και απαιτείται υψηλή συγκέντρωση για τη θεραπεία. Παρ' όλα αυτά, υψηλότερες δόσεις TMZ μπορεί να προκαλέσουν υψηλότερο κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών. Η συνεργιστική δράση με σιδερόλη μπορεί να είναι μια πιθανή λύση στην θεραπεία του GBM καθώς δίνει την δυνατότητα χρήσης χαμηλότερων δόσεων TMZ αλλά και την πιθανότητα υπερνίκησης της αντοχής των κυττάρων. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της συνδυασμένης θεραπείας μπορεί να είναι πολλά υποσχόμενα στη θεραπεία GBM.

Στην μελέτη της συνδυαστικής θεραπείας σιδερόλης με RT τα αποτελέσματα δεν ήταν θετικά καθώς φάνηκε ότι οι δύο αυτές θεραπείες λειτουργούν ανταγωνιστικά στα T98 κύτταρα GBM. Σε δύο μεμονωμένους συνδυασμούς υπήρξε συνεργιστική δράση, παρ' όλα αυτά είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη αυτού του συνδυασμού ενώ είναι σημαντικό να αξιολογηθεί και ο τρόπος με τον οποίο θα πρέπει να γίνεται η συνδυαστική χορήγηση.

Τέλος, όσον αφορά την μελέτη της ουσίας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες NIH/3T3, αυτή έδειξε πολύ σημαντικά ευρήματα καθώς η τοξικότητα της ουσίας σε αυτή την κυτταρική σειρά ήταν πολύ χαμηλότερη συγκριτικά με τις νεοπλασματικές σειρές που μελετήθηκαν. Η διαφορά στις τιμές IC₅₀, 70μM στα NIH/3T3 και 18μM και 13μM στα T98 και U87 αντίστοιχα, είναι αρκετά σημαντική, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σιδερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανή θεραπεία κατά του GBM χωρίς να επηρεάζει αρνητικά τα φυσιολογικά κύτταρα.

Η ουσία αυτή θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω, αφενός στον συνδυασμό με RT, διότι αποτελεί μία απ' τις βασικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις για το GBM αυτή την στιγμή, αφετέρου σε ζωικά μοντέλα για να επιβεβαιωθεί η δράση της *in vivo*. Επιπρόσθετα, η μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία επιδρά η σιδερόλη θα ήταν ένα σημαντικό πεδίο έρευνας καθώς θα βοηθούσε ιδιαίτερα στο να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο: Το γλοιοβλάστωμα (GBM) είναι ο πιο επιθετικός πρωτοπαθής όγκος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) σε ενήλικες, με πολύ κακή πρόγνωση. Ως θεραπευτική προσέγγιση χρησιμοποιείται ολική μακροσκοπική εκτομή, όταν αυτό είναι δυνατόν, ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Παρά την θεραπευτική αντιμετώπιση, ο όγκος συνήθως επανεμφανίζεται εντός 7-9 μηνών. Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη χρήση φυσικών ουσιών ως πιθανή θεραπεία για το GBM. Επιπλέον, ο συνδυασμός αυτών των φυσικών ουσιών με ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία είναι ένα πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας. Η σιδερόλη είναι ένα εντοκαουρανικό διτερπενοειδές, που απομονώνεται από το γένος *Sideritis*. Τα εκχυλίσματα σιδερίτη έχουν ήδη μελετηθεί για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες.

Υλικά - Μέθοδοι: Σε αυτή τη μελέτη διερευνήσαμε την αντικαρκινική δράση της σιδερόλης στις κυτταρικές σειρές GBM T98 και U87, καθώς και τις επιδράσεις της συνδυασμένης θεραπείας με τεμοζολομίδη (TMZ) και ακτινοθεραπεία (RT). Η κυτταρική βιωσιμότητα και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου (MTT) και τη μέθοδο Trypan Blue. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδερόλης για τον υπολογισμό των τιμών IC₅₀ στις 72 ώρες μετά τη θεραπεία. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου του DNA μετά από θεραπεία με σιδερόλη σε συγκεντρώσεις IC₅₀ και διπλάσια τιμή IC₅₀ για 72 ώρες. Η επίδραση της σιδερόλης στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο wound healing. Επιπλέον, η κυτταρική βιωσιμότητα και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετά από συνδυασμένη θεραπεία με σιδερόλη και TMZ, καθώς και με σιδερόλη και RT, αξιολογήθηκαν επίσης με τη μέθοδο Trypan blue και οι επιδράσεις της συνδυαστικής θεραπείας αναλύθηκαν με το λογισμικό CompuSyn. Τέλος, διερευνήσαμε την κυτταροτοξικότητα της σιδερόλης στα κύτταρα NIH/3T3.

Αποτελέσματα: Η θεραπεία με σιδερόλη μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων στις κυτταρικές σειρές T98 και U87 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και οι τιμές IC50 υπολογίστηκαν στα 18 μ M και 13 μ M, αντίστοιχα. Επιπλέον, η σιδερόλη προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και ανέστειλε τη μετανάστευση των κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η σιδερόλη και η TMZ έχουν συνεργιστική δράση στην πλειονότητα των συνδυασμών που δοκιμάστηκαν στα T98 και U87 κύτταρα. Όσον αφορά τη συνδυασμένη θεραπεία σιδερόλης και ακτινοβολίας, δεν υπάρχει συνεργιστική δράση στην πλειονότητα των συνδυασμών που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων σιδερόλης σε κυτταροκαλλιέργειες NIH/3T3 για 72 ώρες έδειξε υποτοξική δράση στις αρχικές δόσεις, 10 μ M και 20 μ M, και κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50% (IC50) στα 70 μ M.

Συμπεράσματα: Συμπερασματικά, η σιδερόλη μπορεί να αποτελέσει μια καινοτόμο στρατηγική για τη θεραπεία του GBM και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα και τον τρόπο δράσης της.

ABSTRACT

Objective: Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary central nervous system (CNS) tumor in adults, with a poor prognosis. When possible, gross total resection is used as a therapeutic intervention, followed by radiotherapy and chemotherapy. Despite treatment, the tumor usually returns within 7-9 months. Recently, research has concentrated on the use of natural substances as a treatment for GBM. In addition, the combination of natural substances with radiotherapy and/or chemotherapy is very important field of research. Siderol is an ent-kaurane diterpenoid, isolated from the genus *Sideritis*. *Sideritis* extracts have already been studied for their anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties.

Materials - Methods: In this study we investigated the antitumoral effect of Siderol in GBM T98 and U87 cell lines, as well as the effects of combined treatment with temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT). Cell viability and proliferation were evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and trypan blue exclusion assay. Different concentrations of siderol were used in order to calculate the IC₅₀ values at 72 h after treatment. Flow cytometry used for the DNA cell cycle analysis after treatment with siderol in concentrations of IC₅₀ and twice the IC₅₀ values for 72 h. The effect of siderol in cell's migratory ability was tested using wound healing assay. Furthermore, cell viability and proliferation after combined treatment with siderol and TMZ as well as siderol and RT, also were evaluated with the trypan blue exclusion assay and the effects of the combination treatment were analyzed with CompuSyn software. Also, we investigated the cytotoxicity of Siderol in NIH/3T3 cells.

Results: Treatment with siderol significantly reduced cell viability in T98 and U87 cell lines in a dose-dependent manner and IC₅₀ values were calculated, 18 μ M and 13 μ M, respectively. Moreover, siderol induced G₀/G₁ cell cycle arrest in a dose-dependent manner and inhibited the migration in both cell lines. Siderol and TMZ have synergistic effect in the majority of tested combinations in T98 and U87 cells. Concerning the combined treatment with siderol and radiation, there is no synergistic effect in the majority of tested combinations. Additionally,

administration of increasing concentrations of siderol to NIH/3T3 cell cultures for 72 hours showed a hypotoxic effect at initial dosages of 10 μ M and 20 μ M and cell death at a rate of 50% (IC₅₀) at 70 μ M.

Conclusions: In conclusion, siderol may represent an innovative strategy for the treatment of GBM, and further studies are needed on siderol's efficacy and mode of action.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dan H. Sanes, Thomas A. Reh, William A. Harris, Development of the Nervous System (Third Edition), Academic Press, 2012, Pages 1-22, ISBN 9780080923208, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374539-2.00005-7>.
2. Urbán N, Blomfield IM, Guillemot F. Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*. 2019 Dec 4;104(5):834-848. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.026. PMID: 31805262.
3. Cervantes EP, Comin CH, Junior RMC, Costa LDF. Morphological Neuron Classification Based on Dendritic Tree Hierarchy. *Neuroinformatics*. 2019 Jan;17(1):147-161. doi: 10.1007/s12021-018-9388-7. PMID: 30008070.
4. Verkhratsky A, Arranz AM, Ciuba K, Pękowska A. Evolution of neuroglia. *Ann N Y Acad Sci*. 2022 Dec;1518(1):120-130. doi: 10.1111/nyas.14917. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36285711.
5. Verkhratsky A, Hol EM, de Witte LD, Aronica E. Neuroglia in the healthy brain. *Handb Clin Neurol*. 2025;209:1-5. doi: 10.1016/B978-0-443-19104-6.00008-5. PMID: 40122619.
6. Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. The human central nervous system: a synopsis and atlas. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1988
7. Erulkar, Solomon D., Lentz, Thomas L.. "nervous system". *Encyclopedia Britannica*, 21 Feb. 2025
8. Zeng B, Liu Z, Lu Y, Zhong S, Qin S, Huang L, Zeng Y, Li Z, Dong H, Shi Y, Yang J, Dai Y, Ma Q, Sun L, Bian L, Han D, Chen Y, Qiu X, Wang W, Marín O, Wu Q, Wang Y, Wang X. The single-cell and spatial transcriptional landscape of human gastrulation and early brain development. *Cell Stem Cell*. 2023 Jun 1;30(6):851-866.e7. doi: 10.1016/j.stem.2023.04.016. Epub 2023 May 15. PMID: 37192616; PMCID: PMC10241223.
9. Muller F, O'Rahilly R. Embryonic development of the central nervous system. Amsterdam: Academic Press, 2004.
10. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2018 Aug 4;392(10145):432-446. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30990-5. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30060998.
11. Vigneswaran, Krishanthan, Stewart Neill, and Costas G. Hadjipanayis. "Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification." *Annals of translational medicine* 3.7 (2015).
12. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol*. 2020 Oct 30;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200. Erratum in: *Neuro Oncol*. 2022 Jul 1;24(7):1214. PMID: 33123732; PMCID: PMC7596247.
13. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007 Nov;114(5):443-58. doi: 10.1007/s00401-007-0293-7. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17805551; PMCID: PMC2039798.
14. Louis, D. N. (2016). WHO classification of tumours of the central nervous system. (No Title).
15. Tihan, T., Fisher, P. G., Kepner, J. L., Godfraind, C., McComb, R. D., Goldthwaite, P. T., & Burger, P. C. (1999). Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(10), 1061-1068.
16. Bailey, P., & Cushing, H. (1926). A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. (No Title).
17. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015 Jun;129(6):809-27. doi: 10.1007/s00401-015-1424-1. Epub 2015 May 6. PMID: 25943885; PMCID: PMC4436696.

18. Rudà R, Bruno F, Pellerino A, Soffietti R. Ependymoma: Evaluation and Management Updates. *Curr Oncol Rep.* 2022 Aug;24(8):985-993. doi: 10.1007/s11912-022-01260-w. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35384591; PMCID: PMC9249684.
19. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol.* 2020 Oct 30;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200. Erratum in: *Neuro Oncol.* 2022 Jul 1;24(7):1214. PMID: 33123732; PMCID: PMC7596247.
20. McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG. Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study. *J Neurosurg.* 2009 Apr;110(4):725-9. doi: 10.3171/2008.9.JNS08117. PMID: 19061350.
21. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, Wani K, Tatevossian R, Punchihewa C, Johann P, Reimand J, Warnatz HJ, Ryzhova M, Mack S, Ramaswamy V, Capper D, Schweizer L, Sieber L, Wittmann A, Huang Z, van Sluis P, Volckmann R, Koster J, Versteeg R, Fults D, Toledano H, Avigad S, Hoffman LM, Donson AM, Foreman N, Hewer E, Zitterbart K, Gilbert M, Armstrong TS, Gupta N, Allen JC, Karajannis MA, Zagzag D, Hasselblatt M, Kulozik AE, Witt O, Collins VP, von Hoff K, Rutkowski S, Pietsch T, Bader G, Yaspo ML, von Deimling A, Lichter P, Taylor MD, Gilbertson R, Ellison DW, Aldape K, Korshunov A, Kool M, Pfister SM. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell.* 2015 May 11;27(5):728-43. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.002. PMID: 25965575; PMCID: PMC4712639.
22. Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S.M., Barnholtz-Sloan, J.S. (2015). Epidemiology of Gliomas. In: Raizer, J., Parsa, A. (eds) *Current Understanding and Treatment of Gliomas. Cancer Treatment and Research*, vol 163. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_1
23. McNeill, Katharine A. "Epidemiology of brain tumors." *Neurologic clinics* 34.4 (2016): 981-998.
24. 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. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013
25. Fernandes RT, Teixeira GR, Mamere EC, Bandeira GA, Mamere AE. The 2021 World Health Organization classification of gliomas: an imaging approach. *Radiol Bras.* 2023 May-Jun;56(3):157-161. doi: 10.1590/0100-3984.2022.0089-en. PMID: 37564083; PMCID: PMC10411771.
26. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, Wu Y, Daldrup-Link HE. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res.* 2021 Sep;171:105780. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105780. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34302977; PMCID: PMC8384724.
27. Hata N, Katsuta T, Inoue T, et al. [Extracranial metastasis of glioblastoma to the lung and heart with a histological resemblance to small cell carcinoma of the lung: an autopsy case] *No Shinkei geka. Neurological Surgery.* 2001 May;29(5):433-438. PMID: 11449715.
28. Ulutin C, Fayda M, Aksu G, Cetinayak O, Kuzhan O, Ors F, Beyzadeoglu M. Primary glioblastoma multiforme in younger patients: a single-institution experience. *Tumori.* 2006 Sep-Oct;92(5):407-11. doi: 10.1177/030089160609200507. PMID: 17168433.
29. Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007 Dec;130(Pt 12):3336-41. doi: 10.1093/brain/awm263. Epub 2007 Nov 12. PMID: 17998256.
30. Ranger, A.M., Patel, Y.K., Chaudhary, N. et al. Familial syndromes associated with intracranial tumours: a review. *Childs Nerv Syst* 30, 47–64 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00381-013-2309-z>
31. Vijapura, Charmi, et al. "Genetic syndromes associated with central nervous system tumors." *Radiographics* 37.1 (2017): 258-280.
32. Friedman, J. M. (2022). *Neurofibromatosis 1*.

33. Roth, J., Roach, E. S., Bartels, U., Jóźwiak, S., Koenig, M. K., Weiner, H. L., ... & Wang, H. Z. (2013). Subependymal giant cell astrocytoma: diagnosis, screening, and treatment. Recommendations from the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference 2012. *Pediatric Neurology*, 49(6), 439-444.
34. Johansson, G., Andersson, U., & Melin, B. (2016). Recent developments in brain tumor predisposing syndromes. *Acta oncologica*, 55(4), 401-411.
35. Spina, S., Gervasini, C., & Milani, D. (2015). Ultra-rare syndromes: the example of Rubinstein–Taybi syndrome. *Journal of Pediatric Genetics*, 177-186.
36. Baker, M. J., Goldstein, A. M., Gordon, P. L., Harbaugh, K. S., Mackley, H. B., Glantz, M. J., & Drabick, J. J. (2016). An interstitial deletion within 9p21. 3 and extending beyond CDKN2A predisposes to melanoma, neural system tumours and possible haematological malignancies. *Journal of medical genetics*.
37. Ali, M. I. (2017). Ollier disease. *Apollo Medicine*, 14(1), 72-74.
38. Prokopchuk, O., Andres, S., Becker, K., Holzapfel, K., Hartmann, D., & Friess, H. (2016). Maffucci syndrome and neoplasms: a case report and review of the literature. *BMC research notes*, 9(1), 1-7.
39. Behnan J, Finocchiario G, Hanna G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain*. 2019 Apr 1;142(4):847-866. doi: 10.1093/brain/awz044. PMID: 30946477; PMCID: PMC6485274.
40. Sahm F, Capper D, Jeibmann A, Habel A, Paulus W, Troost D, von Deimling A (2012) Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol* 69:523–526. doi:10.1001/archneurol.2011.2910
41. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG et al (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New Eng J Med* 350:2129–2139. doi:10.1056/NEJMoa040938
42. Slamon D, Pegram M (2001) Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol* 28:13–19
43. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB et al (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New Eng J Med* 363:1693–1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448
44. Druker B (2001) Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 38:9–14
45. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M et al (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New Eng J Med* 364:2507–2516. doi:10.1056/NEJMoa1103782
46. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034
47. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
48. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP et al (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
49. Cancer Genome Atlas Research N (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068. doi:10.1038/nature07385
50. International Cancer Genome C, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabe RR, Bhan MK, Calvo F, Eerola I et al (2010) International network of cancer genome projects. *Nature* 464:993–998. doi:10.1038/nature08987

51. Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK (1997) Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res* 57:1250–1254
52. Louis DN (1994) The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:11–21
53. Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1181–1189
54. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosenberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK et al (2012) Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3:709–722
55. Mashiyama S, Murakami Y, Yoshimoto T, Sekiya T, Hayashi K (1991) Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 6:1313–1318
56. Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, Rollbrocker B, Bostrom J, Wiestler OD, Louis DN, Reifenberger G, von Deimling A (1997) Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol* 151:853–857
57. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL et al (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807–1812. doi:10.1126/science.1164382
58. Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D et al (2010) Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 28:3061–3068. doi:10.1200/JCO.2009.26.7252
59. Network TC (2013) Corrigendum: comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 494:506.
60. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60:1383–1387
61. Lee JC, Vivanco I, Beroukhi R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, Yuza Y et al (2006) Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 3:e485. doi:10.1371/journal.pmed.0030485
62. Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, Olson JM, Geyer JR, Chi SN, da Silva NS et al (2011) Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 29:3999–4006. doi:10.1200/JCO.2011.35.5677
63. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA et al (2011) Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 20:810–817. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.005
64. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland EC, Huse JT, Jhanwar S et al (2012) Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:3041–3046. doi:10.1073/pnas.1114033109
65. Gorovets D, Kannan K, Shen R, Kasthuber ER, Islamdoust N, Campos C, Pentsova E, Heguy A, Jhanwar SC, Mellinghoff IK et al (2012) IDH mutation and neuroglial developmental features define clinically distinct subclasses of lower grade diffuse astrocytic glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:2490–2501. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2977
66. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T et al (2009) The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* 23:1327–1337. doi:10.1101/gad.1777409

67. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD (2010) Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2183–2188. doi:10.1073/pnas.0909896107
68. McBride SM, Perez DA, Polley MY, Vandenberg SR, Smith JS, Zheng S, Lamborn KR, Wiencke JK, Chang SM, Prados MD et al (2010) Activation of PI3 K/mTOR pathway occurs in most adult low-grade gliomas and predicts patient survival. *J Neurooncol* 97:33–40. doi:10.1007/s11060-009-0004-4
69. Gutmann DH, Rasmussen SA, Wolkenstein P, MacCollin MM, Guha A, Inskip PD, North KN, Poyhonen M, Birch PH, Friedman JM (2002) Gliomas presenting after age 10 in individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Neurology* 59:759–761
70. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S. et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129, 829–848 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
71. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ et al (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New Eng J Med* 360:765–773. doi:10.1056/NEJMoa0808710
72. Draaisma K, Chatzipli A, Taphoorn M, Kerkhof M, Weyerbroek A, Sanson M, Hoeben A, Lukacova S, Lombardi G, Leenstra S, Hanse M, Fleischeuer R, Watts C, McAbee J, Angelopoulos N, Gorlia T, Golfopoulos V, Kros JM, Verhaak RGW, Bours V, van den Bent MJ, McDermott U, Robe PA, French PJ. Molecular Evolution of IDH Wild-Type Glioblastomas Treated With Standard of Care Affects Survival and Design of Precision Medicine Trials: A Report From the EORTC 1542 Study. *J Clin Oncol*. 2020 Jan 1;38(1):81-99. doi: 10.1200/JCO.19.00367. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31743054.
73. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C, Li B, Arden K, Ren B, Nathanson DA, Kornblum HI, Taylor MD, Kaushal S, Cavenee WK, Wechsler-Reya R, Furnari FB, Vandenberg SR, Rao PN, Wahl GM, Bafna V, Mischel PS. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature*. 2017 Mar 2;543(7643):122-125. doi: 10.1038/nature21356. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28178237; PMCID: PMC5334176.
74. deCarvalho AC, Kim H, Poisson LM, Winn ME, Mueller C, Cherba D, Koeman J, Seth S, Protopopov A, Felicella M, Zheng S, Multani A, Jiang Y, Zhang J, Nam DH, Petricoin EF, Chin L, Mikkelsen T, Verhaak RGW. Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma. *Nat Genet*. 2018 May;50(5):708-717. doi: 10.1038/s41588-018-0105-0. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29686388; PMCID: PMC5934307.
75. Vecht CJ, Hovestadt A, Verbiest HB, van Vliet JJ, van Putten WL. Dose-effect relationship of dexamethasone on Karnofsky performance in metastatic brain tumors: a randomized study of doses of 4, 8, and 16 mg per day. *Neurology*. 1994 Apr;44(4):675-80. doi: 10.1212/wnl.44.4.675. PMID: 8164824.
76. Schiff D, Lee EQ, Nayak L, Norden AD, Reardon DA, Wen PY. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro Oncol*. 2015 Apr;17(4):488-504. doi: 10.1093/neuonc/nou304. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25358508; PMCID: PMC4483077.
77. Pace A, Dirven L, Koekkoek JAF, Golla H, Fleming J, Rudà R, Marosi C, Le Rhun E, Grant R, Oliver K, Oberg I, Bulbeck HJ, Rooney AG, Henriksson R, Pasman HRW, Oberndorfer S, Weller M, Taphoorn MJB; European Association of Neuro-Oncology palliative care task force. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *Lancet Oncol*. 2017 Jun;18(6):e330-e340. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30345-5. PMID: 28593859.
78. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, Batchelor TT, Bindra RS, Chang SM, Chiocca EA, Cloughesy TF, DeGroot JF, Galanis E, Gilbert MR, Hegi ME, Horbinski C, Huang RY, Lassman AB, Le Rhun E, Lim M, Mehta MP, Mellinghoff IK, Minniti G, Nathanson D, Platten M, Preusser M, Roth P, Sanson M, Schiff D, Short SC, Taphoorn MJB, Tonn JC, Tsang J, Verhaak RGW, von Deimling A, Wick W, Zadeh G, Reardon DA, Aldape KD, van den

- Bent MJ. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro Oncol.* 2020 Aug 17;22(8):1073-1113. doi: 10.1093/neuonc/noaa106. PMID: 32328653; PMCID: PMC7594557.
79. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr, Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20;370(8):699-708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573. PMID: 24552317; PMCID: PMC4201043.
 80. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459-66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19269895.
 81. F.H. Doyle, J.M. Pennock, J.S. Orr, J.C. Gore, G.M. Bydder, R.E. Steiner, I.R. Young, H. Clow, D.R. Bailes, M. Burl, D.J. Gilderdale, P.E. Walters, Imaging of the brain by nuclear magnetic resonance, *The Lancet*, Volume 318, Issue 8237, 1981, Pages 53-57, ISSN 0140-6736,
 82. McCutcheon IE, Preul MC. Historical Perspective on Surgery and Survival with Glioblastoma: How Far Have We Come? *World Neurosurg.* 2021 May;149:148-168. doi: 10.1016/j.wneu.2021.02.047. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33610867.
 83. Melvin Deutsch, Sylvan B. Green, Thomas A. Strike, Peter C. Burger, James T. Robertson, Robert G. Selker, William R. Shapiro, John Mealey, Joseph Ransohoff, Pietro Paoletti, Kenneth R. Smith, Guy L. Odom, William E. Hunt, Byron Young, Eben Alexander, Michael D. Walker, David A. Pistenmaa, Results of a randomized trial comparing BCNU plus radiotherapy, streptozotocin plus radiotherapy, BCNU plus hyperfractionated radiotherapy, and BCNU following misonidazole plus radiotherapy in the postoperative treatment of malignant glioma, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, Volume 16, Issue 6, 1989, Pages 1389-1396, ISSN 0360-3016.
 84. Luis Souhami, Wendy Seiferheld, David Brachman, Ervin B. Podgorsak, Maria Werner-Wasik, Robert Lustig, Christopher J. Schultz, William Sause, Paul Okunieff, Jan Buckner, Lucia Zamorano, Minesh P. Mehta, Walter J. Curran, Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: Report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, Volume 60, Issue 3, 2004, Pages 853-860, ISSN 0360-3016.
 85. Bander ED, Magge R, Ramakrishna R. Advances in Glioblastoma Operative Techniques. *World Neurosurg.* 2018 Aug;116:529-538. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.023. PMID: 30049047.
 86. Kargiotis O, Geka A, Rao JS, Kyritsis AP. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2010 Dec;100(3):323-38. doi: 10.1007/s11060-010-0199-4. Epub 2010 May 7. PMID: 20449629.
 87. Blyth BJ, Cole AJ, MacManus MP, Martin OA. Radiation therapy-induced metastasis: radiobiology and clinical implications. *Clin Exp Metastasis.* 2018 Apr;35(4):223-236. doi: 10.1007/s10585-017-9867-5. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29159430.
 88. Lyhne NM, Primdahl H, Kristensen CA, Andersen E, Johansen J, Andersen LJ, Evensen J, Mortensen HR, Overgaard J. The DAHANCA 6 randomized trial: Effect of 6 vs 5 weekly fractions of radiotherapy in patients with glottic squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol.* 2015 Oct;117(1):91-8. doi: 10.1016/j.radonc.2015.07.004. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26255764.
 89. Bennardo L, Passante M, Cameli N, Cristaudo A, Patruno C, Nisticò SP, Silvestri M. Skin Manifestations after Ionizing Radiation Exposure: A Systematic Review. *Bioengineering (Basel).*

- 2021 Oct 22;8(11):153. doi: 10.3390/bioengineering8110153. PMID: 34821719; PMCID: PMC8614920.
90. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.
 91. Gupta J.K., Upmanyu N., Patnaik A.K., Mazumder P.M. Evaluation of antiulcer activity of *Leucas lavandulifolia* on mucosal lesion in rat. *Asian, J. Pharm. Clin. Res.* 2010;3:118–120.
 92. Chang SM, Mehta MP, Vogelbaum MA, Taylor MD, Ahluwalia MS. Neoplasms of the central nervous system. In: Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 11th ed Wolters Kluwer Health; 2019:1568–1616.
 93. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991 May 15;21(1):109-22. doi: 10.1016/0360-3016(91)90171-y. PMID: 2032882.
 94. Zoi V, Galani V, Tsekeris P, Kyritsis AP, Alexiou GA. Radiosensitization and Radioprotection by Curcumin in Glioblastoma and Other Cancers. *Biomedicines.* 2022 Jan 28;10(2):312. doi: 10.3390/biomedicines10020312. PMID: 35203521; PMCID: PMC8869399.
 95. Karachi A, Dastmalchi F, Mitchell DA, Rahman M. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2018 Nov 12;20(12):1566-1572. doi: 10.1093/neuonc/noy072. PMID: 29733389; PMCID: PMC6231207.
 96. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res.* 1987 Nov 15;47(22):5846-52. PMID: 3664486
 97. Nanegrungsunk D, Onchan W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurol Res.* 2015 Feb;37(2):167-83. doi: 10.1179/1743132814Y.00000000423. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25033940.
 98. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009
 99. Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, Germano IM. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg.* 2003 Dec;99(6):1047-52. doi: 10.3171/jns.2003.99.6.1047. PMID: 14705733
 100. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012;5(1):102–114.
 101. Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021 Dec;1876(2):188616. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188616. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34419533.
 102. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al.. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997–1003.
 103. Forte IM, Indovina P, Iannuzzi CA, Cirillo D, Di Marzo D, Barone D, Capone F, Pentimalli F, Giordano A. Targeted therapy based on p53 reactivation reduces both glioblastoma cell growth and resistance to temozolomide. *Int J Oncol.* 2019 Jun;54(6):2189-2199. doi: 10.3892/ijo.2019.4788. Epub 2019 Apr 16. PMID: 31081046.
 104. Atkins RJ, Ng W, Stylli SS, Hovens CM, Kaye AH. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *J Clin Neurosci.* 2015 Jan;22(1):14-20. doi: 10.1016/j.jocn.2014.09.003. Epub 2014 Nov 28. PMID: 25444993.
 105. Gil Del Alcazar CR, Todorova PK, Habib AA, Mukherjee B, Burma S. Augmented HR Repair Mediates Acquired Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Mol Cancer Res.* 2016

- Oct;14(10):928-940. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0125. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27358111; PMCID: PMC5065752.
106. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4622-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3012. Epub 2009 Jul 7. Erratum in: *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 15;19(16):4543-4. PMID: 19584161; PMCID: PMC2737355.
 107. Erasmus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016 Jul-Sep;769:19-35. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.05.005. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27543314.
 108. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada J. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol.* 2012 Aug 14;2:98. doi: 10.3389/fonc.2012.00098. PMID: 22912934; PMCID: PMC3418701.
 109. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discov Today.* 2015 Jul;20(7):899-905. doi: 10.1016/j.drudis.2015.02.011. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25744176.
 110. Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2018 Oct 15;58(10):405-421. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0141. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30249919; PMCID: PMC6186761.
 111. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol.* 2014 Jun;85(6):830-8. doi: 10.1124/mol.114.091850. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24574520; PMCID: PMC4014668.
 112. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):448-57. doi: 10.1038/sj.cdd.4401359. PMID: 14713959.
 113. Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021 Dec;1876(2):188616. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188616. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34419533.
 114. Zhou Q, Wang Y, Ma W. The progress of immunotherapy for glioblastoma. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(11):2654-8. doi: 10.1080/21645515.2015.1081727. PMID: 26308501; PMCID: PMC4685673.
 115. Boussiotis VA, Charest A. Immunotherapies for malignant glioma. *Oncogene.* 2018 Mar;37(9):1121-1141. doi: 10.1038/s41388-017-0024-z. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29242608; PMCID: PMC5828703.
 116. Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Koido S, Ohkusa T, Tasaki T, Hayashi K, Komita H, Watanabe N, Suzuki Y, Yamamoto Y, Mori R, Arai T, Tanaka T, Joki T, Yanagisawa T, Murayama Y. Phase I/II trial of combination of temozolomide chemotherapy and immunotherapy with fusions of dendritic and glioma cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Dec;65(12):1499-1509. doi: 10.1007/s00262-016-1905-7. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27688162; PMCID: PMC11028634.
 117. Czarnywojtek A, Borowska M, Dyrka K, Van Gool S, Sawicka-Gutaj N, Moskal J, Kościński J, Graczyk P, Hałas T, Lewandowska AM, Czepczyński R, Ruchała M. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology.* 2023;108(5):423-431. doi: 10.1159/000531319. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37459849.
 118. Schirrmacher V. Cancer Vaccines and Oncolytic Viruses Exert Profoundly Lower Side Effects in Cancer Patients than Other Systemic Therapies: A Comparative Analysis. *Biomedicines.* 2020 Mar 16;8(3):61. doi: 10.3390/biomedicines8030061. PMID: 32188078; PMCID: PMC7148513.
 119. Martikainen M, Essand M. Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2019 Feb 5;11(2):186. doi: 10.3390/cancers11020186. PMID: 30764570; PMCID: PMC6407011.

120. Zhang Q, Liu F. Advances and potential pitfalls of oncolytic viruses expressing immunomodulatory transgene therapy for malignant gliomas. *Cell Death Dis.* 2020 Jun 25;11(6):485. doi: 10.1038/s41419-020-2696-5. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2020 Nov 23;11(11):1007. doi: 10.1038/s41419-020-03216-z. PMID: 32587256; PMCID: PMC7316762.
121. Audia A, Conroy S, Glass R, Bhat KPL. The Impact of the Tumor Microenvironment on the Properties of Glioma Stem-Like Cells. *Front Oncol.* 2017 Jul 10;7:143. doi: 10.3389/fonc.2017.00143. PMID: 28740831; PMCID: PMC5502267.
122. Scherm A, Ippen FM, Hau P, Baurecht H, Wick W, Gempt J, Knüttel H, Leitzmann MF, Seliger C. Targeted therapies in patients with newly diagnosed glioblastoma-A systematic meta-analysis of randomized clinical trials. *Int J Cancer.* 2023 Jun 1;152(11):2373-2382. doi: 10.1002/ijc.34433. Epub 2023 Jan 30. PMID: 36647335.
123. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. PMID: 20129251; PMCID: PMC2818769.
124. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene.* 2018 Mar;37(12):1561-1575. doi: 10.1038/s41388-017-0045-7. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29321659; PMCID: PMC5860944.
125. Kyritsis MD, Bondy ML, Levin VA. Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and anti-inflammatory agents. *Nutr Cancer.* 2011;63(2): 174-184. doi:10.1080/01635581.2011.523807
126. Zoi V, Galani V, Vartholomatos E, Zacharopoulou N, Tsoumeleka E, Gkizas G, Bozios G, Tsekeris P, Chousidis I, Leonardos I, Tzakos AG, Kyritsis AP, Alexiou GA. Curcumin and Radiotherapy Exert Synergistic Anti-Glioma Effect In Vitro. *Biomedicines.* 2021 Oct 28;9(11):1562.
127. Zoi V, Galani V, Lianos GD, Voulgaris S, Kyritsis AP, Alexiou GA. The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomedicines.* 2021 Aug 26;9(9):1086.
128. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, et al. Coumarins — An Important Class of Phytochemicals, Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health. s.l. : A. Venket Rao and Leticia G. Rao, IntechOpen, 2015. DOI: 10.5772/59982.
129. Guo H, He Y, Bu C, Peng Z. Antitumor and apoptotic effects of 5-methoxypsoralen in U87MG human glioma cells and its effect on cell cycle, autophagy and PI3K/Akt signaling pathway. *Arch Med Sci.* 2019;15(6):1530-1538. doi:10.5114/aoms.2019.81729.
130. Kurek J. Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life. s.l. : IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85400.
131. Alexiou GA, Lazari D, Markopoulos G, et al. Moschamine inhibits proliferation of glioblastoma cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Tumour Biol.* 2017;39(5):1010428317705744. doi:10.1177/1010428317705744.
132. Lazari D, Alexiou GA, Markopoulos GS, et al. N-(p-coumaroyl) serotonin inhibits glioblastoma cells growth through triggering S-phase arrest and apoptosis. *J Neurooncol.* 2017;132(3):373-381. doi:10.1007/s11060-017-2382-3.
133. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(11):1683-1693. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002.
134. Vidak M, Rozman D, Komel R. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. *Molecules.* 2015;20(10):19406-19432. doi:10.3390/molecules201019406.
135. Tsuji S, Nakamura S, Maoka T, et al. Antitumour Effects of Astaxanthin and Adonixanthin on Glioblastoma. *Mar Drugs.* 2020;18(9):474. Published 2020 Sep 18. doi:10.3390/md18090474.

136. Lopes FG, Oliveira KA, Lopes RG, et al. Anti-cancer Effects of Fucoxanthin on Human Glioblastoma Cell Line. *Anticancer Res.* 2020;40(12):6799-6815. doi:10.21873/anticancer.14703.
137. Kuttan G, Pratheeshkumar P, Manu KA, Kuttan R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharm Biol.* 2011;49(10):995-1007. doi:10.3109/13880209.2011.559476.
138. Giannakopoulou M, Dimitriadis K, Koromili M, Zoi V, Vartholomatos E, Galani V, Kyritsis AP, Alexiou GA, Lazari D. Siderol Inhibits Proliferation of Glioblastoma Cells and Acts Synergistically with Temozolomide. *Biomedicines.* 2022 Dec 12;10(12):3216. doi: 10.3390/biomedicines10123216. PMID: 36551972; PMCID: PMC9775304.
139. Zhang J, Chen D, Han DM, et al. Tannic acid mediated induction of apoptosis in human glioma Hs 683 cells. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6845-6850. doi:10.3892/ol.2018.8197.
140. Zhai K, Siddiqui M, Abdellatif B, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Natural Compounds in Glioblastoma Therapy: Preclinical Insights, Mechanistic Pathways, and Outlook. *Cancers.* 2021; 13(10):2317.
141. Velásquez C, Mansouri S, Mora C, et al. Molecular and Clinical Insights into the Invasive Capacity of Glioblastoma Cells. *J Oncol.* 2019;2019:1740763.
142. Zanutto-Filho, A.; Braganhol, E.; Edelweiss, M.I.; Behr, G.A.; Zanin, R.; Schröder, R.; Simões-Pires, A.; Battastini, A.M.O.; Moreira, J.C.F. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23, 591–601.
143. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Sep 26;27(1):48.
144. Klinger NV, Mittal S. Therapeutic Potential of Curcumin for the Treatment of Brain Tumors. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9324085.
145. Huang B.R., Tsai C.H., Chen C.C., Way T.D., Kao J.Y., Liu Y.S., Lin H.Y., Lai S.W., Lu D.Y. Curcumin promotes connexin 43 degradation and temozolomide-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Am. J. Chin. Med.* 2019;47:657–674.
146. Yang L., Wang Y., Guo H., Guo M. Synergistic Anti-Cancer Effects of Icaritin and Temozolomide in Glioblastoma. *Cell Biochem. Biophys.* 2015;71:1379–1385.
147. Souza P.O., Bianchi S.E., Figueiro F., Heimfarth L., Moresco K.S., Goncalves R.M., Hoppe J.B., Klein C.P., Salbego C.G., Gelain D.P., et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 2018;51:23–33.
148. Jiang J, Lan Y-Q, Zhang T, Yu M, Liu X-Y, Li L-H, et al. The in vitro effects of caffeine on viability, cycle cycle profiles, proliferation, and apoptosis of glioblastomas. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2015) 19:3201–7.
149. Li N, Zhang P, Kiang KMY, Cheng YS, Leung GKK. Caffeine sensitizes u87-mg human glioblastoma cells to temozolomide through mitotic catastrophe by impeding G2 arrest. *BioMed Res Int.* (2018) 2018:5364973.
150. Luo SM, Wu YP, Huang LC, Huang SM, Hueng DY. The Anti-Cancer Effect of Four Curcumin Analogues on Human Glioma Cells. *Onco Targets Ther.* 2021 Aug 4;14:4345-4359.
151. Lal N, Nemaysh V, Luthra PM. Proteasome mediated degradation of CDC25C and Cyclin B1 in Demethoxycurcumin treated human glioma U87 MG cells to trigger G2/M cell cycle arrest. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;356:76-89.
152. Weng M.-S., Ho Y.-S., Lin J.-K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Pharmacol.* 2005;69:1815–1827.
153. Schmidt F, Knobbe C.B., Frank B., Wolburg H., Weller M. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncol. Rep.* 2008;19:1061–1066.
154. Zhang H., Zhu Y., Sun X., He X., Wang M., Wang Z., Wang Q., Zhu R., Wang S. Curcumin-Loaded Layered Double Hydroxide Nanoparticles-Induced Autophagy for Reducing Glioma Cell Migration and Invasion. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2016;12:2051–2062.

155. Senft C., Polacin M., Priester M., Seifert V., Kogel D., Weissenberger J. The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. *BMC Cancer*. 2010;10:491.
156. Li T, Xiao Y, Wang Z, Xiao H, Liu H. The Mechanism Study of Common Flavonoids on Antiglioma Based on Network Pharmacology and Molecular Docking. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022 Jan 31;2022:2198722.
157. Nakada M, Okada Y, Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci*. 2003 Jan 1;8:e261-9.
158. Roomi M. W., Monterrey J. C., Kalinovsky T., Rath M., Niedzwiecki A. Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. *Oncology Reports*. 2010;24(3):747–757.
159. Jiao Y., Li H., Liu Y., et al. Resveratrol inhibits the invasion of glioblastoma-initiating cells via down-regulation of the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Nutrients*. 2015;7(6):4383–4402.
160. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol*. 2020 May;57(5):2461–2478.
161. Osada M., Imaoka S., Funae Y. (2004). Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 α protein. *FEBS Lett*. 575 (1–3), 59–63.
162. Luthra P. M., Lal N. (2016). Prospective of curcumin, a pleiotropic signalling molecule from *Curcuma longa* in the treatment of glioblastoma. *Eur. J. Med. Chem*. 109, 23–35.
163. Wang T. Y., Chen J. X. (2019). Effects of curcumin on vessel formation insight into the pro- and antiangiogenesis of curcumin. *Evid. Based. Complement. Altern. Med.*, 2019.
164. Demirelma, H., and E. Gelinci. "Determination of the cytotoxic effect on human colon cancer and phenolic substance content of the endemic species *Sideritis ozturkii* Aytaç & Aksoy." (2019).
165. Sarikurkcü, C.; Locatelli, M.; Mocan, A.; Zengin, G.; Kirkan, B. Phenolic Profile and Bioactivities of *Sideritis perfoliata* L.: The Plant, Its Most Active Extract, and Its Broad Biological Properties. *Front. Pharmacol*. 2020, 10, 1642. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01642>.
166. Axiotis, E.; Petrakis, E.A.; Halabalaki, M.; Mitakou, S. Phytochemical Profile and Biological Activity of Endemic *Sideritis sipylea* Boiss. in North Aegean Greek Islands. *Molecules* 2020, 25, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules25092022>.
167. Cavalcanti, M.R.M.; Passos, F.R.S.; Monteiro, B.S.; Gandhi, S.R.; Heimfarth, L.; Lima, B.S.; Nascimento, Y.M.; Duarte, M.C.; Araujo, A.A.; Menezes, I.R.; et al. HPLC-DAD-UV analysis, anti-inflammatory and anti-neuropathic effects of methanolic extract of *Sideritis bilgeriana* (Lamiaceae) by NF- κ B, TNF- α , IL-1 β and IL-6 involvement. *J. Ethnopharmacol*. 2021, 265, 113338. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113338>.
168. Żyżelewicz, D.; Kulbat-Warycha, K.; Oracz, J.; Żyżelewicz, K. Polyphenols and Other Bioactive Compounds of *Sideritis* Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules* 2020, 25, 3763. <https://doi.org/10.3390/molecules25163763>.
169. Oalđe, M.; Kolarević, S.; Živković, J.; Aradski, A.A.; Marić, J.J.; Kolarević, M.K.; Đorđević, J.; Marin, P.D.; Šavikin, K.; Vuković-Gačić, B.; et al. A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models in vitro. *Food Funct*. 2021, 12, 3233–3245. <https://doi.org/10.1039/d1fo00447f>.
170. Şimşek, E.; Uysal, T. The Effects of the *Sideritis ozturkii* Extract on the Expression Levels of some Apoptotic Genes. *Curr. Perspect. Med. Aromat. Plants (CUPMAP)* 2018, 1, 8–12.
171. Tomou EM, Chatziathanasiadou MV, Chatzopoulou P, Tzakos AG, Skaltsa H. NMR-Based Chemical Profiling, Isolation and Evaluation of the Cytotoxic Potential of the Diterpenoid Siderol from Cultivated *Sideritis euboea* Heldr. *Molecules*. 2020 May 20;25(10):2382. doi: 10.3390/molecules25102382. PMID: 32443927; PMCID: PMC7287962.
172. Jeremic I, Tadic V, Isakovic A, Trajkovic V, Markovic I, Redzic Z, Isakovic A. The mechanisms of in vitro cytotoxicity of mountain tea, *Sideritis scardica*, against the C6 glioma cell line. *Planta Med*. 2013 Nov;79(16):1516–24. doi: 10.1055/s-0033-1350809. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24072501.

173. Ozdil B, Calik-Kocaturk D, Altunayar-Unsalan C, Acikgoz E, Oltulu F, Gorgulu V, Uysal A, Oktem G, Unsalan O, Guler G, Aktug H. Differences and similarities in biophysical and biological characteristics between U87 MG glioblastoma and astrocyte cells. *Histochem Cell Biol.* 2024 Jan;161(1):43-57. doi: 10.1007/s00418-023-02234-0. Epub 2023 Sep 12. PMID: 37700206.
174. Kiseleva LN, Kartashev AV, Vartanyan NL, Pinevich AA, Samoilovich MP. CHARACTERISTICS OF A172 AND T98G CELL LINES. *Tsitologiya.* 2016;58(5):349-55. English, Russian. PMID: 30188626.
175. Rahimi AM, Cai M, Hoyer-Fender S. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. *Cells.* 2022 Aug 28;11(17):2677. doi: 10.3390/cells11172677. PMID: 36078083; PMCID: PMC9455036.
176. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015 Dec 15;574(2):193-203. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26260013.
177. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015 Nov 2;111:A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. PMID: 26529666; PMCID: PMC6716531.
178. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Apr 1;2016(4):pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379. PMID: 27037069.
179. Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A.* 2004 Mar;58(1):21-32. doi: 10.1002/cyto.a.20003. PMID: 14994216.
180. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol.* 2020;2109:225-229. doi: 10.1007/7651_2019_259. PMID: 31414347.
181. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
182. Vengoji, R.; Macha, M.A.; Batra, S.K.; Shonka, N.A. Natural products: A hope for glioblastoma patients. *Oncotarget* 2018, 9, 22194–22219. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25175>.
183. Uddin, M.S.; Kabir, M.T.; Mamun, A.A.; Sarwar, S.; Nasrin, F.; Bin Emran, T.; Alanazi, I.S.; Rauf, A.; Albadrani, G.M.; Sayed, A.A.; et al. Natural Small Molecules Targeting NF-κB Signaling in Glioblastoma. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 703761. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.703761>.
184. Soukhtanloo, M.; Mohtashami, E.; Maghrouni, A.; Mollazadeh, H.; Mousavi, S.H.; Roshan, M.K.; Tabatabaeizadeh, S.-A.; Hosseini, A.; Vahedi, M.M.; Jalili-Nik, M.; et al. Natural products as promising targets in glioblastoma multiforme: A focus on NF-κB signaling pathway. *Pharmacol. Rep.* 2020, 72, 285–295. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00081-7>.
185. Behl, T.; Sharma, A.; Sharma, L.; Sehgal, A.; Singh, S.; Sharma, N.; Zengin, G.; Bungau, S.; Toma, M.; Gitea, D.; et al. Current Perspective on the Natural Compounds and Drug Delivery Techniques in Glioblastoma Multiforme. *Cancers* 2021, 13, 2765. <https://doi.org/10.3390/cancers13112765>.
186. Zoi, V.; Galani, V.; Vartholomatos, E.; Zacharopoulou, N.; Tsoumeleka, E.; Gkizas, G.; Bozios, G.; Tsekeris, P.; Chousidis, I.; Leonardos, I.; et al. Curcumin and Radiotherapy Exert Synergistic Anti-Glioma Effect In Vitro. *Biomedicines* 2021, 9, 1562. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111562>.
187. Koromili, M.; Kapourani, A.; Koletti, A.; Papandreou, G.; Assimopoulou, A.N.; Lazari, D.; Barmapalexis, P. Preparation and Evaluation of Siderol Amorphous Solid Dispersions: Selection of Suitable Matrix/Carrier. *AAPS PharmSciTech* 2022, 23, 214.
188. Romanucci, V.; Di Fabio, G.; D'Alonzo, D.; Guaragna, A.; Scapagnini, G.; Zarrelli, A. Traditional uses, chemical composition and biological activities of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. *J. Sci. Food Agric.* 2017, 97, 373–383. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7867>.
189. Çelik, T.; Önderci, M.; Pehlivan, M.; Yumrutaş, Ö.; Üçkardeş, F. In vitro scolicidal effects of *Sideritis perfoliata* extract against *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Clin. Pract.* 2021, 75, e14498. <https://doi.org/10.1111/ijcp.14498>.
190. Güvenç, A.; Okada, Y.; Akkol, E.K.; Duman, H.; Okuyama, T.; Çalış, I. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic

- compounds from *Sideritis brevibracteata*. Food Chem. 2010, 118, 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.034>.
191. Tomou, E.M.; Lytra, K.; Chrysargyris, A.; Christofi, M.-D.; Miltiadous, P.; Corongiu, G.L.; Tziouvelis, M.; Tzortzakis, N.; Skaltsa, H. Polar constituents, biological effects and nutritional value of *Sideritis sipylea* Boiss. Nat. Prod. Res. 2022, 36, 4200–4204. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1969649>.
 192. Charami, M.T.; Lazari, D.; Karioti, A.; Skaltsa, H.; Hadjipavlou-Litina, D.; Souleles, C. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). Phytother. Res. 2008, 22, 450–454. <https://doi.org/10.1002/ptr.2333>. PMID: 18386254.
 193. Oalde, M.; Kolarević, S.; Živković, J.; Aradski, A.A.; Marić, J.J.; Kolarević, M.K.; Đorđević, J.; Marin, P.D.; Šavikin, K.; Vuković-Gačić, B.; et al. A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models in vitro. Food Funct. 2021, 12, 3233–3245. <https://doi.org/10.1039/d1fo00447f>.
 194. Stagos, D.; Portesis, N.; Spanou, C.; Mossialos, D.; Aligiannis, N.; Chaita, E.; Panagoulis, C.; Reri, E.; Skaltsounis, L.; Tsatsakis, A.M.; et al. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food Chem. Toxicol. 2012, 50, 4115–4124. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>.
 195. González-Burgos, E.; Carretero, M.E.; Gómez-Serranillos, M.P. *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—a review. J. Ethnopharmacol. 2011, 135, 209–225. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.014>.
 196. Cavalcanti, M.R.M.; Passos, F.R.S.; Monteiro, B.S.; Gandhi, S.R.; Heimfarth, L.; Lima, B.S.; Nascimento, Y.M.; Duarte, M.C.; Araujo, A.A.; Menezes, I.R.; et al. HPLC-DAD-UV analysis, anti-inflammatory and anti-neuropathic effects of methanolic extract of *Sideritis bilgeriana* (Lamiaceae) by NF- κ B, TNF- α , IL-1 β and IL-6 involvement. J. Ethnopharmacol. 2021, 265, 113338. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113338>.
 197. Sklirou, A.D.; Angelopoulou, M.T.; Argyropoulou, A.; Chaita, E.; Boka, V.; Cheimonidi, C.; Niforou, K.; Mavrogonatou, E.; Pratsinis, H.; Kalpoutzakis, E.; et al. Phytochemical Study and In Vitro Screening Focusing on the Anti-Aging Features of Various Plants of the Greek Flora. Antioxidants 2021, 10, 1206. <https://doi.org/10.3390/antiox10081206>.
 198. Tomou, E.-M.; Papaemmanouil, C.D.; Diamantis, D.A.; Kostagianni, A.D.; Chatzopoulou, P.; Mavromoustakos, T.; Tzakos, A.G.; Skaltsa, H. Anti-Ageing Potential of *S. euboea* Heldr. Phenolics. Molecules 2021, 26, 3151. <https://doi.org/10.3390/molecules26113151>.
 199. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Chinou, I.B.; Mitakou, S.; Gikas, E.; Tsarbopoulos, A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 811–815. <https://doi.org/10.1021/jf001018w>.
 200. Şimşek Sezer, E.N.; Uysal, T. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Anticancer Potential of *Sideritis niveotomentosa*: Endemic Wild Species of Turkey. Molecules 2021, 26, 2420. <https://doi.org/10.3390/molecules26092420>.
 201. Demirelma, H.; Gelinci, E. Determination of the cytotoxic effect on human colon cancer and phenolic substance content of the endemic species *Sideritis ozturkii* aytac & aksoy Appl. Ecol. Environ. Res. 2019, 17, 7407–7419. https://doi.org/10.15666/aeer/1704_74077419.
 202. Porter, A.; Jänicke, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 1999, 6, 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>.
 203. Şimşek, E.; Uysal, T. The Effects of the *Sideritis ozturkii* Extract on the Expression Levels of some Apoptotic Genes. Curr. Perspect. Med. Aromat. Plants (CUPMAP) 2018, 1, 8–12.
 204. Yumrutas, O.; Oztuzcu, S.; Ozturk, N.; Pehlivan, M.; Poyraz, E.; Bozgeyik, I.; ZiyaĀĀci, Y.; Cevik, M.O.; Aksoy, A.F.; BaĀĀs, H.; et al. Cell viability, anti-proliferation and antioxidant activities of *Sideritis syriaca*, *Tanacetum argenteum* subsp. *argenteum* and *Achillea aleppica* subsp. *zederbaueri* on human breast cancer cell line (MCF-7). J. App. Pharm. Sci. 2015, 5, 001–005.
 205. Chen, J.; Ouyang, Y.; Cao, L.; Zhu, W.; Zhou, Y.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Yang, X.; Mao, L.; Lin, S.; et al. Diazepam inhibits proliferation of human glioblastoma cells through triggering a G0/G1 cell

- cycle arrest. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 2013, 25, 285–291.
<https://doi.org/10.1097/ANA.0b013e31828bac6a>.
206. Liu, X.; Chen, J.Y.; Chien, Y.; Yang, Y.P.; Chen, M.T.; Lin, L.T. Overview of the molecular mechanisms of migration and invasion in glioblastoma multiforme. *J. Chin. Med. Assoc.* 2021, 84, 669–677. <https://doi.org/10.1097/JCMA.000000000000552>.