

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΑΡΑΒΕΛΗΣ**

**DEPARTMENT OF NEUROSURGERY
SECTION OF MOLECULAR BIOLOGY
MD ANDERSON CANCER CENTER
UNIVERSITY OF HOUSTON, TEXAS
CHAIRMAN: RAYMOND SAWAYA, M.D.
CHIEF: JASTI S. RAO, Ph. D.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**« Ο ρόλος του παράγοντα TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor-2)
στη διεισδυτικότητα των γλοιωμάτων – Πειραματική μελέτη »**

Υπό

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ ΤΑΣΙΟΥ

Λάρισα 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7885/1
Ημερ. Εισ.: 07-12-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
616.993 81
ΤΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083848

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΑΡΑΒΕΛΗΣ**

**DEPARTMENT OF NEUROSURGERY
SECTION OF MOLECULAR BIOLOGY
MD ANDERSON CANCER CENTER
UNIVERSITY OF HOUSTON, TEXAS
CHAIRMAN: RAYMOND SAWAYA, M.D.
CHIEF: JASTI S. RAO, Ph. D.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« Ο ρόλος του παράγοντα TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor-2)
στη διεισδυτικότητα των γλοιωμάτων – Πειραματική μελέτη »

Υπό

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ ΤΑΣΙΟΥ

Λάρισα 2003

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

- Καθηγητής Καραβέλης Αντώνιος
- Καθηγητής Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ
- Καθηγητής Παπαδημητρίου Αλέξανδρος

‘Η έγκριση της διατριβής από την Ιατρική Σχολή δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα’ (Νόμος 5343/32, άρθρο 200 παρ. 2)

Στην
οικογένειά
μου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δημιουργία των όγκων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων παθολογικών διεργασιών, που αφορούν στη συσσώρευση γενετικών βλαβών σε γονίδια υπεύθυνα για την ομαλή ανάπτυξη κάθε οργάνου και συστήματος. Τα γονίδια αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι επιφορτισμένα με την ομαλή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο.

Όπως συμβαίνει και με τις κακοήθειες νεοπλασίες σε άλλα όργανα, έτσι και στο νευρικό σύστημα ο ρόλος της γενετικής στην ογκογένεση είναι καθοριστικός και για αυτό όλο και περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνται με στόχο το πέρασμα από το γονίδιο στη θεραπεία.

Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας μελετήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ο ρόλος του TFPI-2 στη διεισδυτική συμπεριφορά καθώς και στην απόπτωση των ανθρωπίνων γλοιωμάτων.

Η εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής, ανατέθηκε από τους Καθηγητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ.κ. Π.Α. Μολυβδά, Καθηγητή Φυσιολογίας, Α. Παπαδημητρίου, Καθηγητή Νευρολογίας και Α. Καραβέλη Καθηγητή Νευροχειρουργικής, που ήταν και ο επιβλέπων Καθηγητής, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή της Νευροχειρουργικής Κλινικής, κ. Αντώνιο Καραβέλη και Καθηγητή μου, για τις πολύτιμες συμβουλές του, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε και το ανεξάντλητο ενδιαφέρον του, ώστε να έρθει σε πέρας αυτό το έργο.

Βαθείες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή της Μοριακής Βιολογίας και Διευθυντή του εργαστηρίου Section of Invasive Program, Department of Neurosurgery, MD Anderson Cancer Center, University of Texas, στο Houston, Dr Jasti S Rao, Ph.D., για τη συνεχή συμβουλευτική και εποικοδομητική παρέμβασή του, χωρίς τη συνεργασία του οποίου, θα ήταν αδύνατη η διεκπεραίωση αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τους:

- Dr Santhi D. Konduri, Ph.D., πτυχιούχο της Μοριακής Βιολογίας, για τη συνεχή και άοικνη καθοδήγησή της σε θέματα μεθοδολογίας, εκπαίδευση σε τεχνικές

Μοριακής Βιολογίας και για την ειλικρινή ενθάρρυνσή της στη διεκπεραίωση του πειραματικού σταδίου της εργασίας.

- Dr Raymond Sawaya, M.D., Chairman of Department of Neurosurgery, MD Anderson Cancer Center, για τη διαρκή υποστήριξη του τεχνικού τμήματος αυτής της μελέτης.

Στη μελέτη αυτή βοήθησαν και τους ευχαριστώ:

Ο Διευθυντής Χειρουργικής του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Βόλου κ. Α. Λιούπης, ο Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής του Λαϊκού Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών κ. Γ. Κουράκλης, ο Καθηγητής Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Α. Κυρίτσης, ο Επιμελητής Β' της Νευροχειρουργικής ΕΣΥ του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Κ. Πατεράκης, καθώς και ο Ειδικευόμενος της ΩΡΛ του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Γ. Μπέης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά την οικογένειά μου και τον κ. Γ. Γιοξάρη, Γραμματέα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μου έδειξαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ. 4
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 7
• Επιδημιολογία	σελ. 7
• Αιτιοπαθογένεια	σελ. 9
- Οικογενή γλοιώματα	σελ. 10
• Κυτταρογενετική	σελ. 11
- Χαρακτηριστικά των γλοιωμάτων	σελ. 11
• Μοριακή Γενετική	σελ. 14
- Κατασταλτικά γονίδια	σελ. 14
- Ογκογονίδια	σελ. 15
• Μεταβολισμός των γλοιωμάτων	σελ. 18
• Διεισδυτικότητα των γλοιωμάτων	σελ. 19
- Μηχανισμοί	σελ. 21
• Αγγειογένεση	σελ. 22
• Ταξινόμηση και διαβάθμιση των γλοιωμάτων	σελ. 23
- Αστροκυτταρικοί όγκοι	σελ. 24
- Ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι	σελ. 27
- Επενδυματικοί όγκοι	σελ. 27
- Μικτά γλοιώματα	σελ. 28
• Κλινική εικόνα	σελ. 29
• Παρακλινική εκτίμηση	σελ. 30
- Αξονική Τομογραφία	σελ. 30
- Μαγνητική Τομογραφία	σελ. 34
- Ποζιτρονική Τομογραφία	σελ. 37
- Μονοφωτονική Τομογραφία	σελ. 37
• Αντιμετώπιση των γλοιωμάτων	σελ. 37
- Χειρουργική θεραπεία	σελ. 37
- Ακτινοθεραπεία	σελ. 40

- Χημειοθεραπεία	σελ. 41
• Προεγχειρητική προετοιμασία ασθενούς	σελ. 42
• Πρόγνωση	σελ. 43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 45
• Υλικά και μέθοδοι	σελ. 45
• Αποτελέσματα	σελ. 51
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ. 60
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ. 66
SUMMARY	σελ. 67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ. 68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο TFPI-2 (human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2), είναι μια πρωτεάση σερίνης, αναστολέας τύπου kunitz, που αναστέλλει την πλασμίνη, την τρυψίνη, τη χυμοτρυψίνη, την καθεψίνη G και την καλλικρεΐνη αλλά όχι τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA), τον ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (tPA) και τη θρομβίνη. Από έρευνες που έγιναν στο εργαστήριό μας, προτάθηκε ότι, η έκφραση του TFPI-2 ελαττώνεται ή απουσιάζει, κατά την ανάπτυξη των γλοιωμάτων στον άνθρωπο. Για να ερευνήσουμε το ρόλο του TFPI-2 στη διεισδυτικότητα των όγκων εγκεφάλου, χρησιμοποιήσαμε 2 κυτταρικές σειρές: 1) κύτταρα πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (SNB-19) και 2) κύτταρα γλοιώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Hs683), στις οποίες ενσωματώσαμε *vector* ικανό να εκφράζει συμπληρωματικό αντίγραφο του ολικού μήκους mRNA του TFPI-2, είτε σε *sense* (0.7 kb) ή σε *antisense* (1 kb) προσανατολισμό. Τα Hs683, είναι κύτταρα που παράγουν αυξημένες ποσότητες TFPI-2 πρωτεΐνης και mRNA, με μειωμένη διεισδυτική ικανότητα. Εν αντιθέσει, τα SNB-19 κύτταρα παρουσιάζουν έντονη διεισδυτική συμπεριφορά και αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης όγκου αλλά παράγουν μικρές έως αμελητέες ποσότητες TFPI-2 πρωτεΐνης και mRNA. Έχει βρεθεί ότι, η έκφραση του TFPI-2 είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού κακοήθειας άρα και διεισδυτικότητας του όγκου. Αυτό ισχύει για διάφορους όγκους και όχι αποκλειστικά και μόνο για τα γλοιώματα. Τόσο *in vitro*, με διάφορες τεχνικές, που αναλύονται στη συνέχεια σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και *in vivo*, μετά από ενδοεγκεφαλική ένεση σε ποντίκια (nude mice), η μελέτη του παράγοντα TFPI-2, οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα-συμπέρασμα. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά, βάσει της οποίας η *down* και *up regulation* του TFPI-2, παίζει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτική συμπεριφορά των ανθρωπίνων γλοιωμάτων, καθώς και στην κυτταρική επιβίωση αυτών (απόπτωση).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι κακοήθεις όγκοι του εγκεφάλου, χαρακτηρίζονται για τη διεισδυτικότητά τους και την αποδόμηση του περιβάλλοντος φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού. Η διεισδυτική συμπεριφορά τους, φαίνεται να εξαρτάται, εν μέρει, από μια πληθώρα πρωτεολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών της σερίνης, της κυστεΐνης και των μεταλλοπρωτεασών (1). Παρά τις διάφορες στρατηγικές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντιμετώπιση των γλοιοβλαστωμάτων, το προσδόκιμο επιβίωσης δεν έχει αυξηθεί. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι, ο TFPI-2 είναι σημαντικός παράγων ρύθμισης του εξωγενούς συστήματος πήκτικότητας του αίματος, μέσω της ικανότητας του να αναστέλλει την ενεργοποίηση ιστικών παραγόντων (Xa και VIIa). Η έκφραση του uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) και του υποδοχέα του uPAR (Receptor), εν μέρει, σχετίζεται άμεσα με τη διεισδυτικότητα των γλοιωμάτων (2,3). Η σύνδεση του uPA με τον υποδοχέα του uPAR, μετατρέπει το ζυμογόνο-πλασμινογόνο σε πλασμίνη, μια πρωτεάση σερίνης, η οποία προάγει τη λύση και διάλυση της εξωκυττάριας μεμβράνης (ECM) και άρα και τη διείσδυση των νεοπλασματικών κύτταρων (4-8). Οι αναστολείς της πλασμίνης, πιθανότατα παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της διεισδυτικότητας και της κακοήθους συμπεριφοράς των γλοιωμάτων (7,8).

Ο TFPI-2 είναι επίσης γνωστός και ως MSPI (Matrix-associated Serine Protease Inhibitor) ή, ως PP-S (Placental Protein). Είναι ένας αναστολέας-πρωτεάση σερίνης, 32-33 kDa, που αποτελείται από τρεις τύπου kunitz περιοχές, ομόλογες του TFPI (9-11). Κατά κύριο λόγο το 75-90% της τριάδας αυτής, είναι συνδεδεμένο με την ECM (12). Αυτή η τριάδα, συντίθεται από μια 25 kDa μη γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, η οποία επιδέχεται διαφόρου βαθμού γλυκοσυλίωση (10). Ο TFPI-2 αναστέλλει την τρυψίνη, την πλασμίνη, τη χυμοτρυψίνη, την καθεψίνη G, την καλλικρεΐνη του πλάσματος, καθώς και τον ιστικό παράγοντα VIIa, αλλά όχι το uPA, tPA (tissue Plasminogen Activator) και τη θρομβίνη (9,13-16). Το γονίδιο του TFPI-2, έχει εντοπιστεί στο 7q22 χρωμόσωμα με φθορίζοντα υβριδισμό *in situ* (17). Ανασυνδυασμένος TFPI-2 αναστέλλει τη γένεση της πλασμίνης, άσχετα με το αν το ένζυμο συνδέεται με τα νεοπλασματικά κύτταρα ή, με την ECM και, αναστέλλει την

αποσύνθεση της μεμβράνης και τη δοκιμασία διεισδυτικότητας σε επιφάνεια *matrigel* (*matrigel invasion*) στα HT-1080 καρκινικά κύτταρα ινοσαρκώματος (18).

Σύμφωνα με τις έρευνές μας, η έκφραση του TFPI-2 διαφέρει μεταξύ των γλοιωμάτων, βάσει του βαθμού διαφοροποίησης (*grade*). Δηλαδή, σε υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους, έχουμε μικρότερη έκφραση του TFPI-2. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι, ο TFPI-2 εξαφανίζεται κατά το σχηματισμό νεοπλασματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, επιλέξαμε μια υψηλού και μια χαμηλού βαθμού κακοήθειας κυτταρική σειρά γλοιώματος (SNB-19 και Hs683 αντίστοιχα), στις οποίες ενσωματώσαμε σταθερά *vector control*, ικανό να εκφράζει ένα συμπληρωματικό αντίγραφο του ολικού μήκους του mRNA του TFPI-2 σε *sense* (0.7 kb) και *antisense* (1 kb) προσανατολισμό. Έπειτα επιλέξαμε *sense* (SNB-19) κλώνους, οι οποίοι εκφράζουν υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA και, *antisense* (Hs683) κλώνους, που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA, συγκριτικά με τα γονικά τους κύτταρα και τους *vector controls*. Όπως παρατηρήθηκε, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, η *upregulation* ή η *downregulation* του TFPI-2 προκαλεί μείωση ή αύξηση της διεισδυτικής συμπεριφοράς αυτών των κλώνων, συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*.

Ορμώμενοι από αυτά, το ενδιαφέρον μας στράφηκε στο ρόλο του TFPI-2 στην απόπτωση των κυττάρων του γλοιώματος. Απόπτωση δε σημαίνει τίποτα άλλο, παρά κυτταρική αυτοκτονία. Το κοινό σημείο των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση, είναι η ενεργοποίηση μιας σειράς πρωτεασών, που είναι γνωστές ως *caspases* (19). Στην απόπτωση όμως, εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως, ο PARP [Poly (ADP-Ribose) Polymerase], ένα συστατικό του πυρήνα που αποτελεί στόχο των *caspases* και το σύμπλεγμα Apaf-1_cytochrome-c, που παίζει το ρόλο του ενεργοποιητή μερικών από τις *caspases*, όπως η *caspase-9* (20,21). Το cyt-c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, όπου συναντά και συνδέεται με τον Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1). Στην όλη διαδικασία, εμπλέκονται παράγοντες που προάγουν την κυτταρική επιβίωση, όπως ο Bcl-2 που εδράζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εμποδίζει τη μετανάστευση του cyt-c στο κυτταρόπλασμα, καθώς και παράγοντες που ανταγωνίζονται τη δράση του Bcl-2, όπως ο BAX (22-27). Επίσης, οδοί μεταφοράς σήματος, όπως οι MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), περιλαμβανομένου

των ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases), φαίνεται να επηρεάζουν τις οδούς προαγωγής και αντίστασης στην απόπτωση (28). Έτσι, σε αυτή τη μελέτη ενδιαφερθήκαμε να αναφέρουμε την έκφραση των προ- και αντι-αποπτωτικών συστατικών, όπως οι BAX, Bcl-2, *caspases* (9,8,7,3), cyt-c, Apaf-1 και ERKs.

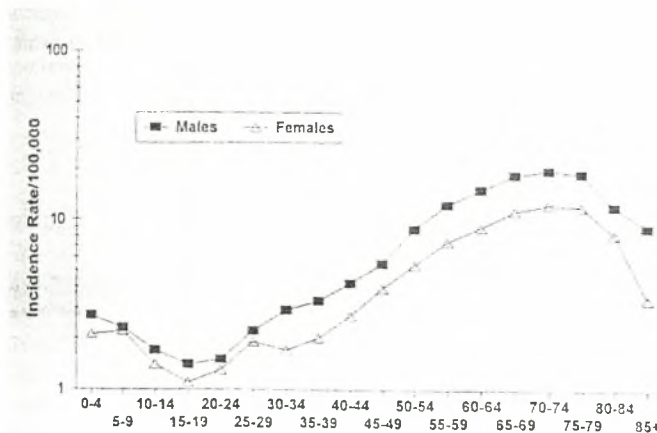
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Τα γλοιώματα, αποτελούν τη μεγαλύτερη υποκατηγορία πρωτοπαθών όγκων του ΚΝΣ. Η αιτιολογία τους όμως συγκριτικά με τα μηνιγγιώματα και τα νευρινώματα, είναι η λιγότερο καλά κατανοητή.

Στις ΗΠΑ, από τους 17000 πολίτες στους οποίους διαγιγνώσκεται πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου, οι 11500 πεθαίνουν (29). Η πλειοψηφία των όγκων αυτών αφορά τα γλοιώματα. Στο 97%, τα γλοιώματα παρουσιάζουν ενδοκρανιακή εντόπιση. Σύμφωνα με μια μελέτη που έγινε στην πολιτεία του Los Angeles, για το χρονικό διάστημα 1972-1991, από τα 6950 διαγνωσμένα πρωτοπαθή γλοιώματα, μόνο τα 187 (2,8%) εντοπίστηκαν στο σπονδυλικό σωλήνα, (0,14/100000 άνδρες/έτος – 0,11/100000 γυναίκες/έτος), εκ των οποίων το 54% ήταν επενδυμάτα, το 40% αστροκυτώματα και μόλις το 6% άλλοι τύποι γλοιωμάτων (30,31).

Όσον αφορά τα ενδοκρανιακά γλοιώματα, για τα οποία θα γίνεται λόγος από εδώ και στο εξής, η καμπύλη επίπτωσης με βάση την ηλικία φαίνεται στην εικ. 1:

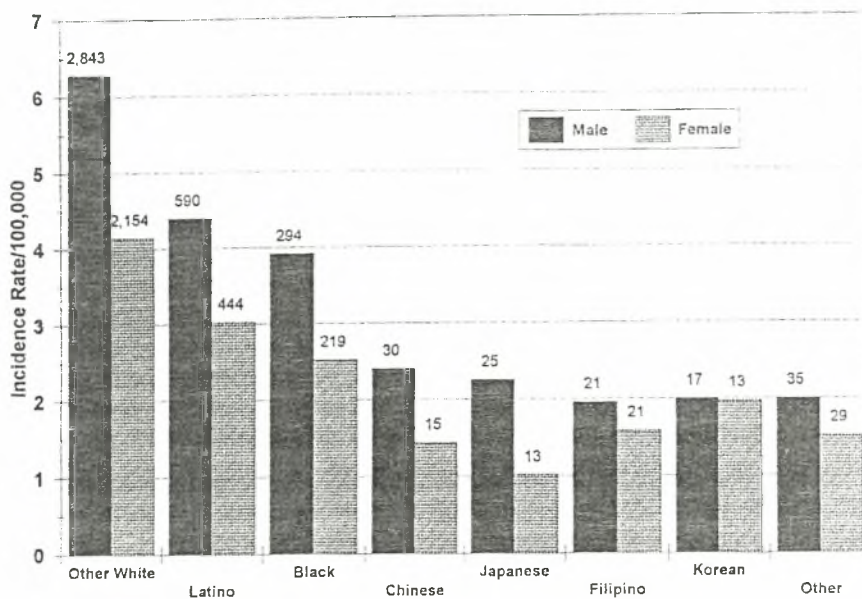


Εικ. 1 Καμπύλη επίπτωσης των ενδοκρανιακών γλοιωμάτων με βάση την ηλικία σε άνδρες και γυναίκες ανά 100.000 πληθυσμό (Preston – Martin S: Epidemiology. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 2-11).

Η καμπύλη αυτή, μετά από μία άνοδο (peak) που παρουσιάζει σε ηλικία μικρότερη των 10 ετών, αρχίζει να ανέρχεται και πάλι μετά την ηλικία των 25 ετών,

παρουσιάζοντας δεύτερο *peak* στη δεκαετία των 70 (32). Η επίπτωση των γλοιωμάτων σε άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών, έχει διπλασιαστεί από το 1968 έως το 1985 ενώ, παρόμοια αύξηση παρατηρείται και στη θνητότητα, σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, παγκοσμίως (33-35). Αυτή όμως η αύξηση είναι μάλλον εικονική και για αυτό ευθύνονται τρεις παράγοντες: α) η βελτίωση των απεικονιστικών μεθόδων, β) η αλλαγή συμπεριφοράς στη φροντίδα των ηλικιωμένων ατόμων και γ) η σύσταση και εφαρμογή διαφόρων προγραμμάτων στους ηλικιωμένους (36).

Οι άνδρες ασχέτου εθνικότητας, προσβάλλονται σε μεγαλύτερη συχνότητα από τις γυναίκες, εικ. 2:



Εικ. 2 Μέση ετήσια επίπτωση των ενδοκρανιακών γλοιωμάτων με βάση το φύλο και την εθνικότητα ανά 100.000 πληθυσμό (Preston – Martin S: Epidemiology. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 2-11).

Η καλούμενη αναλογία ως προς το φύλο (*sex ratio*, SR) ποικίλει ανάλογα με την ηλικία, τον τύπο του γλοιώματος και την γεωγραφική περιοχή. Ανάλογα με τον τύπο του γλοιώματος, το SR είναι μεγαλύτερο για τα επενδυώματα (2,1), ακολουθούν τα ολιγοδενδρογλοιώματα (1,6) και τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα (1,6), όπως προκύπτει από μελέτη που έγινε σε 9 γεωγραφικές περιοχές στις ΗΠΑ (37). Οι αναλογίες ως προς το φύλο, διαφέρουν μόνο στους ασιατικούς πληθυσμούς, οι οποίες είναι μικρότερες. Τα υψηλότερα ποσοστά αφορούν στη λευκή φυλή ενώ, έχει διαπιστωθεί ότι οι μετανάστες παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό από τους ιθαγενείς.

Για αυτό έχουν ενοχοποιηθεί, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής. Επίσης από μελέτες έχει βρεθεί ότι η επίπτωση των γλοιωμάτων, αυξάνει στους άνδρες που ανήκουν στις ανώτερες κοινωνικές τάξεις ενώ, κάτι τέτοιο δε διαπιστώθηκε αντίστοιχα στις γυναίκες. Διάφορες μελέτες συσχετίζουν την επίπτωση και θνητότητα των γλοιωμάτων με την εργασία του ασθενούς (38-48). Αυτές όμως οι συσχετίσεις είναι πιθανές και απλώς, αιτιολογούν την ανδρική υπεροχή στα γλοιώματα.

Το προσδόκιμο επιβίωσης των ατόμων που πάσχουν από γλοιώμα, είναι άμεσα συνυφασμένο με τον ιστολογικό τύπο και την ηλικία. Για παιδιά ηλικίας 0-14 ετών, η πενταετής επιβίωση ανέρχεται στο 60% (49). Συγκεκριμένα, για ασθενείς με επενδύωμα είναι 65%, 60% για αυτούς με ολιγοδενρογλοιώμα, 43% για PNET (Primitive Neuroectodermal Tumors) και 44% για το αστροκύτωμα.

ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Από διάφορες μελέτες, τόσο στο παρελθόν όσο και πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ γλοιωμάτων και χρόνιων παθήσεων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και οι αλλεργικές αντιδράσεις (50,51). Ο ρόλος όμως, της ιονίζουσας ακτινοβολίας στην αιτιοπαθογένεια των όγκων του ΚΝΣ, είναι αναμφισβήτητος. Παιδιά που ακτινοβολήθηκαν στο ΚΝΣ στα πλαίσια θεραπείας της λευχαιμίας, παρουσίασαν υπεροχή στα γλοιώματα (52,53). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη στη Σουηδία, η ακτινογραφία κοιλίας κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης, συνηγορεί υπέρ της αύξησης των όγκων του ΚΝΣ (54).

Μερικά γλοιώματα εμφανίζουν γενετικό χαρακτήρα, ιδίως αυτά που εμφανίζονται στα πλαίσια των φακωματώσεων, όπως η νευροϊνωμάτωση. Επίσης, διερευνάται ο οικογενής χαρακτήρας των γλοιωμάτων. Τα PNET και τα γλοιώματα, εμφανίζονται κυρίως σε παιδιά, με συγγενείς που είχαν όγκο του ΚΝΣ. Πάντως η εμφάνιση γλοιώματος σε σχέση με την κληρονομικότητα δεν ξεπερνά το 4% (55-57).

Σε πειραματικό στάδιο βρίσκεται, η συσχέτιση μεταξύ όγκων του ΚΝΣ και νιτροδών παραγώγων (NOCs) σε διάφορα είδη και κυρίως στους πιθήκους (58). Μάλιστα τα έμβρυα είναι 50 φορές πιο ευαίσθητα από τα μεγαλύτερα ζώα. Το μοντέλο αυτό,

αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '70. Ως προδιαθεσικοί παράγοντες παρουσιάζονται οι εξής:

- Δίαιτα και μάλιστα αυτό υποστηρίζει την προαναφερθείσα υπόθεση
- Επαγγελματικοί παράγοντες (59)
- Λοιμογόννοι παράγοντες, όπως το *Toxoplasma gondii*, ο ιός της γρίπης κατά την εγκυμοσύνη (60-62) κτλ
- Ομάδα αίματος, σύμφωνα με το σύστημα ABO ενοχοποιείται η ομάδα A (63-66)
- Φάρμακα όπως βαρβιτουρικά, διουρητικά, αντισταμινικά, αντιεμετικά (67,68)
- Κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (67,69,70)
- Αλκοόλ (67,68,70)
- Κάπνισμα, παθητικό και ενεργητικό (67,70-72)
- Ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο (73,74)

Οικογενή γλοιώματα

Η ανίχνευση ειδικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών στους πρωτοπαθείς όγκους εγκεφάλου και, η συσχέτιση αυτών με κληρονομικώς μεταδιδόμενα νοσήματα, π.χ. οξώδης σκλήρυνση, νευροϊνωμάτωση, οικογενής πολυποδίαση, σύνδρομο Li Frammeni, οδήγησαν τους ερευνητές στη μελέτη αυτής της κακοήθειας (75-79). Ο Von Motz και οι συν. (80), ανέφεραν 3 αδελφές με αστροκύτωμα grade III και, οι Heunch και Blom (81), ανέφεραν δύο αδέρφια και μια θεία με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Σύμφωνα με την *National Familial Brain Tumor Registry*, του ογκολογικού κέντρου *John Hopkins* στη Βαλτιμόρη, αναφέρονται 127 περιστατικά από 59 οικογένειες (82,83). Τα δείγματα, συλλέχθηκαν από 27 πολιτείες, την Κολομβία και τον Καναδά. Μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 49 έτη και μέσος χρόνος ενασχόλησης με την εκπαίδευση, τα 12,9 χρόνια. Οι περισσότεροι ζούσαν σε αστικές ή ημιαστικές περιοχές, με πιο συχνή απασχόληση αυτή του αγρότη, δασκάλου και ηλεκτρολόγου σε τηλεφωνικές γραμμές. Πάνω από το 50% των ασθενών εμφάνισαν υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade) αστροκύτωμα.

Πέραν της κληρονομικότητας όμως, βασικό ρόλο παίζει και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η αναγνώριση προδιαθεσικών παραγόντων, η

απόκτηση αναλυτικού οικογενειακού ιστορικού και η προώθηση εγγραφής των ασθενών αυτών σε ειδικές κοινότητες, θα βοηθήσουν επιδημιολογικά, γενετικά και σε έδαφος μοριακής βιολογίας τη διερεύνηση της αιτιολογίας-αιτιοπαθογένειας των όγκων του εγκεφάλου.

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η ανάλυση των νεοπλασμάτων σε επίπεδο χρωματοσωμάτων, έπαιξε σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της βιολογίας των όγκων καθώς και στη διάγνωση, ταξινόμηση και πρόγνωση αυτών. Δύο είναι οι κύριοι τύποι γονιδίων που πρωταγωνιστούν στην ανάπτυξη του όγκου, τα ογκογονίδια και τα κατασταλτικά γονίδια του όγκου.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που συμβάλλουν στην ογκογένεση είναι:

A) Η μετάθεση, η προσθήκη και η αναστροφή, που αφορούν κυρίως τα ογκογονίδια

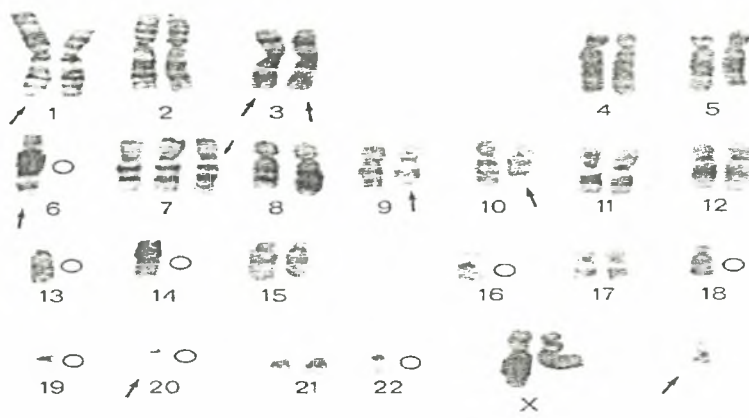
B) Η απόσπαση και η μονοσωμία, συσχετίζονται με τους καταστολείς

Γ) Η τρισωμία, η ισοχρωμοσωμία, και τα ζεύγη μικρών έκκεντρων τμημάτων χρωματίνης (double minute χρωματοσώματα), αφορούν κυρίως τα ογκογονίδια.

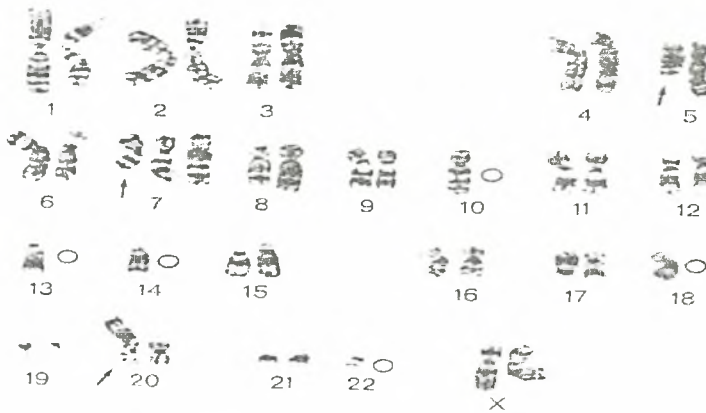
Κυτογενετικά χαρακτηριστικά των γλοιωμάτων

Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Αναλύθηκε ο καρύοτυπος από περίπου 200 γλοιοβλαστώματα, συμπεριλαμβανομένων 10 παιδιατρικών περιστατικών (84-93). Οι συνήθεις χρωμοσωμικές ανωμαλίες ήταν αριθμητικές και αφορούσαν τρισωμία 7, η οποία παρατηρήθηκε στο 45% των περιπτώσεων, ενώ μονοσωμία στα χρωματοσώματα 10 και 22 παρατηρήθηκε στο 35% και 17% αντίστοιχα. Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, παρατηρήθηκαν στο 60% των περιπτώσεων που αναλύθηκαν και συγκεκριμένα, απόσπαση ή μετάθεση, ίδια του βαρέως σκέλους του χρωματοσώματος 9, εικ. 3 και 4:



Εικ. 3 Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον καρυότυπο πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (Rey JA, Bello MJ: Cytogenetics. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W. B. Saunders Co 1999, 25-37).



Εικ. 4 Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον καρυότυπο πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (Rey JA, Bello MJ, de Campos, et al. On trisomy of chromosome 7 in human gliomas. Cancer Genet Cytogenet 1987;29:323).

Επίσης παρατηρήθηκαν και ανωμαλίες του τύπου *double minute* (12-40% των περιπτώσεων).

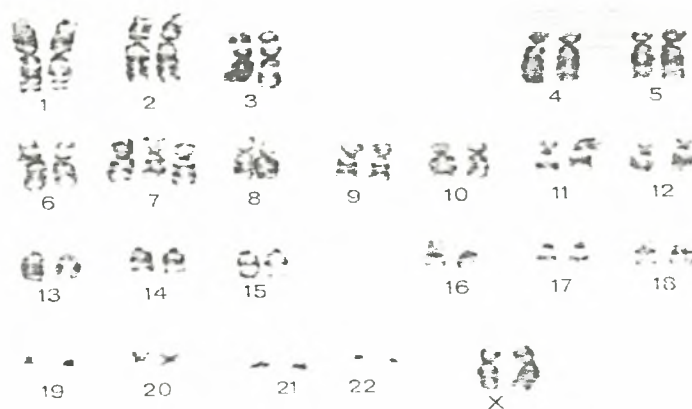
Παρόμοια ευρήματα έχουμε και στο **γλοιοσάρκωμα** (75,86,94).

Αναπλαστικό αστροκύτωμα

Ελέγχθηκε ο καρυότυπος από 43 περιστατικά (75,84-87,90,92,95). Τα μισά ήταν κατά φύση ή 45,XO και τα υπόλοιπα μισά εμφάνισαν εικόνα παραπλήσια με αυτή του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος.

Low grade αστροκύτωμα

Αναλύθηκαν 70 περιπτώσεις, συμπεριλαμβανόμενων και 31 παιδιατρικών περιστατικών (86,87,90,92,93,95-97,98). Μόνο στις 26 (50%) περιπτώσεις ενηλίκων, παρατηρήθηκαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ιδία τρισωμία 7 και *double minute* χρωματοσώματα, εικ. 5:



Εικ. 5 Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον καρυότυπο *low grade* αστροκυτώματος – Τρισωμία 7 (Rey JA, Bello MJ: Cytogenetics. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W. B. Saunders Co 1999, 25-37).

Μονοσωμία 10, 13, 15, 20 και 22, καθώς και δομικές αλλοιώσεις στα χρωματοσώματα 4, 11, 12, 13, 16, 18 και 21 εμφάνισαν μεμονωμένες περιπτώσεις. Είναι σημαντικό πάντως να σημειωθεί ότι, στα 15 από τα 26 προαναφερθέντα περιστατικά, η έλλειψη ενός φυλετικού χρωματοσώματος ήταν η μόνη ανωμαλία που παρατηρήθηκε.

Επενδυώματα

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αφορούν κατά κύριο λόγο στο χρωματόσωμα 22 ενώ, έχει παρατηρηθεί και μονοσωμία 10 ή αποσπάσεις τμήματος του 10.

Ολιγοδενδρογλοιώματα

Τα δείγματα παρουσιάστηκαν είτε ως νορμοκαρυοτικά ή με καρυότυπο 45,XO. Οι

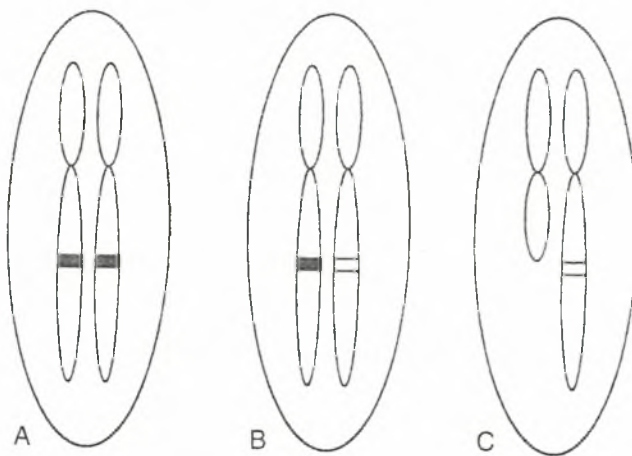
περιπτώσεις με ανωμαλίες αφορούσαν το χρωματόσωμα 7, τρισωμία ή αλλοιώσεις στο μακρύ σκέλος, απόσπαση του βραχέως σκέλους του χρωματοσώματος 1 και μονοσωμία ή απόσπαση του 22 χρωματοσώματος.

Έχει παρατηρηθεί ότι, τα νεοπλάσματα που συνοδεύονται από χρωμοσωμικές ανωμαλίες υποτροπιάζουν και οι ασθενείς τελικά πεθαίνουν ενώ, στις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύονται ανωμαλίες οι ασθενείς, παραμένουν εν ζωή και χωρίς υποτροπή του όγκου (99).

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η δραστηριότητα των ογκογονιδίων και η έλλειψη ή μεταλλαγή της λειτουργικότητας των κατασταλτικών γονιδίων, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των γλοιωμάτων.

Κατασταλτικά γονίδια των όγκων (*tumor suppressor genes*): Αποτελούν τους ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης. Αναστολή της δράσης τους, συνεπάγεται ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και άρα, δημιουργία όγκου (*two hit theory*), εικ. 6:



Εικ. 6 *Two hit theory* της ογκογένεσης λόγω αναστολής της δράσης των κατασταλτικών γονιδίων (Knudson AG: Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:820).

Οι παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με αναστολή της δράσης των γονιδίων αυτών και συνδυάζονται με όγκους του ΚΝΣ είναι:

- Η Νευροϊνωμάτωση τύπου I και II, όπου παρατηρούνται αστροκυτώματα και επενδυμάτα στον εγκέφαλο και το ΝΜ
- Η Οζώδης Σκλήρυνση (Νόσος του Bourneville), που συνδυάζεται με την ανάπτυξη υποεπενδυματικών γιγαντοκυτταρικών επενδυμωμάτων
- Το Σύνδρομο Li Fraumeni, μια σπάνια δυσλειτουργία, όπου συνυπάρχουν σαρκώματα των μαλακών ιστών, καρκίνος του μαστού και όγκοι του ΚΝΣ, οικογενούς χαρακτήρα
- Η Νόσος Von Hippel Lindau, στην οποία παρατηρούνται αιμαγγειοβλαστώματα της παρεγκεφαλίδας, σε συνδυασμό με καρκίνωμα του μαστού και,
- Το Σύνδρομο Turcot, στο οποίο αστροκυτώματα και PNET, συνδυάζονται με πολυποδίαση του παχέως εντέρου.

Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής γονιδίων, είναι το γονίδιο p53, μεταλλάξεις ή ελλείψεις του οποίου παρατηρούνται σε πολλά είδη όγκων, καθώς και στα γλοιώματα (αστροκυτώματα, αναπλαστικά αστροκυτώματα και γλοιοβλαστώματα). Το p53 γονίδιο εντοπίζεται στο 17p χρωματόσωμα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 53 kDa, γνωστή ως p53. Έχει βρεθεί ότι η p53 πρωτεΐνη, επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό με πολλούς τρόπους, συμμετέχοντας στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση βλάβης του DNA μετά από ακτινοβολία, στην σταθεροποίηση του γονιδιώματος και στην απόπτωση δηλαδή, στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (100-111).

Αλλά τέτοια γονίδια είναι το NF1, που σχετίζεται με τη Νευροϊνωμάτωση τύπου I (νόσος του Von Recklinghausen), το NF2, με τη Νευροϊνωμάτωση τύπου II (πολλαπλά μηνιγγιώματα και ακουστικά νευρινώματα άμφω), το RB1, υπεύθυνο για το ρετινοβλάστωμα, το APC, που συνδέεται με το σύνδρομο Turcot και το p16, του οποίου η δράση παρομοιάζεται με αυτή του p53.

Ογκογονίδια (oncogenes): Εκτός όμως από τα γονίδια-καταστολείς του όγκου, σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση, παίζουν και τα ογκογονίδια.

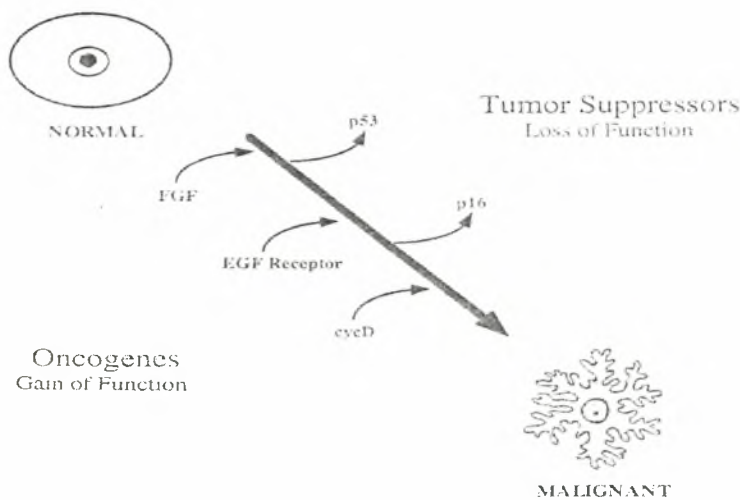
Τα ογκογονίδια, δεν είναι τίποτα άλλο παρά, ενεργοποιημένα πρωτοογκογονίδια (*proto-oncogenes*). Πολλά πρωτοογκογονίδια, δρουν ως υποδοχείς των διάφορων παραγόντων ανάπτυξης. Μετάλλαξη, πολλαπλασιασμός ή υπερέκφραση των γονιδίων αυτών, συνεπάγεται συνεχές σήμα για κυτταρική ανάπτυξη. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του γλοιοβλαστώματος, φαίνεται να παίζει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα EGFR (**E**pidermal **G**rowth **F**actor-**R**eceptor), ο οποίος απομονώνεται στο 36% αυτών ενώ, παρατηρείται μόλις στο 7% και 3% στα αναπλαστικά και λοιπά αστροκυτώματα αντίστοιχα (112). Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 170 kDa, που περιλαμβάνει ένα εξωκυττάριο τμήμα, που δεσμεύει τον EGF ή τον TGF α (**T**ransforming **G**rowth **F**actor **a**lpha) παράγοντα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα, με δραστηριότητα τυροσίνης-κινάσης. Συνεπώς, ο υποδοχέας αυτός είναι κοινός τόσο για τον EGF παράγοντα, όσο και για τον TGF α . Παριστά μια απλή πρωτεΐνη, η έκφραση της οποίας μπορεί να είναι η κατάληξη των γενετικών μεταβολών των κυττάρων του γλοιώματος, σε ένα πρωιμότερο στάδιο της εξέλιξης. Αυξημένα επίπεδα TGF α , έχουν βρεθεί στα ούρα ασθενών με γλοίωμα, σε ποσά συγκρινόμενα με το βαθμό κακοήθειας. Παρόμοιο με το EGFR γονίδιο, είναι και το c-erbB-2, το οποίο αν και παρουσιάζει υπερέκφραση στα αστροκυτώματα, παρά ταύτα δε φαίνεται να πολλαπλασιάζεται στα γλοιώματα και αυτή του η υπερέκφραση δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως αν σχετίζεται με την πρόγνωση (113).

Ο TGF β (**T**ransforming **G**rowth **F**actor **b**eta), συμβάλλει στην κυτταρική γονιμοποίηση και διαφοροποίηση και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των γλοιωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, δηλαδή καταστέλλει τα λεμφοκύτταρα που διηθούν το γλοίωμα και μεσολαβούν με την Ιντερλευκίνη-2 (IL-2), (114-116). Επίσης, η αλληλεπίδραση του TGF β με το αγγειακό σύστημα, προκαλεί καταρράκτη από ανοσοαντιδράσεις (χημικές μεταβολές), που λαμβάνουν χώρα κατά την πήκτικότητα του αίματος.

Άλλα τέτοια γονίδια είναι, ο PDGFR (**P**latelet **D**erived **G**rowth **F**actor **R**eceptor), ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νευρογλοίας και εμφανίζεται σε

δυο τύπους, PDGFRA (παρουσιάζεται να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης) και PDGFRB, ο FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), με μιτογόνο και αγγειογενή δραστηριότητα, ο IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), που φαίνεται να σχετίζεται με την γένεση και την εξέλιξη των γλοιωμάτων, καθώς και άλλα όπως c-myc, N-myc, N-ras, c-ros κλπ.

Συμπερασματικά λοιπόν, θα λέγαμε ότι η ογκογένεση, σχηματικά τουλάχιστον, θα μπορούσε να παρασταθεί ως εξής, εικ. 7:

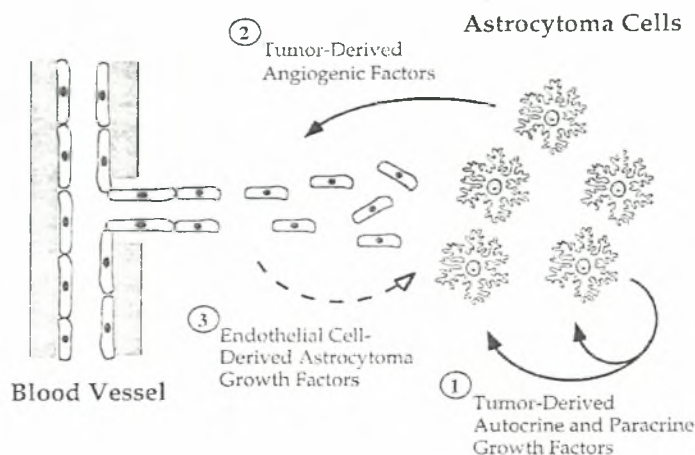


Εικ. 7 Σχηματική παράσταση της ογκογένεσης (Morrison RS: Growth Factor – Mediated Signaling Pathways. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 52-64).

και πολύ απλουστευμένα θα μπορούσε να περιγραφεί ως:

- Αδρανοποίηση (inactivation) των γονιδίων-καταστολείς των όγκων, ή
- Ενεργοποίηση (activation) των ογκογονιδίων,

η οποία πραγματοποιείται μέσα από ειδικά μονοπάτια-οδούς ενδιάμεσου σήματος, που δεν είναι άλλα από αυτά της γονιμοποίησης, της διείσδυσης, της αγγειογένεσης και της μετανάστευσης (proliferation, invasiveness, angiogenesis and migration), εικ. 8:



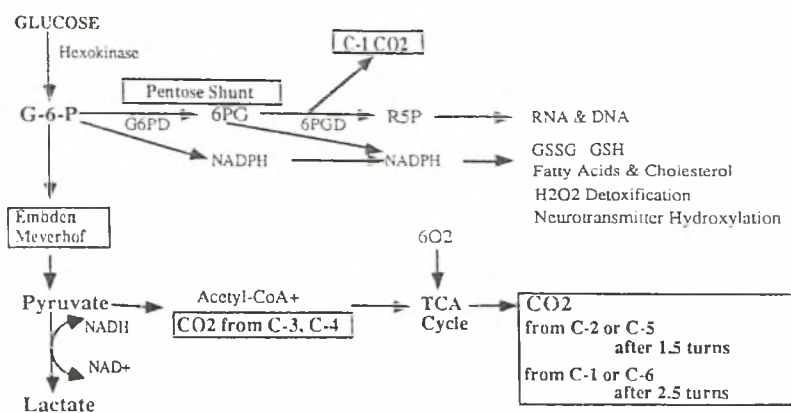
Εικ. 8 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μέσα από ειδικά μονοπάτια – οδούς ενδιάμεσου σήματος (Morrison RS: Growth Factor – Mediated Signaling Pathways. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 52-64).

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Έχει αποδειχθεί ότι, οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι αυξάνουν το μεταβολισμό της γλυκόζης μετά από χημειοθεραπεία, ως απάντηση σε αυτή, παρουσιάζουν και τη μικρότερη επιβίωση. Ο έλεγχος γίνεται με ποζιτρονικό τομογράφο (PET), προ και μετά τη θεραπεία (117-118).

Όσον αφορά στην ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία, τα αποτελέσματα ποικίλλουν και για αυτό απαιτείται περισσότερη μελέτη επί του θέματος.

Η γλυκόζη αποτελεί την βασικότερη πηγή ενέργειας και ο μεταβολισμός της φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί, εικ. 9:



Εικ. 9 Ο μεταβολισμός της γλυκόζης (Spense AM: Glioma Metabolism. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 65-75).

Σε αντίθεση με τη γλυκόζη, ο μεταβολισμός του οξυγόνου στα κακοήθη γλοιώματα, μειώνεται συγκριτικά με το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό (MR_{O_2}), δεδομένου ότι η ροή του αίματος είναι η ίδια και στις δύο περιπτώσεις (119,120).

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι, η πρωτεϊνοσύνθεση αυξάνεται στα κακοήθη νεοπλασμάτα και μάλιστα, ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας (121-124). Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, το πιο πολλά υποσχόμενο αμινοξύ, είναι η λευκίνη, γιατί διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ) και εισέρχεται στον εγκεφαλικό ιστό, δια μέσου του φυσιολογικού μηχανισμού των αμινοξέων. Σύμφωνα με τον Mineura και συν. (125), η έκπτωση της πρωτεϊνοσύνθεσης μετά από ακτινοθεραπεία, σχετίζεται με βελτίωση της νευρολογικής εικόνας για περισσότερο χρονικό διάστημα, καθώς και βελτίωση της απεικόνισης της βλάβης μετά από CT έλεγχο (125).

Πάντως, τουλάχιστον ακόμη, δε μπορούμε να πούμε αν, η προσφορά του προσδιορισμού των παραγόντων μεταβολισμού, συγκριτικά με την CT και τον MRI, είναι περισσότερο ή λιγότερο αξιόπιστη και κλινικά χρήσιμη. Χρειάζεται για αυτό περαιτέρω έλεγχος στη διάθεσή μας.

ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Η διεισδυτικότητα, αποτελεί την πρωταρχική αιτία υποτροπής των κακοήθων γλοιωμάτων, κατόπιν τοπικής θεραπείας αυτών και οφείλεται στη μικροσκοπική διήθηση του περιβάλλοντα φυσιολογικού ιστού από νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτή τους η ιδιότητα, είναι και το σημαντικότερο εμπόδιο ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Οι μηχανισμοί ανάπτυξης και διείσδυσης των γλοιωμάτων, περιλαμβάνουν μεταβολές στην κυτταρική προσκόλληση, τη διακίνηση και την πρωτεόλυση των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης. Η έκφραση πολλών πρωτεολυτικών ενζύμων όπως, οι πρωτεάσες κυστεΐνης, η καθεψίνη Β και οι μεταλλοπρωτεάσες της μεμβράνης (MMP), φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην διεισδυτικότητα των γλοιωμάτων.

Παθολογική Ανατομία: Τα γλοιώματα και ιδιαίτερα τα αναπλαστικά, διηθούν και εξαπλώνονται καταλαμβάνοντας μεγάλη έκταση στον εγκέφαλο.

Σε ιστολογικά παρασκευάσματα, τα περισσότερα γλοιοβλαστώματα περιλαμβάνουν μια κεντρική περιοχή νέκρωσης, που περιβάλλεται από πυκνό δακτύλιο νεοπλασματικών κυττάρων και μια περιφερική ζώνη διήθησης. Η διήθηση αυτή, επιτυγχάνεται κατά μήκος των οδών της λευκής ουσίας, γύρω από τα νευρικά κύτταρα, κατά μήκος των αγγείων και κάτω από τη χοριοειδή μήνιγγα (126,127). Σε αυτή ακριβώς, οφείλεται και η τάση τους να υποτροπιάζουν. Η κατανόηση της βιολογίας της διεισδυτικότητας των γλοιωμάτων, θα δώσει φως στη θεραπευτική τους αντιμετώπιση.

Σε περίπτωση τοπικής θεραπείας του όγκου (χειρουργείο, ακτινοβολία) και υποτροπής αυτού, ο νέος όγκος εμφανίζεται στην ίδια θέση και μάλιστα σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% των περιπτώσεων (128-131), εικ. 10:



Εικ. 10 T1 ακολουθίες μετά από έγχυση σκιαγραφικής ουσίας κακοήθους γλοιώματος στους 0 (Α), 3 (Β) και 6 (C) μήνες μετά την διάγνωση του όγκου. Είναι σαφής η προοδευτική επιδείνωση της εικόνας (Mikkelsen T, Rosenblum ML: Tumor Invasiveness. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 76-86).

Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι, η διείσδυση των νεοπλασματικών κυττάρων γίνεται κατά μήκος της μυελίνης, δια μέσου του μεσολοβίου, μέσω του ENY και κατά μήκος των βασικών μεμβρανών. Οι πιο συχνές οδοί διασποράς των κακόηθων αστροκυτωμάτων, είναι κατά συνέχεια ιστών και κατά μήκος της μυελίνης.

Η *in vitro* καταγραφή της διεισδυτικότητας, επιτυγχάνεται με τη μέθοδο *matrigel* και με αυτή των σφαιροειδών (132-134). Σύμφωνα με την τελευταία αποδεικνύεται ότι, σφαιροειδή μεταστατικών όγκων δε διηθούν συσσωρεύσεις (aggregates) κυττάρων εγκεφαλικού παρεγχύματος, ενώ αντίθετα τα κύτταρα γλοιώματος διηθούν, αλλά δε διηθούν συσσωματώματα από κύτταρα λεπτής μήνιγγας, τα οποία διηθούνται και μάλιστα επιθετικότερα από τα μεταστατικά κύτταρα, όπως κύτταρα από καρκίνο του μαστού ή του πνεύμονα (αιματογενής διασπορά) (135).

Μηχανισμοί διήθησης των νεοπλασματικών κυττάρων:

- **Πρωτεολυτικά ένζυμα:** είναι σημαντικός ο ρόλος τους, τόσο στην ανάπτυξη-επέκταση του νεοπλάσματος, όσο και στην αγγειογένεση. Αυτός είναι και ο λόγος της έντονης αγγειοβρίθειας των όγκων, η οποία μάλιστα σχετίζεται με το βαθμό κακοήθειας. Τα ένζυμα αυτά δεν είναι άλλα από τις πρωτεάσες της σερίνης και τις μεταλλοπρωτεάσες της κυστεΐνης και του ασπαρτικού οξέος. Πολύ σημαντικός είναι ο έλεγχος των μεταλλοπρωτεασών. Έχει αποδειχθεί ότι, πρόκειται για σημαντικούς παράγοντες, που μεσολαβούν στη μετανάστευση κατά συνεχεία ιστών. Η έκκριση αυτών από τα αστροκύτταρα, φαίνεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη, την επέκταση, καθώς και στη φλεγμονή και την τοπική διήθηση των αστροκυτωμάτων (136). Αναφέρεται ότι οι μεταλλοπρωτεάσες, προκαλούν διάσπαση των ιστών και έτσι συμβάλλουν στην επέκταση του όγκου (137-139). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί, το σύμπλεγμα uPA-uPAR και ο αναστολέας PAI (Plasminogen Activator Inhibitor). Ο PA είναι ένα ένζυμο, η ενεργοποίηση του οποίου πιστεύεται ότι, αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους τα νεοπλασματικά κύτταρα, προκαλούν λύση των κυτταρικών δομών που περιβάλλουν τον όγκο και επιτυγχάνουν έτσι την επέκταση αυτού (140,141). Άλλα παραδείγματα αποτελούν, η καθεψίνη Β, μια πρωτεάση κυστεΐνης, η μεταλλοπρωτεάση MMP-2, η κολλαγενάση τύπου IV και η α2 μακροσφαιρίνη, ένζυμα τα οποία ανιχνεύονται στις κακοήθειες, όπως και στα γλοιώματα και φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αύξηση και την επέκταση των όγκων αυτών (142).
- **Μόρια προσκόλλησης:** Πρόκειται για πρωτεΐνες, συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες συμβάλλουν στη στεγανοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και στη στερεά πρόσφυση και συνένωση των κυττάρων μεταξύ τους, έτσι ώστε η απουσία τους οδηγεί σε αύξηση της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ακεραιότητα (143).
- **Παράγοντες ανάπτυξης:** Μελέτες δείχνουν ότι, οι EGF και FGF ενεργοποιούν το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ ο PDGF (AA και BB), όχι μόνο

δεν παρουσιάζει καμία τέτοια δράση αλλά αντιθέτως, ενεργοποιεί την παραγωγή κυττάρων που μοιάζουν με τα ολιγοδενδροκύτταρα (144-146). Η γένεση, η διείσδυση και η μετάσταση κυττάρων είναι βιολογικές ιδιότητες, που διαφέρουν μεταξύ τους και δεν είναι απαραίτητο να σχετίζονται η μία με την άλλη. Έτσι εξηγείται, γιατί οι διάφοροι όγκοι ανταποκρίνονται διαφορετικά στους παράγοντες ανάπτυξης.

- **Παράγοντες μετανάστευσης:** Ένας τέτοιος παράγοντας που έχει απομονωθεί, είναι γνωστός ως GMF (**G**lioma-derived **M**otility **F**actor). Ουσιαστικά πρόκειται για δύο μοριακά είδη, GMF I και GMF II. Ο παράγοντας αυτός παίζει ρόλο, ιδιαίτερα όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα αποχωρίζονται και μεταναστεύουν μακριά από την πρωτοπαθή εστία, προάγοντας έτσι την διεισδυτικότητα. Έχει αποδειχθεί όμως ότι, για να δράσει ο GMF απαιτείται η φυσιολογική δομή και οργάνωση του κυτταρικού σκελετού, όπως αυτή των ινιδίων ακτίνης. Επώση των κύτταρων με κυτοχάλασίνη B, η οποία διακόπτει το δίκτυο των ινιδίων ακτίνης, συνεπάγεται αναστολή της δράσης του GMF και επομένως και της μετανάστευσης (147). Παρόμοια δράση, λέγεται ότι παρουσιάζουν και οι πρωτεάσες κυστεΐνης, όπως οι καθεψίνες B και L (148).

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Διακρίνονται τρεις κατηγορίες αγγειογένεσης:

A) **Tumor-associated angiogenesis**, διασπορά νέων μικροαγγείων, από προϋπάρχοντα μικροαγγεία του εγκεφάλου προς το νεόπλασμα.

B) **Tumor-induced vascular modification**, τα νεοπλασματικά κύτταρα, διηθούν τα φυσιολογικά αγγεία του εγκεφάλου, μεταβάλλοντας τη μορφολογία και τη λειτουργικότητά τους.

Γ) **Vascular expansion**, προϋπάρχοντα φυσιολογικά αγγεία επιμηκύνονται και τροποποιούνται, ώστε να αντεπεξέλθουν στις αυξημένες ανάγκες παροχής αίματος, λόγω ανάπτυξης του όγκου ή εμφάνισης αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας.

Στα *low grade* γλοιώματα, η μικροκυκλοφορία υφίσταται από προϋπάρχοντα αγγεία,

που περιβάλλονται από νεοπλασματικά κύτταρα ενώ, στην αρχιτεκτονική δομή των *high grade*, απαντώνται και οι τρεις προαναφερθείσες υποκατηγορίες αγγειογένεσης.

Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα μέσω ενός καταρράκτη γεγονότων, που περιλαμβάνουν βασικά 3 φάσεις, την αρχική, την παραγωγική και την τελική φάση.

Αυτές οι τρεις φάσεις απαρτίζονται από δέκα βήματα:

- Τα νέα μικροαγγεία προέρχονται από τα μετατριχοειδικά φλεβίδια.
- Η αρχική φάση λαμβάνει χώρα όταν, καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη του φλεβιδίου στο σημείο, όπου ενεργοποιείται ο αγγειογενετικός παράγων.
- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιμηκύνονται και μεταναστεύουν.
- Ενδοθηλιακά κύτταρα ακολουθούν τα κύτταρα οδηγούς και στοιχίζονται ώστε, να σχηματιστεί η αρχική εστία.
- Σχηματίζεται το κανάλι και ο αυλός.
- Τα κύτταρα οδηγοί δε διαιρούνται. Τα υπόλοιπα ενδοθηλιακά κύτταρα όμως, διαιρούνται και η παραγωγική φάση αρχίζει. Έτσι σιγά-σιγά εμφανίζονται τα πρώτα μικροαγγεία.
- Στην τελική φάση τα μικροαγγεία συνενώνονται ή αναστομώνονται, σχηματίζοντας μεγαλύτερα αγγεία.
- Εμφανίζεται ενδοαγγειακή ροή.
- Κύτταρα περιβάλλουν τα νέα αγγεία.
- Νέες κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζονται γύρω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η τελική φάση έχει πλέον ολοκληρωθεί και μπορούμε να μιλάμε για μια νέα κυκλοφορία άκρως λειτουργική.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ταξινόμησης των γλοιωμάτων, λαμβάνοντας υπόψη την ιστολογική τους εικόνα, την ακτινολογική τους απεικόνιση, τη θέση εντόπισης και την κυτταροκινητική τους. Όμως, η αιτιολογική τους ταξινόμηση γίνεται με βάση την ιστογένεση και την κυτταρική διαφοροποίηση που εμφανίζουν. Η ιστογένεση προσδιορίζεται από την προέλευση των κυττάρων, το

αρχικό στάδιο διαφοροποίησης και τις μεταβολές, που υφίσταται ο φαινότυπος και ο γονότυπος όταν αναπτύσσεται το νεόπλασμα.

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO=World Health Organization), πρότεινε μια ιστολογική ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του ΚΝΣ και κατά επέκταση και των γλοιωμάτων, η οποία γίνεται βάσει της διαφοροποίησης.

Έτσι τα γλοιώματα διακρίνονται σε:

- A) Αστροκυτταρικούς όγκους
- B) Ολιγοδενδρογλοιακούς όγκους
- Γ) Επενδυματικούς όγκους και,
- Δ) Μικτά γλοιώματα

A) Αστροκυτταρικοί όγκοι

Διακρίνονται σε 2 μεγάλες υποκατηγορίες:

1) **Αστροκυτώματα**, πρόκειται για διάχυτους διηθητικούς αστροκυτταρικούς όγκους, που διακρίνονται σε:

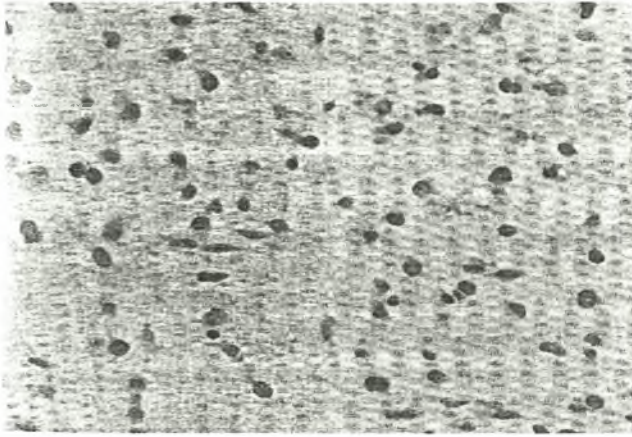
- *Αστροκύτωμα (WHO grade II)*
- *Αναπλαστικό αστροκύτωμα (WHO grade III) και,*
- *Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (WHO grade IV)*

2) **Ειδικοί τύποι** αστροκυτταρικών όγκων:

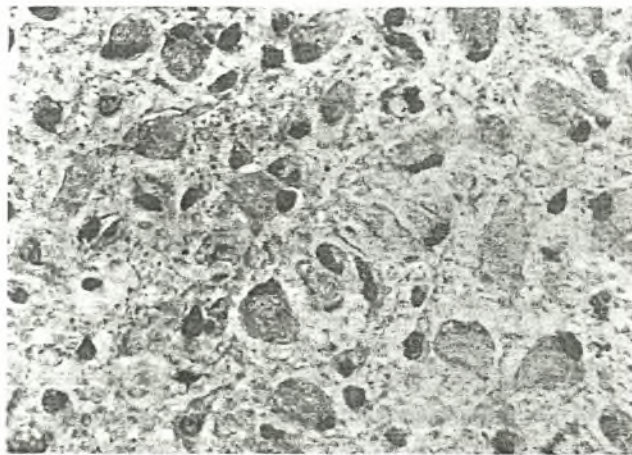
- *Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα (WHO grade I) (149,150)*
- *Πλειομορφικό ξανθοαστροκύτωμα και,*
- *Υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύτωμα* (απαντάται στην οξώδη σκλήρυνση)

Μια άλλη κατάταξη βάσει της ιστολογικής εικόνας είναι σε:

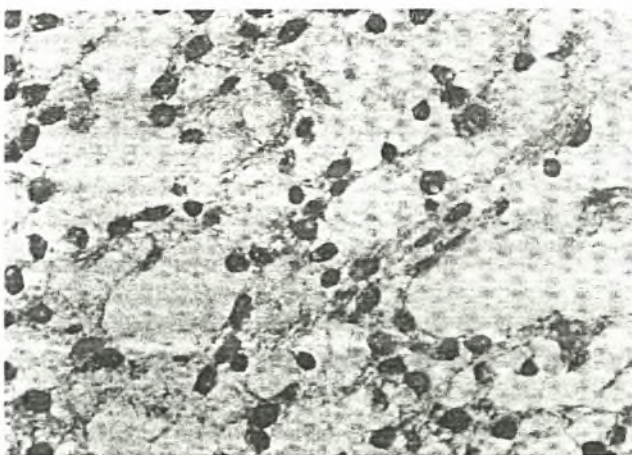
- *Ινώδες (Fibrillary)*, που είναι και το πιο συχνό, εικ.11
- *Γεμιστοκυτταρικό (Gemistocytic)*, το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας, εικ. 12 και,
- *Πρωτοπλασμικό (Protoplasmic)*, απαντάται σπάνια, λιγότερο από το 1% των αστροκυτωμάτων, εικ. 13



Εικ. 11 Ινώδες αστροκύτωμα (WHO grade II) (Vandenberg SR, Lopes MBS: Classification. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 172-191).



Εικ. 12 Γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα (WHO grade II) (Vandenberg SR, Lopes MBS: Classification. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 172-191).



Εικ. 13 Πρωτοπλασμικό αστροκύτωμα (WHO grade II) (Vandenberg SR, Lopes MBS: Classification. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 172-191).

Το γεμιστοκυτταρικό, είναι το δεύτερο πιο συχνό αστροκύτωμα, 10-20% όλων των αστροκυτωμάτων. Για να χαρακτηριστεί ένα αστροκύτωμα ως γεμιστοκυτταρικό, θα πρέπει το 60% των κυττάρων του και άνω, να είναι γεμιστοκύτταρα. Είναι αποδεδειγμένο ότι, όγκοι που έχουν πάνω από 20% γεμιστοκύτταρα, έχουν πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά, από όγκους του ίδιου βαθμού διαφοροποίησης, που απαρτίζονται από περισσότερα ινώδη κύτταρα (152).

- Σύμφωνα με μια άλλη κλίμακα ταξινόμησης, το *St Anne-Mayo system*, τα αστροκυτώματα βαθμονομούνται ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι ατυπία, μίτωση, ενδοθηλιακή γονιμοποίηση και νέκρωση. Η ταξινόμηση κατά WHO, ουσιαστικά αποτελεί μια απλοποιημένη μορφή της ταξινόμησης κατά *St Anne-Mayo*. Η αντιστοιχία έχει ως εξής:
- **Grade 1**, όπου δεν παρατηρείται κανένα από τα προαναφερθέντα μορφολογικά κριτήρια, (*WHO grade I*).
- **Grade 2**, παρατηρείται μόνο *ατυπία*, 1, (*WHO grade II*).
- **Grade 3**, υπάρχει *ατυπία* και *μίτωση*, 2, (*WHO grade III*).
- **Grade 4**, εμφανίζονται τρεις ή τέσσερις από τις παραπάνω παραμέτρους, όπου εκτός από *ατυπία* και *μίτωση*, υπάρχει επιπλέον *ενδοθηλιακή γονιμοποίηση ή και νέκρωση*, 3 ή 4, (*WHO grade IV*).

Το αστροκύτωμα 1 σύμφωνα με το *St Anne-Mayo system*, είναι τόσο σπάνιο, ~1%, που θεωρείται ουσιαστικά ανύπαρκτο.

Σε υποτροπή του όγκου, στο 50-75%, ο επανεμφανιζόμενος όγκος, είναι υψηλότερου βαθμού κακοήθειας, από τον αρχικό (151).

Τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα, αντιπροσωπεύουν το 15-20% όλων των ενδοκρανιακών όγκων και περίπου το 50% όλων των γλοιωμάτων, στους ενήλικες. Τα περισσότερα από αυτά, προκύπτουν από αστροκυτώματα *grade II* και *III*. Σπανιότερα, εμφανίζονται *de novo*, χωρίς να προϋπάρχει χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας βλάβη. Μια κλινικοπαθολογική μελέτη των γλοιωμάτων, με μέγιστη διάσταση μικρότερη από 2 cm, αποκάλυψε ότι το 20% αυτών, ήταν πολύμορφα γλοιοβλαστώματα, ακόμη και σε πρώιμα στάδια (153-157).

Τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα, είναι εξαιρετικά επιθετικοί όγκοι. Το μέγεθος τους ποικίλει από λίγα mm, έως πολλά cm. Η διασπορά του όγκου μπορεί να είναι τόσο

μεγάλη, ώστε να επεκτείνονται, δια του μεσολοβίου, στο αντίθετο ημισφαίριο (“butterfly” pattern).

Σύμφωνα με τη WHO, διακρίνουμε δύο ιστοπαθολογικές υποκατηγορίες πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων:

- **Το γιγαντοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα**, που εντοπίζεται κυρίως στον κροταφικό λοβό, έχει καλύτερη πρόγνωση από το τυπικό γλοιοβλάστωμα και μοιάζει πολύ με καρκίνωμα και,
- **Το γλοιοσάρκωμα**, που η συχνότητα του σαρκωματώδους στοιχείου, κυμαίνεται από 2-8% (158,159).

B) Ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι

1) **Ολιγοδενδρογλοιώματα**: αποτελούν το 5% όλων των ενδοκρανιακών όγκων και το 10-17% όλων των γλοιωμάτων (160-162).

2) **Αναπλαστικά ολιγοδενδρογλοιώματα**: αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% των γλοιωμάτων και αντιστοιχούν στα υψηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα (163).

Γ) Επενδυματικοί όγκοι

Διακρίνονται σε:

1) **Επενδυμώματα** και,

2) **Υποεπενδυμώματα**, τα οποία περιέχουν επενδυματικά κύτταρα και αστροκύτταρα.

Τα επενδυμώματα, αποτελούν το 10% των όγκων του εγκεφάλου και το 6% των ενδοκρανιακών γλοιωμάτων, με μεγαλύτερη συχνότητα στην παιδική και νεανική ηλικία (151,164). Οι όγκοι αυτοί, αναπτύσσονται κατά προτίμηση στο κοιλιακό σύστημα και ιδία στην 4^η κοιλία και ακολουθούν ο υδραγωγός και ο νωτιαίος μυελός.

Εν αντιθέσει με τα παιδιά, στους ενήλικες, τα επενδυμάματα αντιστοιχούν στο 60% των γλοιωμάτων του νωτιαίου μυελού (165).

Σύμφωνα με την WHO διακρίνονται 3 ιστολογικές υποκατηγορίες:

- **Το κυτταρικό (cellular)**
- **Το παπιλλώδες (papillary)** και,
- **Των αμιγών κύτταρων (clear cell)**

Το αναπλαστικό επενδύωμα, αποτελεί την κακοήθη εξέλιξη του επενδυμάματος και μπορεί να συμβεί στα περισσότερα σημεία εντόπισης του όγκου, αλλά είναι ασύνηθες στα επενδυμάματα του νωτιαίου μυελού (151). Εδώ, αξίζει να τονιστεί η διαφοροποίηση μεταξύ επενδυμοβλαστώματος και αναπλαστικού επενδυμάματος. Το επενδυμοβλάστημα, αντιπροσωπεύει εμβρυονικό όγκο, εξαιρετικά κακοήθη, συχνά γιγαντιαίο, που εμφανίζεται υπερσκηνιδιακά σε νεογνά και παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών. Είναι όγκος που επιθετικά διηθεί τις γύρω δομές και έχει την τάση να δίνει πολύ σύντομα σταγονοειδείς μεταστάσεις κατά μήκος του ΚΝΣ.

Το **μυξοπαπιλλώδες (mioxorapillary)** επενδύωμα, αποτελεί μια κλινικοπαθολογική διάκριση του επενδυμάματος. Πρόκειται για ένα βραδέως εξελισσόμενο όγκο, που εντοπίζεται συνήθως στην ιππούριδα των ενηλίκων (166,167).

Δ) Μικτά γλοιώματα

Στην προσπάθεια να τεθούν κανόνες ορισμού, έχει ορισθεί ότι, μικτοί όγκοι χαρακτηρίζονται τα γλοιώματα στα οποία ο μικρότερος ποσοτικά, κυτταρικός τύπος, ξεπερνά το 30% (168).

Διακρίνουμε:

- 1) **Τα μικτά ολιγοαστροκυτώματα**, τα οποία αποτελούν μίγμα ολιγοδενδροκυττάρων και ποικίλου αριθμού νεόπλαστων αστροκυττάρων, με όχι και τόσο καλή πρόγνωση (163,169).
- 2) **Το κακόηθες ολιγοαστροκύτωμα**, είναι γενικώς αποδεκτό ότι, το αστροκυτταρικό στοιχείο είναι το πλέον υπεύθυνο για την αναπλαστική μεταλλαγή του όγκου (151,154).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Γενικώς οι ταχέως εξελισσόμενοι όγκοι, προκαλούν έντονη νευρολογική συμπτωματολογία, ενώ αντίθετα, οι βραδέως αναπτυσσόμενοι, παρουσιάζουν πτωχή συμπτωματολογία, επειδή δίνουν χρόνο στον εγκέφαλο να προσαρμοστεί. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, στο 97%, τα γλοιώματα παρουσιάζουν ενδοκρανιακή εντόπιση. Η πιο συνηθισμένη εκδήλωση των όγκων του εγκέφαλου, είναι η προοδευτική εμφάνιση παρετικής σημειολογίας. Η κεφαλαλγία, που είναι σύμπτωμα πολλών παθήσεων, εμφανίζεται στο 54% των όγκων του εγκέφαλου, ενώ οι επιληπτικές κρίσεις, που δίνουν ελπίδες καλύτερης πρόγνωσης, στο 26%.

Επειδή η συμπτωματολογία εξαρτάται από την εντόπιση του όγκου, για το λόγο αυτό θα αναφερθούμε ξεχωριστά στην κλινική εκδήλωση των υπερσκηνιδίων και υποσκηνιδίων όγκων αντίστοιχα.

• Υπερσκηνιδίοι όγκοι

1. Ενδοκράνια υπέρταση, από την πίεση που εξασκεί στον εγκέφαλο ο όγκος, το περιεστιακό οίδημα ή και τα δύο
2. Εστιακή νευρολογική σημειολογία βλάβης του παρεγχύματος, εξαιτίας της διήθησης από τον όγκο, της πίεσης που εξασκείται από τη μάζα, το οίδημα ή την αιμορραγία που μπορεί να προκληθεί εντός του όγκου και της πίεσης που δέχονται οι εγκεφαλικές συζυγίες
3. Επιληπτικές κρίσεις
4. Ψυχικές διαταραχές, σύγχυση, κατάθλιψη, απάθεια, λήθαργος και,
5. Εικόνα παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου

• Υποσκηνιδίοι όγκοι

1. Ενδοκράνια υπέρταση λόγω υδροκεφαλίας και,
2. Σημειολογία ανάλογα με την υποσκηνίδα δομή που υφίσταται την πίεση:
 - Ημισφαίρια της παρεγκεφαλίδας: αταξία των άκρων, δυσμετρία, τρόμος τελικού σκοπού.
 - Σκώλικας: βάδισμα με ευρεία βάση, παραπαίον βάδισμα (βάδισμα μεθυσμένου), αταξία κορμού.

- Εγκεφαλικό στέλεχος: κατάληψη των κρανιακών συζυγιών, διαταραχές από τις μακρές ίνες και περιστροφικός ή κάθετος νυσταγμός.

ΠΑΡΑΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

- Αξονική τομογραφία (CT)
- Μαγνητική τομογραφία (MRI)
- Μονοφωτονική τομογραφία (SPECT) και,
- Ποζιτρονική τομογραφία (PET)

Η κλινική εικόνα, η θεραπεία και η πρόγνωση των ενδοκρανιακών όγκων και ειδικότερα των γλοιωμάτων, έχουν αλλάξει ριζικά μετά την ανακάλυψη και την ευρεία εφαρμογή των μοντέρνων απεικονιστικών εξετάσεων (CT και MRI), οι οποίες μάλιστα είναι ατραυματικές, παρουσιάζουν με μεγάλη ευκρίνεια την ανατομία των δομών και επαναλαμβάνονται χωρίς ιδιαίτερες επιπτώσεις. Οι εξετάσεις αυτές έχουν εκτοπίσει τελείως, όλες τις παλιές και επικίνδυνες νευροαπεικονιστικές μεθόδους διερεύνησης του ΚΝΣ, όπως την κοιλιογραφία, την πνευμοεγκεφαλογραφία και σε μικρότερο βαθμό την αγγειογραφία.

Επιπλέον οι πρόοδοι στην πυρηνική ιατρική, με την ανακάλυψη ραδιοϊσοτόπων που διέρχονται τον ΑΕΦ, έδωσε νέες δυνατότητες στη διερεύνηση της αιματικής ροής και του μεταβολισμού του εγκεφάλου και των νεοπλασμάτων του, επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (SPECT και PET).

Η πρόωμη όμως διάγνωση, έχει δημιουργήσει και πολλά νέα προβλήματα και ηθικά διλήμματα τόσο στην πρόγνωση και θεραπεία, όσο και στην ποιότητα ζωής των ασθενών αλλά και του περιβάλλοντος αυτών.

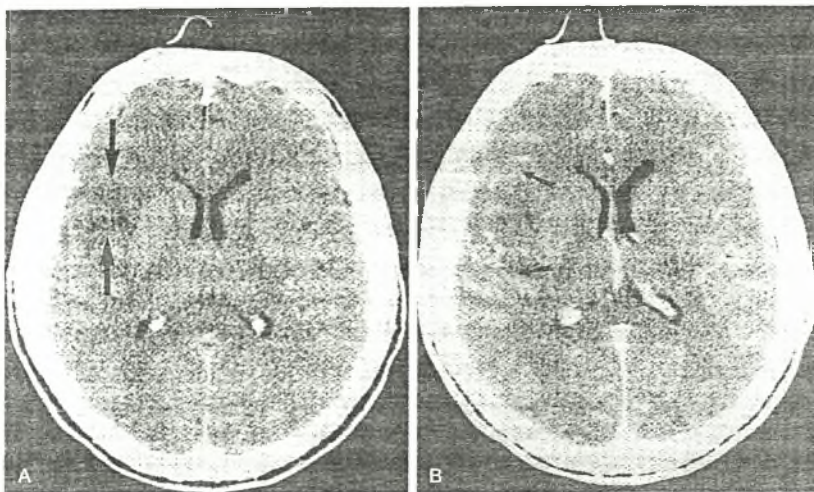
ΑΞΟΝΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ

Αστροκύτωμα

Τα *low grade* αστροκυτώματα, αντιπροσωπεύουν το 9% όλων των ενδοκρανιακών όγκων και το 25-30% των ενδοκρανιακών αστροκυτωμάτων και συνήθως

παρατηρούνται σε παιδιά και άτομα νεαρής ηλικίας.

Από τη CT χαρακτηριστική είναι, η μη επιθετική βιολογία του όγκου αυτού. Απεικονίζεται είτε ως ισόπυκνη, χωρίς σαφώς διακριτά όρια, ή ως σαφώς αφορισμένη υπόπυκνη βλάβη, χωρίς ή με μικρή χωροκατακτητική δράση, εικ. 14:

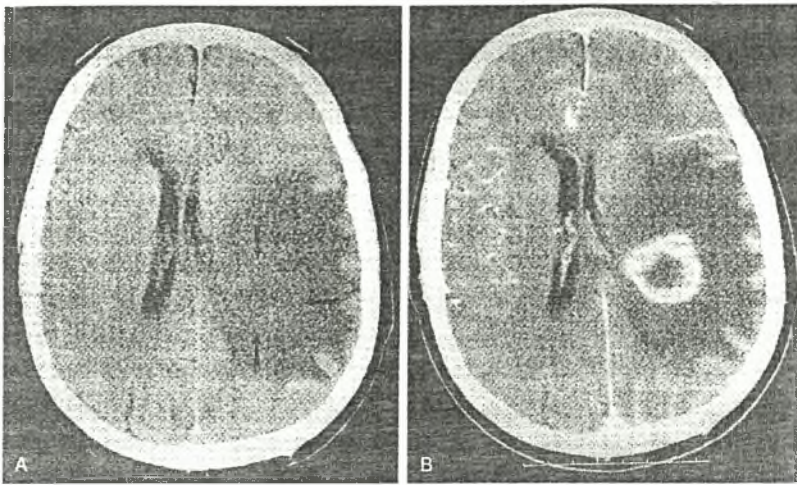


Εικ. 14 *Low grade* αστροκύτωμα χωρίς (A) και με (B) χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας ενδοφλεβίως (Blake LC, Maravilla KR: Computed Tomography. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 242-274).

Υπάρχει ελάχιστο αγγειογενές οίδημα και εμπλουτισμός, γεγονός που αποδεικνύει, την ακεραιότητα του ΑΕΦ. Κυστικοί σχηματισμοί ή νέκρωση, είναι εξαιρετικά ασύνηθες φαινόμενο. Περί τα 10-20% των ενδοκρανιακών γλοιωμάτων, παρουσιάζουν επασβεστώσεις. Αυτό ισχύει κυρίως για τις *low grade* κακοήθειες, αλλά μπορεί περιστασιακά να ισχύει και για τους *high grade* όγκους.

Αναπλαστικό αστροκύτωμα

Αντιπροσωπεύουν το 25-30% των αστροκυτωμάτων και εμφανίζονται σε σχετικά μεγαλύτερης ηλικίας πληθυσμό. Πολλές φορές η CT απεικόνιση είναι παρόμοια με αυτή των *low grade* νεοπλασμάτων, ενώ μερικά χαρακτηριστικά υποδηλώνουν μια πιο επιθετική συμπεριφορά και τότε είναι δύσκολη η διαφοροδιάγνωση από τα *high grade* γλοιώματα, εικ. 15:



Εικ. 15 Αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς (A) και με (B) χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας ενδοφλεβίως – Υποτροπή όγκου (Blake LC, Maravilla KR: Computed Tomography. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 242-274).

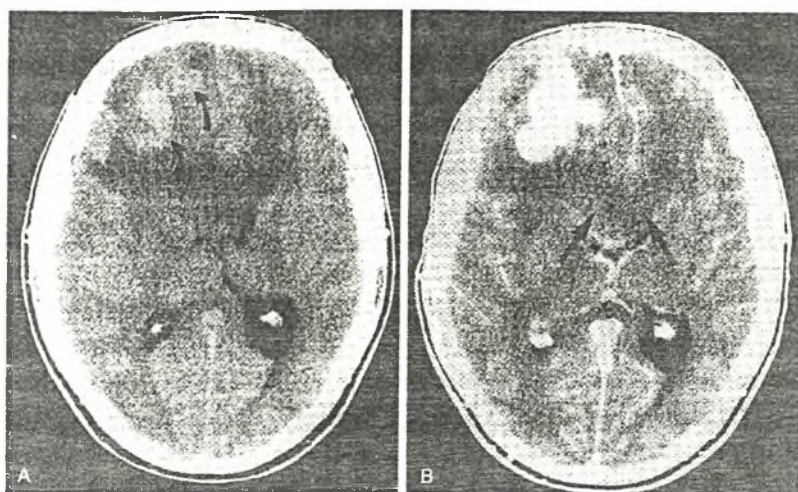
Γενικότερα, τα όρια δεν είναι και τόσο σαφή, το οίδημα μεγαλύτερο, εμφανίζουν χωροκατακτητικότητα και περισσότερο εμπλουτισμό συγκριτικά με τα *low grade*. Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει από βλάβες απομυελινωτικής νόσου και μεταστάσεις.

Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Είναι ο πιο κοινός πρωτοπαθής υπερσκληνδιακός όγκος σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα. Αντιπροσωπεύει το 15-20% όλων των ενδοκρανιακών όγκων, και το 50% των γλοιομάτων. Εμφανίζεται κυρίως κατά την 5^η-7^η δεκαετία της ζωής, είναι σπάνιο σε ασθενείς κάτω των 30 ετών και παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες (3:2) (170). Η πρόγνωση είναι πολύ κακή με μέσο όρο επιβίωσης τους 6-9 μήνες.

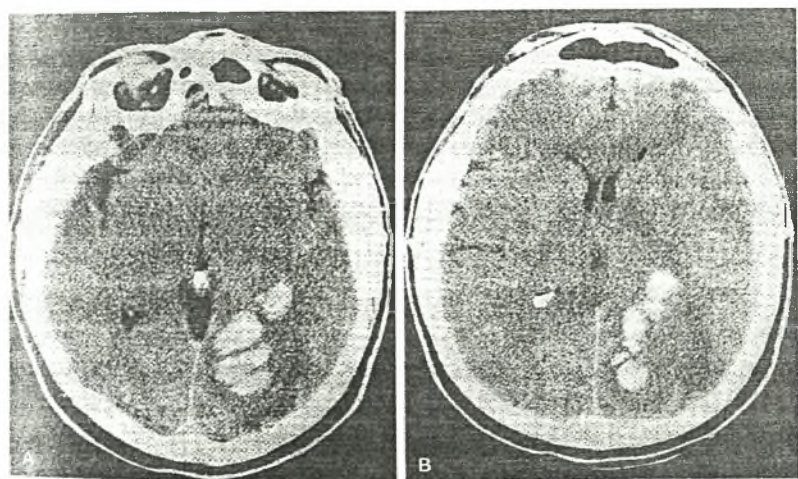
Τα γλοιοβλαστώματα, όταν εκδηλωθούν, είναι πλέον μεγάλου μεγέθους και στη CT απεικονίζονται ως βλάβες ετερογενείς χωρίς σαφή όρια. Το επίκεντρο του όγκου εντοπίζεται χαρακτηριστικά βαθιά στη λευκή ουσία. Εντοπίζονται κυρίως στα ημισφαίρια και κατά προτίμηση στον κροταφικό και μετωπιαίο λοβό. Συχνά διηθούν το μεσολόβιο και το φλοιό, ενώ περιστασιακά, εμπλέκονται και οι μήνιγγες. Χαρακτηριστική είναι η διασπορά στην υποεπενδυματική κοιλιακή επιφάνεια και η επινέμηση στους υπαραχνοειδείς χώρους. Μεταστάσεις απομακρυσμένες εκτός του ΚΝΣ είναι σπάνιες.

Οι υπέρπυκνες εστίες στη CT αντιστοιχούν είτε σε εστιακές αιμορραγίες ή σε συσσωρευμένα νεοπλασματικά κύτταρα, εικ. 16:



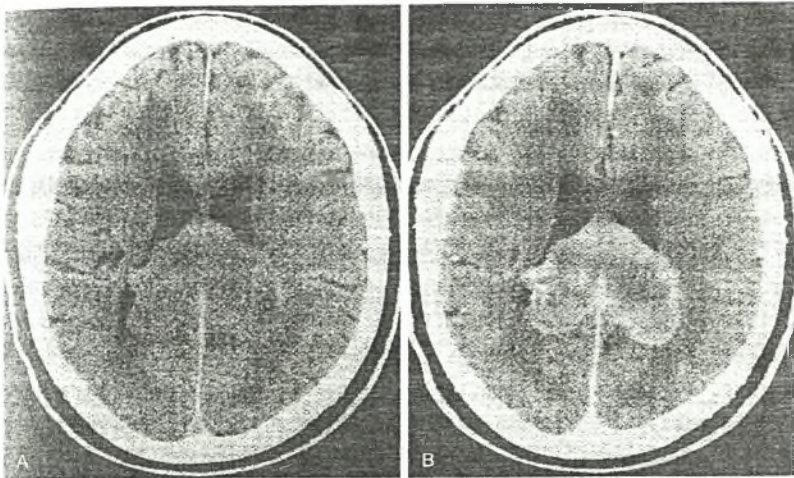
Εικ. 16 Αξονική τομογραφία πολύμορφου γλοιοβλαστώματος χωρίς (Α) και με (Β) χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας ενδοφλεβίως. Χαρακτηριστική είναι η έντονη πρόσληψη σκιαγραφικού, τυπική στα κακοήγη γλιώματα (Blake LC, Maravilla KR: Computed Tomography. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 242-274).

Η αιμορραγία και η νέκρωση είναι χαρακτηριστικά του γλοιοβλαστώματος. Οι επασβεστώσεις είναι σπάνιες, αλλά μπορεί να παρατηρηθούν, ιδία σε όγκους που από *low grade*, εξελίχθηκαν σε γλοιοβλαστώματα. Σπανιότερα εμφανίζεται ως ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, αγνώστου αιτιολογίας και, είναι δύσκολο να διαφοροδιαγνωσθεί από αιμορραγία, οφειλόμενη σε αρτηριακή υπέρταση, έμφρακτο ή ρήξη αγγειακής δυσπλασίας (171,172), εικ. 17:



Εικ. 17 Αξονική τομογραφία πολύμορφου γλοιοβλαστώματος που υποδέεται εικόνα ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (Blake LC, Maravilla KR: Computed Tomography. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 242-274).

Τεράστιο οίδημα, εστίες με εμπλουτισμό και μεγάλη χωροκατακτητικότητα, συνηγορούν υπέρ του όγκου. Πολλές φορές ο διαχωρισμός όγκου-οιδήματος είναι αδύνατος. Ο εμπλουτισμός εκδηλώνεται κυρίως με τη μορφή δακτυλίου, συχνά παχέως και ετερογενούς, που περιβάλλει νεκρωτικές εστίες ή κυστικούς σχηματισμούς. Συχνά οι όγκοι αυτοί επεκτείνονται και στο άλλο ημισφαίριο, παίρνοντας τη χαρακτηριστική μορφή «πεταλούδας», “butterfly” pattern, εικ. 18:



Εικ. 18 Αξονική τομογραφία χωρίς (Α) και με (Β) χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας ενδοφλεβίως – πολύμορφο γλοιοβλάστωμα υπό μορφή ‘πεταλούδας’ (Blake LC, Maravilla KR: Computed Tomography. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 242-274).

Σε γενικές γραμμές, παρόμοια εικόνα παρουσιάζουν και οι άλλες, λιγότερο συχνές, μορφές γλοιωμάτων, ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης και με εξαίρεση κάποιες ιδιαιτερότητες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε όγκο χωριστά.

ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ

Μιλώντας γενικότερα για τον MRI και για το πώς απεικονίζονται οι διάφορες δομές και βλάβες στις δύο πιο βασικές ακολουθίες, T1 και T2, θα λέγαμε ότι διακρίνουμε 2 ειδών απεικονίσεις:

Υψηλής έντασης σήμα

T1: Οίδημα

Κύστη

Αιμοσιδηρίνη

Ταχέως ρέον αίμα

Όγκος

Επασβέστωση

Χαμηλής έντασης σήμα

T1: Λίπος

Υποξύ Υποσκληρίδιο Αιμάτωμα

Μελανίνη

Αυξημένο λεύκωμα

Χορήγηση γαδολινίου

T2: Επασβέστωση

Οξύ Υποσκληρίδιο Αιμάτωμα

Λέμφωμα

Ταχέως ρέον αίμα

Αυξημένο λεύκωμα

T2: Οίδημα

Κύστη

Χρόνιο Υποσκληρίδιο Αιμάτωμα

Όγκος

Αστροκύτωμα

Στον MRI, απεικονίζεται ως σαφώς αφοριζόμενη ομοιογενής βλάβη, χαμηλού σήματος στις T1 και αυξημένου στις T2 ακολουθίες, με ελάχιστο οίδημα και χωροκατακτητικότητα. Συνήθως εντοπίζονται στην επιφάνεια. Μπορεί να υπάρχουν επασβεστώσεις, ενώ η ενίσχυση μετά χορήγηση σκιαγραφικού, κυμαίνεται από ελάχιστη έως καθόλου (173).

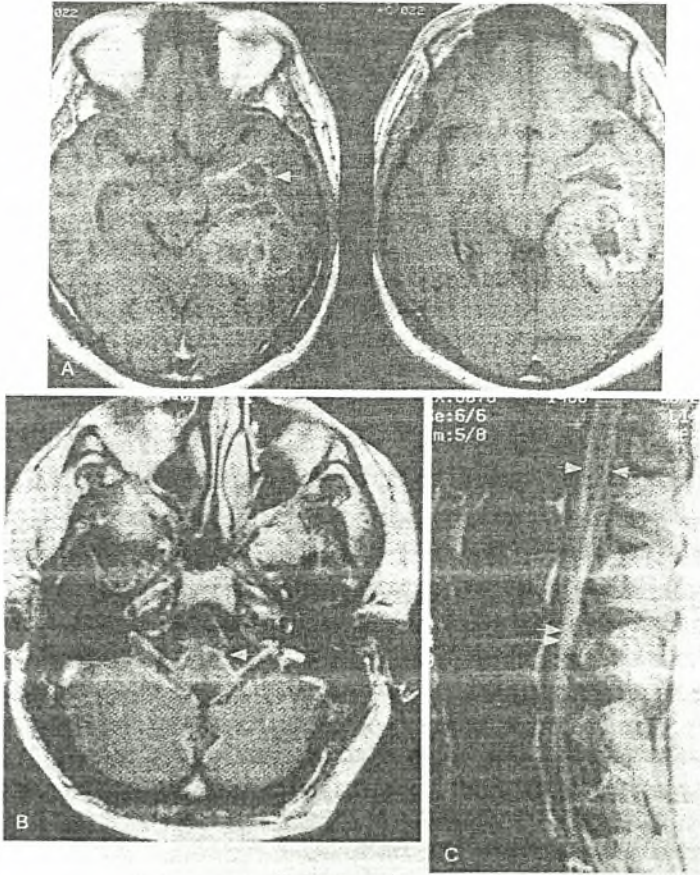
Αναπλαστικό αστροκύτωμα

Απεικονίζεται ως, χωροκατακτητική ετερογενής μάζα, με λιγότερο σαφή όρια, μεγαλύτερο οίδημα και εντονότερη ενίσχυση. Κύστεις και επασβεστώσεις μπορεί να υπάρχουν. Στις T1 και T2 απλές ακολουθίες εκδηλώνεται ως ετερογένεια σήματος. Η εικόνα αυτή είναι κατά προσέγγιση. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις, όπου βλάβη με εικόνα παρόμοια αστροκυτώματος, αποδείχθηκε, βάσει βιοψίας, αναπλαστικό αστροκύτωμα (174).

Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Απεικονίζεται ως ετερογενής βλάβη και στις 2 ακολουθίες (T1 και T2). Αυτή η ετερογένεια χαρακτηρίζεται από συνδυασμό κύστεων, αιμορραγίας και νέκρωσης. Η

βλάβη παρουσιάζεται εξαιρετικά χωροκατακτητική, με ασαφή όρια και μεγάλο οίδημα. Η αιμορραγία είναι συχνή και μάλιστα μερικοί υποστηρίζουν ότι, η εναπόθεση αιμοσιδηρίνης υποβοηθά στη διάκριση μεταξύ γλοιοβλαστώματος και αναπλαστικού αστροκυτώματος (174). Η ενίσχυση μετά τη χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας, είναι πολύ μεγαλύτερη και μάλιστα τις περισσότερες φορές παρουσιάζεται ανομοιογενής (173). Σχεδόν πάντα εμφανίζεται ως μεγάλη βλάβη, υψηλού σήματος στις T2 ακολουθίες. Συχνά είναι αδύνατος ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ όγκου, οιδήματος και διήθησης της λευκής ουσίας. Πολλές φορές, ο όγκος διηθεί το επένδυμα και τις λεπτομήνιγγες. Ο MRI με ενδοφλέβια έγχυση σκιαγραφικού, είναι πιο ευαίσθητος στην ανίχνευση λεπτομηνιγγικής διασποράς σε σχέση με τη CT (175). Ένδειξη αυτής αποτελεί η πρόσληψη σκιαγραφικού από τη χοριοειδή μήνιγγα των κρανιακών νεύρων και του στελέχους, εικ. 19:



Εικ. 19 Επενδυματική και υπαραχνοειδής διασπορά γλοιοβλαστώματος. Εγκάρσια T1 ακολουθία χωρίς (A) και με (B) χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας ενδοφλεβίως. Οβελιαία T1 ακολουθία με σκιαγραφικό της οσφυοϊεράς μοίρας με ενίσχυση τόσο του μυελικού κώνου όσο και της ιππούριδας (Gold RL, JR Dillon WP: Magnetic Resonance Imaging. Berger & Wilson. The Gliomas. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1999, 275-293).

Για τα υπόλοιπα γλοιώματα και την απεικόνιση τους στις T1 και T2 απλές ακολουθίες, ισχύουν παρόμοια ευρήματα, ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησής τους.

PET και SPECT

Οι νέες τεχνολογίας τομογραφικές γ-κάμερες, για την εκτέλεση της ποζιτρονικής τομογραφίας (**PET=Positron Emission Tomography**) και της μονοφωτονικής τομογραφίας (**SPECT=Single Photon Emission Computerized Tomography**), έχουν πολύ μεγάλη διακριτική ικανότητα.

Ο προσδιορισμός της μεταβολικής δραστηριότητας των γλοιωμάτων, με το PET, ανάλογα με τη δυνατότητα πρόσληψης της γλυκόζης ή της μεθειονίνης, μπορεί να σχετιστεί με την έκταση που καταλαμβάνει το γλοίωμα, το βαθμό της κακοήθειάς του και την επιβίωση.

Στο SPECT, με τη βοήθεια του ισotόπου Θαλλίου²⁰¹ (²⁰¹Thallium), είναι δυνατό να εκτιμηθεί η κακοήθεια του νεοπλασματος και να διαφοροδιαγνωσθεί η μετακινική νέκρωση από την υποτροπή του όγκου.

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΟΙΩΜΑΤΩΝ

Η αναμονή και η στενή παρακολούθηση της εξέλιξης, η χειρουργική αντιμετώπιση και οι επικουρικές θεραπείες, με ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικά μέσα, περιλαμβάνονται στην τακτική για την αντιμετώπιση των γλοιωμάτων.

Χειρουργική θεραπεία

Η πλέον ενδεδειγμένη και διαδεδομένη, είναι η χειρουργική αντιμετώπιση των γλοιωμάτων. Γενικότερα η χειρουργική επέμβαση προτείνεται στις εξής περιπτώσεις:

1. Σε συμπαγείς ή κυστικούς ευμεγέθεις όγκους, όπου υπάρχει άμεσος κίνδυνος εγκολεασμού.
2. Σε περιπτώσεις απόφραξης της κυκλοφορίας του ENY

3. Στα κυστικά αστροκυτώματα της παρεγκεφαλίδας, στην παιδική ηλικία
4. Σε υπερσκληνίδια πλοκυτταρικά αστροκυτώματα και,
5. Σε περιπτώσεις ανθεκτικών στα φάρμακα, επιληπτικών κρίσεων.

Στα κακοήθη όμως γλοιώματα η χειρουργική επέμβαση δεν αποτελεί θεραπεία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επέμβαση προτείνεται για να υπάρξει ιστολογική ταξινόμηση και κυρίως ανακούφιση του εγκεφάλου από την πίεση, προκειμένου να δεχθεί την ακτινοβολία.

Μορφές της χειρουργικής αντιμετώπισης αποτελούν:

1. **Η βιοψία.** Διενεργείται είτε με ανοικτή μέθοδο ή με στερεοταξία. Διαφορές στη θνησιμότητα και θνητότητα μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων, δε φαίνεται να υπάρχουν. Σε γενικές γραμμές όμως, προτιμάται η στερεοτακτική βιοψία, γιατί είναι ακριβής, ασφαλής και ελάχιστα χρονοβόρα. Η μόνη ίσως διαφορά υπέρ της ανοικτής μεθόδου είναι ότι, λαμβάνονται μεγαλύτερα τεμάχια υλικού, για ιστολογική εξέταση. Πάντοτε μετά τη διενέργεια της στερεοτακτικής βιοψίας, είναι απαραίτητος ο έλεγχος με αξονική τομογραφία, ώστε να αποκλεισθεί η πιθανότητα αιμορραγίας.
2. **Η εσωτερική ανακούφιση του όγκου.** Γίνεται είτε με κρανιοτομία (ανοικτή μέθοδος) ή στερεοτακτικά. Με τη μέθοδο αυτή αφαιρούνται σχετικά εύκολα οι περιοχές νέκρωσης, που είναι εκτεταμένες.
3. **Η ολική εκτομή του όγκου.** Επιχειρείται με την κλασσική οστεοπλαστική κρανιοτομία. Με τη χρήση πλοηγού (neuronavigator), ο προσδιορισμός της θέσης της κρανιοτομίας και η εντόπιση της θέσης του όγκου, γίνεται με μεγάλη ακρίβεια. Η μέθοδος, χρησιμοποιεί προεγχειρητικά, την αξονική τομογραφία και ειδικούς *markers*, που τοποθετούνται στο κεφάλι του ασθενούς και στη συνέχεια ανιχνεύονται από το μηχάνημα. Πρόκειται όμως, για μια υψηλού κόστους μέθοδο, η οποία δεν είναι διαθέσιμη σε πολλές κλινικές και δη στην χώρα μας. Άλλες νευροφυσιολογικές μέθοδοι, όπως αυτή της χαρτογράφησης ή του ηλεκτροφλοιογραφήματος, βοηθούν στον προσδιορισμό του περιγράμματος του όγκου.

Οι ενδείξεις για επέμβαση, έχουν αναθεωρηθεί, μετά την αλματώδη εξέλιξη της τεχνολογίας και των μονάδων υποστήριξης. Η όσο το δυνατόν ριζικότερη εξαίρεση των γλοιωμάτων είναι θετικός παράγων επιβίωσης. Η ηλικία δεν αποτελεί πλέον ανασταλτικό παράγοντα. Σημαντικό ρόλο παίζει η γενική κατάσταση του ασθενούς, όπως αυτή ορίζεται με βάση την κλίμακα Karnofsky (Κλίμακα Karnofsky Score >70), (πίνακας 1). Αν η κλίμακα είναι κάτω του 70 και στον απεικονιστικό έλεγχο υπάρχει μετάθεση της μέσης γραμμής, η απόφαση για χειρουργική επέμβαση είναι συζητήσιμη. Οι διαταραχές του πηκτικού μηχανισμού, η βαριά καρδιοπάθεια και η ανεπαρκής λειτουργία των πνευμόνων, μπορεί απλά να καθυστερήσουν ή και να αναβάλλουν τη χειρουργική επέμβαση.

Ένδειξη υπάρχει σε όλους τους όγκους της λευκής και της φαιάς ουσίας, ανεξάρτητα από το ημισφαίριο στο οποίο εντοπίζονται. Αντένδειξη αποτελούν, η διήθηση του μεσολοβίου και των βασικών γαγγλίων. Προσοχή χρειάζεται στους όγκους που επεκτείνονται στην έλικα του προσαγωγίου, γιατί μιμούνται τους όγκους που διηθούν το μεσολόβιο. Όταν ο όγκος εντοπίζεται στα βασικά γάγγλια ή στο εγκεφαλικό στέλεχος, προτιμάται η στερεοτακτική βιοψία. Πρόβλημα υπάρχει στις περιπτώσεις των διηθητικών νεοπλασμάτων, που δεν παρεκτοπίζουν τις δομές του εγκεφάλου. Εδώ, η επικρατούσα άποψη είναι η αναμονή και στενή παρακολούθηση, μετά τη διενέργεια βιοψίας, γιατί η πλειονότητα των όγκων αυτών, είναι *low grade* γλοιώματα. Αν όμως η βιοψία αποκαλύψει ότι πρόκειται για *grade III* ή *IV* γλοιώματα, οι γνώμες διχάζονται για το κατά πόσο είναι σκόπιμο να επέμβουμε ή να αναμείνουμε, παρακολουθώντας τον ασθενή με διάφορες απεικονιστικές μεθόδους.

Η εγχείρηση προτείνεται υπό την προϋπόθεση ότι, η εκτομή του όγκου θα συμβάλλει στην επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης, στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και στη μείωση της πιθανότητας υποτροπής του όγκου. Τα ευμεγέθη κακοήγη γλοιώματα, είναι προτιμότερο να αντιμετωπίζονται με εσωτερική ανακούφιση, γιατί η ολική εξαίρεση θέτει σε κίνδυνο τη ζωή του ασθενούς. Σχεδόν σε όλες όμως τις περιπτώσεις, η διενέργεια βιοψίας με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, είναι απαραίτητη.

Πίνακας 1

Κλίμακα Karnofsky

- 100 Φυσιολογική κατάσταση. Δε δίδεται η εντύπωση ύπαρξης νόσου.
- 90 Φυσιολογική δραστηριότητα. Υπάρχουν ελάχιστα συμπτώματα.
- 80 Φυσιολογική δραστηριότητα με προσπάθεια. Μερικά συμπτώματα.
- 70 Αυτοεξυπηρετείται. Αδυνατεί να έχει φυσιολογική δραστηριότητα.
- 60 Ενίοτε χρειάζεται βοήθεια. Σε γενικές γραμμές αυτοεξυπηρετείται.
- 50 Χρειάζεται σημαντική βοήθεια.
- 40 Ανάπηρος. Χρειάζεται ειδική βοήθεια.
- 30 Βαρειά αναπηρία.
- 20 Βαρειά κατάσταση. Άμεση ανάγκη έντονης θεραπείας και υποστήριξης.
- 10 Θάνατος.

Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία περιλαμβάνει τις εξής μορφές:

1. **Συμβατική (εξωτερική) ακτινοθεραπεία.** Καλυτερεύει την πρόγνωση, όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις. Ο χρόνος επιβίωσης είναι ευθέως ανάλογος της δόσης της ακτινοβολίας. Ο φυσιολογικός όμως, εγκεφαλικός ιστός, μπορεί να δεχτεί μέχρι ένα ορισμένο ανώτατο όριο ακτινοβολίας. Το όριο αυτό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 60 Gray (Gy), επειδή υπάρχει ο κίνδυνος μετακινικής βλάβης του εγκεφάλου. Εναλλακτικοί τρόποι ακτινοβολίας, είναι η χρησιμοποίηση βαρέων ιόντων, νετρονίων, πρωτονίων, ακτινοαισθητήρων και διαφόρων σχημάτων κλασματικής ακτινοθεραπείας, που παρά τον αρχικό ενθουσιασμό, δε φαίνεται να υπερτερούν της συμβατικής ακτινοθεραπείας.
2. **Βραχυθεραπεία (εσωτερική) ή ενδοϊστική ακτινοθεραπεία.** Πρόκειται για εμφύτευση ραδιενεργών ισοτόπων, εντός της κοιλότητας του όγκου. Θεωρητικά φαίνεται να υπερτερεί της συμβατικής ακτινοθεραπείας, γιατί επιτρέπει την απελευθέρωση υψηλών δόσεων ακτινοβολίας επί του όγκου, χωρίς να επεκτείνεται ιδιαίτερα στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς. Η απελευθέρωση της ακτινοβολίας είναι συνεχής και καταστρέφει εκείνα τα κύτταρα, τα οποία

βρίσκονται στην παραγωγική φάση της μίτωσης δηλαδή, αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία.

3. **Ραδιοχειρουργική.** Η εφαρμογή της ραδιοχειρουργικής στα κακοήθη γλοιώματα, επεκτείνεται όλο και περισσότερο, είτε ως εναλλακτική λύση της βραχυθεραπείας ή σε ασθενείς που για οποιοδήποτε λόγο δεν πληρούν τα κριτήρια των πρωτοκόλλων της βραχυθεραπείας. Παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της ραδιοχειρουργικής είναι, η παθολογία του ασθενούς που πρόκειται να υποβληθεί σε αυτή, η ηλικία, η κλίμακα Karnofsky, το μέγεθος του όγκου και ο αριθμός των εστιών του. Παρά το γεγονός ότι, αποτελεί μια πολύ ελκυστική και γενικότερα αποδεκτή τεχνική, δεν είναι ακόμη στατιστικά αποδεδειγμένο το αν και κατά πόσο υπερτερεί της βραχυθεραπείας.

Χημειοθεραπεία

Χρησιμοποιείται είτε ως επικουρική θεραπεία της ακτινοβολίας μετεγχειρητικά, ή ως αποκλειστική θεραπεία σε περιπτώσεις υποτροπής της νόσου. Η χημειοθεραπεία χορηγείται σε ασθενείς κάτω των 70 ετών και με κλίμακα Karnofsky, οπωσδήποτε, άνω των 50. Συγκεκριμένα για τα νεοπλάσματα του εγκεφάλου, εναλλακτική οδό χορήγησης, αποτελεί η ενδοκαρωτιδική δια μέσου εμφυτευμένου συστήματος, η οποία έχει το πλεονέκτημα να αυξάνει τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου εντός και γύρω από τον όγκο, ελαττώνοντας σε μεγάλο βαθμό τις παρενέργειές του. Επιπλέον με τη μέθοδο αυτή δεν απαιτείται η χορήγηση φαρμάκων που να διασπών τον ΑΕΦ, αφού αυτός παρακάμπτεται (176).

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, προσβάλλουν τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα του όγκου, αλλά παράλληλα και φυσιολογικά κύτταρα, όπως αυτά του μυελού των οστών και του γαστρεντερικού συστήματος, προκαλώντας τοξικές παρενέργειες από τα αντίστοιχα συστήματα. Πρόσφατα με τη δυνατότητα που υπάρχει για μεταμόσχευση του μυελού των οστών, μπορούμε να χορηγήσουμε υψηλές δόσεις τέτοιων φαρμάκων.

Βιολογικά παρασκευάσματα, όπως οι κυτοκίνες και οι ιντερφερόνες, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά μέχρι στιγμής η αποτελεσματικότητά τους είναι αμφίβολη.

Τα νευροτοξικά συμβάματα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, είτε χορηγούνται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό είναι:

- Περιφερική νευροπάθεια
- Μυοπάθεια
- Μυελοπάθεια-αραχνοειδίτιδα
- Οξεία ή χρόνια εγκεφαλοπάθεια
- Οξύ παρεγκεφαλιδικό σύνδρομο και,
- Σύνδρομο παράδοξης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης.

ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Η πλειοψηφία των ασθενών με γλοιώμα, θα υποβληθούν είτε σε ανοικτή ή στερεοτακτική βιοψία, προκειμένου να προσδιοριστεί η ιστολογική εικόνα και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου.

Η προεγχειρητική προετοιμασία ασθενών με γλοιώμα περιλαμβάνει εκτός από τον συνήθη έλεγχο ρουτίνας και ειδικό έλεγχο για την αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων, της ενδοκράνιας υπέρτασης και της υδροκεφαλίας.

- **Αντιεπιληπτικά.** Έχει καθιερωθεί να χρησιμοποιούνται προληπτικά, κυρίως για γλοιώματα με εντόπιση πάνω από το σκηνίδιο.
- **Θεραπεία του περιεστιακού οιδήματος.** Η ανάπτυξη οιδήματος είναι σπάνια στα *low grade*, αλλά πολύ συχνή στα *high grade* γλοιώματα. Το οίδημα αυτό είναι αγγειογενές και οφείλεται στη διάσπαση του ΑΕΦ, με αποτέλεσμα την έξοδο υπερλευκωματούχου υγρού στον εξωκυττάριο χώρο. Το οίδημα έχει την τάση να καταλαμβάνει, ως επί το πλείστον, τον εξωκυττάριο χώρο της λευκής μάλλον παρά της φαιάς ουσίας, πιθανότατα λόγω της μικρότερης αντίστασης ροής που συναντά στη λευκή ουσία (177,178). Η αντιμετώπιση του γίνεται κυρίως με **κορτικοστεροειδή**, σε συνδυασμό με **H2-αναστολείς** (histamin blockers), για την αποφυγή πεπτικών ελκών και αιμορραγίας από το ανώτερο γαστρεντερικό, αν και η διαθέσιμη βιβλιογραφία δεν υποστηρίζει οριστικά αυτή την εκδοχή. Απαιτείται όμως, ένα μεσοδιάστημα κάποιων ημερών, μέχρι τα

κορτικοστεροειδή να μειώσουν το οίδημα. Στο χρόνο αυτό άλλα μέτρα μπορεί να εφαρμοστούν όπως: α) η θέση του ασθενούς στις 30°, β) η αφαίρεση ENY (1-1.5lt/d), γ) οι ωσμωτικοί παράγοντες, μαννιτόλη, δ) τα διουρητικά, ίδια σε συνδυασμό με μαννιτόλη και ε) ο υπεραερισμός.

- **Αντιμετώπιση της υδροκεφαλίας.** Εμφανίζεται σαν επιπλοκή πιο συχνά σε όγκους που εντοπίζονται στον οπίσθιο κρανιακό βόθρο, το εγκεφαλικό στέλεχος, τα βασικά γάγγλια και το διεγκέφαλο. Παρά το ότι η χρήση διουρητικών μπορεί να βοηθήσει, η οριστική αντιμετώπιση είναι καθαρά χειρουργική, με την τοποθέτηση ενδοκοιλιακού καθετήρα εξωτερικής παροχέτευσης ή εν ανάγκη με κοιλιοπεριτοναϊκή παροχέτευση.

Το βασικότερο όμως ρόλο στην προετοιμασία αυτών των ασθενών, παίζει η **συναισθηματική και ψυχολογική υποστήριξή τους.**

ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Παράγοντες που παίζουν ρόλο στην πρόγνωση των γλοιωμάτων είναι:

1. **Ηλικία.** Είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας πρόγνωσης. Η βιολογική εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι: α) οι κυτταρικές γραμμές ασθενών ηλικίας άνω των 50 ετών είναι πιο ανθεκτικές στα παράγωγα της νιτροζουρίας (BCNU, CCNU), από ότι οι αντίστοιχες ασθενών μικρότερης ηλικίας, β) οι ιστολογικές παραλλαγές του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος είναι πολύ πιο συχνές στις μεγάλες ηλικίες και γ) η αντίσταση των ηλικιωμένων είναι ελαττωμένη, με αποτέλεσμα η προεγχειρητική και μετεγχειρητική κατάσταση τους να εμφανίζεται τις περισσότερες φορές επιδεινωμένη.
2. **Ιστολογική εικόνα.** Παίζει αναμφίβολα σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση, για αυτό και όλα τα συστήματα ταξινόμησης των γλοιωμάτων στηρίζονται στα ιστολογικά ευρήματα δηλαδή, την πληθώρα των κύτταρων, τη μορφολογία του πυρήνα, τα νεοσύστατα αγγεία και τη νέκρωση. Παρά ταύτα όμως ο χρόνος επιβίωσης ασθενών με γλοίωμα *grade III* και *IV*, δε διαφέρει ή είναι οριακός, όταν εφαρμόζεται το ίδιο θεραπευτικό σχήμα.

3. **Λειτουργική κατάσταση του ασθενούς (Performance status).** Για την εκτίμηση της λειτουργικής ικανότητας του ασθενούς, έχουν επινοηθεί διάφορες κλίμακες, με πλέον δημοφιλή την κλίμακα Karnofsky.
4. **Εξαιρεσιμότητα του όγκου.** Όσο πιο εκτεταμένη είναι η εξαίρεση του όγκου, τόσο μεγαλύτερη είναι η επιβίωση του ασθενούς, ανεξάρτητα από την προεγχειρητική του κατάσταση.
5. **Διάρκεια εμφάνισης των συμπτωμάτων.** Όγκοι με μικρότερη διάρκεια εμφάνισης συμπτωμάτων, χαρακτηρίζονται από επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και ιστολογική κακοήθεια.
6. **Ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς.** Ο ρόλος της στο χρόνο επιβίωσης δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη ολοκληρώθηκε σε 2 στάδια:

1) *in vitro* και 2) *in vivo*.

Όσον αφορά στο πρώτο στάδιο, για την εφαρμογή του επιλέξαμε 2 κυτταρικές σειρές:

1) κύτταρα πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (SNB-19) και 2) κύτταρα γλοιώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Hs683).

Χρησιμοποιήσαμε ως *vector control* τον PcDNA 3.1 (ευκαριωτικού τύπου) για να “μολύνουμε” SNB-19 τα κύτταρα με 0.7 kb *sense* TFPI-2 cDNA και τα Hs683 κύτταρα με 1 kb *antisense* TFPI-2 cDNA. Η επιλογή των σταθερών κλώνων έγινε με τη βοήθεια G418, όπως αναλύεται στη συνέχεια.

Οι ECM πρωτεΐνες, απομονώθηκαν από κυτταροκαλλιέργειες με πληρότητα 80-90% και αναλύθηκαν για TFPI-2 πρωτεΐνη με τη μέθοδο Western Blotting, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου Northern Blotting, καθώς και τη μέθοδο GAPDH, ως ενδογενή έλεγχο.

Με τη μέθοδο Western Blotting, προσδιορίστηκε η έκφραση και καθορίστηκαν τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνών, που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι:

- Οι ERK πρωτεΐνες, που χαρακτηρίζονται από φωσφορυλίωση σε ειδικές θέσεις τυροσίνης και θρεονίνης, εμφανίζονται με συγκεκριμένο μοτίβο, Thr-Glu-Tyr. Η φωσφορυλίωση και στις 2 αυτές θέσεις είναι απαραίτητη για την πλήρη ενζυματική ενεργοποίηση (179-181).
- Ο BAX παράγοντας, προάγει την απόπτωση ενώ, ο Bcl-2 δρα ως αναστολέας αυτής. Και οι δύο αυτοί παράγοντες αποτελούν μέλη της ίδιας οικογένειας, γνωστής ως Bcl-2 family (27,182).

- Οι *caspases*, διαιρούνται σε *initiators* (caspase-8,9,10) και *effectors* (caspase-3,6,7), βάσει της θέσης που κατέχουν στον *caspase cascade* (183-186). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, ο PARP, διασπάται από το μόριο των 116 kDa, σε δύο τμήματα των 85 και 25 kDa αντίστοιχα.
- Το κυτόχρωμα, είναι μια πρωτεΐνη-μεταφορέας ηλεκτρονίων. Τα κυτοχρώματα είναι γνωστά, ως απαραίτητα συστατικά της μιτοχονδριακής αναπνευστικής συσκευής και κατατάσσονται σε 4 ομάδες (a,b,c και d). Το cyt-c (M.W. 15 kDa), μεταφέρεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (187,188). Ο Apaf-1, δεσμεύει το cyt-c στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα γνωστό ως “*apoptosome*” (21).

Η ενεργοποίηση των πρωτεασών της ICE-οικογένειας, προκαλεί την έναρξη της απόπτωσης στα κύτταρα των θηλαστικών. Το “*apoptosome*” οδηγεί στη μετατροπή του προενζύμου, *procaspase-9*, σε ένζυμο, *caspase-9* και την ενεργοποίησή του, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον *caspase cascade* (-3 και -7), (21,189).

Η διεισδυτικότητα των κλώνων ελέγχθηκε με τις εξής δοκιμασίες: α) επώαση με *matrigel* και διείσδυση διαμέσου φίλτρων (*matrigel assay*), β) μετανάστευση βασισμένη στα σφαιροειδή του ίδιου κυτταρικού τύπου (*migration assay*) και γ) διείσδυση των σφαιροειδών νεοπλασματικών κυττάρων σε *aggregates* κυττάρων εγκεφάλου από έμβρυα ποντικού (*spheroid assay*).

Για την ολοκλήρωση της μελέτης χρησιμοποιήσαμε, *in vivo*, 40 ποντίκια (*nude mice*), τα οποία όλα είχαν υποβληθεί σε εκτομή του θύμου αδένου, “*αθυμικά*”.

Κατόπιν ενδοεγκεφαλικής ένεσης νεοπλασματικών κυττάρων σε αυτά και ακολουθώντας μια διαδικασία όπως αυτή αναλύεται στη πορεία, ελέγξαμε την ικανότητα ανάπτυξης όγκου.

Κυτταροκαλλιέργειες:

Υψηλής (SNB-19) και χαμηλής (Hs683) κακοήθειας κύτταρα, τα οποία προμηθευτήκαμε από την American Type Culture Collection (Mannasas, VA), αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (**D**ulpeco's **M**odified **E**agle's **M**edium),

ενισχυμένο με 1% γλουταμίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 10% Βόιο εμβρυϊκό ορό (pH 7.2-7.4), σε υγρή ατμόσφαιρα με 5% CO₂ στους 37°C. Η υποδιαίρεση των καλλιεργειών γινόταν κάθε 3-5 μέρες.

Προετοιμασία των *Constructs*:

1 kb και 0.7 kb τμήματα (fragments) του ανθρώπινου TFPI-2, πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της RT-PCR (**R**everse **T**ranscriptase-**P**olymerase **C**hain **R**eaction), χρησιμοποιώντας ειδικούς *primers*. Το 0.7 kb *fragment* κλωνοποιήθηκε σε *sense* προσανατολισμό ενώ, το 1 kb *fragment* σε *antisense* προσανατολισμό, στον PcDNA 3.1 *vector* (Invitrogen San Diego, CA). Ο προσανατολισμός επιβεβαιώθηκε από *restriction digestion* (πέψη υπό περιορισμό) και η επίδειξη της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με αυτόματο μηχάνημα (sequencer, της Applied Biosystems Inc., USA), δείχνοντας 100% ομολογία με τη δημοσιευμένη αλληλουχία του TFPI-2 cDNA (9).

"Μόλυνση" (transfection) των κυττάρων με TFPI-2:

Τα SNB-19 κύτταρα "μολύνθηκαν" με το 0.7 kb *sense* cDNA *construct* και τα Hs683 με το 1 kb *antisense* *construct*. Επίσης και στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές, ενσωματώθηκε PcDNA 3.1 *vector* μόνος του, ως *control*, χρησιμοποιώντας *lipofectamine* (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν ολονύκτια (4×10^5 κύτταρα ανά 60 mm τριβλείο) και αφού πλύθηκαν με PBS (Phosphate-Buffered Saline), παρέμειναν σε 100 µl *serum free medium* με 1-2µg πλασμιδιακού DNA. Η *lipofectamine* (7µl διαλυμένα σε 100 µl *serum free medium*), προσετέθη στάγδην στο DNA. 12 ώρες αργότερα, το θρεπτικό αυτό υλικό αντικαταστάθηκε από DMEM εμπλουτισμένο με 10% Βόιο εμβρυϊκό ορό. Η επιλογή των κλώνων άρχισε 48 ώρες μετά τη "μόλυνση", αναπτύσσοντας τα κύτταρα αυτά σε πλήρες θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με G418 (800µl/ml, Life Technologies). Οι καλλιέργειες αυτές συνεχίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη.

Μέθοδος Western Blotting:

Οι ECM πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τους κλώνους (SNB-19 *sense* και Hs683 *antisense*), τους *vector controls* και τα γονικά κύτταρα με 200 μ l SDS-PAGE *sample buffer*. 25 μ l των δειγμάτων, ελέγχθηκαν για TFPI-2 επίπεδα με τη μέθοδο Western Blotting. Όσον αφορά στον έλεγχο της απόπτωσης, η προετοιμασία των δειγμάτων πρωτεΐνης ήταν λίγο διαφορετική. Τα κύτταρα, μεγάλωσαν σε τριβλεία των 10 cm, μέχρι το 80-90% της πληρότητάς τους αλλά η απομόνωση έγινε με το *lysis buffer*, που περιέχει διάλυμα RIPA pH 7.4 (1% Nonidet P-40, 15 mM NaCl, 0.1 M Na_2VO_4 και 0.5 M EDTA), αναμειγμένο με 2.5 mg/ml *aprotinin* και 0.1 M PMSF. Για κάθε τριβλείο, απαιτήθηκε ποσότητα 1ml από το *lysis buffer*. Τα τριβλεία δονήθηκαν περιστροφικά, για 15 περίπου min σε ειδική πλατφόρμα. Για ομογενοποίηση, τα δείγματα διαδοχικά καταψύχθηκαν στους -80°C για 20 min και η τήξη έγινε σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές. Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C , για 20 min και το υπερκείμενο τμήμα, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του Lowry (190). 30 μ g πρωτεΐνης αναμιγνύονται με 10 μ l *4x-sample buffer*, που περιέχει 2% β -*mercaptoethanol*. Τα ECM δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 3 min και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας *gels polyacrilamide* 12% ή 15% (191). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε νιτροκυτταρικές μεμβράνες και ακολούθησε *blocking* σε 4% άπαχο ξηρό γάλα διαλυμένο σε 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4 και 0.1% Tween-20 (TTBS) για 2 περίπου ώρες στους 23°C , ή σε 4% άπαχο ξηρό γάλα διαλυμένο σε PBS με 1% Tween-20 (PBS-T), για 1 περίπου ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου (192). Εν συνεχεία, οι μεμβράνες επώαστηκαν ολονύχτια στους 4°C , με *anti-TFPI-2* αντίσωμα διαλυμένο σε 1:3000 TTBS, που περιείχε 1% αλβουμίνη Βόιου ορού (*primary antibody*). Για τον έλεγχο της απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από κουνέλι, αραιωμένα σε 1:1000 PBS-T με 1% αλβουμίνη Βόιου ορού, όπως *anti-Bcl-2*, *anti-BAX*, *anti-caspase-3*, *anti-caspase-9* και *anti-Apaf-1* (1:2000 αραιώση), μονοκλωνικά από ποντίκι αντισώματα, όπως *anti-caspase-7*, *anti-caspase-8*, *anti-PARP* (1:2000 αραιώση), *anti-cytochrome-c* και *anti-pERK* (1:2000 αραιώση), καθώς και πολυκλωνικό από αίγα *anti-ERK-1* αντίσωμα

(1:2000 αραιώση). Κατόπιν αρκετών πλύσεων, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντίστοιχο *secondary antibody*, *anti-TFPI-2* (1:3000 αραιώση σε TTBS), *anti-mouse* HRP, *anti-rabbit* HRP και *anti-goat* HRP (1:1000 αραιώση σε PBS-T), σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αντιδρώσες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το ECL (Enhanced ChemiLuminescence) *reagent system*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Amersham, Pharmacia Biotech, U.K.).

Χρωματομετρική μέθοδος ενεργοποίησης των πρωτεασών *caspase-3* και *caspase-9* :

Κύτταρα, $2-5 \times 10^5$ λύθηκαν με *lysis buffer* από την εταιρία MBL. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών καθορίστηκαν με τα κύτταρα σε τριβλείο 96-θέσεων, στα 405 nm απορροφητικότητας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MBL, Japan). Η ενεργοποίηση των *caspase-9* και *-3* στους *sense* και *antisense* κλώνους μετρήθηκε και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη στα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*.

Μέθοδος Northern Blotting :

Με τη μέθοδο αυτή, ελέγξαμε τα επίπεδα mRNA του TFPI-2. Το συνολικό κυτταρικό RNA (t-RNA), απομονώθηκε και 10 μ g RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε *gel* αγαρόζης-φορμαλδεΐδης, μεταφέρθηκαν σε νάιλον μεμβράνη ολονύκτια και κατόπιν συνδέθηκαν με τη μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία (193). Οι μεμβράνες υβριδοποιήθηκαν στους 65°C ολονύκτια, με συμπληρωματικό, cDNA TFPI-2 *probe*, σεσημασμένο με ^{32}P -*deoxycytidine triphosphate* (*primer labeling*). Κατόπιν, πλύθηκαν σε 0.5% SSC και 0.1% SDS για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα για 15 min στους 65°C και τέλος εκτέθηκαν σε *x-ray film* στους -70°C. Οι μεμβράνες τελικά, υπέστησαν *stripping* και επανυβριδοποιήθηκαν με cDNA GAPDH (GlycerAldehyde Phosphate DeHydrogenase), στα πλαίσια ενδογενούς ελέγχου.

Δοκιμασία διεισδυτικότητας σε *matrigel* (*matrigel invasion assay*) :

Η διεισδυτικότητα των κλώνων (SNB-19 *sense*, Hs683 *antisense* και *vector control*)

και των γονικών κυττάρων, δοκιμάστηκε *in vitro* με *matrigel invasion assay*. Εν περιλήψη, φίλτρο με πόρους διαμέτρου 8 μm , επώαστηκε με *matrigel* (1mg/ml) και εν συνεχεία, τα κύτταρα τρυψινίστηκαν και 20 μl από το κυτταρικό διάλυμα (3×10^5 κύτταρα/ml) προστέθηκαν εις τριπλούν σε 24 *wells plate*. Μετά από επώαση για 24 ωρών στους 37°C, τα κύτταρα που πέρασαν δια μέσου του φίλτρου στην κάτω επιφάνεια αυτού, υπολογίστηκαν ποσοτικά και εκφράστηκαν ως ποσοστό του συνόλου των κυττάρων, στην άνω και κάτω επιφάνεια του φίλτρου. Τα κύτταρα στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης μονιμοποιήθηκαν, χρωματίστηκαν με χρώση Hema-3 και φωτογραφήθηκαν (slides).

Δοκιμασία μετανάστευσης (migration assay) :

Τα γονικά κύτταρα και οι κλώνοι (3×10^6 κύτταρα/τριβλείο) καλλιεργήθηκαν για να σχηματίσουν σφαιροειδή (spheroids) σε τριβλεία κυτταροκαλλιέργειας των 100 mm^2 , τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί, με 75% άγαρ (194). Τα σφαιροειδή χρωματίστηκαν με φθορίζουσα χρώση DiI. Μετά από 24 ώρες, η περιοχή καλύφθηκε από νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία μετανάστευσαν από τα σφαιροειδή. Τα κύτταρα μετρήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης της κυτταρικής μετανάστευσης.

Τρισδιάστατη δοκιμασία διεισδυτικότητας των σφαιροειδών (Three-Dimensional Spheroid Invasion Assay) :

Η διεισδυτικότητα των σφαιροειδών μετρήθηκε σε ένα τρισδιάστατο μοντέλο, στο οποίο τα σφαιροειδή χρωματίστηκαν με DiI και καλλιεργήθηκαν με *aggregates* εγκεφάλου εμβρύων ποντικού, χρωματισμένα με DiO χρώση (195). Σε διάφορες φάσεις της καλλιέργειας, μια σειρά από τομές πάχους 1 μm αποκτήθηκε με τη βοήθεια *confocal laserscanning microscope*. Οι τομές αυτές ελήφθησαν από την επιφάνεια προς το κέντρο. Οι χρώσεις DiI και DiO ανιχνεύθηκαν με *laser* Αργού στα 520-560 nm (DiI) και με *laser* Ηλίου/Νέου στα 590 nm (DiO).

Ενδοεγκεφαλική ένεση :

Με στόχο την εκτίμηση των αποτελεσμάτων του *up* και *downregulation* του TFPI-2, ενέσαμε εναιώρημα από κάθε τύπο κυττάρου στον εγκέφαλο αθυμικού ποντικού (*in vivo*). Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 40 ποντίκια, ανά σειρά 5 γονικά, 5 *vector control* και 10 για τον κάθε κλώνο. Τα κύτταρα τρυπινίστηκαν και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό ελεύθερο ορού (*serum free medium*), σε συγκέντρωση 2×10^5 κύτταρα/μl. Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 0.35-0.45ml διαλύματος 0.06 M 2,2,2-τριβρωμεθανόλης (Aldich Chemical Co., Milwaukee, WI), 1,25 ισομυλαλκοόλης και 98.5% βακτηριοστατικού ορού και ενέθηκαν ενδοεγκεφαλικά, με 10 μl εναιωρήματος του αντίστοιχου κυτταρικού τύπου, με τη βοήθεια στερεοτακτικού πλαισίου (196). Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, τα ποντίκια θανατώθηκαν με ενδοκαρδιακή διήθηση, αρχικά με PBS και εν συνεχεία με 4% παραφορμαλδεΐδης σε NaCl 0.9%. Οι εγκέφαλοι αφαιρέθηκαν και παρέμειναν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης για 4 ώρες και εν συνεχεία, επώαστηκαν για 2 ημέρες σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS στους 4°C. Την επομένη, οι εγκέφαλοι τεμαχίστηκαν, τέθηκαν σε μικροσκοπικά *slides* και καταψύχθηκαν στους -20°C. Οι κρυστατικές τομές, χρωματίστηκαν με χρώση εωσίνης/αιματοξυλίνης για τη μελέτη της ανάπτυξης όγκου.

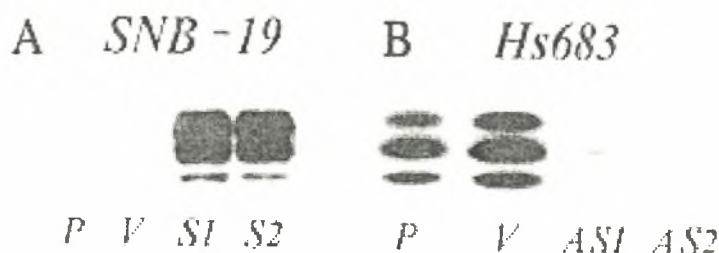
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στο ρυθμό ανάπτυξης μεταξύ γονικών κυττάρων, κυττάρων με *vector control* μόνο, καθώς και των κλώνων SNB-19 *sense* και Hs683 *antisense*.

Παραγωγή της TFPI-2 πρωτεΐνης και mRNA :

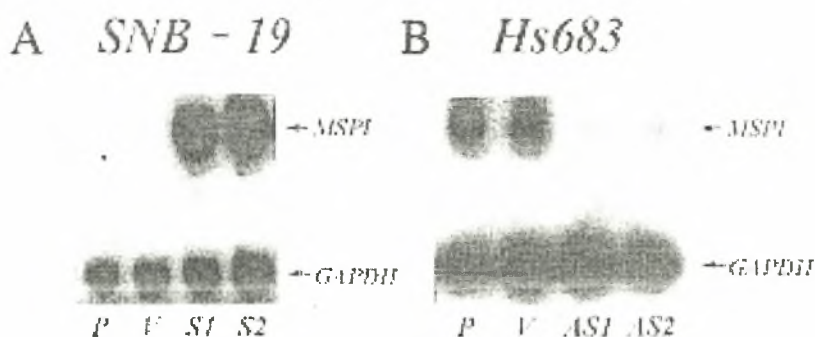
Κατά την Western Blotting ανάλυση για την παραγωγή TFPI-2 πρωτεΐνης, όπως αναμενόταν, τριπλές ζώνες TFPI-2 εμφάνισαν οι SNB-19 *sense* κλώνοι αλλά όχι οι

γόνοι και οι *vector controls*. Οι Hs683 *antisense* κλώνοι, παρήγαγαν κατά 90% λιγότερο TFPI-2 από ότι οι αντίστοιχοι γόνοι και *vector controls*, Εικ. 20 A-B:



Εικ. 20 Western Blotting ανάλυση της TFPI-2 πρωτεΐνης των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

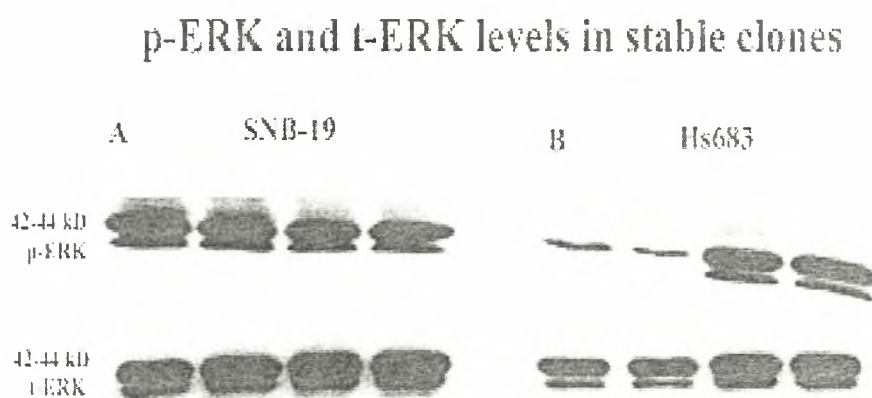
Η ανάλυση με Northern Blotting των ίδιων κλώνων και *vector controls* και η GAPDH μέθοδος, ως ενδογενής έλεγχος, επιβεβαίωσαν ότι οι SNB-19 *sense* κλώνοι υπερεκφράζουν το μήνυμα TFPI-2, ενώ οι SNB-19 γόνοι και *vector controls* δεν εκφράζουν TFPI-2 mRNA. Οι Hs683 *antisense* κλώνοι, παράγουν στατιστικά σημαντικά λιγότερο TFPI-2 mRNA ($p < 0,01$) συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*, εικ. 21 A-B:



Εικ. 21 Northern Blotting ανάλυση του TFPI-2 mRNA των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19(A) και Hs683 (B), αντίστοιχα. Ενδογενής έλεγχος με την GAPDH μέθοδο.

Έκφραση των p-ERK και t-ERK :

Η ενζυματική δράση και ενεργοποίηση των ERK πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μετά από φωσφορυλίωσή τους (p-ERKs). Στο υλικό μας παρατηρήθηκε ότι, τα επίπεδα p-ERK μειώνονται στους SNB-19 *sense* κλώνους ενώ το αποτέλεσμα είναι αντίστροφο για τους Hs683 *antisense* κλώνους, συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*. Παρά ταύτα, δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά των επιπέδων του t-ERK (total ERK) και στα δύο είδη κλώνων *sense* και *antisense*, συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*, εικ. 22 A-B:

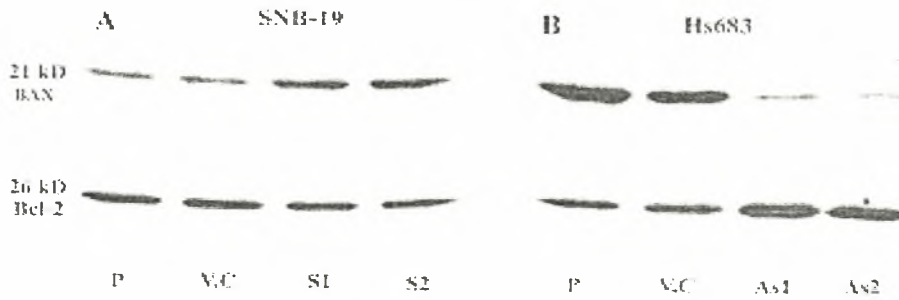


Εικ. 22 Western Blotting ανάλυση της έκφρασης των επιπέδων της p-ERK και t-ERK πρωτεΐνης των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Καθορισμός των επιπέδων BAX και Bcl-2 :

Ως γνωστό, η δράση των παραγόντων BAX και Bcl-2 είναι ανταγωνιστική. Στο υλικό μας διαπιστώθηκε ότι, η έκφραση του BAX αυξάνεται στους SNB-19 *sense* κλώνους, αλλά μειώνεται στους Hs683 *antisense*, συγκριτικά με τους γόνους και τους *vector controls*, όπως επίσης ότι, το επίπεδο του Bcl-2 μειώνεται στα SNB-19 κύτταρα ενώ, αυξάνεται στα Hs683, συγκριτικά με τα γονικά και τους *vector controls*, εικ.23 A-B:

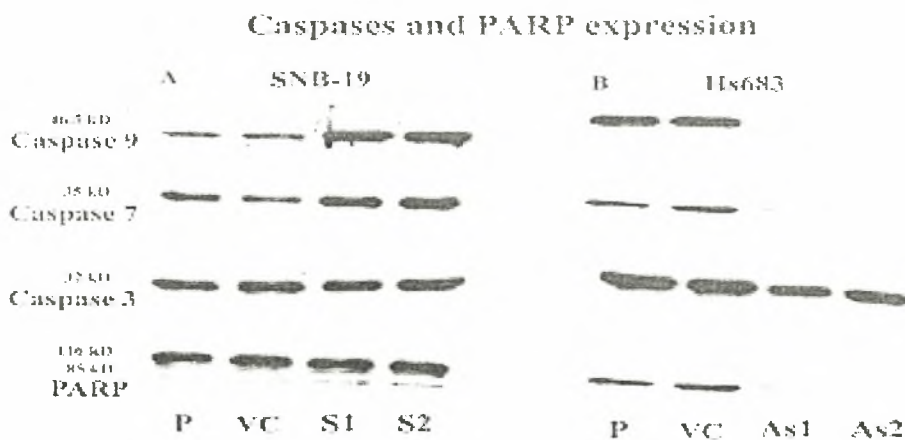
BAX and Bcl-2 levels in stable clones



Εικ. 23 Western Blotting ανάλυση της έκφρασης των επιπέδων της BAX και Bcl-2 πρωτεΐνης των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Καθορισμός των επιπέδων των *caspases* -9,8,7,3 και του παράγοντα PARP :

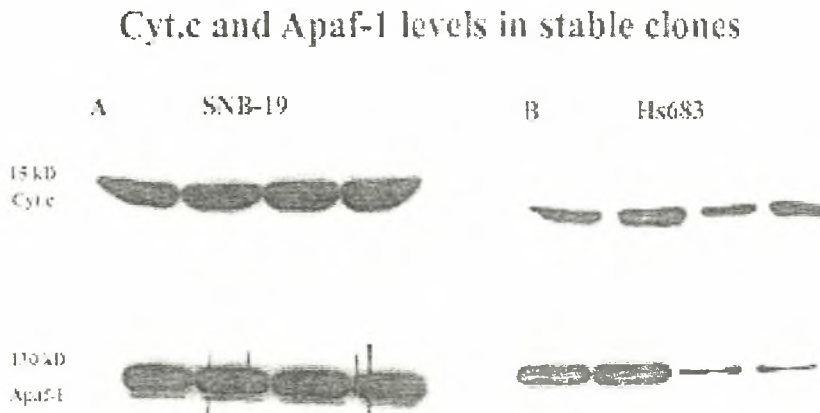
Για την επίτευξη της απόπτωσης η συμμετοχή των *caspase cascade* και παράγοντα PARP, είναι απαραίτητη. Στο υλικό μας παρατηρήσαμε ότι, η έκφραση των *caspases*-9,7,3 καθώς και του παράγοντα PARP, αυξάνεται στους SNB-19 *sense* κλώνους ενώ, μειώνεται στους Hs683 *antisense*, συγκριτικά με τους γόνους και τους *vector controls*, εικ. 24 A-B. Η *caspase*-8 δεν εκφράζεται, τόσο στους *sense* όσο και στους *antisense* κλώνους .



Εικ. 24 Western Blotting ανάλυση της έκφρασης των *caspases*-9, -7, -3 και PARP επιπέδων των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Έκφραση των cytochrome-c και Araf-1 :

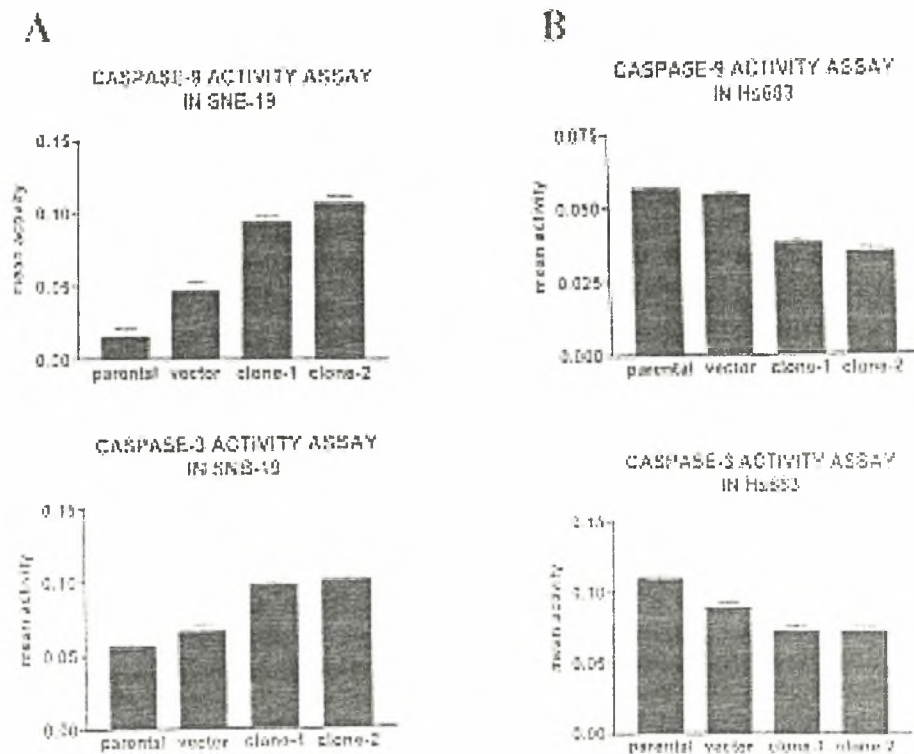
Η συμβολή του συμπλέγματος cyt-c_Araf-1, γνωστού ως “apoptosome”, στην απόπτωση είναι καθοριστική. Στα πειράματά μας διαπιστώθηκε ότι, η έκφραση των cyt-c και Araf-1 αυξάνεται στους SNB-19 *sense* κλώνους και μειώνεται στους Hs683 *antisense*, συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*, εικ. 25 A-B:



Εικ. 25 Western Blotting ανάλυση των cytochrome-c και Araf-1 επιπέδων των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Μέθοδος ενεργοποίησης των *caspases* -9 και 3 :

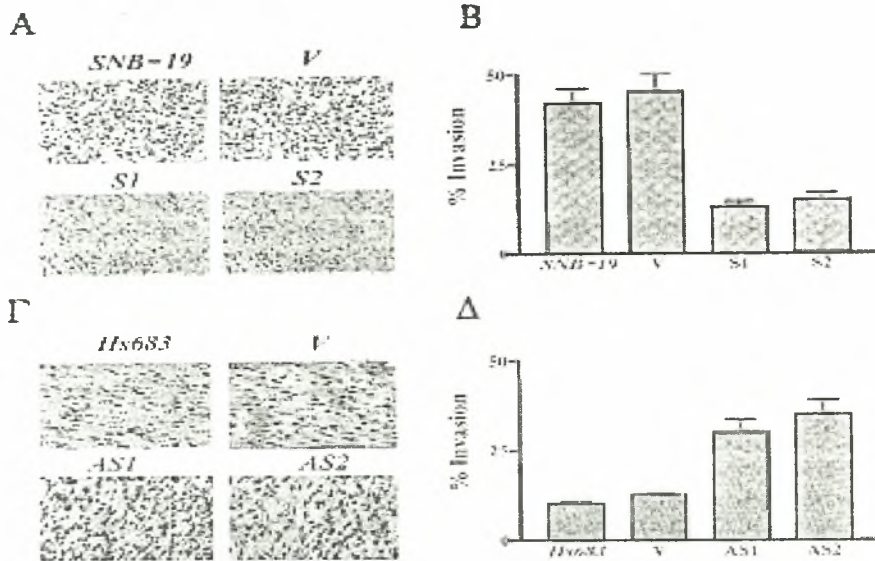
Η ενεργοποίηση των *caspases*-9 και -3, είναι αυξημένη στους SNB-19 *sense* κλώνους και μειωμένη στους Hs683 *antisense*, πάντα σε σύγκριση με τους γόνους και τους *vector controls*, εικ. 26 A-B:



Εικ. 26 Μέθοδος ενεργοποίησης των *caspases* -9 και -3 των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Κυτταρική διεισδυτικότητα σε *matrigel* :

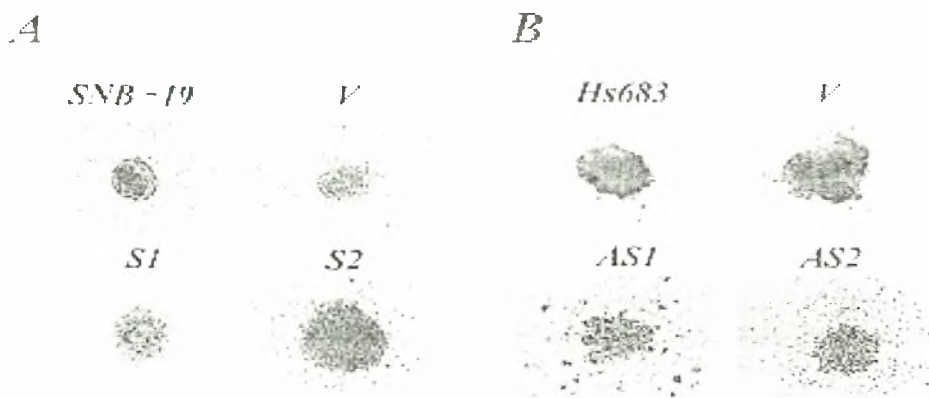
Διαπιστώθηκε ότι, οι SNB-19 *sense* κλώνοι που διείσδυσαν δια μέσου των φίλτρων, αφού προηγουμένως είχαν επωαστεί με *matrigel*, ήταν κατά πολύ λιγότεροι συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*. Η MMT μέθοδος έδειξε ότι, το 42-45% των SNB-19 κλώνων, διείσδυσαν σε σχέση με το μόλις 13-16% των γονικών κύτταρων και των *vector controls*. Οι Hs683 *antisense* κλώνοι, που διαπέρασαν το *matrigel* φίλτρο ήταν κατά πολύ περισσότεροι, συγκριτικά με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*. Η MMT μέθοδος έδειξε ότι, το ποσοστό διεισδυτικότητας των γόνων και των *vector controls* ήταν 10-12%, συγκριτικά με το 30-35% των Hs683 *antisense* κλώνων, εικ. 27 Α-Β-Γ-Δ:



Εικ. 27 *Matrigel invasion assay* των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A,B) και Hs683 (Γ,Δ), αντίστοιχα.

Δοκιμασία μετανάστευσης (migration assay) :

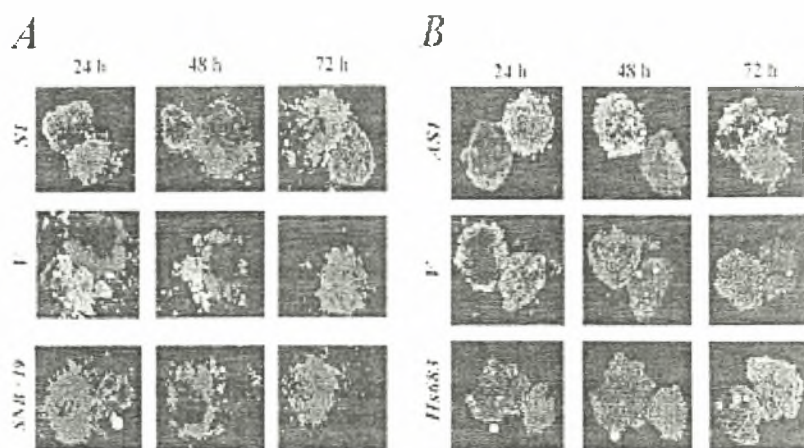
Μετρώντας τη μετανάστευση των δύο κλώνων και των *vector controls* τους, βασισμένοι στα σφαιροειδή του ίδιου κυτταρικού τύπου, παρατηρήθηκε μικρότερη μετανάστευση από τα σφαιροειδή των SNB-19 *sense* κλώνων, σε σχέση με τα σφαιροειδή των SNB-19 γόνων και *vector control*. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στα Hs683 κύτταρα δηλαδή, περισσότεροι *antisense* κλώνοι μετανάστευσαν συγκριτικά με τα Hs683 γονικά κύτταρα και τους *vector controls*, εικ. 28 A-B:



Εικ. 28 *Migration assay* των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Δοκιμασία διείσδυσης των σφαιροειδών σε aggregates κυττάρων εγκεφάλου από εμβρύων ποντικών (spheroid assay) :

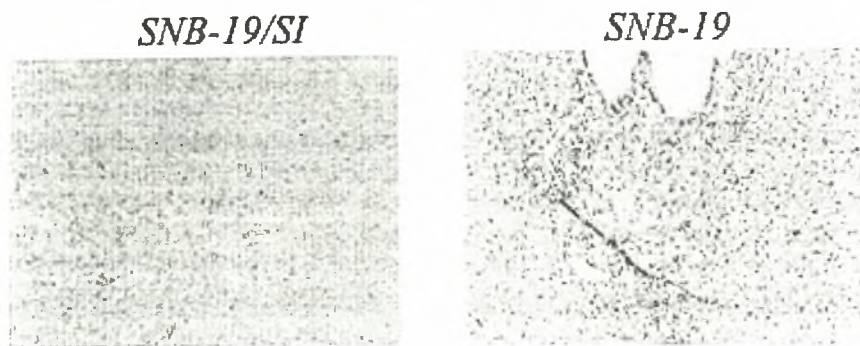
Τα σφαιροειδή των SNB-19 TFPI-2 *sense* κλώνων απέτυχαν να διεισδύσουν στα aggregates εμβρυϊκών εγκεφάλων ποντικών, αν και τα σφαιροειδή των γονικών κυττάρων και των *vector controls* διεισδύουν. Εν αντιθέσει, τα σφαιροειδή των Hs683 TFPI-2 *antisense* κλώνων διείσδυσαν στα aggregates, αλλά όχι αυτά των γόνων και των *vector controls*, εικ. 29 A-B:



Εικ. 29 *Spheroid assay* των γόνων, *vector controls* και κλώνων για τις δύο κυτταρικές σειρές, SNB-19 (A) και Hs683 (B), αντίστοιχα.

Ενδοεγκεφαλικός σχηματισμός όγκου σε ποντίκια, στα οποία έγινε εκτομή του θύμου αδένου:

Όπως αναμενόταν, ποντίκια στα οποία ενέσαμε ενδοεγκεφαλικά SNB-19 γονικά κύτταρα ή κύτταρα *vector control*, σχημάτισαν στη θέση αυτή όγκο ενώ, στα ποντίκια που ενέσαμε SNB-19 *sense* κλώνους, σχηματίστηκαν μικρότεροι όγκοι, εικ. 30. Ένεση με Hs683 κύτταρα (γονικά και *vector controls*) δεν παρήγαγε όγκο, όπως ήταν αναμενόμενο της κυτταρικής αυτής σειράς. Πολύ μικροί όμως όγκοι, σχηματίστηκαν στα ποντίκια στα οποία ενέσαμε Hs683 TFPI-2 *antisense* κλώνους.



Εικ. 30 Σχηματισμός μικρότερου όγκου μετά από ενδοεγκεφαλική ένεση SNB-19 *sense* κλώνων σε ποντίκια (*nude mice*), συγκριτικά με των γονικών κυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ανθρώπινος TFPI-2 παράγοντας, είναι ένας αναστολέας τύπου kunitz 32 kDa, που βρίσκεται στην εξωκυττάρια μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών. Επίσης, υπάρχει στον πλακούντα και σε διάφορους ιστούς ενηλίκων όπως, ήπαρ, σκελετικοί μύες, καρδιά, νεφροί και πάγκρεας. Γενικότερα, συντίθεται και εκκρίνεται από πληθώρα κυττάρων όπως, κύτταρα της κερατίνης στιβάδας του δέρματος, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και συγκυτιοτροφοβλάστες (11,12,14-16,197). Επίσης, υπάρχει σοβαρή υπόνοια ότι, ο εν λόγω παράγοντας συμμετέχει στον πηκτικό μηχανισμό του αίματος (9-13). Αρκετές κυτταρικές σειρές καρκινώματος ωοθηκών και η κυτταρική σειρά T98G, κύτταρα ανθρωπίνου γλοιώματος, περιέχουν σημαντική ποσότητα TFPI-2 (11). Εμείς επιλέξαμε τα Hs683 (low grade glioma cell line) κύτταρα, εξαιτίας της μη διεισδυτικής συμπεριφοράς τους και, του ότι παράγουν μεγάλες ποσότητες TFPI-2 πρωτεΐνης και mRNA. Παρομοίως, επιλέξαμε τα SNB-19 (multiform glioblastoma cell line) κύτταρα, για τις υψηλά διεισδυτικές και ογκογενείς ιδιότητές τους, παρά το γεγονός ότι, η παραγωγή της TFPI-2 πρωτεΐνης και του mRNA είναι ελλιπής. Σε αυτή τη μελέτη, μπορέσαμε να υπερεκφράσουμε την TFPI-2 πρωτεΐνη και mRNA, ενσωματώνοντας στα SNB-19 κύτταρα ένα TFPI-2 *sense* τμήμα (construct) και να μειώσουμε την έκφραση της TFPI-2 πρωτεΐνης και mRNA στα Hs683 κύτταρα, στα οποία ενσωματώσαμε *antisense* TFPI-2 τμήμα. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα *sense* και *antisense* τμήματα επηρέασαν την έκφραση του TFPI-2 στα συγκεκριμένα κύτταρα, δεν είναι σαφής. Πιθανότατα, να σχετίζεται με μεταφορά mRNA ή με υβριδισμό κυτταροπλασματικού TFPI-2 mRNA, το οποίο έχει μετατοπιστεί.

Κύτταρα πολλών όγκων εκκρίνουν πολυπεπίδια όπως, πρωτεάσες και τους αναστολείς τους, τα οποία ως γνωστό, εμπλέκονται στην διεισδυτικότητα και την ανάπτυξη του όγκου (198-200). Νεοπλασματικά κύτταρα μερικών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο, εκκρίνουν πρωτεάσες σερίνης όπως τρυψίνη, καθώς και πολλές μορφές αναστολέων αυτής (201,202). Ο TFPI-2, ως αναστολέας πρωτεασών σερίνης, συνδεόμενων με την επιπολής στιβάδα της εξωκυττάριας μεμβράνης, παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμησή της κατά τη διάρκεια της διείσδυσης και μετανάστευσης των νεοπλασματικών κυττάρων, της επούλωσης του τραύματος και

της αγγειογένεσης (10). Προηγούμενη μελέτη ανασυνδυασμένου TFPI-2, έδειξε ότι αυτός αναστέλλει τη γένεση της πλασμίνης στην επιφάνεια της εξωκυττάριας μεμβράνης των HT-1080 κύτταρων ινοσαρκόματος και επομένως, αναστέλλει την αποδόμηση και τη διείσδυση της μεμβράνης από αυτά τα κύτταρα (18).

Βάσει άλλων μελετών, σχετικά με τους PAI-1 και PAI-2 αναστολείς ενεργοποίησης του πλασμινογόνου, προτάθηκε ότι, η άμεση αναστολή της πλασμίνης μπορεί να είναι περισσότερο αποτελεσματική τακτική για την αναστολή της διεισδυτικότητας του όγκου και της δημιουργίας μεταστάσεων, από ότι η αναστολή του uPA ή tPA (203). Οι uPA, uPAR, tPA, PAI-1 και PAI-2, είναι όλοι παράγοντες που υπερπαράγονται στους καρκίνους του παχέως εντέρου, στομάχου, εγκεφάλου, μαστού και δέρματος. Επιπλέον, η παρουσία PAI-1 και PAI-2 σχετίζεται θετικά με το βαθμό κακοήθειας του όγκου (204,205). Σε πρόσφατη αναφορά, η παρουσία PAI-1, ενεργοποιεί μάλλον, παρά αναστέλλει τη δημιουργία μεταστάσεων, στο νευροβλάστωμα (206). Η TFPI-2 και PAIs παράγοντες δρουν σε διάφορα στάδια του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Ειδικότερα, ο PAI-1 δεσμεύει το σύμπλεγμα uPA-uPAR. Εν αντιθέσει, ο TFPI-2 αναστέλλει απευθείας την πλασμίνη, η οποία απελευθερώνοντας παράγοντες ανάπτυξης από την εξωκυττάρια μεμβράνη και ενεργοποιώντας τον TGFβ και συγκεκριμένες προ-MMPs από κύτταρα όγκων, προκαλεί την αποδόμηση της εξωκυττάριας μεμβράνης, η οποία ακολουθείται από διείσδυση του όγκου (7,207). Αν και επιδρώντας μέσω συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο επίπεδο της πλασμίνης, η διείσδυση και μετάσταση του όγκου, αναστέλλεται πολύ πιο αποτελεσματικά από ότι αναστέλλοντας τους uPA ή tPA, κανένας φυσικός αναστολέας της πλασμίνης δεν έχει ανιχνευθεί, ο οποίος να μπορεί να αναστείλει την πλασμίνη που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια. Η πλασμίνη που συνδέεται με τα ογκοκύτταρα, δε μπορεί να ανασταλεί παρουσία της α2-αντιπλασμίνης, η οποία είναι γνωστή και ως αναστολέας πλασμίνης πλάσματος (plasma plasmin inhibitor) (203,208-211). Μεταξύ άλλων φυσικών πρωτεασών-αναστολέων σερίνης, η πρωτεάση *nexin-1*, αρχικά αναστέλλει την α-θρομβίνη, αλλά δεν αναστέλλει τον uPA ή την πλασμίνη της κυτταρικής επιφάνειας (212). Η *mepsin* (mammary serine protease inhibitor), μια πρωτεΐνη καταστολέας όγκου, άλλοτε αναστέλλει τις πρωτεάσες και άλλοτε όχι (213). Η υψηλή ομολογία σε σερπίνες (serpins), εκ των

οποίων μερικές μπορεί να αναστείλουν τις πρωτεάσες ($\alpha 2$ -αντιθρυψίνη, PAI-1 και PAI-2) και μερικές όχι (οβαλβουμίνη, αγγειοτενσινογόνο), μπορεί να εξηγήσουν αυτή την αντιφατικότητα (214). Μια αναφορά σχετική με την ανασταλτική δράση της *matsin*, δηλώνει ότι η *matsin* αναστέλλει τον tPA αλλά όχι τον uPA και την πλασμίνη (215). Οι Seftor και συν. (216) ανακάλυψαν ότι, η *matsin* καταστέλλει το διεισδυτικό φαινότυπο στα MDA-MB-435 κύτταρα (κύτταρα καρκίνου του μαστού), μεταβάλλοντας την ακεραιότητά τους.

Όμως, ο TFPI-2 είναι διαφορετικός από τους PAI-1, PAI-2, *nexin-1* πρωτεάση και *matsin*. Σε αντίθεση με αυτές τις πρωτεΐνες (όλες των οποίων είναι σερπίνες), ο TFPI-2 (ένας αναστολέας τύπου kunitz), αναστέλλει απευθείας την πλασμίνη, η οποία ενεργοποιώντας προ-MMPs διευκολύνει την αποδόμηση της εξωκυττάριας μεμβράνης και τη διεισδυτικότητα των ογκοκυττάρων. Ο TFPI-2, είναι επίσης στενά συνδεδεμένος με την εξωκυττάρια μεμβράνη.

Στην παρούσα μελέτη, τα SNB-19 κύτταρα κλωνοποιήθηκαν με *sense* δομές-*construct* και εμφάνισαν λιγότερη διεισδυτικότητα συγκριτικά με τους γόνους και τους *vector controls*, ενώ οι Hs683 *antisense* κλώνοι παρουσίασαν αύξηση της διεισδυτικότητας τους σε σχέση με τα γονικά κύτταρα και τους *vector controls*. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, αναδεικνύεται για πρώτη φορά η σημαντικότητα του TFPI-2 στην αναστολή της αποσύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζοντας τη διεισδυτική ικανότητα του όγκου. Τα επίπεδά του, σχετίζονται με το βαθμό κακοήθειας και τη διεισδυτική συμπεριφορά των γλοιωμάτων.

Επιπλέον, ο TFPI-2, εκτός από το να αναστέλλει την πλασμίνη και άλλες συγγενείς με αυτή πρωτεάσες, αναστέλλει και το σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIa, που αποτελεί κυτταρικό ενεργοποιητή του εξωγενούς πήκτικου μηχανισμού (9,13). Επί παραδείγματι, ο TFPI-2 αναστέλλει τον ενεργοποιητή του ανθρωπίνου παράγοντα X, μέσω του συμπλέγματος ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIa στα J-82 κύτταρα κυστικού καρκινώματος (13). Υπάρχουν μελέτες, που συνδυάζουν το σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIa με την αύξηση της ογκογένεσης (217-219). Συγκεκριμένα, ο ιστικός παράγοντας επιδρά στην αγγειογένεση και μετάσταση του όγκου, με την προϋπόθεση ότι έχει σχηματίσει σύμπλεγμα με τον καταλυτικής δράσης παράγοντα VII (220). Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, ο TFPI-2 δρα ανασταλτικά στο σύμπλεγμα αυτό (9,217). Ο ιστικός παράγον επίσης,

προάγει την παραγωγή του αγγειακού παράγοντα αύξησης των ενδοθηλιακών κύτταρων και του uPAR στα καρκινικά κύτταρα και τα επίπεδά του σχετίζονται με το βαθμό αγγειογένεσης και ανάπτυξης του όγκου στα ινοσαρκώματα, στα μελανώματα, στον καρκίνο του μαστού και του παγκρέατος (220-225).

Ο ρόλος του TFPI-2 στη ρύθμιση του εξωγενούς πηκτικού μηχανισμού που προαναφέρθηκε, είναι ήδη γνωστός. Στη μελέτη αυτή, οι SNB-19 *sense* κλώνοι, παρουσιάζουν αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης *in vitro* και μείωση του σχηματισμού όγκου *in vivo* ενώ, οι Hs683 *antisense* κλώνοι, παρουσιάζουν αύξηση της μετανάστευσης και της διείσδυσης, *in vitro* και προκαλούν πολύ μικρό σχηματισμό όγκου, *in vivo*. Βάσει αυτών των στοιχείων, αποκαλύπτεται ότι ο TFPI-2 επηρεάζει την ανάπτυξη των γλοιωμάτων και *in vivo*. Ο ρόλος του TFPI-2 στα γλοιώματα, *in vitro*, αλλά και *in vivo*, είναι σημαντικός και με περαιτέρω μελέτες θα καθοριστεί ο ρυθμιστικός ρόλος του παράγοντα αυτού στην αναστολή εξωκρανιακών νεοπλασμάτων και άλλων όγκων. Για πρώτη φορά αναφέρεται ότι, ο TFPI-2 εκπίπτει στα γλοιώματα. Η έκφρασή του είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου. Πρόκειται για μια τεκμηριωμένη άποψη, η οποία επιβεβαιώθηκε και *in vivo* αναδεικνύοντας ότι ο TFPI-2 εξαφανίζεται κατά το σχηματισμό όγκου.

Φαίνεται όμως ότι, ο TFPI-2 παίζει ρόλο και στην απόπτωση των γλοιωμάτων, μέσω του *caspase cascade*. Οι *caspases*, παίζουν ζωτικής σημασίας ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (19,183,184,186,226,227). Για να γίνει αυτό υπάρχουν δύο οδοί. Η πρώτη οδός, αφορά υποδοχείς θανάτου όπως, FAS ή TNF (Tumor Necrosis Factor) (228). Στη δεύτερη οδό, προαποπτωτικά σήματα σε μιτοχονδριακό επίπεδο, προάγουν τη μετατόπιση του cyt-c, από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (22-24,188,229-232). Τότε το cyt-c συνδέεται με τον Apaf-1, ένα ομόλογο του CED-4 στα θηλαστικά, και το σύμπλεγμα επιδρά στην *procaspase-9* (233,234). Αυτό συνεπάγεται την αυτοενεργοποίηση της *procaspase-9* (235). Το σύμπλεγμα cyt-c_Apaf-1_*procaspase-9*, είναι γνωστό ως “*apoptosome*”, το οποίο με τη σειρά του επιδρά στις *effector caspases*, προκαλώντας την ενεργοποίησή τους. Και οι δύο αυτές οδοί οδηγούν σε ένα *caspase cascade*, που μεγεθύνει το αποπτωτικό σήμα και εξασφαλίζει γρήγορο και μη αναστρέψιμο κυτταρικό θάνατο.

Σήματα ανώμαλων παραγόντων ανάπτυξης εμπλέκονται στην παθογένεση των

γλοιωμάτων. Η ERK οδός, αποτελεί επίσης στόχο και φαίνεται να παίζει ρόλο στη γονιμοποίηση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Αν και η ενεργοποίηση της ERK/MAPK, η οποία επιτυγχάνεται με φωσφορυλίωση σε επίπεδο Ser-Thr, δεν περιορίζεται μόνο στη νεοπλασματική γλοία, η επιλεκτική ενεργοποίηση στα νεοπλασματικά κύτταρα δηλώνει ότι, αυτό μπορεί να αποτελέσει δείκτη προσδιορισμού του φαινοτύπου της νεόπλαστικής γλοίας (236). Εμείς αποδείξαμε ότι, το p-ERK επίπεδο μειώνεται στα SNB-19 κύτταρα ενώ, αυξάνεται στα Hs683 αλλά δεν παρατηρείται καμία ουσιαστική διαφορά στα επίπεδα της t-ERK και στους δύο τύπους κυττάρων.

Ο BAX παράγων, παίζει κρίσιμο ρόλο στην απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ακτινο- και χημειοθεραπείας. Επίσης, η προσθήκη του BAX γονιδίου σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, έδειξε ότι τα A-172 κύτταρα οδηγούνται σε νέκρωση και κυτταρικό θάνατο ενώ, τα U251 οδηγούνται σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο (237). C6 κύτταρα γλοιώματος “μολύνθηκαν” με το BAX γονίδιο και απεδείχθη ότι κατά αυτόν τον τρόπο, ανταποκρίνονται στη θεραπεία με κυτοσίνη-αραβινοσίδη. Το πείραμα επαναλήφθηκε και *in vivo* σε ποντίκια και το αποτέλεσμα ήταν ότι, η υπερέκφραση του BAX γονιδίου, οδηγεί σε πτωτική τάση ανάπτυξης συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν φέρουν το γονίδιο (238). Στη μελέτη μας, ο TFPI-2 οδηγεί σε αύξηση της BAX πρωτεΐνης στους SNB-19 *sense* κλώνους και μείωση στους Hs683 *antisense* κλώνους.

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας Bcl-2, που φαίνεται να παίζει ρόλο, είναι η Bcl-2 πρωτεΐνη. Ο Bcl-2 είναι ένα ογκογονίδιο με αντί-αποπτωτική δράση, που όμως μετατρέπεται σε BAX-like death effector. Υψηλά επίπεδα Bcl-2 έχουν προ-αποπτωτική δράση, επηρεάζοντας την οδό: FAS mediated apoptosis (237,239). Η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε δύο κυτταρικές σειρές κακοήθους γλοιώματος, προάγει την κυτταρική μετανάστευση από τα σφαιροειδή και τη διείσδυση στις matrigel-επωαζόμενες μεμβράνες. Η διεισδυτικότητα των fetal-rat brain aggregates ενισχύεται παρουσία του Bcl-2. Έχει προταθεί ότι, ο ρόλος του Bcl-2 στην κακοήθεια και το φαινότυπο των κυττάρων των γλοιωμάτων, είναι να ευοδώνει τη μετανάστευση και τη διεισδυτικότητα των κυττάρων, μεταβάλλοντας την έκφραση μιας σειράς μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους (240). Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι, τα επίπεδα του Bcl-2 αυξάνονται στους Hs683 *antisense* κλώνους με αποτέλεσμα

οι κλώνοι να γίνονται πιο διεισδυτικοί ενώ, μειώνονται στους SNB-19 *sense* κλώνους (241).

Υπερέκφραση του BAX, προάγει την απελευθέρωση του cyt-c και την ενεργοποίηση των *caspases* (242). Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε επίσης ότι, τα επίπεδα των cyt-c, Araf-1, *caspases* (-9,7,3) και PARP αυξήθηκαν στους *sense* κλώνους (SNB-19) και μειώθηκαν στους *antisense* κλώνους (Hs683). Η *caspase-8* δεν εκφράστηκε σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές. Αποδείξαμε λοιπόν ότι, η απόπτωση επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση του cyt-c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, τη σύνδεσή του με τον Araf-1 και την ενεργοποίηση των *caspases*, μέσω της *caspase-9* από το σύμπλεγμα αυτό και όχι της *caspase-8*. Η ενεργοποίηση της *caspase-9* (initiator), θέτει σε ενέργεια τον *caspase cascade* με την ενεργοποίηση άλλων *caspases*, όπως -7 και -3 και διασπά τον PARP. Έτσι επέρχεται η απόπτωση και ο κυτταρικός θάνατος-αυτοκτονία.

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη παγκοσμίως που έφερε στην επιφάνεια, άλλη μια ζωτικής σημασίας δράση του TFPI-2 στην ογκογένεση δηλαδή, την επίδρασή του στη διαδικασία της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων. Πρόκειται λοιπόν για έναν πολύ σημαντικό παράγοντα, ο οποίος στο μέλλον μπορεί να παίξει πρωταγωνιστικό ρόλο στην αντιμετώπιση των γλοιωμάτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

1. Ο TFPI-2, εκτός από σημαντικό παράγοντα ρύθμισης του εξωγενούς πηκτικού μηχανισμού του αίματος, παίζει σπουδαίο ρόλο και στην αναστολή της αποσύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης ενώ, έλλειψη αυτού φαίνεται να συμβάλλει στην απόπτωση.
2. Η έκφραση του TFPI-2 διαφέρει μεταξύ των γλοιωμάτων, βάσει του βαθμού διαφοροποίησης (grade) δηλαδή, σε υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους έχουμε μικρότερη έκφραση του παράγοντα αυτού.
3. Ο TFPI-2 εξαφανίζεται κατά το σχηματισμό όγκου.
4. *Upregulation* του TFPI-2, προκαλεί μείωση της διεισδυτικής συμπεριφοράς των νεοπλασματικών κυττάρων.
5. *Downregulation* του TFPI-2, προκαλεί αύξηση της διεισδυτικότητας του όγκου.
6. Ο TFPI-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση δηλαδή, στη διεργασία της απόπτωσης.
7. Είναι πιθανό, στο απώτερο μέλλον, ο παράγοντας αυτός να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση των γλοιωμάτων και μάλιστα αυτών με εξαιρετικά επιθετική συμπεριφορά.

TITLE

« A novel role of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion – An experimental study»

By

ANASTASIA TASIOU

SUMMARY

Human tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) is a Kunitz-type serine protease inhibitor that inhibits plasmin, trypsin, chymotrypsin, cathepsin G, and plasmin kallikrein but not urokinase-type plasminogen activator (uPA), tissue plasminogen activator (tPA), or thrombin. Preliminary findings in our laboratory suggested that the expression of TFPI-2 is downregulated or lost during tumor progression in human gliomas. To investigate the role of TFPI-2 in the invasiveness of brain tumors, we stably transfected the high grade glioma cell line SNB-19 and the low grade glioma cell line Hs683 with a vector capable of expressing a transcript complementary to the full-length TFPI-2 mRNA in either sense (0.7 kb) or antisense (1kb) orientations. We chose the Hs683 low grade glioma cell line because of its relatively non invasive nature, which produces high level of TFPI-2 protein and mRNA. Similarly, we chose the SNB-19 glioblastoma cell line for its highly invasive and tumor-forming characteristics, as well as its relative deficiency in producing TFPI-2 protein and mRNA. Different studies suggested that TFPI-2 expression differ among glioma cell types according to grade, with higher grade cells expressing less TFPI-2. In fact this is proved for a plenty of other tumors, as well as TFPI-2 transcripts are also widely expressed in various adult human tissues. The same result is coming out of the investigation of the role of TFPI-2, either in vitro by using many different procedures as following, or in vivo after intracerebral injection in nude mice. Our report is the first one to demonstrate that down- or upregulation of TFPI-2 plays a significant role in the invasive behavior of human gliomas and a novel role in cell survival in human gliomas (apoptosis).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Duffy MJ. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1992;10:145.
2. Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S, Bruner JM, Nicholson JL, Rao JS. Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* 1994;54:5016.
3. Gladson CL, Pijuan-Thompson V, Olman MA, Gillepsi GY, Yocoub IZ. Up-regulation of urokinase and urokinase receptor genes in malignant astrocytoma. *Am J Pathol* 1995;146:1150.
4. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993;73:161.
5. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovich J, Reynolds JJ. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteases. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667:1.
6. Vassali JD, Baccino D, nad Belin D. A cellular binding site for the Mr. 55,000 form of human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* 1985;100:86.
7. Kwaan HC. The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer metastasis Rev* 1992;11: 291.
8. Kramer MD, Reinartz J, Brunner G, Schirmmacher V. Plasmin in pericellular proteolysis and cellular invasion. *Invasion Metastasis* 1994;14:210.
9. Sprecher CA, Kisiel W, Mathewes S, Foster DC. Molecular cloning, expression and partial characterization of a second human tissue -factor-pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3353.
10. Rao CN, Prasad R, Liu Y, O' Toole EA, Reeder DJ, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. Extracellular matrix associated serine protease inhibitors (Mr. 33,000, 31,000, 27,000) are single gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:82.
11. Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Umeda M, Miyazaki K. cDNA cloning and mRNA expression of a serine

- proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem (Tokyo)* 1994;116:939.
12. Lino M, Foster DC, Kisiel W. Quantification and characterization of human endothelial cell derived tissue factor pathway inhibitor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:40.
 13. Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel human kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *J Biochem* 1996;35:266.
 14. Rao CN, Peavey CL, Yueying, Liu Y, Lapiere JC, Woodley DT. Partial characterization of matrix associated serine proteinase inhibitors from human skin cells. *J Invest Dermatol* 1995;104:379.
 15. Rao CN, Gomez DE, Woodley DT, Thorgeirson UP. Partial characterization of novel serine inhibitors from human umbilical vein endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1995;319:55.
 16. Rao CN, Liu Y, Peavey CL, Woodley DT. Novel extracellular matrix associated serine proteinase inhibitors from human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:311.
 17. Miyagi Y, Yasumitsu H, Koshikawa N, Matsuda Y, Itoh H, Hori TA, Aoki I, Misugi K, Miyazaki K. Cloning of the cDNA encoding mouse PP-5/TFPI-2 and mapping of the gene to chromosome 6. *DNA Cell Biol* 1996;15:947.
 18. Rao CN, Cook B, Liu Y, Chilukuri K, Stack SM, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix associated serine protease inhibitor TFPI-2/33kDa MSPI. *Int J Cancer* 1998;76:749.
 19. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salsvesen GS, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87:171.
 20. Patel TG, Gores J, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB* 1996;10:587.
 21. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695.
 22. Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb RA, Babior BM. Loss of function of cytochrome-c in Jurkat cells undergoing Fas mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:21629.

23. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome-c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132.
24. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome-c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129.
25. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacher PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627.
26. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675.
27. Yin XM, Oltval ZN, Korsmeyer JS. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994;369:321.
28. Jarpe MB, Widmann C, Knall C, Schlesinger TK, Gibson S, Yuguri T, Fanger GR, Gelfand EG, Johnson GL. Anti-apoptotic versus proapoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* 1998;17:1475.
29. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics, 1992. *CA* 1992;41:19.
30. Mack T. Cancer surveillance program in Los Angeles county. *Natl Cancer Inst Monogr* 1977;47:99.
31. Preston-Martin S, Henderson BE, Peters JM. Descriptive epidemiology of central nervous system neoplasms in Los Angeles county. *In* Selikoff IJ, Hammond EC (eds): *Brain Tumors in the Chemical Industry*. New York, The New York Academy of Sciences, 1982
32. Preston-Martin S, Lewis S, Winkelmann R, et al. Descriptive epidemiology of primary brain tumors in New Zealand, 1948-1988. *Cancer Causes Control* 1993;4:529.
33. Davis DL, Schwartz J. Trends in cancer mortality: US white males and females, 1968-83. *Lancet* 1988;1:633.
34. Greig NH, Ries LG, Yancik R, et al. Increasing annual incidence of primary malignant brain tumors in the elderly. *JNCI* 1990;82:1621.

35. Davis DL. International trends in cancer mortality in France, West Germany, Italy, Japan, England and Wales and the USA. *Lancet* 1990;336:474.
36. Modan B, Wagener DK, Feldman JJ, et al. Increased mortality from brain tumors: A combined outcome of diagnostic technology and change of attitude toward the elderly. *Am J Epidemiol* 1992;135:1349.
37. Velema JP, Walker AM. The age curve of nervous system tumor incidence in adults: Common shape but changing levels by sex, race and geographical location. *Int J Epidemiol* 1987;16:177.
38. Mancuso TF. Tumors of the central nervous system: Industrial considerations. *Acta Unio International Union Against Cancer* 1963;19:488.
39. Sorahan T, Parkes HG, Veys CA, et al. Mortality in the British rubber industry, 1946-85. *Br J Ind Med* 1989;46:1.
40. Thomas TL, Decoufle P, Moure-Eraso R. Mortality among workers employed in petroleum refining and petrochemical plants. *J Occup Med* 1980;22:97.
41. Marsh GM, Enterline PE, McCraw D. Mortality patterns among petroleum refinery and chemical plant workers. *Am J Indust Med* 1991;19:29.
42. Blair A, Hayes HM Jr. Cancer and other causes of death among US veterinarians, 1966-1977. *Int J Cancer* 1980;25:181.
43. Ahlbom A, Norell S, Rodvall Y. Dentists, dental nurses, and brain tumors. *Br Med J* 1986;292:662.
44. McLaughlin JK, Malke HSR, Blot W, et al. Occupational risks for intracranial gliomas in Sweden. *JNCI* 1987;78:253.
45. Thomas TL, Stolley PD, Stemhagen A, et al. Brain tumor mortality risk among men with electrical and electronics jobs: A case-control study. *JNCI* 1987;79:233.
46. Mack W, Preston-Martin S, Peters JM. Astrocytoma risk related to job exposure to electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1991;12:57.
47. Musicco M, Filipini G, Bordo BM, et al. Gliomas and occupational exposure to carcinogens: Case-control study. *Am J Epidemiol* 1982;116:782.
48. Brownson RC, Reif JS, Chang JC, et al. An analysis of occupational risks for brain cancer. *Am J Pub Health* 1990;80:169.
49. Crist WM, Kun LE. Common solid tumors of childhood. *N Engl J Med* 1991;324:461.

50. Schlehofer B, Blettner M, Becker N, et al. Medical risk factors and the development of brain tumors. *Cancer* 1992;69:2541.
51. Ryan P, Lee MW, North B, et al. Risk factors for tumors of the brain and meninges: Results from the Adelaide Adult Brain Tumor Study. *Int J Cancer* 1992;51:20.
52. Meadows AT, Baum E, Fossati-Bellani F, et al. Second malignant neoplasms in children: An update from the late effects study group. *J Clin Oncol* 1985;3:532.
53. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;325:1330.
54. Rodvall Y, Pershagen G, Hrubec Z, et al. Prenatal x-ray exposure and childhood cancer in Swedish twins. *Int J Cancer* 1990;46:362.
55. Farwell J, Flannery JT. Cancer in relatives of children with central-nervous-system neoplasms. *N Engl J Med* 1984;311:749.
56. Wrensch M, Barger GR. Familial factors associated with malignant gliomas. *Genet Epidemiol* 1990;7:291.
57. Bondy ML, Lustbader ED, Baffler PA, et al. Genetic epidemiology of childhood brain tumors. *Genet Epidemiol* 1991;8:253.
58. Rice JM, Rehm S, Donovan PS, et al. Comparative transplacental carcinogenesis by direct acting and metabolism-dependent alkylating agents in rodents and nonhuman primates. *IARC Sci Publ* 1989;96:17.
59. Savitz DA, Chen J. Parental occupation and childhood cancer: Review of epidemiologic studies. *Environ Health Perspect* 1990;88:325.
60. Schuman LM, Choi NW, Gullen WH. Relationship of central nervous system neoplasms to *Toxoplasma gondii* infection. *Am J Pub Health* 1967;57:848.
61. Fredrick J, Alberman ED. Reported influenza in pregnancy and subsequent cancer in the child. *Br Med J* 1972;2:485.
62. Bithell JF, Draper GJ, Gorbach PD. Association between malignant disease in children and maternal virus infections. *Br Med J* 1973;1:706.
63. Yates PO, Pearce KM. Recent changes in blood-group distribution of astrocytomas. *Lancet* 1960;1:194.
64. Selverstone B, Cooper DR. Astrocytoma and ABO blood groups. *J Neurosurg* 1961;18:602.

65. Buckwalter JA, Turner JH, Gamber HH. Psychoses, intracranial neoplasms and genetics. *Arch Neurol Psychiatry* 1959;81:480.
66. Strang RR, Tovi D, Lopez J. Astrocytomas and the ABO blood groups. *J Med Genet* 1966;3:274.
67. Preston-Martin S, Yu MC, Benton B, et al. N-nitroso compounds and childhood brain tumors: A case-control study. *Cancer Res* 1982;42:5240.
68. Kuijten RR, Bunin GR, Nass CC, et al. Gestational and familial risk factors for childhood astrocytoma: Results of a case-control study. *Cancer Res* 1990;50:2608.
69. Howe GR, Burch JD, Chiarelli AM, et al. An exploratory case-control study of brain tumors in children. *Cancer Res* 1989;49:4349.
70. Choi NW, Schuman LM, Gullen WH. Epidemiology of primary central nervous system neoplasms: II. Case-control study. *Am J Epidemiol* 1970;91:467.
71. Burch JD, Craib KJP, Choi BCK, et al. An exploratory case-control study fo brain tumors in adults. *JNCI* 1987;78:601.
72. Gold E, Gordis L, Tonascia L, et al. Risk factors for brain tumors in children. *Am J Epidemiol* 1979;109:309.
73. Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979;109:273.
74. Tomenius L. 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm County. *Bioelectromagnetics* 1986;7:191.
75. Bigner SH, Mark J, Burger PC, et al. Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 1988;48:405.
76. Kapp JP, Paulson G, Odom GL, et al. Brain tumors with tuberous sclerosis. *J Neurosurg* 1967;26:191.
77. Rodriguez HA, Berthrong M. Multiple primary intracranial tumor in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Arch Neurol* 1966;14:467.
78. Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: Report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959;2:465.
79. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1990;71:747.
80. Von Motz IP, Bots G, Endtz LJ. Astrocytoma in three sisters. *Neurol* 1977;27:1038.

81. Heuch I, Blom GP. Glioblastoma multiforme in three family members including one case of true multicentricity. *J Neurol* 1986;233:142.
82. Osman M, Grossman SA, Griffin C, et al. The National Familial Brain Tumor Registry. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991;10:124.
83. Grossman SA, Osman M, Hruban RH, et al. Familial gliomas: The potential role of environmental exposures. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995;14:149.
84. Rey JA, Bello MJ, de Compos, et al. Chromosomal patterns in human malignant astrocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;29:201.
85. Rey JA, Bello MJ, de Compos, et al. On trisomy of chromosome 7 in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;29:323.
86. Jenkins RB, Kimmel DW, Moertel CA, et al. A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;39:253.
87. Lindstrom E, Salford LG, Heim S, et al. Trisomy 7 and sex chromosome loss need not be representative of tumor parenchyma cells in malignant glioma. *Genes Chromosom Cancer* 1991;3:474.
88. Sawyer JR, Swanson CM, Chaddock WM, et al. Evolution of tumor chromosome abnormalities after therapy in a pediatric astrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:119.
89. Karnes PS, Tran TN, Cui MY, et al. Cytogenetic analysis of 39 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;59:12.
90. Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, et al. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosom Cancer* 1992;5:357.
91. Sawyer JR, Swanson CM, Roloson GJ, et al. Cytogenetic findings in a case of pediatric glioblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;64:75.
92. Thiel G, Losanowa T, Kintzel D, et al. Karyotypes in 90 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;58:109.
93. Neumann E, Kalousek DK, Norman MG, et al. Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71:40.
94. Chaddock WM, Gollin SM, Gray BA, et al. Gliosarcoma with chromosome abnormalities in a neonate exposed to heptachlor. *Neurosurgery* 1987;221:557.

95. Yamada K, Kondo T, Yoshioka M, et al. Cytogenetic studies in 20 human brain tumors: Association of No. 22 chromosome abnormalities with tumors of the brain. *Cancer Genet Cytogenet* 1980;2:293.
96. Rey JA, Bello MJ, de Compos, et al. Chromosomal composition of a series of 22 human low-grade gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;29:223.
97. Griffin CA, Long PP, Carson BJ, et al. Chromosome abnormalities in low-grade central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;60:67.
98. Sawyer JR, Roloson GJ, Hobson EA, et al. Trisomy for chromosome 1q in a pontine astrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;47:101.
99. de Compos JM, Kusak ME, Bello MJ, et al. Karyotype and prognosis in oligodendroglial tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;52:203.
100. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318.
101. Karp JE, Broder S. New directions in molecular medicine. *Cancer Res* 1994;54:653.
102. Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409.
103. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:11.
104. Prives C, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor protein: Meeting review. *Genes Dev* 1993;7:529.
105. Sussi T, Legros Y, Lubin R, et al. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: A review. *Int J Cancer* 1994;57:1.
106. Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild type and mutant p53. *FASEB J* 1993;7:855.
107. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu Ve, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817.
108. Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805.
109. Livingstone LR, White A, Sprouse J, et al. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992;70:923.

110. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169.
111. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847.
112. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 1992;276:299.
113. Schwechheimer K, Laufle RM, Schmahl W, et al. Expression of neu/c-erbB-2 in human brain tumors. *Hum Pathol* 1994;25:772.
114. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Ann Rev Cell Biol* 1990;6:597.
115. Kuppner MC, Hamou M-F, Sawamura Y, et al. Inhibition of lymphocyte function by glioblastoma-derived transforming growth factor-beta 2. *J Neurosurg* 1989;71:211.
116. Palladino MA, Morris RE, Starnes HF, et al. The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1990;593:181.
117. Rozental JM, Levine RL, Nickles RJ. Changes in glucose uptake by malignant gliomas: Preliminary study of prognostic significance. *J Neuro-oncol* 1991;10:75.
118. Rozental JM, Levine RL, Nickles RJ, et al. Glucose uptake by gliomas after treatment. *Arch Neurol* 1989;46:1302.
119. Rhodes CG, Wise RJ, Gibbs JM, et al. In vivo disturbance of the oxidative metabolism of glucose in human cerebral gliomas. *Ann Neurol* 1983;14:614.
120. Tyler JL, Diksic M, Villemure JG, et al. Metabolic and hemodynamic evaluation of gliomas using positron emission tomography. *J Nucl Med* 1987;28:1123.
121. Derlon JM, Bourdet C, Bustany P, et al. [¹⁴C]L-methionine uptake in gliomas. *Neurosurgery* 1989;25:720.
122. Sato K, Kameyama M, Ishiwata K, et al. Dynamic study of methionine uptake in glioma using positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 1992;19:426.
123. Smith CB, Deibler GE, Eng N, et al. Measurement of local cerebral protein synthesis in vivo: Influence of recycling of amino acids derived from protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9341.

124. Widmann R, Kocher M, Ernestus RI, et al. Biochemical and autoradiographical determination of protein synthesis in experimental brain tumors of rats. *J Neurochem* 1992;59:18.
125. Mineura K, Sasajima T, Kowada M, et al. Changes in the (¹¹C-methyl)-L-methionine uptake index in gliomas following radiotherapy. *Gan No Rinsho* 1989;35:1101.
126. Scherer HD. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer* 1940;1:159.
127. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, et al. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1988;68:698.
128. Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, et al. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. *J Neurosurg* 1986;65:654.
129. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* 1980;30:907.
130. Bashir R, Hochberg F, Oot R. Regrowth patterns of glioblastoma multiforme related to planning of interstitial brachytherapy radiation fields. *Neurosurgery* 1988;23:27.
131. Liang BC, Thornton AF Jr, Sandler HM, et al. Malignant astrocytomas: Focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *J Neurosurg* 1991;75:559.
132. de Ridder L, Calliauw L. Invasion of human brain tumors in vitro: Relationship to clinical evolution. *J Neurosurg* 1990;72:589.
133. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, et al. Isolation and characterization of type IV collagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982;21:6188.
134. Bjerkvig R, Laerum OD, Mella O. Glioma cell interactions with fetal rat brain aggregates in vitro and with brain tissues in vivo. *Cancer Res* 1986;46:4071.
135. Pulliam L, Berens ME, Rosenblum ML. A normal human brain cell aggregate model for neurobiological studies. *J Neurosci Res* 1988;21:521.
136. Apodaca G, Rutka JT, Bouhana K, et al. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells. *Cancer Res* 1990;50:2322.

137. Paganetti PA, Caroni P, Schwab ME. Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: Involvement of a metalloprotease. *J Cell Biol* 1988;107:2281.
138. Rao JS, Steck PA, Mohanam S, et al. Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 1993;53:2208.
139. Halaka AN, Bunning RA, Bird CC, et al. Production of collagenase and inhibitor (TIMP) by intracranial tumors and dura in vitro. *J Neurosurg* 1983;59:461.
140. Mohanam S, Sawaya R, McCutcheon I, et al. Modulation of in vitro invasion of human glioblastoma cells by urokinase-type plasminogen activator receptor antibody. *Cancer Res* 1993;53:4143.
141. Sitrin RG, Gyetko MR, Kole KL, et al. Expression of heterogeneous profiles of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by human glioma lines. *Cancer Res* 1990;50:4957.
142. Businaro R, Fabrizi C, Fumagalli L, et al. Synthesis and secretion of alpha 2-macroglobulin by human glioma established cell lines. *Exp Brain Res* 1992;88:213.
143. Edvardsen K, Brunner N, Spang-Thomsen M, et al. Migratory, invasive and metastatic capacity of NCAM transfected rat glioma cells. *Int J Dev Neurosci* 1993;5:681.
144. Lund-Johansen M, Forsberg K, Bjerkvig R, et al. Effects of growth factors on a human glioma cell line during invasion into rat brain aggregates in culture. *Acta Neuropathol* 1992;84:190.
145. Lund-Johansen M. Interactions between human glioma cells and fetal rat brain aggregate studied in a chemically defined medium. *Invasion Metastasis* 1990;10:113.
146. Pedersen PH, Ness GO, Engebraaten O, et al. Heterogeneous response to the growth factors [EGF, PDGF(bb), TGF-alpha, bFGF, IL-2] on glioma spheroid growth, migration and invasion. *Int J Cancer* 1994;56:255.
147. Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, et al. Motility factor produced by malignant glioma cells: Role in tumor invasion. *J Neurosurg* 1990;73:881.
148. Boike G, Lah T, Sloane BF, et al. A possible role for cyteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumour cells. *Melanoma Res* 1992;1:333.

149. Forsyth PA, Shaw EG, Scheithauer BW, et al. Supratentorial pilocytic astrocytomas: A clinicopathologic, prognostic and flow cytometric study of 51 patients. *Cancer* 1993;72:1335.
150. Clark GB, Henry JM, McKeever PE. Cerebral pilocytic astrocytoma. *Cancer* 1985;56:1128.
151. Russell DS, Rubinstein LJ. *Pathology of Tumors of the Nervous System*, ed 5. London, Edward Arnold, 1989.
152. Krouwer HGJ, Davis RL, Silver R, et al. Gemistocytic astrocytomas: A reappraisal. *J Neurosurg* 1991;74:399.
153. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. *Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings*, ed 3. New York Churchill Livingstone, 1991.
154. Muller W, Afra D, Schroder R. Supratentorial recurrences of gliomas: Morphological studies in relation to time intervals with 544 astrocytomas. *Acta Neurochir* 1977;37:75.
155. Laws ER Jr, Taylor WF, Clifton MB, et al. Neurosurgical management of low-grade astrocytoma of the cerebral hemispheres. *J. Neurosurg* 1984;61:665.
156. Dropcho EJ, Wisoff JH, Walker RW, et al. Supratentorial malignant gliomas in childhood: A review of 50 cases. *Ann Neurol* 1987;22:355.
157. Tamura M, Ono N, Zama A, et al. Small gliomas: Clinicopathological study. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1993;33:425.
158. Morantz RA, Feigin I, Ransohoff J III. Clinical and pathological study of 24 cases of gliosarcoma. *J Neurosurg* 1976;45:398.
159. Meis JM, Martz KL, Nelson JS. Mixed glioblastoma multiforme and sarcoma: A clinicopathologic study of 26 Radiation Therapy Oncology Group cases. *Cancer* 1991;67:2342.
160. Mork SJ, Lindegaard K-F, Halvorsen TB, et al. Oligodendroglioma: Incidence and biological behavior in a defined population. *J Neurosurg* 1985;63:881.
161. Zulch KJ. *Brain Tumours: Their Biology and Pathology*, ed 3. Berlin, Springer-Verlag, 1986.
162. Tola MR, Casetta I, Granieri E, et al. Intracranial gliomas in Ferrara, Italy, 1976 to 1991. *Acta Neurol Scand* 1994;90:312.
163. Cairncross JG, Macdonald DR, Ramsay DA. Aggressive oligodendroglioma: A chemosensitive tumour. *Neurosurgery* 1992;31:78.

164. Yates AJ, Becker LE, Sachs LA. Brain tumors in childhood. *Childs Brain* 1979;5:31.
165. Salazar OM, Castro-Vita H, Van-Houtte P, et al. Improved survival in cases of intracranial ependymoma after radiation therapy: Late report and recommendations. *J Neurosurg* 1983;59:652.
166. Morantz RA, Kepes JJ, Batnitzky S, et al. Extraspinal ependymomas: Report of three cases. *J Neurosurg* 1979;51:383.
167. Pulitzer DR, Martin PC, Collins PC, et al. Subcutaneous sacrococcygeal ("myxopapillary") ependymal rests. *Am J Surg Pathol* 1988;12:672.
168. Hurtt MR, Moosy J, Donovan-Peluso M, et al. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: Histopathology and prognosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:84.
169. Kros JM, de Jong AA, van der Kwast ThH. Ultrastructural characterization of transitional cells in oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:186.
170. Atlas SW. Intra-axial brain tumors. *In Atlas SW (ed): Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine.* New York, Raven, 1991, pp 223-326.
171. Atlas SW, Grossman RI, Gomori JM, et al. Hemorrhagic intracranial neoplasms: spin-echo MR imaging. *Radiology* 1978;164:71.
172. Zimmerman RA, Bilaniuk LT. Computed tomography of acute intratumoral hemorrhage. *Radiology* 1980;135:355.
173. Masters LT, Zimmerman RD. Imaging of supratentorial brain tumors in adults. *Neuroimaging Clin North Am* 1993;3:649.
174. Dean BL, Drayer BP, Bird CR, et al. Gliomas: Classification with MR imaging. *Radiology* 1990;174:411.
175. Sze G, Abramson A, Krol G, et al. Gadolinium-DTPA in the evaluation of intradural extramedullary spine disease. *AJNR* 1988;9:153.
176. Fountzilias G, Karavelis A, Markantonakis P, Sridhar SK, Kalogera-Fountzila A, Selviaridis P, Karkavelas G, Sidiropoulos D, Giavroglou C, Vritsios A, Foroglou G and Tourkantonis A. Post-operative intracarotid chemotherapy followed by radiation therapy in patients with malignant gliomas. *Reg Cancer Treat* 1991;3:332.
177. Fishman RA. *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*, ed 2. Philadelphia, WB Saunders, 1992.

178. Bilsky M, Posner JB. Intensive and postoperative care of intracranial tumors. *In* Ropper AH (ed): Neurological and Neurosurgical Intensive Care, ed 3. New York, Raven Press, 1993, pp 309-329.
179. Crews CM, Erikson RL. Purification of a murine protein-tyrosin/threonine kinase that phosphorylates and activates the ERK-1 gene product: relationship to the fission yeast byr-1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8205.
180. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 1992;258:478.
181. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erikson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber M J, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/ mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991;10:885.
182. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1.
183. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1.
184. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443.
185. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312.
186. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551.
187. Boyer PD, Chance B, Ernster L, Mitchell P, Racker E, Slater EC. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Ann Rev Biochem* 1977;46:955.
188. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome-c. *Cell* 1996;86:147.
189. Srinivasa MS, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949.
190. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265.
191. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680.
192. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 4350.

193. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156.
194. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Rucklidge GJ. Spheroid culture in cancer research. *In* Bjerkvig R. (ed) CRC Press, Ann Arbor: 1990, pp 3-18.
195. Pedersen PH, Marienhagen K, Mork S, Bjerkvig R. Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in adult rat brain. *Cancer Res* 1993;53:5158.
196. Go Y, Chintala SK, Gokaslan ZL, Venkaiah B, Bjerkvig R, Oka K, Nicholson GL, Sawaya R, Rao JS. Inhibition of in vivo tumorigenicity and invasiveness of a human glioblastoma cell line transfected with antisense uPAR vectors. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:440.
197. Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima Y, Minaguchi H, Migusi K, Yasumitsu H, Miyazaki K. Specific expression of PP5/TFPI-2 mRNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. *Placenta* 1998;19:217.
198. Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, Yasumitsu H, Umeda M. Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrix pump-1, secreted from human rectal carcinoma cell line. *Cancer Res* 1990;50:7758.
199. Umenishi F, Yasumitsu H, Ashida Y, Yamauti J, Umeda M, Miyazaki K. Purification and properties of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, overproduced by Rous sarcoma virus-transformed rat liver cell line, and its identification as transin. *J Biochem* 1990;108:537.
200. Yasumitsu H, Miyazaki K, Umenishi F, Koshikawa K, Umeda M. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64 kDa and 90 kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem* 1992;111:74.
201. Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992;52:5046.
202. Koshikawa K, Yasumitsu H, Nagashima Y, Umeda M, Miyazaki K. Identification of one-and-two-chain forms of trypsinogen-1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. *Biochem J* 1994;303:187.

203. Eitzman DT, Krauss JC, Shen T, Cui J, Ginsburg D. Lack of plasminogen activator inhibitor-1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood* 1996;87:4718.
204. Andreassen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffey MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;72:1.
205. Reuning U, Magdolen V, Wilhem O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int J Oncol* 1998;13:893.
206. Sugiura Y, Ma L, Sun B, Shimada H, Laug WE, Seeger RC, DeClerk YA. The plasminogen-activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res* 1999;59: 1327.
207. Rao CN., Mohanam S, Puppala A, Rao JS. Regulation of proMMP-1 and proMMP-3 activation of tissue factor pathway inhibitor-2/matrix associate serine protease inhibitor. *Bioch Biophys Res* 1999;255:94.
208. Stephens RW, Pollanen J, Tapiovaara H, Leung KC, Sim PS, Salonen EM, Ronne E, Behrendt N, Dano K, Vaheri A. Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface bound reactants. *J Cell Biol* 1989;108:1987.
209. Bizik J, Lizinova A, Stephens RW, Grofova M. Vaheri A. Plasminogen activation by tPA on the surface of human melanoma cells in the presence of α -2 macroglobulin secretion. *Cell Regul* 1990;1:895.
210. Quax PHA, van Muijen GNP., Weening Verhoff EJD, Lund LR, Dano K, Ruitter DJ, Verheijen J H. Metastatic behavior of human melanoma cells in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator its type-1 inhibitor and urokinase mediated degradation. *J Cell Biol* 1991;115:191.
211. Reinartz J, Batrla R, Boukamp P, Fusenig N, Kramer MD. Binding and activation of plasminogen at the surface of human keratinocytes. *Exp Cell Res* 1993;208:197.
212. Wanger SL, Lau AL, Cunningham DD. Binding of protease nexin-1 to the fibroblast cell surface alters its target proteinase specificity. *J Biol Chem* 1989;264:611.

213. Zou G, Anisovic A, Hendrix MJC, Thor A, Neveu M, Sheng S, Seftor E, Sager R. Identification of a novel serpin with tumor suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 1994;263:526.
214. Pemperton PA, Wong DT, Gibson HL, Kiefer MC, Fitzpatrick PA, Sager RA, Barr PJ. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases: evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. *J Biol Chem* 1995;270:15832.
215. Sheng S, Truong B, Fredrickson D, Wu R, Pardee AB, Sager R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;75:499.
216. Seftor EB, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJC. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res* 1999;58:5681.
217. Dvorak H. Thrombosis and cancer. *Hum Pathol* 1987;18: 275.
218. Ruf W, Mueller BM. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol* 3: 1996, pp 379-384.
219. Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Davane I, Dillehay DL, Contrini J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS, Kudryk B, Kretzer DL, Rickles FR. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization of in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in cancer. *Am J Pathol* 1998;152:399.
220. Olliver V, Bentolilam S, Chabbathm J, Hakim J, de Prost D. Tissue factor-dependent VEGF production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 1998;91:2698.
221. Taniguchi T, Kakkar AK, Tuddenham EG, Williamson RC, Lemoine NR. Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998;58:4461.
222. Contrini J, Hair G, Kretzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 2: 1996, pp 209-215.
223. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruff W. Expression of tissue factor by human melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 11832.

224. Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, Yoshizumi M, Kasahara T, Nishimura H, Nawroth PP, Nakagawa M. The angiogenic effects of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:207.
225. Mueller BM, Ruff W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998;101:1372.
226. Martin JS, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995;82:349.
227. Nicholson WD, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22 (8): 1997, pp 299-306.
228. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355.
229. Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:21878.
230. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 6939.
231. Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K. Overexpression of Bcl-xL inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997;57:3115.
232. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial trans membrane depolarization. *EMBO J* 1998;17:37.
233. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479.
234. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to elegans CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405.
235. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949.

236. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, Vandenberg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 1998;153(5):1411.
237. Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Relative level of expression of Bax and Bcl-xL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene* 1999;18:5703.
238. Vogelbaum MA, Tong JX, Higashikubo R, Gutmann DH, Rich KM. Transfection of C6 glioma cells with the Bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosine arabinoside. *J Neurosurg* 1998;88(1):99.
239. Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Expression level of Bcl-2 determines anti-or proapoptotic function. *Cancer Res* 1999;59(16):4119.
240. Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M. Bcl-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 1998;440(3):419.
241. Konduri SD, Rao CN, Chandrasekar N, Tasiou A, Mohanam S, Kin Y, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Rao JS. A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion. *Oncogene* 2001;20(47):6938.
242. Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Takenaka K, Shinoda J, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y. Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene* 2000;19(31):3508.