

**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Pokročilá diagnostika a moderní léčebné  
strategie u pacientů s glioblastomem**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

obor onkologie

komentovaný soubor prací

Brno 2020

MUDr. Radek Lakomý, Ph.D.

#### Poděkování:

Velmi děkuji své manželce Blance a celé rodině za podporu a trpělivost, které mi po celou dobu mé práce poskytovaly.

Dále také děkuji svým kolegům za cenné odborné rady a dlouholetou spolupráci. Děkuji především MUDr. Tomáši Kazdovi, Ph.D., prof. RNDr. Ondřeji Slabému, Ph.D., prof. MUDr. Pavlu Šlampovi, CSc., doc. MUDr. Alexandru Poprachovi, Ph.D., prof. MUDr. Rostislavu Vyzulovi, CSc., prof. MUDr. Marku Svobodovi, Ph.D. a doc. MUDr. Igoru Kissovi, Ph.D.

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Komentář.....   | 4  |
| 1 Úvod.....   | 7  |
| 2 Epidemiologie a etiologie glioblastomu .....                        | 8  |
| 3 Patogeneze glioblastomu .....                                       | 10 |
| 3.1 Modely patogeneze (primární vs. sekundární glioblastom) .....     | 10 |
| 3.2 Molekulární klasifikace (molekulární podtypy) .....               | 12 |
| 3.3 Vlastní příspěvek k problematice .....                            | 13 |
| 4 Diagnostické metody u glioblastomu.....                             | 15 |
| 4.1 Symptomy.....   | 15 |
| 4.2 Zobrazovací metody .....  | 15 |
| 4.2.1 Standardní zobrazovací metody .....                             | 15 |
| 4.2.2 Pokročilé MR zobrazovací metody .....                           | 16 |
| 4.2.3 Pokročilé vyšetřovací metody z oblasti nukleární medicíny.....  | 17 |
| 4.2.4 Hodnocení léčebné odpovědi, pseudoprogrese a pseudoodpověď..... | 17 |
| 4.2.5 Vlastní příspěvek k problematice .....                          | 18 |
| 4.3 WHO klasifikace 2016 – princip integrované diagnózy .....         | 20 |
| 4.4 Molekulární diagnostika .....                                     | 24 |
| 4.4.1 Základní molekulárně genetické biomarkery u gliomů.....         | 24 |
| 4.4.2 Diagnostické biomarkery .....                                   | 27 |
| 4.4.3 Prognostické biomarkery.....                                    | 28 |
| 4.4.4 Prediktivní biomarkery.....                                     | 29 |
| 4.4.5 Pokročilé metody molekulární diagnostiky.....                   | 31 |
| 4.4.6 Vlastní příspěvek k problematice .....                          | 32 |
| 5 Moderní terapie glioblastomu .....                                  | 35 |
| 5.1 Neurochirurgická léčba.....                                       | 35 |
| 5.2 Radioterapie.....   | 36 |
| 5.3 Chemoterapie.....   | 40 |
| 5.3.1 Chemoterapie v pooperační léčbě glioblastomu .....              | 40 |
| 5.3.2 Chemoterapie u rekurentního glioblastomu .....                  | 45 |
| 5.3.3 Vlastní příspěvek k problematice .....                          | 47 |
| 5.4 Moderní léčebné přístupy .....                                    | 52 |
| 5.4.1 Optune .....  | 52 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.4.2 | Cílená léčba .....                     | 53 |
| 5.4.3 | Imunoterapie.....                      | 56 |
| 5.4.4 | Vlastní příspěvek k problematice ..... | 58 |
| 6     | Závěr .....                            | 59 |
| 7     | Citace .....                           | 60 |
| 8     | Seznam zkratk .....                    | 71 |
| 9     | Seznam příloh .....                    | 76 |

## Komentář

V současné době jsme svědky velkého pokroku napříč všemi lékařskými obory. Překotný rozvoj v oblasti molekulární biologie a genetiky nám umožnil přesněji pochopit a popsat proces patogeneze nádorových onemocnění. Gliomy, a v první řadě glioblastomy jako jejich nejčastější a nejagresivnější forma, nejsou výjimkou. Získané poznatky byly využity při revizi WHO klasifikace mozkových nádorů v roce 2016. Díky konceptu tzv. integrované diagnózy, stojícím na histopatologickém obrazu onemocnění a molekulárních biomarkerech, dnes došlo ke zpřesnění diagnostiky, lepšímu odhadu prognózy a predikce léčebné odpovědi. Přesnější stratifikace pacientů s glioblastomy do různých podskupin dle profilu biomarkerů je a bude zásadní při jejich zařazování do klinických studií s novými léky. První část habilitační práce je věnována procesům karcinogeneze a molekulární klasifikaci glioblastomů. Kromě souhrnu základních informací o stěžejních biomarkerech s diagnostickým, prognostickým a prediktivním významem jsou zde zmíněny a komentovány vlastní příspěvky. Jedná se především o poznatky, které naše skupina nabyła při výzkumu role nekódujících mikroRNA. Jde o velkou skupinu nových perspektivních biomarkerů, které se podílejí na epigenetické regulaci buněčných procesů a na vlastní patogenezi onemocnění. Toho dnes můžeme využít pro odhad prognózy glioblastomu, případně pro predikci léčebné odpovědi. MikroRNA v sobě také skrývají potenciál terapeutického využití. V druhé části habilitační práce je velký prostor věnován standardní multimodální léčbě glioblastomu, která spočívá v maximální možné bezpečné resekci nádoru následované konkomitantní chemoradioterapií a adjuvantní chemoterapií s temozolomidem. Bohužel ani přes nabyté znalosti a obrovské možnosti současné patologie a laboratorní diagnostiky zatím nedošlo od roku 2005 k zásadní změně terapeutického postupu. Léčba pomocí střídavých elektrických polí vysílaných z elektrod nalepených na kůži hlavy (Optune) je omezeně dostupná a není vhodná pro každého. Klinické studie s cílenou léčbou a moderní imunoterapií skončily neúspěchem. Přesto se nám podařilo díky povšechnému medicínskému pokroku během posledních 10 let prodloužit život našich pacientů o několik měsíců. Ve srovnání se stavem před 10 lety naši neurochirurgové dosahují více radikálních a bezpečných resekcí, což umožňuje většímu procentu pacientů podstoupit intenzivní pooperační léčbu. Zlepšila se také podpůrná a symptomatická léčba. Díky hodnocení našeho souboru pacientů jsme navíc, ve shodě se zahraničními centry, potvrdili roli nového negativního prognostického faktoru, kterým je rychlá časná progresse glioblastomu na plánovacím MR vyšetření před zahájením pooperační léčby. Tato vysoce riziková skupina pacientů je nyní předmětem výzkumu naší kooperační

skupiny (akademická studie 2. fáze GlioMET, grantová podpora AZV ČR, hlavní řešitel Dr. Radek Lakomý). I přes dílčí úspěchy je nutný další výzkum, především s moderní léčbou. Celosvětově se nyní mění pohled na koncept klinických studií s glioblastomy. Hodně nadějí je vkládáno do sériového testování biomarkerů s využitím precizní cílené léčby a imunoterapie. Předmětem zájmu vědeckých týmů je aktuálně pochopení a překonání mechanismů přirozené a získané lékové rezistence. Tímto komplexním přístupem se snad podaří změnit nepříznivou prognózu i u takového onemocnění, jakým je glioblastom.

**Klíčová slova:** glioblastom, karcinogeneze, prognóza, chemoradioterapie, molekulární cílená léčba, imunoterapie

## Commentary

We are currently witnessing great progress across all medical disciplines. The rapid development in the field of molecular biology and genetics has enabled us to understand and describe the process of cancer pathogenesis more accurately. Gliomas and primarily glioblastomas as their most common and aggressive form are no exception. The findings were used in the revision of the WHO classification of brain tumours in 2016. Thanks to the concept of the so-called integrated diagnosis, which is based on the histopathological features of the disease and molecular biomarkers, we were able to refine diagnosis, estimate the prognosis more precisely, and make better treatment response predictions. More accurate stratification of patients with glioblastomas into different subgroups according to the profile of biomarkers has been and will continue to be crucial for their inclusion in clinical trials with new drugs. The first part of this habilitation thesis is devoted to the processes of carcinogenesis and molecular classification of glioblastomas. Here, in addition to a summary of basic information on key biomarkers with diagnostic, prognostic and predictive significance, our contributions are mentioned and commented on. These are mainly findings that our group has gained in the research of the role of non-coding microRNAs. It is a large group of new promising biomarkers that are involved in the epigenetic regulation of cellular processes and in the pathogenesis of the disease itself. Today, we can use it to estimate the prognosis of glioblastoma, or to predict the response to treatment. However, microRNAs have the potential for therapeutic use. In the second part of the habilitation thesis, a substantial amount of space is devoted to the standard multimodal treatment of glioblastoma, which consists of the maximum possible safe tumour resection

followed by concomitant chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide. Unfortunately, despite the acquired knowledge and the huge possibilities of current pathology and laboratory diagnostics, there has been no fundamental change in the therapeutic procedure since 2005. The treatment with alternating electric fields emitted from electrodes affixed to the scalp (Optune) is limited and not suitable for everyone. Clinical trials with targeted therapy and modern immunotherapy have failed. Nevertheless, thanks to general medical progress over the last 10 years, we have managed to extend the lives of our patients by several months. Compared to 10 years ago, our neurosurgeons achieve more radical and safe resections, allowing a larger percentage of patients to undergo intensive postoperative treatment. The supportive and symptomatic treatment has also improved. Thanks to the evaluation of our group of patients, we also confirmed, in agreement with foreign centres, the role of a new negative prognostic factor, which is the rapid early progression of glioblastoma on a planning MR examination before the start of postoperative treatment. This high-risk group of patients is now the subject of research by our cooperation group (academic study of the 2nd phase GliOMET, grant support from AZV ČR – Czech health research council, principal investigator Radek Lakomý, MD). Despite these partial successes, further research is needed, especially with modern treatment. The concept of clinical trials with glioblastomas is now changing worldwide. Much hope is placed in serial testing of biomarkers using precise targeted treatment and immunotherapy. Scientific teams are currently focused on understanding and overcoming the mechanisms of intrinsic and acquired drug resistance. With this comprehensive approach, it is hopefully possible to change the unfavourable prognosis even in a disease such as glioblastoma.

**Keywords:** glioblastoma, carcinogenesis, prognosis, chemoradiotherapy, molecular targeted therapy, immunotherapy

## 1 Úvod

Glioblastom je nejčastější primární maligní nádor mozku u dospělých. I přes intenzivní multimodální přístup zahrnující makroskopicky radikální chirurgický výkon, pooperační radioterapii a chemoterapii zůstává glioblastom stále nevléčitelným onemocněním, s mediánem přežití mezi 14 a 17 měsíci a 5letým přežitím kolem 5 %. I když došlo k významnému pokroku v oblasti diagnostických a léčebných metod, přežití pacientů se za posledních 10 let zlepšilo řádově jen o měsíce. Podobně jako u jiných diagnóz probíhá u glioblastomu intenzivní výzkum v oblasti molekulární biologie a genetiky. Cílem je lépe pochopit patogenezí onemocnění, nalézt nové prognostické a prediktivní faktory a především objevit další potenciální terapeutické cíle. Získané znalosti z oblasti genetiky a molekulární biologie byly využity při poslední aktualizaci WHO klasifikace nádorů CNS v roce 2016. Informace z preklinického výzkumu byly také impulsem pro zahájení klinických studií s cílenou léčbou a moderní imunoterapií. Bohužel žádná z nich zatím nesplnila naše očekávání a zkoušený preparát ani metoda významně neovlivnily nepříznivou prognózu onemocnění. Příčin tohoto neúspěchu je samozřejmě více, jistou roli hraje také lokalizace onemocnění v mozku. Stále významnějším faktorem, který přispěl k určité stagnaci v léčbě, je velká intra- a interpersonální heterogenita onemocnění. Ta je zodpovědná za rozdílné biologické chování a citlivost k léčebným modalitám. Proto je důležité dále podporovat výzkum, pátrat po nových potenciálních léčebných cílech a pacienty více zařazovat do klinických studií. Věřím, že díky možnostem, které dnes vědecký pokrok umožňuje, se toto úsilí vyplatí a na glioblastom nebudeme brzy nahlížet jako na fatální onemocnění.

Habilitační práce s názvem „Pokročilá diagnostika a moderní léčebné strategie u pacientů s glioblastomem“ v podstatě navazuje na disertační práci autora „Prognostické a prediktivní faktory u glioblastoma multiforme“, která byla obhájena v roce 2012. Došlo k jejímu podstatnému rozšíření o nové poznatky v oblasti diagnostiky a léčby. Tyto mnohaleté zkušenosti jsou dnes základem pro další výzkum s cílem zlepšit prognózu pacientů s glioblastomy (aktuálně běžící granty, akademické studie), pregraduální a postgraduální výuku, nebo pro tvorbu doporučených postupů České onkologické společnosti pro léčbu nádorů CNS.

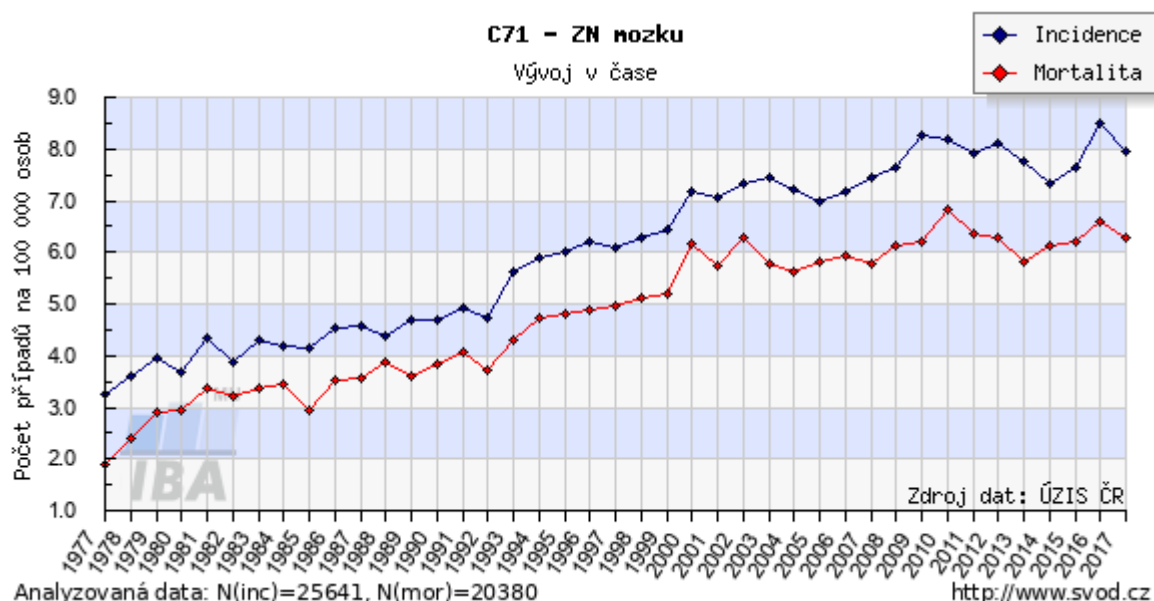
Práce je členěna do logicky navazujících kapitol tak, aby byla komplexně shrnuta aktuální problematika glioblastomu. Součástí některých kapitol jsou vlastní příspěvky autora.



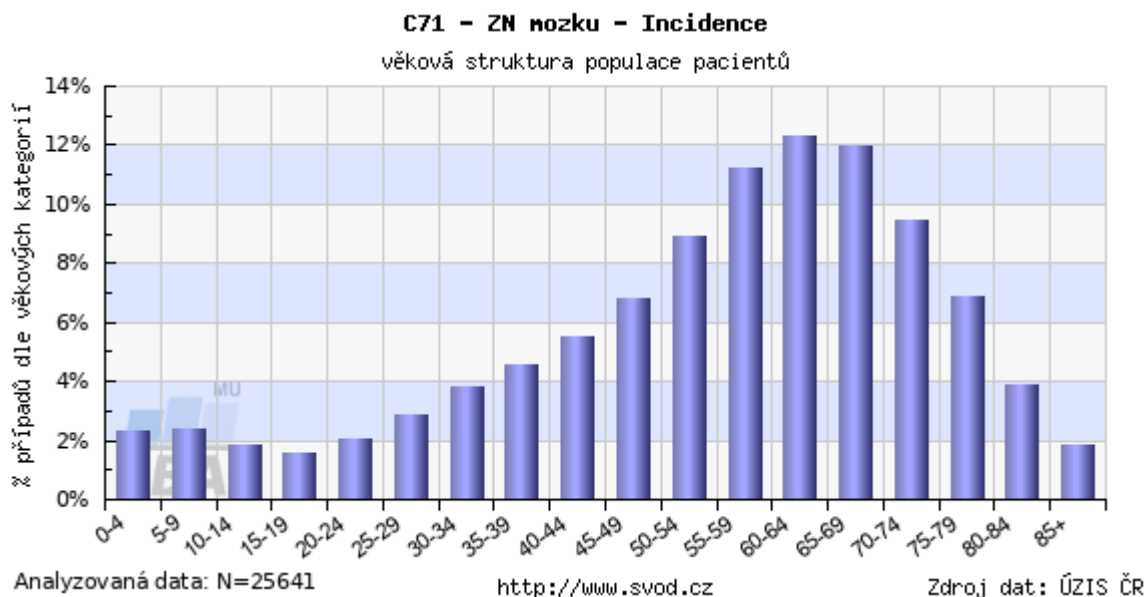
## 2 Epidemiologie a etiologie glioblastomu

Primární nádory mozku jsou velmi heterogenní skupina onemocnění. Představují jen cca 2 % všech nádorů, ale kvůli své lokalizaci patří mezi závažná onemocnění, doprovázená vysokou morbiditou a mortalitou. Jejich incidence je v posledních letech přibližně stacionární, v roce 2017 bylo v ČR hlášeno 7,9 nových případů na 100 000 obyvatel s mortalitou 6,3/100 000/rok (Obr. 1). Incidence má 2 vrcholy, první u dětí do 9 let a pak po 60. roku (Obr. 2) (1). Většina dětských nádorů vzniká v zadní jámě lební v úzkém vztahu k mozkovému kmeni. U dospělých, zvláště ve středním a vyšším věku naopak dominuje lokalizace supratentoriální, v obou hemisférách. Podle publikované analýzy americké databáze CBTRUS z let 2012–2016 převažují benigní nádory nad maligními (69,8 % vs. 30,2 %). Z benigních nádorů jsou nejvíce zastoupeny meningeomy (53,3 % benigních nádorů CNS, 37,6 % ze všech nádorů CNS, častější u žen). Nejčastějšími maligními nádory jsou gliomy (80,8 % všech maligních nádorů, 25,5 % všech primárních nádorů). Nejvíce zastoupeným a nejzhoubnějším gliomem je glioblastom (14,6 % všech primárních nádorů CNS, 48,3 % všech zhoubných nádorů CNS, cca 57,3 % gliomů, častěji u mužů), s incidencí 3,22 případů/100 000 obyvatel/rok. Anaplastický astrocytom jako další astrocytární vysokostupňový gliom je ve srovnání s glioblastomem podstatně méně frekventní (6,8 % všech gliomů) (2). Výskyt glioblastomu v ČR byl v období 2011–2015 podobný jako v USA. Incidence high-grade astrocytárních nádorů, s dominantním zastoupením glioblastomu, se u nás pohybovala kolem 3,74/100 000/rok (cca 394 nových případů ročně). Incidence high-grade astrocytomů se zvyšuje s věkem, medián věku pacientů v ČR je 62 let, 42 % z nich má v době diagnózy věk 65 a více, 24 % pak 70 let a více. Onemocnění je častější u mužů než u žen (poměr 1,3 : 1). Bohužel roční počty úmrtí na high-grade astrocytomy jsou stále poměrně vysoké, i když v posledních letech stagnují 3,24/100 000, což odpovídá 341 případům (3). Dlouhodobé přežití pacientů s glioblastomy je podle americké databáze vzácné (5leté a 10leté přežití 6,8 % a 4,7 %). Je pravděpodobnější v mladším věku do 39 let (26,2 % a 18,6 %), po 40. roku života rapidně klesá (5,5 % a 3,7 %) (2).

**Obr. 1: Incidence a mortalita nádorů mozku v ČR (1)**



**Obr. 2: Věková distribuce nádorů mozku v ČR (1)**



Etiologie vzniku gliomů je pravděpodobně multifaktoriální. Jednoznačně potvrzeným rizikovým faktorem je zatím jen ionizující záření na oblast hlavy. Latentní interval mezi dávkou záření a vznikem mozkového nádoru je variabilní, může se pohybovat od 5 let po několik dekád (4,5). Zvýšená incidence gliomů, meningeomů a nádorů z nervových

pochev byla pozorována u dětí, které podstoupily radioterapii mozkovny, např. při léčbě akutní lymfoblastické leukemie (6,7). Hodně diskutovaným tématem je bezpečnost používání mobilních telefonů a elektromagnetické záření. Tato otázka stále není nedořešena, provedené epidemiologické studie zatím nepřinesly jasné závěry (8,9). Autoři studií proto doporučují delší sledování pro nejasnou délku možné latentní periody. Stejně na tom jsou i další sledované potenciální rizikové faktory, jako je zvýšená expozice toxickým látkám v zaměstnání (herbicidey, pesticidy, práce s oleji, barvami a dalšími ropnými produkty), dietní návyky (tučná jídla), traumata hlavy, kouření, alkohol, infekce (cytomegalovirus, herpetické viry, toxoplazmóza), i zde jsou nutné další studie. Jistou roli hraje funkce imunitního systému. Dlouhodobá imunosuprese (infekce HIV, imunosupresivní léčba po transplantacích) je obecně spojena s vyšším výskytem nádorů. Naopak některá epidemiologická šetření zaměřená na incidenci mozkových nádorů poukázala na možný protektivní vliv vystimulovaného imunitního systému u alergiků (astma bronchiale, atopické ekzémy) (10,11). Pouze 5 % gliomů je podmíněno familiárně a cca 1 % vzniká v rámci genetických syndromů (12,13). Mezi nejznámější patří neurofibromatóza 1. typu (mutace genu *NF1*), Liův-Fraumeniho syndrom (mutace genu *TP53*), hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom (mutace jednoho z reparačních genů MMR systému – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) a další. Vyšší náchylnost ke vzniku mozkových nádorů byla prokázána také při mutacích genů *TERT*, *CCDC26*, *CDKN2A/CDKN2B*, *RTEL1*, *PHLDB1* a *EGFR* (14).

### 3 Patogeneze glioblastomu

#### 3.1 Modely patogeneze (primární vs. sekundární glioblastom)

Glioblastom je nejagresivnější forma astrocytomu (stupeň IV) s typickým histologickým obrazem (buněčné atypie, vysoká mitotická aktivita, angiogeneze, nekrózy). Patogeneze je obecně velmi složitý proces. Aktivací onkogenů a deaktivací nádorových supresorových genů dochází k narušení regulace buněčného cyklu, procesu apoptózy a k nekontrolované nádorové proliferaci. Významnou roli v procesu onkogeneze hrají také epigenetické mechanismy jako metylační stav DNA, mikroRNA, změny chromatinu a další (15). Z pohledu patogeneze rozlišujeme dvě základní skupiny glioblastomů, které mají odlišné molekulárně genetické vlastnosti. Častější je „primární glioblastom“, který vzniká přímo maligním zvratem zdravé gliální buňky (de novo) a představuje 95 % všech glioblastomů. Zbývajících 5 %

glioblastomů je označováno jako „sekundární glioblastom“, protože vznikají postupnou maligní transformací z astrocytomu nižšího stupně (Obr. 3) (16).

### **Obr. 3: Patogeneze primárního a sekundárního glioblastomu, upraveno podle Ohgakiho a kol. (16)**

Před objevením mutace genu pro isocitrátdehydrogenázu (*IDH*) se předpokládalo, že primární a sekundární glioblastomy mají původ ve stejné prekurzorové gliální buňce. Rozdílné biologické chování je pak způsobeno náhodnými genetickými změnami při klonální expanzi. Pohled na tuto problematiku se díky přibývajícím znalostem o molekulárně genetických abnormalitách u těchto skupin glioblastomů změnil a dnes převládá názor odlišných buněčných prekurzorů. Pacienti s primárním glioblastomem jsou ve srovnání se sekundárním většinou starší (medián věku 62 vs. 45 let), častěji jde o muže (poměr k ženám 1,46 vs. 1,16) a klinické potíže před stanovením diagnózy mají kratší trvání (kolem 3 vs. 15 měsíců). Rozdílná je i lokalizace onemocnění. Primární glioblastom se objevuje v různých částech mozku, kdežto u sekundárního glioblastomu je častější výskyt ve frontálních lalocích (16). Zásadní rozdíl je také v přežití, kdy u sekundárních glioblastomů je délka života od diagnózy více než 2x delší než u glioblastomů primárních (17,18). Určit na základě klasického histopatologického nálezu, zda se jedná o primární či sekundární glioblastom, je velmi problematické. Ke specifikaci je nutné doplnit molekulárně genetické vyšetření. V první řadě jde o vyšetření mutace genu *IDH*, jejíž absence je znakem primárního glioblastomu (dále viz kapitola WHO klasifikace) (19). Pro primární glioblastomy je dále typická především amplifikace/overexprese genů pro tyrozinkinázové receptory (např. *EGFR*, *PDGFR*, *MET*, *IGFR*), která vede k hyperaktivaci nitrobuněčných signálních drah PI3K/AKT a RAS/MAPK, jejímž důsledkem je zvýšená nádorová proliferace a angiogeneze. Na patologické aktivaci výše uvedených drah se dále podílí inaktivace nádorových supresorů (např. *PTEN* u PI3K/AKT a *NF1* u RAS/MAPK). U sekundárních glioblastomů dochází k postupné malignizaci nízkostupňových astrocytomů, a to často za přispění poškozených epigenetických regulací (mutace genu *IDH*, G-CIMP, metylace promotoru genu pro *MGMT*). Bývají zde postiženy kontrolní mechanismy apoptózy (mutace genu nádorového supresoru *TP53*) a regulační procesy buněčného cyklu (např. mutace onkosupresorů *RBI*, *CDKN2A*). Přítomna bývá také mutace genu *ATRX*. Řada genetických změn se mezi primárními a sekundárními glioblastomy překrývá (16,20). Dle aktuálních doporučení mezinárodního konsorcia neuropatologů a klinických neuroonkologů cIMPACT-NOW (The Consortium to

Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – not official WHO) je na základě rozdílné biologie a chování glioblastomů dle přítomnosti IDH mutace zvažováno přeřazení IDH mutovaného glioblastomu k dalším IDH mutovaným gliomům. Termín glioblastom by dále pro tuto jednotku nebyl používán a byl by nově označován jako „astrocytom, IDH mutovaný (IDHmt), WHO grade IV. Název „glioblastom“ by tak zůstal rezervován jen pro IDH nemutované (wild-type, IDHwt) glioblastomy (13,21).

### 3.2 Molekulární klasifikace (molekulární podtypy)

Glioblastomy jsou velmi heterogenní skupinou onemocnění. Snaha o rozdělení glioblastomů do několika podskupin na základě podobného profilu genové exprese, a tak lepší určení prognózy pacienta, případně predikce odpovědi na léčbu, vedla v roce 2006 k vytvoření tzv. Kalifornské klasifikace. Ta obsahovala tři základní molekulární podtypy glioblastomů: proneurální, proliferální a mezenchymální (22). V roce 2010 pak byla publikována komplexní analýza na úrovni DNA, mRNA a mikroRNA v rámci projektu nádorových atlasů (The Cancer Genome Atlas – TCGA). Výsledky vedly k vytvoření známější tzv. Bostonské klasifikace. Podle této klasifikace byly glioblastomy rozděleny do čtyř podtypů – klasický, mesenchymální, proneurální a neurální (23). Po objevení IDH mutace, která hraje významnou roli v časných fázích karcinogeneze gliomů, došlo k další úpravě. Dle aktuálních znalostí rozlišujeme IDH mutované (IDHmt) glioblastomy, typické u mladých pacientů (< 50 let) s nejlepší prognózou a IDH nemutované (IDHwt) glioblastomy, které dále dělíme na tři hlavní podskupiny. U mladších pacientů se vyskytuje proneurální typ (RTK I – receptor tyrosine kinase I) s amplifikací genu *CDK4* a *PDGFR-alfa*, u starších pak typ klasický (RTK II) s amplifikací genu pro *EGFR* a delecí *CDKN2A/B* a typ mesenchymální s horší prognózou. U všech IDHwt glioblastomů se může vyskytovat mutace genu promotoru *TERT* (Obr. 4) (24). Bohužel ani přes známý mutační profil, typický pro jednotlivé podskupiny, nejsme zatím schopni tyto znalosti plně využít pro predikci léčebné odpovědi. V roce 2015 sice byla publikována retrospektivní analýza studie AVAglio u nově diagnostikovaných glioblastomů, dle které pacienti s proneurálním subtypem více profitovali z léčby bevacizumabem ve srovnání s ostatními typy (25), ale velká prospektivní randomizovaná klinická studie jednoznačně potvrzující tyto výsledky zatím neproběhla.

**Obr. 4: Molekulární klasifikace glioblastomů, upraveno podle Reifenbergera a kol. (24)**

Jak již bylo zmíněno, v procesu patogeneze glioblastomu hrají velkou úlohu také epigenetické mechanismy. Předmětem velkého zájmu jsou v posledních 10 letech mikroRNA (miRNA). Jde o velkou skupinu krátkých nekódujících RNA, které obsahují cca 18–25 nukleotidů. MiRNA se selektivně vážou na jednovláknové mRNA (messenger RNA), tím tlumí jejich translaci nebo vedou k jejich degradaci. MiRNA se tak podílí na malignizaci nízkostupňových gliomů, zasahují do regulace klíčových buněčných signálních drah (např. EGFR/PI3K/AKT, JAK/STAT), ovlivňují odpověď na chemoradioterapii, a jsou tak důležitými hráči nejen v patogenezi, ale i ve vývoji rezistence k léčbě. Na miRNA se dnes proto pohlíží nejen jako na prognostické a prediktivní faktory, ale také jako na potenciální terapeutické cíle (20,26).

### 3.3 Vlastní příspěvek k problematice

*Sana J, Busek P, Fadrus P, Besse A, Radova L, Vecera M, Reguli S, Stollinova Sromova L, Hilser M, Lipina R, Lakomy R, Kren L, Smrcka M, Sedo A, Slaby O. Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. Sci Rep. 2018; 8(1): 2836 (citace 27, příloha 1).*

*Typ časopisu: Jimp*

*IF = 4,011; JCR Category MULTIDISCIPLINARY SCI Q1*

V práci „**Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival**“ jsme si dali za cíl nalézt skupinu mikroRNA specifických pro kmenové buňky glioblastomu a určit jejich vztah k přežití. Na buněčných kulturách od 10 pacientů s glioblastomem jsme pomocí globální expresní analýzy identifikovali celkem 51 rozdílně exprimovaných miRNA mezi kmenovými a nekmenovými buňkami glioblastomu ( $p < 0,001$ ). Některé z nich korelovaly s expresí markerů kmenových buněk jako transkripční faktor Sox-2, cytoskeletální protein nestin nebo povrchový buněčný glykoprotein CD133. Po další statistické analýze s cílem zvýšit specificitu miRNA profilu u kmenových a nekmenových buněk glioblastomu nám zůstalo celkem 9 miRNA ( $p < 0,0001$ ). Všechny byly zvýšeně exprimované u kmenových buněk (miR-9-3p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p, miR-124-3p, miR-153-3p, miR-301a-3p, miR345-5p a miR-652-3p). Ve druhé fázi práce jsme se věnovali potenciálnímu využití námi identifikovaných miRNA. V TCGA databázi 485 pacientů s glioblastomy s dostupnými daty o miRNA profilech a celkovém přežití jsme našli shodu v 7 z 9 námi vybraných miRNA

(miR-9-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p, miR-153-3p, miR-301a-3p, miR-345-5p, miR-652-3p). Ty jsme pak použili pro vytvoření rizikového skóre, které by mohlo sloužit pro odhad prognózy pacientů s glioblastomy, a to nezávisle na stavu mutace IDH. Námi identifikované miRNA by také mohly být potenciálními terapeutickými cíli. V naší práci jsme potvrdili, že miRNA epigeneticky ovlivňují biologické chování kmenových buněk a mohou tak hrát důležitou roli při rezistenci k onkologické léčbě.

Besse A, Sana J, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, Hermanova M, Jancalek R, Reguli S, Lipina R, Svoboda M, Slampa P, Slaby O. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response. *Tumour Biol.* 2016; 37(6): 7719–7727 (citace 28, příloha 2).

Typ časopisu: *Jimp*

IF = 3,650; JCR Category ONCOLOGY Q2

Cílem práce „**MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response**“ bylo povrdit zapojení miR-338 do procesu proliferace a diferenciacie glioblastomových buněk a zjistit, zda by regulace její hladiny spolu s radioterapií měla potenciál pro terapeutické využití. Nejprve jsme popsali významně sníženou expresi miR-338-3p a miR-338-5p v tkáni glioblastomu u 40 pacientů ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání ( $p < 0,05$ ), což svědčí o zapojení těchto miRNA do procesu patogeneze onemocnění. Na třech buněčných liniích *in vitro* jsme poté zjistili, že po cíleném zvýšení exprese miR-338-5p dochází k poklesu proliferace nádorových buněk. Tento pokles byl způsoben zástavou buněčného cyklu, pravděpodobně inhibicí RHEB (důležitý aktivátor mTOR signální dráhy). Následně jsme kombinovali zvýšenou expresi miR-338-5p s gama ozářením buněčných kultur 5 Gy (zdroj Cesium 137). Opět bylo dosaženo snížení buněčné proliferace, ale na rozdíl od předchozího pokusu došlo k žádoucímu zvýšení apoptózy nádorových buněk. Terapeutické zvýšení hladiny miR-338-5p v buňkách glioblastomu v kombinaci s radioterapií by mohlo být další možností jak zlepšit léčebné výsledky.

## 4 Diagnostické metody u glioblastomu

### 4.1 Symptomy

Klinické projevy mozkových nádorů souvisí s jejich lokalizací, velikostí a rychlostí růstu. Potíže u pacientů s glioblastomy se na rozdíl od nízkostupňových gliomů rozvíjejí poměrně rychle a ve většině případů trvají jen týdny před stanovením diagnózy. Jsou způsobeny rychle rostoucím nádorem a okolním edémem, které zvyšují nitrolební tlak. Ten se nejčastěji projevuje bolestí hlavy, zvracením, instabilitou, poruchami psychiky, vizu, bradykardií a v konečném důsledku až poruchou vědomí. K ložiskovým příznakům při supratentoriální lokalizaci patří nejčastěji senzomotorický deficit, porucha řeči, kognitivních funkcí, potíže s krátkodobou pamětí, parciální či generalizované epiparoxysmy (častější u nízkostupňových gliomů). Při infratentoriální lokalizaci (netypická lokalizace pro glioblastom u dospělých) bývá v popředí mozečková a kmenová symptomatologie, případně parézy hlavových nervů. Vzácně a spíše v pozdních fázích onemocnění může dojít k postižení mening a míchy s příslušnou neurologickou symptomatologií, případně i k rozvoji vzdálených systémových metastáz (zjištěny častěji při autopsiích než v průběhu života pacienta) (29–32).

### 4.2 Zobrazovací metody

#### 4.2.1 Standardní zobrazovací metody

Zobrazovací metody jsou zásadní pro primární diagnostiku nitrolebních procesů, plánování léčby (operace, ozařování), hodnocení efektu léčby a následné sledování. Výpočetní tomografie (CT) je vzhledem ke své dostupnosti často metodou první volby, zvláště při diferenciální diagnostice akutních stavů. Ve vztahu k primárním mozkovým nádorům jde ale jen o vyšetření orientační. Základní zobrazovací metodou pro nádory mozku a míchy je magnetická rezonance (MR) a její modalities. V porovnání s CT vyšetřením poskytne MR lepší zobrazení mozkových struktur (výraznější tkáňový kontrast) a tím lépe odliší normální tkáň od patologické. Další výhodou je absence ionizujícího záření. CT vyšetření pro plánování a hodnocení efektu léčby proto využíváme jen v situacích, kdy nelze použít MR (např. MR nekompatibilní železné implantáty, kardiostimulátor). Základní MR vyšetření je složeno z kombinace několika sekvencí T1 a T2 vážených obrazů, FLAIR (fluid attenuated inversion recovery – zobrazení s potlačením signálu volné tekutiny a mozkomíšního moku), difuzně vážených obrazů (DWI – diffusion weighted imaging). T1 nativní sekvence je vhodná



pro detekci krvácení či reziduí derivátů hemoglobinu v nádoru, T2/FLAIR sekvence přináší informaci o rozsahu edému, případně podílu nízkostupňového gliomu. Glioblastomy jsou v T1 váženém obraze hypo- či izointenzní, s centrální hypointenzní částí odpovídající nekróze, v T2 váženém obraze jsou nehomogenní, převážně hyperintenzní, s okolním hyperintenzním lemem odpovídajícím edému, zvýrazněnému ve FLAIR sekvenci. Po intravenózní aplikaci kontrastní látky na bázi chelátů gadolinia dochází při poruše hematoencefalické bariéry k nepravidelnému syčení tumoru, často s převahou v periférii při přítomné centrální nekróze, která se nesytí (33). Pro zobrazení cévního řečiště lze použít MR angiografii nebo digitální subtrakční angiografii. Ke standardním doplňkovým metodám patří také vyšetření očního pozadí nebo elektroencefalografie.

#### 4.2.2 Pokročilé MR zobrazovací metody

S rozvojem metody magnetické rezonance se do praxe postupně dostávají pokročilé techniky MR zobrazení. Jejich využití v praxi je nutno konzultovat s neuroradiologem. Při diferenciální diagnostice nitrolebních ložiskových procesů, odhadu stupně malignity a hodnocení účinnosti léčby lze použít difuzně vážené zobrazení (DWI). S restrikcí difuze souvisí vyšší buněčnost tumoru, a tím i předpokládaný vyšší stupeň malignity. Mezi varianty difuzní MR patří traktografie, které mohou být přínosné při plánování neurochirurgického výkonu s cílem co nejradikálnější resekce, bez poškození důležitého mozkového centra či nervové dráhy. Další doplňkovou metodou, vhodnou při primární diagnostice, určení gradingu, při diferenciální diagnostice recidivy a pseudoprogrese je perfuzní MR, která hodnotí průtok krve mozkem (34). Bližší informace o složení intrakraniálních lézí může poskytnout MR spektroskopie. Jde o neinvazivní metodu, která je založena na hodnocení přítomnosti a koncentrace metabolitů uvnitř vyšetřované tkáně. U gliomů jde nejčastěji o N-acetylaspartát (NAA), cholin (Cho), kreatinin (Cr), lipidy (Lip), laktát (Lac), myoinositol (mI) a glutamát-glutamin (Glx). Za nejvíce specifický nádorový marker je dnes považován cholin. Jeho zvýšená koncentrace a poměr Cho/NAA a Cho/Cr podporuje diagnózu nádorového onemocnění. Dle koncentrace metabolitů a jejich poměrů může MR spektroskopie pomoci odlišit nádorové léze od nenádorových, rozpoznat primární nádor od metastáz, v případě primárního nádoru odhadnout histologický typ a stupeň malignity, určit rozsah nádoru, ukázat jeho agresivní fokusy vhodné k cílené stereotaktické biopsii či radioterapii (35,36). Dále může být pomocnou metodou při diferenciální diagnostice recidivy nádoru a postradiačních změn (pseudoprogrese, poradiační nekrózy). Přes výše uvedený potenciál je třeba na MR

spektroskopii stále pohlížet jako na nastavbové pomocné vyšetření a správnou diagnózu zpravidla určit v kombinaci s výše uvedenými metodami (strukturální MR, difuzní MR, perfuzní MR, případně PET/CT, PET/MR).

#### 4.2.3 Pokročilé vyšetřovací metody z oblasti nukleární medicíny

Pozitronová emisní tomografie je v onkologii již standardní diagnostickou metodou. Nejvíce používaným radiofarmakem je stále  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglukóza ( $^{18}\text{F}$ -FDG), která odráží metabolismus nádorových buněk (glykolýzu). Vzhledem k přirozeně vysoké metabolické aktivitě ve zdravé mozkové tkáni (šedá hmota) není  $^{18}\text{F}$ -FDG ideálním radiofarmakem pro zobrazení mozkových tumorů (vysoká metabolická aktivita pozadí). Z tohoto důvodu se do popředí zájmu dostala především aminokyselinová radiofarmaka, která jsou markerem proteosyntézy, a tudíž i proliferace nádorových buněk. Ve srovnání s  $^{18}\text{F}$ -FDG mají nízkou kumulaci ve zdravé mozkové tkáni a naopak vysokou v nádoru. Patří mezi ně  $^{11}\text{C}$ -MET ( $^{11}\text{C}$ -methionin),  $^{18}\text{F}$ -FET ( $^{18}\text{F}$ -fluoroethyltyrosin) a  $^{18}\text{F}$ -FDOPA ( $^{18}\text{F}$ -fluorodihydroxyphenylalanin). Dalším a u nás často používaným radiofarmakem pro zobrazení mozkových nádorů je  $^{18}\text{F}$ -FLT ( $^{18}\text{F}$ -fluorothymidin). Jedná se o analog pyrimidinových nukleotidů, který koreluje se syntézou DNA a proliferací nádorových buněk. Nadále jsou vyvíjena další radiofarmaka (fluorocholin – marker lipidového metabolismu, fluoromizonidazol – marker hypoxie a další) (37,38). I přes pokroky v oblasti nukleární medicíny je PET vyšetření také nutno brát jako doplňkovou metodu, která zvyšuje senzitivitu a specifitu MR vyšetření. PET zobrazení s novými radiofarmaky může přispět k přesnější diagnostice nejasných lézí (podezření na nádor), určit fokusy maligního zvratu u nízkostupňových gliomů vhodných k cílené stereotaktické biopsii. Dále může být využito při plánování radioterapie, k hodnocení efektu léčby a v poslední řadě může být další pomocnou metodou při diferenciální diagnostice poléčebných změn a nádorové recidivy.

#### 4.2.4 Hodnocení léčebné odpovědi, pseudoprogrese a pseudoodpověď

K hodnocení léčebné odpovědi byla v minulosti vypracována řada kritérií. U solidních nádorů se dnes nejvíce užívají WHO a RECIST kritéria, případně jejich modifikace při použití léčby s unikátním mechanismem účinku, jako je imunoterapie. Vzhledem ke specifické lokalizaci a biologickému chování glioblastomu, které je odlišné od jiných extrakraniálních nádorů, nejsou výše uvedená kritéria vhodná. V roce 1990, kdy hlavní zobrazovací metodou

mozkových nádorů bylo ještě CT vyšetření, byla publikována MacDonaldova kritéria (39). Ta kromě měření sytících se lézí ve dvou rozměrech reflektovala i klinický stav pacienta a užívání kortikosteroidů. S příchodem MR vyšetření, zavedením chemoradioterapie s temozolomidem (CHT/RT), s následným výskytem fenoménu pseudoprogrese nejčastěji do 12 týdnů po ukončení CHT/RT (u cca 20–30 % pacientů, častěji při metylaci MGMT) (40–42) se ukázala MacDonaldova kritéria jako nedostačující a byla postupně nahrazena RANO kritérii (Response Assessment Criteria in Neuro-Oncology). RANO kritéria již komplexněji popisují velikost nádorové léze (včetně nesyťící se porce v T2/FLAIR zobrazení) a zohledňují možnost pseudoprogrese během prvních 12 týdnů po léčbě chemoradioterapií. Pro uzavření nálezu jako progrese onemocnění časně po léčbě chemoradioterapií je vyžadována progredující léze mimo ozařované pole nebo její histologická verifikace (43). RANO kritéria procházejí dalšími úpravami, především pro potřeby klinických studií. S pseudoprogresí se můžeme potýkat také při použití imunoterapie, proto byla vypracována tzv. iRANO kritéria (44). Při užití léků s antiangiogenním účinkem se naopak můžeme setkat s pseudoodpovědí. Po jejich aplikaci totiž dochází k částečné úpravě předtím zvýšené propustnosti nádorových cév pro gadolinium, což se na kontrolním MR vyšetření projeví zmenšením syťící se části tumoru (45). Také byla provedena modifikace RANO kritérií pro hodnocení efektu léčby u mozkových metastáz (RANO-BM) (46).

#### 4.2.5 Vlastní příspěvek k problematice

*Kazda T, Bulik M, Pospisil P, Lakomy R, Smrcka M, Slampa P, Jancalék R. Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging. Neuroimage Clin. 2016; 11: 316–321 (citace 47, příloha 3).*

Typ časopisu: *Jimp*

IF = 4,348; JCR Category NEUROIMAGING Q1

V práci „Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging“ jsme si dali za cíl využít kombinace MR spektroskopie (MRS) a difuzní MR (DWI) pro rozlišení recidivy glioblastomu od poléčebných změn po konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem. Do naší prospektivní studie jsme zařadili celkem 39 pacientů po makroskopicky radikálním resekčním výkonu verifikovaným pooperační MR,

léčených Stuppovým režimem a suspektní recidivou na strukturálním MR vyšetření. U každého pacienta byla provedena MR spektroskopie s hodnocením koncentrací metabolitů uvnitř suspektního ložiska (NAA – N-acetylaspartát a N-acetylaspartylglutamát, Cho – cholin, Cr – kreatinin, Lip – lipidy, Lac – laktát) a jejich poměrů. Cholin je markerem buněčné membránové integrity a jeho vyšší koncentrace souvisí s proliferací nádorových buněk, zatímco NAA je marker denzity a viability neuronů. U všech pacientů bylo provedeno MR DWI s kvantifikací difuze vody ve vyšetřované oblasti pomocí ADC (apparent diffusion coefficient) map. Místa s poklesem difuze odpovídají zvýšené buněčnosti při proliferaci nádoru. Konečné odlišení recidivy od poléčebných změn (pseudoprogrese, event. nekróza) bylo stanoveno na základě histologie z biopsie u 67 % pacientů nebo na základě vývoje na kontrolních MR (zbývajících 33 % pacientů odmítajících invazivní výkon). Vypočtené cut-off hodnoty pro diagnózu recidivy byly validovány na historickém souboru. Z našeho sledování pak vznikly závěry použitelné pro klinickou praxi. Poměr Cho/NAA  $\geq 1,3$  a NAA/Cr  $\leq 0,7$  na MRS a hodnota ADC  $\leq 1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$  na DWI s vysokou senzitivitou a specificitou odpovídají recidivě glioblastomu ( $p < 0,001$ ). Na validačním souboru jsme výsledky potvrdili, a to především pro Cho/NAA a hodnotu ADC. Kombinací DWI s ADC  $\leq 1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$  (senzitivita 98,3 %, specificita 100 %) a MRS s Cho/NAA  $\geq 1,3$  (senzitivita 100 %, specificita 94,7 %) s vysokou pravděpodobností můžeme pomocí neinvazivního přístupu přispět k rozlišení časné recidivy glioblastomu od pseudoprogrese po chemoradioterapii. Je nutné však mít na paměti, že jde o pomocné metody, které nejsou schopny spolehlivě odlišit kombinaci více možností, včetně podílu nekrotických změn, které mohou být součástí jak recidivy, tak poléčebných změn.

*Vašina J, Svoboda M, Lakomý R, Kazda T, Adam J, Řehák Z. Využití  $^{11}\text{C}$ -methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku – soubor 16 pacientů. NuklMed 2018; 7(4): 62–68 (citace 48, příloha 4).*

*Typ časopisu: Jost*

Cílem práce „**Využití  $^{11}\text{C}$ -methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku - soubor 16 pacientů**“ byla publikace našich zkušeností s  $^{11}\text{C}$ -methioninem z akademické klinické studie fáze 1, kde jsem byl hlavním řešitelem. Do studie jsme zařadili celkem 18 pacientů, hodnoceno bylo 16 z nich. Ve většině případů se jednalo o rekurentní glioblastom po chemoradioterapii s temozolomidem (12 pacientů), dva pacienti měli astrocytom grade II, jeden pacient oligodendrogliom grade II a jeden pacient metastázu

germinálního nádoru varlete. Při snímání aktivity v odstupu 5, 20 a 35 minut po intravenózní aplikaci radiofarmaka jsme prokázali dostatečně zvýšenou akumulaci  $^{11}\text{C}$ -methioninu v tumoru s hodnotami SUV (standartized uptake value) 2,5krát vyššími než ve zdravé mozkové tkáni a také bezpečnost vyšetření. U prvních 12 pacientů byl podán  $^{11}\text{C}$ -methionin s aktivitou 500 MBq, u zbývajících 4 pacientů pak s nižší aktivitou 350 MBq. Neshledali jsme významné rozdíly v měřených hodnotách  $\text{SUV}_{\text{max}}$  mezi těmito pacienty. Na základě našich výsledků můžeme doporučit methioninový PET jako metodu vhodnou k zobrazení high-grade gliomů nebo při maligní transformaci low-grade gliomů (místa vhodná pro biopsii atd.). Nevýhodou  $^{11}\text{C}$ -methioninu je krátký poločas rozpadu (cca 20 minut), což vyžaduje nutnost výroby radiofarmaka v cyklotronu přímo v PET centru.

### 4.3 WHO klasifikace 2016 – princip integrované diagnózy

Histologické vyšetření je nezbytné k potvrzení nádorového onemocnění, odlišení primárního nádoru od sekundárního (metastázy), případně od jiného neonkologického procesu. Na rozdíl od jiných solidních nádorů se u primárních nádorů mozku nepoužívá klasická TNM klasifikace, protože nevypovídá dostatečně o prognóze onemocnění. Dřívější WHO klasifikace mozkových nádorů z roku 2007 byla založena na klasických histopatologických kritériích, která vedla k určení histologického typu onemocnění (tkáňový původ) a stupně diferenciaci (buněčnost, jaderné atypie, mitózy, mikrovaskulární proliferace a nekrózy). Díky intenzivnímu výzkumu u gliomů byly objeveny nové molekulární biomarkery (především mutace genu *IDH* a kodelece 1p/19q), jejichž znalost se ukázala jako zásadní, protože vedla k lepšímu odhadu prognózy než zavedená WHO klasifikace. Nejlepší prognózu měli pacienti s mutací *IDH* a kodelecí 1p/19q, následovala skupina s mutací *IDH*, bez kodelece 1p/19q a nejhorší prognózu měli pacienti bez mutace *IDH*. Z tohoto důvodu bylo v roce 2016 přistoupeno k 4. revizi WHO klasifikace nádorů CNS, která již kromě histopatologické diagnózy a stupně diferenciaci (gradingu) zohledňuje i molekulární a genetické informace – koncept tzv. integrované diagnózy (19). Nová WHO klasifikace mozkových nádorů definuje difuzní gliomy primárně podle přítomnosti nebo nepřítomnosti mutace *IDH* (1 nebo 2) a kombinované ztráty 1p/19q. Diagnóza oligodendrogliomu dnes vyžaduje přítomnost jak mutace *IDH* (*IDHmt*), tak kodelece 1p/19q. Astrocytom je dělen na nádory bez mutace *IDH* (*IDHwt*) a s mutací *IDH* (*IDHmt*). Nádory *IDHmt* mají příznivější prognózu, tendenci k pomalejšímu růstu a nacházejí se převážně ve frontálním laloku, zatímco *IDHwt* gliomy spíše v temporálním laloku (49,50). Difuzní astrocytomy *IDHwt* nejsou homogenní

jednotkou, protože některé mají molekulární rysy a biologické chování podobné prognosticky nepříznivým IDHwt glioblastomům. V budoucnu se proto očekává další subklasifikace této skupiny na základě nových biomarkerů. Pokud není nebo nemohla být molekulární analýza provedena a diagnóza je stanovena jen na základě morfologického obrazu, je za názvem jednotky uvedeno označení NOS (not otherwise specified), čímž je oznámeno, že vyšetření není kompletní. Znalost těchto molekulárních a genetických charakteristik dnes hraje velmi důležitou roli především pro adjuvantní léčbu. K základním molekulárně genetickým biomarkerům, které se staly součástí nové WHO klasifikace, patří kromě mutace genu *IDH* a kodelece 1p/19q také mutace genu pro histony *H3-K27M*, definující prognosticky závažný středočarový gliom grade IV (Tab. 1) (19,51). K diagnostickým a prognostickým účelům můžeme navíc využít i znalost mutace genu *ATRX*, mutace genu *TERT*, případně *EGFR* amplifikace, viz diagnostický algoritmus difúzních gliomů (Obr. 5 a Obr. 6) (52). Stav metylace promotoru genu pro O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA metyltransferázu (MGMT) sice není součástí nové WHO klasifikace, ale jeho vyšetření má význam prognostický a prediktivní, zvláště u IDH nemutovaných gliomů při zvažované léčbě s alkylačními cytostatiky jako temozolomid. Díky znalosti genotypu jsme dnes schopni přesněji určit histologický typ gliomu, lépe odhadnout prognózu onemocnění, predikovat odpověď na léčbu, a tím stanovit optimální léčebný postup. Superiorita genotypu nad fenotypem je zjevná při nejasných histologických nálezech, kdy podle morfologického obrazu nelze s jistotou specifikovat typ gliomu. Příkladem mohou být dříve uváděné oligoastrocytomy s histologickými znaky jak astrocytomy, tak oligodendrogliomu. Dnes při tomto fenotypu doplníme molekulárně genetickou analýzu a s větší přesností určíme, o jaký typ gliomu se jedná. Stratifikace pacientů na základě integrované diagnózy se ukazuje jako nezbytná také pro správné zařazení pacientů do klinických studií s novými léky. Zvyšuje se tak poté validita závěrů ze studií a reprodukovatelnost výsledku.

**Tab. 1: WHO klasifikace nádorů CNS, revidované 4. vydání, 2016 – mutace IDH, kodelece 1p/19q a mutace H3-K27M jako součást klasifikace (51)**

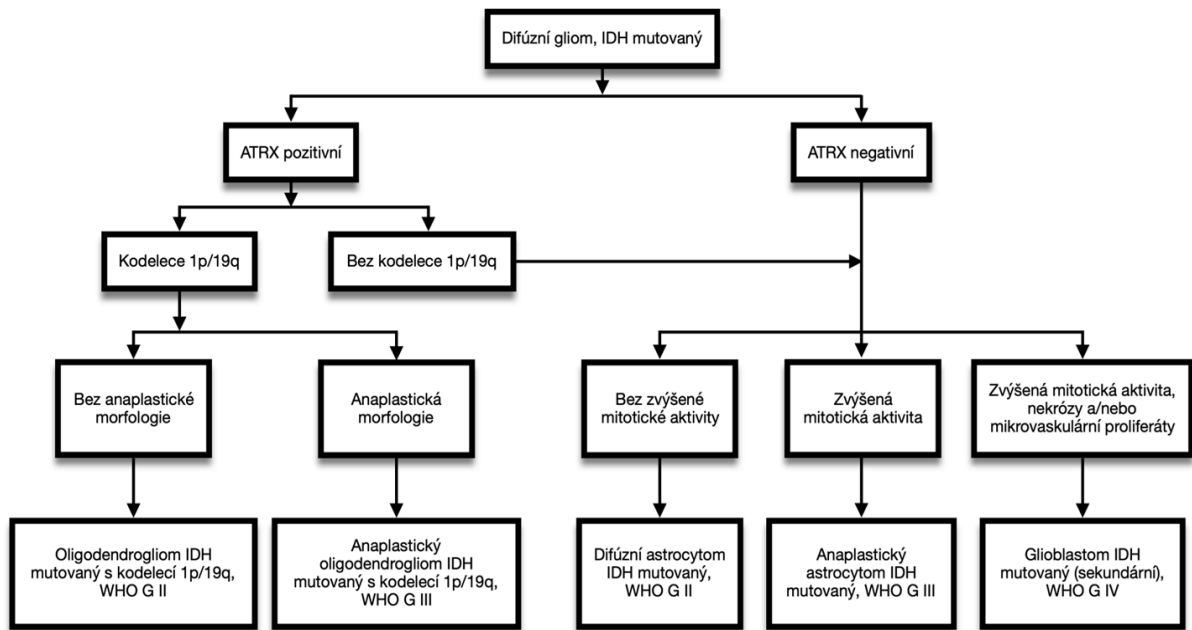
| <b>Difuzní infiltrující astrocytární a oligodendroglální nádory</b> |        | <b>WHO grade</b> |
|---|--------|------------------|
| Difuzní astrocytom, IDH-mutovaný (mt)                               | 9400/3 | II               |
| Gemistocytární astrocytom, IDH-mutovaný (varianta)                  | 9411/3 | II               |
| <i>Difuzní astrocytom, IDH-wildtype (wt)</i>                        | 9400/3 | II               |
| Difuzní astrocytom, NOS   | 9400/3 | II               |
| Anaplastický astrocytom, IDH-mutovaný                               | 9401/3 | III              |
| <i>Anaplastický astrocytom, IDH-wildtype</i>                        | 9401/3 | III              |
| Anaplastický astrocytom, NOS  | 9401/3 | III              |
| Glioblastom, IDH-wildtype   | 9440/3 | IV               |
| Obrovskobuněčný glioblastom (varianta)                              | 9441/3 | IV               |
| Gliosarkom (varianta)   | 9442/3 | IV               |
| <i>Epiteloidní glioblastom (provizorní varianta)</i>                | 9440/3 | IV               |
| Glioblastom, IDH-mutovaný   | 9445/3 | IV               |
| Glioblastom, NOS  | 9440/3 | IV               |
| Difuzní středočarový gliom, H3 K27M-mutovaný                        | 9385/3 | IV               |
| Oligodendrogliom, IDH-mutovaný, s kodelečí 1p/19q                   | 9450/3 | II               |
| Oligodendrogliom NOS  | 9450/3 | II               |
| Anaplastický oligodendrogliom, IDH-mutovaný, s kodelečí 1p/19q      | 9451/3 | III              |
| <i>Anaplastický oligodendrogliom NOS</i>                            | 9451/3 | III              |
| <i>Oligoastrocytom, NOS</i>   | 9382/3 | II               |
| <i>Anaplastický oligoastrocytom, NOS</i>                            | 9382/3 | III              |
| <b>Ostatní astrocytární nádory</b>                                  |        |                  |
| Pilocytární astrocytom  | 9421/1 | I                |
| Pilomyxoidní astrocytom   | 9425/3 | **               |
| Subependymální obrovskobuněčný astrocytom                           | 9384/1 | I                |
| Pleomorfní xantoastrocytom  | 9424/3 | II               |
| Anaplastický pleomorfní xantoastrocytom                             | 9424/3 | III              |
| <b>Ostatní gliomy</b>   |        |                  |
| Chordoidní gliom 3. komory  | 9444/1 | II               |
| Angiocentrický gliom  | 9431/1 | I                |
| Astroblastom  | 9430/3 | **               |
| <b>Ependymové nádory</b>  |        |                  |
| Subependymom  | 9383/1 | I                |
| Myxopapilární ependymom   | 9394/1 | I                |
| Ependymom   | 9391/3 | II               |
| Papilární ependymom   | 9393/3 | II               |
| Světlobuněčný ependymom   | 9391/3 | II               |
| Tanycytický ependymom   | 9391/3 | II               |
| Ependymom, <i>RELA</i> fúze pozitivní                               | 9396/3 | II–III           |
| Anaplastický ependymom  | 9392/3 | III              |

\* Jednotky vyznačení kurzívou jsou provizorní

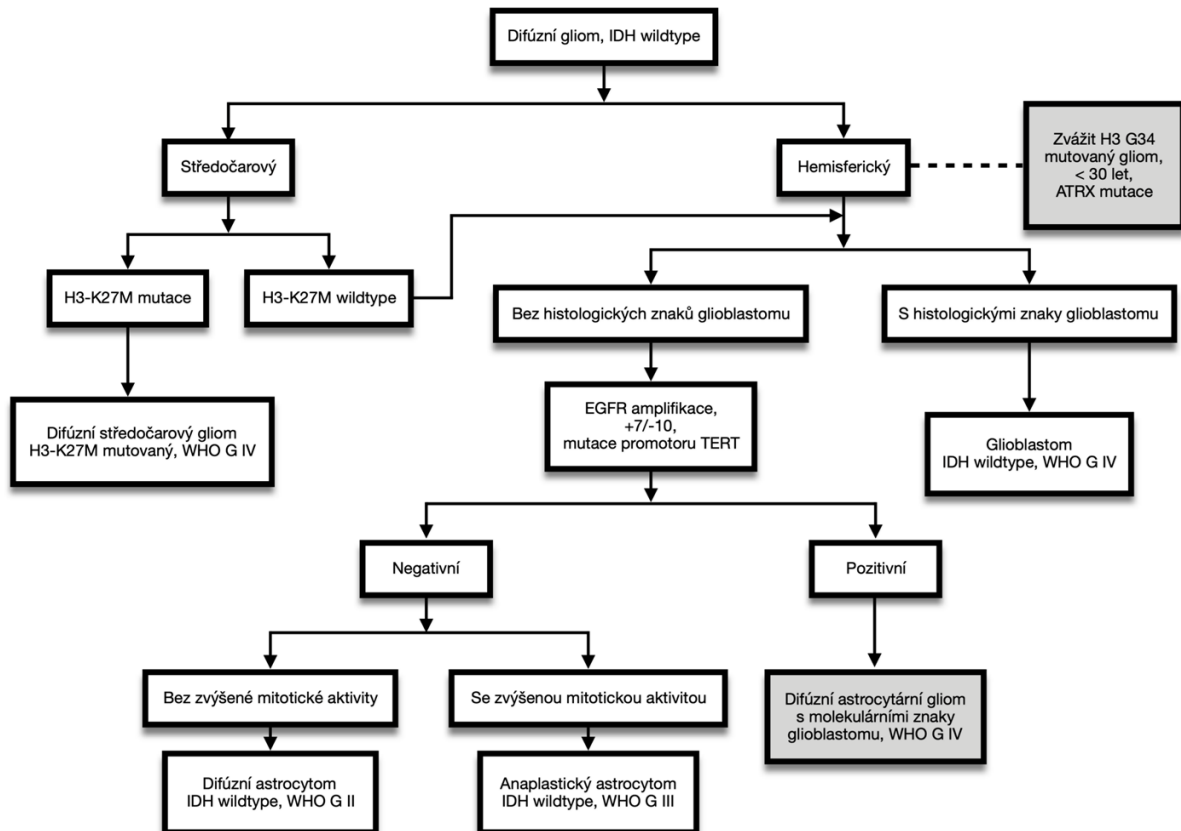
\*\*Definitivní grading není stanoven

\*\*\*NOS (not otherwise specified): diagnóza histologická, molekulární informace nedostupné

**Obr. 5: Integrovaná diagnostika difúzních gliomů, IDH mutovaných, podle Hendrycha a kol. (52)**



**Obr. 6: Integrovaná diagnostika difúzních gliomů, IDH nemutovaných, podle Hendrycha a kol. (52)**





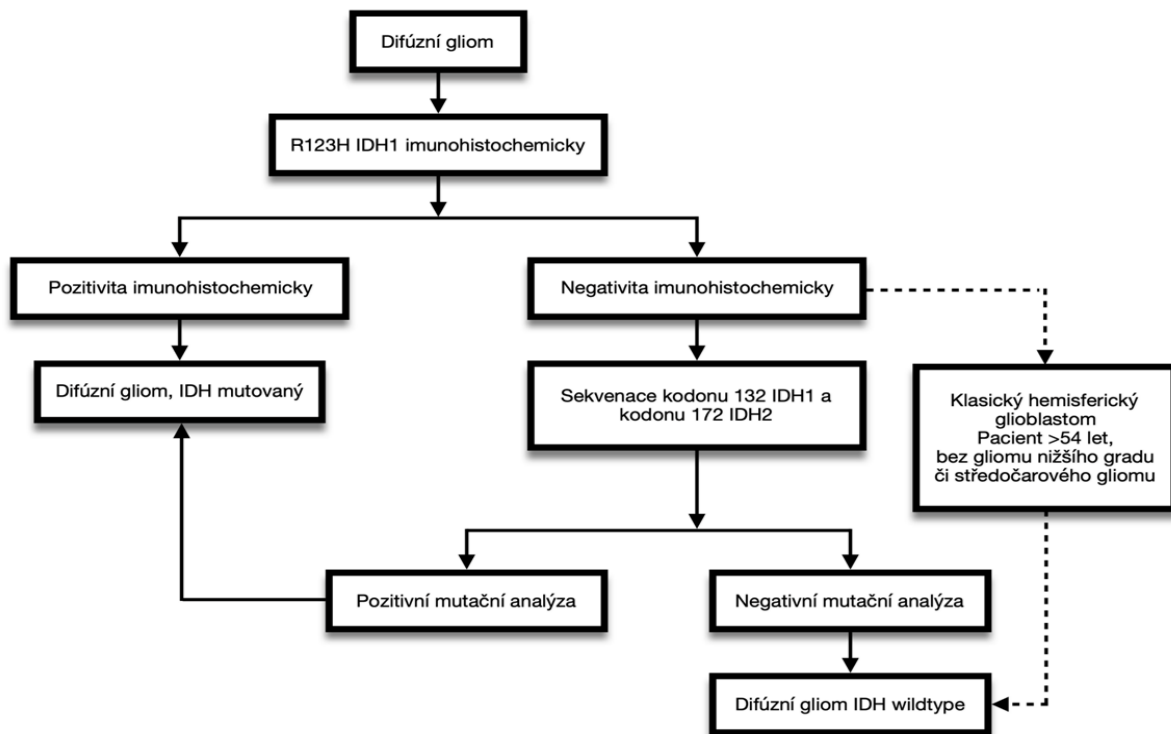
## 4.4 Molekulární diagnostika

### 4.4.1 Základní molekulárně genetické biomarkery u gliomů

#### *Mutace genu pro isocitrátdehydrogenázu 1 a 2 (IDH1 a IDH2)*

Mutace genu pro IDH 1 (kodon 132) byla nejprve objevena u malé části glioblastomů již v roce 2009 (sekundární glioblastomy) (23). Další výzkum pak ukázal, že se mutace IDH1 a později méně frekventní mutace IDH2 (kodon 172) vyskytuje ve vysokém procentu především u adultních nízkostupňových gliomů (80–90 %). Isocitrátdehydrogenáza je důležitý enzym citrátového cyklu. Jeho funkcí je katalyzovat přeměnu isocitrátu na alfa-ketoglutarát. Mutací genu pro IDH dochází ke změně funkce enzymu, která pak hraje zásadní roli v onkogenezi gliomů. Jednak vzniká menší množství alfa-ketoglutarátu, ale především dochází díky aberantní IDH k přeměně alfa-ketoglutarátu na 2-hydroxyglutarát (2-HG). Tento nový (onko)metabolit je pak příčinou hypermetylace histonů, která brání transkripci důležitých tumor supresorových genů (53). Mutace IDH1/2 je dnes považována za faktor diagnostický (gliom vs. reaktivní gliosa) a především silně prognostický. Nádory s mutací IDH1/2 mají významně lepší prognózu než bez mutace (54–56). V budoucnu bude pravděpodobně i faktorem prediktivním při cílené léčbě IDH inhibitory. IDH1 mutace v kodonu 132H se dnes stanovuje u všech gliomů (grade II–IV) imunohistochemicky (IHC). Pokud je IHC analýza negativní, tak by mělo proběhnout genové sekvenování (kodon 132 IDH1 a kodon 172 IDH2) k vyloučení vzácnějších mutací IDH (cca 10 % pacientů). Výjimkou jsou jen pacienti nad 54 let věku, s nestředočarovými glioblastomy, bez gliomu nižšího gradu nebo gliomu ve středočarové lokalizaci v anamnéze. Zde je znalost IDH1 dle IHC analýzy dostačující (Obr. 7).

**Obr. 7: Algoritmus pro vyšetření mutace genů IDH, podle Hendrycha a kol. (52)**



### ***Kodelece 1p/19q***

Jedná se o nebalancovanou translokaci krátkého ramene 1. chromozomu a dlouhého ramene 19. chromozomu, která je diagnostickým a patognomickým markerem pro oligodendrogliomy. Její přítomnost je znakem lepší prognózy a predikuje citlivost k chemoterapii (57). Stanovuje se nejčastěji pomocí FISH (fluorescence in situ hybridization). Pro riziko falešné pozitivivity jsou doporučovány metody umožňující diagnostikovat kompletní ztráty chromozomálních ramének, např. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), array CGH (comparative genomic hybridization) nebo CNV (copy number variation) pomocí NGS (Next Generation Sequencing) (52). Podmínkou pro diagnózu oligodendrogliomu musí být kromě kodelece 1p/19q i přítomnost IDH mutace. Pokud není mutace IDH přítomna, jde pravděpodobně o nekompletní kodeleci a průběh onemocnění je podstatně horší, podobný IDHwt astrocytomu.

### ***Metylce promotoru genu MGMT***

O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA metyltransferáza (MGMT) je enzym, který se podílí na opravách poškozené DNA, např. působením alkylačních cytostatik (temozolomid, lomustin). Metylací

promotoru genu *MGMT* dochází k zástavě transkripce genu *MGMT* a následnému snížení hladiny účinného enzymu. Po aplikaci cytostatické léčby pak vážně oprava poškozené DNA tumoru, což vede k zániku nádorových buněk. Metylace promotoru genu *MGMT* je dnes považována za významný prognostický marker a také prediktor léčebné odpovědi k alkylačním cytostatikům u IDHwt high-grade gliomů. V případě glioblastomů se metylace *MGMT* vyskytuje u cca 35–40 % pacientů. Dosud však není vyřešena jednotná metodika testování metylace *MGMT* promotoru (např. metylačně specifická PCR nebo metoda bisulfitové konverze DNA s HRM – high resolution melting analýzou) a interpretace závěrů („cut-off“ hranice pro pozitivitu výsledku). IHC metoda není pro testování doporučena.

### ***H3-K27M mutace***

Jedná se o mutaci v kodonu 27 genů *H3F3A* nebo *HIST1H3B/C*. Vyskytuje se u difúzních středočarových gliomů (thalamus, mozkový kmen, mícha). Je častější u dětí a mladých dospělých. Je markerem diagnostickým a markerem špatné prognózy podobné jako u primárních glioblastomů (IDHwt). Ve srovnání s IDHwt nestředočarovými glioblastomy je zde menší frekvence metylace *MGMT*. Stanovení mutace se provádí pomocí IHC nebo genovým sekvenováním (58).

### ***ATRX mutace***

Ztráta jaderné exprese *ATRX* (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X linked) hraje také roli v onkogenezi. *ATRX* kóduje protein regulující chromatinovou strukturu telomer. Jeho ztráta umožňuje alternativní prodlužování telomer, což vede k nekonečnému množení nádorových buněk. Vyskytuje se současně s IDH mutací a mutací genu *TP53* a je diagnostickým markerem pro astrocytomy (grade II a III, případně sekundární glioblastom). Její přítomnost je také pozitivním prognostickým faktorem (IDHmt a *ATRX*mt astrocytom má lepší prognózu než IDHmt a *ATRX*wt astrocytom) (51). Stanovení probíhá pomocí imunohistochemie.

### ***TERT mutace***

Telomerázová reverzní transkriptáza (*TERT*) je funkční jednotkou telomerázy, která brání zkracování telomer při buněčném dělení. Mutace promotoru genu *TERT* se nejčastěji objevují u oligodendrogliomů a primárních glioblastomů. Naopak se téměř nevyskytují v IDH mutovaných astrocytomech, kde se v procesu zachování délky telomer uplatňuje mutace genu *ATRX* (52).

### ***Další významné molekulární biomarkery u gliomů***

RELA fúzní gen *C11orf95/RELA* definuje prognosticky nepříznivý supratentoriální ependymom u dětí (nová jednotka ve WHO 2016).

Mutace genů *TP53*, *RB1*, *MDM2*, *PTEN*, *BRAF*, *EGFR*, *CDKN2A*, *PDGFRA* nebo fúze *NTRK*, *MET* a *FGFR* jsou další potenciálně významné biomarkery u gliomů, které lze testovat. Zvláště amplifikace *EGFR* a jeho mutační varianty *EGFRvIII* jsou stále předmětem velkého zájmu pro jejich vysoký výskyt u glioblastomu. Potenciál této molekuly se však zatím nepodařilo plně využít, viz kapitola 5.4.2 Cílená léčba.

#### **4.4.2 Diagnostické biomarkery**

##### ***IDH mutace***

- Při nejasných histologických nálezech přítomnost mutace potvrzuje diagnózu difuzního infiltrativního gliomu, nebo odlišení gliomu bez mutace *IDH*
- Vyskytuje se u grade II a III astrocytomů a oligodendrogliomů a grade IV sekundárních glioblastomů. Primární glioblastomy nemají *IDH* mutaci (*IDHwt*)
- Neinfiltrativní gliomy grade I (pilocytický astrocytom a gangliogliomy) nemají mutaci *IDH*. Její přítomnost tudíž znamená minimálně grade II infiltrativní gliom

##### ***Kodelece 1p/19q***

- Jedná se o marker potvrzující diagnózu oligodendrogliomu při nejasných histopatologických nálezech.
- *IDH* mutované gliomy bez mutace *ATRX* by měly být testovány na kodeleci 1p/19q k vyloučení oligodendrogliomu. Oligodendrogliom by měl mít jak *IDH* mutaci, tak současně kodeleci 1p/19q. Pokud není *IDH* mutace přítomna, tak není vyšetření na kodeleci indikováno (59).

##### ***H3-K27M***

- *H3-K27M* mutace se nejčastěji vyskytuje u pediatrických středočarových gliomů, ale může se vyskytovat i u dospělých pacientů se středočarovým gliomem. Její

přítomnost potvrzuje infiltrativní gliom, což může být přínosné při často malém vzorku tkáně z rizikové biopsie (58).

#### ***ATRX mutace***

- ATRX mutace je spojena s mutací IDH a je typická pro astrocytomy. Mutace ATRX u IDHwt glioblastomu dle IHC by měla být podnětem genového sekvenování IDH (vyloučení vzácnější IDH1 a 2 mutace) (60).

#### ***TERT mutace***

- Přítomnost mutace TERT, IDH a kodelece 1p/19q je typická pro oligodendrogliomy. Absence TERT mutace při IDH mutaci svědčí pro astrocytom. TERT mutace se dále často vyskytuje u primárních IDHwt glioblastomů, zvláště pokud je přítomna také amplifikace genu pro EGFR (61).

### **4.4.3 Prognostické biomarkery**

#### ***IDH mutace***

- IDH mutace je příčinou G-CIMP fenotypu (glioma CpG island methylator phenotype), a souvisí proto i s častou přítomností metylace MGMT (55).
- Přítomnost IDH mutace je markerem příznivé prognózy, v případě glioblastomu silnějším než metylace promotoru genu *MGMT* (62). Gliomy grade II a III bez mutace IDH mají naopak vysoké riziko agresivního průběhu podobně jako u IDHwt glioblastomu (55,63).

#### ***Kodelece 1p/19q***

- Kodelece 1p/19q byl jako marker příznivé prognózy potvrzen v několika klinických studiích u grade II a III oligodendrogliomů (64–68).

#### ***Metylace promotoru genu pro MGMT***

- Metylace promotoru genu pro MGMT je silně spojena s IDH mutací a G-CIMP fenotypem (55).

- Dle řady klinických studií metylace promotoru MGMT potvrdila roli pozitivního prognostického faktoru, zvláště u IDHwt glioblastomů (69). Dle metaanalýzy 34 studií s 4 097 pacienty s glioblastomem se jednoznačně ukázalo lepší celkové přežití u skupiny s metylací MGMT vs. bez metylace (HR 0,494; p = 0,001) (70).

### ***H3-K27M***

- Gliomy s H3-K27M mutací nemívají metylaci MGMT a H3-K27M mutace je negativním prognostickým faktorem jak u dětí, tak u dospělých (58).

### ***ATRX mutace***

- Její přítomnost je pozitivním prognostickým faktorem (IDHmt a ATRXmt astrocytom má lepší prognózu než IDHmt a ATRXwt astrocytom) (51).

### ***TERT mutace***

- Přítomnost mutace TERT u IDHwt glioblastomu je negativním prognostickým faktorem (71).
- Naopak je tomu u oligodendrogliomů (IDHmt a kodelece 1p/19q), kde je TERT mutace příznivý prognostický faktor (50).

## **4.4.4 Prediktivní biomarkery**

### ***IDH mutace***

- IDH mutace je spojena s lepším přežitím u pacientů léčených radioterapií a chemoterapií s alkylačními cytostatiky – spíše pozitivní prognostický faktor (72,73).
- IDH mutace je prediktor pro cílenou léčbu s IDH inhibitory (74). Klinické studie s IDH inhibitory u IDHmt gliomů aktuálně běží.

### ***Kodelece 1p/19q***

- Kodelece 1p/19q je dle výsledků studií potvrzený pozitivní prediktor odpovědi na alkylační cytostatika a kombinaci alkylačních cytostatik s radioterapií (64–68).

### ***Metylace promotoru genu pro MGMT***

- Metylace promotoru MGMT je považována za pozitivní prediktivní marker pro léčebnou odpověď na chemoterapii s alkylačními cytostatiky (temozolomid, lomustin), což je zvláště významné u pacientů s prognosticky horšími IDHwt gliomy, včetně glioblastomů. Důležitá je především její znalost při volbě chemoterapie u starších pacientů s high-grade gliomy (grade III a IV) (75,76).

### **Aktuální doporučení pro testování biomarkerů u gliomů**

Všichni pacienti s nově diagnostikovaným gliomem musí být testováni na přítomnost mutace IDH1 pomocí imunohistochemie (IHC). Při IHC negativitě je nutná genová sekvenace na identifikaci vzácnějších mutací IDH1 a 2 (kromě nestředočarových glioblastomů u pacientů starších 54 let, bez gliomu nižšího gradu nebo gliomu ve středočarové lokalizaci v anamnéze), viz Obr. 7. Pacienti s IDH mutací a histologickým obrazem oligodendrogliomu dále podstupují vyšetření na kódelecí 1p/19q. Pokud není IDH mutace přítomna, tak se vyšetření na kódelecí 1p/19q neprovádí. Také je doporučováno vyšetření na mutace ATRX, případně i TERT (přínos diagnostický a prognostický) (Obr. 5 a 6). Vyšetření na mutaci H3-K27M se provádí jen při klinické indikaci (středočarový IDHwt gliom) (Obr. 6). Pacienti s high-grade gliomy by měli být testováni na stav metylace MGMT – obecně uznávaný léčebný prediktor pro alkylační cytostatika. Nejvýznamnější biomarkery jsou shrnuty v Tab. 2.

Další molekulární testování (např. BRAF mutace, NTRK fúze, FGFR fúze, mutační nádorová nálož) je indikováno vysoce individuálně v rámci precizní medicíny nebo v klinických studiích. I když zatím není v případě glioblastomu k dispozici žádná prokazatelně účinná cílená léčba, je tento postup celosvětově doporučován. Pacientům s řídicí mutací by mohla být nabídnuta standardní efektivní cílená léčba nebo imunoterapie užívaná u jiných diagnóz, případně by mohli být kandidáty pro klinickou studii s novými léky.

**Tab. 2: Nejvýznamnější molekulární diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery u gliomů**

|  | <b>Diagnostický marker</b> | <b>Prognostický marker</b> | <b>Prediktivní marker</b> |
|--|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>Mutace IDH1 a 2</b>                     | ano                        | ano                        | ano                       |
| <b>Kodelece 1p/19q (oligodendrogliomy)</b> | ano                        | ano                        | ano                       |
| <b>Metylace MGMT</b>                       | ne                         | ano                        | ano                       |
| <b>Mutace H3-K27M</b>                      | ano                        | ano                        | ne                        |
| <b>Mutace ATRX</b>                         | ano                        | ano                        | ne                        |
| <b>Mutace TERT</b>                         | ano                        | ano                        | ne                        |

#### 4.4.5 Pokročilé metody molekulární diagnostiky

Jak již bylo řečeno, při naplňování konceptu tzv. integrované diagnózy dle WHO 2016 v praxi používáme zavedený algoritmus vyšetřování molekulárních markerů (Obr. 5–7) (52). Tento poměrně náročný proces bude v budoucnu pravděpodobně nahrazen metodami sekvenování nové generace – NGS (next generation sequencing). Tradiční diagnostické metody jako imunohistochemie, Sangerovo sekvenování, sekvenačně specifická PCR či fluorescenční in situ hybridizace (FISH) jsou cílené na konkrétní gen. Metody jsou na základě výše uvedeného algoritmu prováděny nezávisle na sobě, což s sebou přináší řadu nevýhod. Jednak jde o časovou a finanční náročnost, ale častým problémem bývá větší spotřeba nádorové tkáně, které bývá v případě mozkových nádorů nedostatek. Testování pomocí NGS umožňuje současné testování velkého množství genů, což je z pohledu času a spotřeby menšího množství nádorové tkáně velkou výhodou. Metodu lze použít i u formalinem fixovaných a v parafinu zalitých tkání. Cílem testování mohou být bodové mutace, krátké genové inserce a delece, ale také počet kopií genů či fúzní geny jako následek chromozomálních zlomů. Pomocí NGS lze otestovat celý nádorový genom nebo jeho exom (cca 1 % genomu). V klinické praxi však bude NGS metoda využívána pro cílené sekvenování s využitím sekvenačních panelů, což je soubor desítek až stovek vybraných genů. Tyto geny jsou buďto biologicky významné (např. driving mutace), nebo jsou klinicky významné, protože představují potenciální terapeutický cíl pro dnešní dostupnou léčbu. Dalším produktem NGS, při testování minimálně 300 genů (odpovídá cca 1 milionu bází), může být výpočet mutační



nálože nádoru, což bude v budoucnu důležitý indikátor pro nasazení moderní imunoterapie (77,78).

### ***MikroRNA – nové potenciální diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery***

Jak již bylo dříve diskutováno v kapitole o patogenezi gliomů, velkou oblastí zájmu v posledních 10–15 letech jsou krátké nekódující ribonukleové kyseliny – mikroRNA (miRNA). Studium expresních profilů miRNA umožnilo odhalit zapojení těchto epigenetických modifikátorů do procesu iniciace a progresu nádorového onemocnění. S postupem času a získáváním dalších znalostí se ukazuje, že tyto molekuly budeme moci využít pro lepší odhad prognózy onemocnění a predikovat odpověď k léčbě.

#### **4.4.6 Vlastní příspěvek k problematice**

*Slaby O\*, Lakomy R\*, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, Smrcka M, Svoboda M, Dolezalova H, Novakova J, Valik D, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. Neoplasma. 2010; 57(3): 264–269 (citace 79, příloha 5).*

*\*Both authors contributed equally to this work*

*Typ časopisu: Jimp*

*IF = 1,449; JCR Category ONCOLOGY Q4*

V práci s názvem „**MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients**“ jsme publikovali naše zkušenosti z retrospektivní analýzy souboru 22 pacientů s glioblastomy, kteří po neurochirurgickém výkonu podstoupili standardní léčbu dle Stuppova protokolu. Cílem práce bylo u těchto pacientů změřit expresi 8 vybraných mikroRNA (miRNA) a tyto hodnoty srovnat s nenádorovou tkání od 6 pacientů operovaných pro benigní onemocnění mozku (okolí arteriovenózní malformace). Zjistili jsme, že hladiny miR-221 ( $p = 0,016$ ), miR-222 ( $p = 0,038$ ), miR-181b ( $p = 0,036$ ), miR-181c ( $p = 0,043$ ) a miR-128a ( $p = 0,001$ ) byly významně sníženy v tkáních glioblastomu ve srovnání s nenádorovou tkání, naopak exprese miR-21 byla významně zvýšena (téměř 8x), u miR-181a a miR-125b jsme nenašli významné rozdíly. Dalším cílem bylo zjistit, zda vyšetřené hladiny analyzovaných miRNA souvisí s léčebnou odpovědí (Stuppův režim). MiR-181b a miR-181c byly signifikantně sníženy

u pacientů, kteří pozitivně odpověděli na léčbu ( $p = 0,016$  a  $p = 0,047$ ) ve srovnání s pacienty s progredujícím onemocněním. Naším závěrem tedy bylo, že míra exprese miR-181b a miR-181c může potenciálně predikovat odpověď na léčbu chemoradioterapií s temozolomidem. Samozřejmě, že malá velikost souboru nám tehdy nemohla dát do rukou nové silné léčebné prediktory, ale šlo o jednu z prvních prací zabývajících se tímto tématem, a práce tak byla impulsem pro další výzkum nejen u nás, ale i v zahraničí.

*Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. Cancer Sci. 2011; 102(12): 2186–2190 (citace 80, příloha 6).*

*Typ časopisu: Jimp*

*IF = 3,325; JCR Category ONCOLOGY Q2*

Cílem práce „**MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients**“ bylo potenciální využití specifických miRNA a metylace MGMT pro odhad léčebné odpovědi a prognózy u pacientů s glioblastomy. Provedli jsme retrospektivní analýzu na souboru 38 pacientů s glioblastomy, kteří podstoupili standardní Stuppův režim. Podařilo se nám na rozdíl od předchozí práce potvrdit, že přítomnost metylace MGMT souvisí s delším časem bez progresu onemocnění i celkovým přežitím ( $p = 0,0201$  a  $p = 0,0054$ ). Podobně jako v předchozí práci jsme provedli expresní analýzu 8 vybraných miRNA v nádorové a nenádorové mozkové tkáni (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221 a miR-222). Poté jsme se zabývali otázkou možné predikce léčebné odpovědi a prognózy našich pacientů ve vztahu k expresi vybraných miRNA. Vyšší hladiny miR-195 ( $p = 0,0124$ ) a miR-196b ( $p = 0,0492$ ) pozitivně korelovaly s délkou celkového přežití. Negativním léčebným prediktorem (čas do progresu onemocnění < 6 měsíců) se ukázala být zvýšená hladina miR-181c ( $p = 0,001$ ) a zvýšená hladina miR-21 ( $p = 0,0143$ ). Kombinace miR-181c a miR-21 predikovala časnou progresi onemocnění do 6 měsíců od diagnózy s 92 % senzitivitou a 81 % specificitou ( $p < 0,0001$ ). Naším závěrem bylo, že hladiny miR-21, miR-181c, miR-195 a miR-196b souvisí s celkovým přežitím pacientů s glioblastomy a že kombinací miR-181c a miR-21 bychom mohli

s vysokou senzitivitou a specificitou selektovat vysoce rizikovou skupinu pacientů s časnou progresí onemocnění i přes podání nejúčinnější pooperační léčby. Tato skupina by mohla být dnes předmětem dalšího výzkumu – podrobná genetická analýza pomocí NGS a individualizace léčby dle výsledku (cílená léčba nebo imunoterapie při vysoké mutační náloži).

Sana J, Radova L, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, Besse A, Nekvindova J, Hermanova M, Jancalek R, Svoboda M, Hajduch M, Slampa P, Vyzula R, Slaby O. Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. Carcinogenesis. 2014; 35(12): 2756–2762 (citace 81, příloha 7).

Typ časopisu: Jimp

IF = 5,334; JCR Category ONCOLOGY Q1

V práci „**Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients**“ jsme retrospektivně analyzovali soubor 58 pacientů s glioblastomy a 10 nenádorových vzorků mozkové tkáně. Cílem bylo vytvoření prognostického rizikového skóre založeného na expresi specifických miRNA. Z celkem 754 vyšetřených miRNA bylo vyselektováno 28 miRNA, které se 100% senzitivitou a specificitou odlišily nádorovou tkáň od nenádorové. Po korelaci s klinickými daty jsme identifikovali 6 miRNA, které signifikantně souvisely s časem bez progresu onemocnění – PFS ( $p < 0,001$ ) a celkovým přežitím – OS ( $p < 0,001$ ) a těchto 6 miRNA se stalo základem pro vytvoření rizikového skóre. Pro srovnání jsme analyzovali metylační stav MGMT, který také koreloval s délkou PFS a OS, ale méně signifikantně než podle 6 vybraných miRNA (PFS a OS pro MGMT – 0,035 a 0,022). Význam rizikového skóre jako nezávislého prognostického ukazatele pro PFS a OS potvrdila i multivariační analýza ( $p$  v obou případech  $< 0,001$ ). Výsledek jsme pak ještě validovali s daty 485 pacientů s glioblastomy v TCGA (The Cancer Genome Atlas), kde jsme našli shodu ve 4 námi vytipovaných miRNA (miR-31, miR-224, miR-432\*, miR-454-3p). Provedli jsme novou analýzu PFS a OS podle rizikového skóre s těmito 4 miRNA a i poté bylo možno spolehlivě rozdělit soubor 58 pacientů s glioblastomy na dvě skupiny se signifikantně rozdílným celkovým přežitím ( $p < 0,0115$ ). Stejně jako v předchozích pracích jsme dospěli k závěru, že vybraná skupina miRNA může s poměrně velkou spolehlivostí odhadnout prognózu pacienta s glioblastomem, a může tak přispět

k časnému odhalení pacientů s vysokým rizikem, kterým by měla být věnována zvýšená pozornost při plánování pooperační léčby.

## 5 Moderní terapie glioblastomu

### 5.1 Neurochirurgická léčba

Standardní léčba glioblastomu je založena na multidisciplinárním přístupu. Základem je neurochirurgický výkon, jehož cílem je provést maximální bezpečnou resekci bez poškození funkčně důležitých oblastí mozku a získání nádorové tkáně pro histologické a molekulárně genetické vyšetření. Rozsah resekce je považován za významný prognostický faktor, který ovlivňuje celkové přežití (82–85). Jak rozsáhlý výkon musí být proveden, aby pozitivně ovlivnil délku života pacienta s glioblastomem, není jasné. Podle jedné z retrospektivních analýz by mělo být odstraněno minimálně 70 % nádoru nebo by reziduum nemělo být větší než 5 cm<sup>3</sup> (86). Jiná práce ale doporučuje podstatně radikálnější resekce (> 98 %) nebo menší reziduum (< 2 cm<sup>3</sup>) (87). Velká resekce v každém případě poskytne dostatek tkáně pro validní histologické vyšetření, dekompresí může zlepšit celkový stav pacienta, umožnit vysazení kortikoidů a zvýší šanci na úspěch následné pooperační léčby. Radikalita provedeného výkonu se určuje na základě výsledku pooperačního MR vyšetření v T1 váženém obraze po aplikaci i.v. kontrastu (max. do 48–72 hodin po výkonu). Pokud není přítomno sytící se reziduum tumoru, pak se výkon označuje za radiologicky radikální, totální (gross total resection – GTR). Výkon však není ve skutečnosti radikální, protože mikroskopické šíření nádoru přesahuje hranice viditelné na MR vyšetření a bývá příčinou velmi častých recidiv. Při resekci > 90 % tumoru jde o téměř totální výkon (NTR – near total resection), při odstranění > 50–90 % mluvíme o subtotálním resekčním výkonu (STR – subtotal resection), při operacích menšího rozsahu < 50 % jde pak o parciální resekci či biopsii. Vzhledem k tomu, že výkon nemá kurativní potenciál a musí následovat brzká pooperační léčba, je nutné, aby při snaze o maximální resekci nedošlo k poškození neurologických funkcí. Pooperační stav totiž může významně ovlivnit další léčebné možnosti, a tím i celkový osud pacienta. K tomu slouží předoperační plánování (funkční MR a traktografie), intraoperační zobrazení tumoru a intraoperační elektrofyziologické mapování elokventních oblastí. Pokud je nutno při operaci monitorovat řeč nebo paměť, tak se výkon provádí v bdělém stavu (tzv. awake kraniotomie). K dosažení co největší radikality výkonu může být využito intraoperačních zobrazovacích metod jako UZ, intraoperační MR, operace po aplikaci

kyseliny 5-aminolevulinové (5-ALA), nebo jejich kombinace (88,89). Kumulace protoporfyrinu IX v nádorové tkáni po per os podání 5-ALA a vizualizace nádoru v modrém světle o vlnové délce 400 nm (růžová fluorescence) umožňuje zvýšit radikalitu výkonu často až za hranice viditelné na MR (tzv. supramarginální resekce). Pokud je resekční výkon nemožný (obtížný přístup, komorbidita), je zvažována minimálně biopsie s cílem získat validní tkáň pro histologickou verifikaci procesu (stereotaktický navigovaný výkon). Role neurochirurga je důležitá také při řešení recidiv glioblastomu. Indikace reoperace je vždy posuzována individuálně z pohledu možného benefitu a rizika. Nejlepších výsledků je dosahováno u mladších pacientů (< 60 let), v dobrém stavu (PS 0-1) a při odstranění minimálně 80 % sytící se porce nádoru (90).

## 5.2 Radioterapie

Vzhledem k biologické povaze glioblastomu a jeho infiltrativnímu charakteru růstu, kdy mikroskopické šíření onemocnění přesahuje jeho radiologicky viditelné hranice, je v podstatě nemožné dosáhnout kompletního chirurgického odstranění. Snahy s využitím radioterapie (RT) pro zlepšení lokální kontroly onemocnění a prodloužení celkového přežití (OS – overall survival) se objevují již na konci 50. let 20. století. První randomizované studie s pooperační radioterapií provedla německá skupina – Brain Tumour Study Group (BTSG) v 70. a 80. letech 20. století. Pacienti v rameni s pooperační radioterapií celé mozkovny (WBRT – whole brain radiotherapy) měli významně delší celkové přežití než bez ní (8,4 vs. 3,5 měsíce,  $p < 0,05$ ). Navíc se prokázal vliv aplikované dávky ozařování a zkoušela se i kombinace s chemoterapií (karmustin) (91). Při retrospektivní analýze souboru 621 pacientů (86 % glioblastomů) ze studií skupiny BTSG se ukázalo, že přežití se signifikantně zlepšuje s velikostí dávky, a to především od 50 Gy. Pacienti bez radioterapie, s dávkou < 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy a 60 Gy, měli délku přežití 3,1, 4,2, 6,5, 8,4 a 9,8 měsíců (91,92). Následně proběhla řada studií, ve kterých se zkoušelo další zvyšování dávky a ukázalo se, že při dávkách > 60 Gy již nedochází k významnému zlepšení léčebných výsledků, naopak narůstá riziko radiační nekrózy. Dávka 60 Gy ve 30 frakcích je tak i dnes považována za standard při léčbě glioblastomu. Neuplatnila se ani metoda lokálního zvyšování dávky záření na tumor – tzv. radiochirurgického boostu (15–24 Gy) po proběhlé normofrakcionované RT s 60 Gy. Navýšení dávky dle studie RTOG 9305 nevedlo k prodloužení přežití (13,5 měsíce s RT boostem vs. 13,6 měsíce bez něj) (93). Radioterapie, stejně jako další medicínské obory, zaznamenala v posledních 10–15 letech velký pokrok. Stojí za ním rychlý vývoj v oblasti

výpočetní techniky, zobrazovacích metod, ale také plánovacích zařízení a samotných ozařovacích přístrojů. Ještě před 15 lety bylo standardem 2D plánování RT (62 % center ve Stuppově studii), které umožňuje většinou přípravu pouze jednoduchých ozařovacích plánů s např. dvěma protilehlými poli. Dnes by tento postup byl těžko akceptovatelný. V současnosti jsou všichni pacienti standardně ozařováni plány připravenými pomocí CT vyšetření, tedy 3D. Aktuálně se buďto používá technika 3D konformní RT (3D-CRT) s několika konvergentními neměnnými poli nebo častěji metoda IMRT – ozařování s modulovanou intenzitou svazku (v průběhu ozařování se průběžně mění tvar ozařovacího pole pomocí pohyblivých stínících lamel) a její modality (VMAT – volumetric modulation rapid arc) využívající rotace zdroje záření (gantry), s kratší délkou ozařování. Výhodou IMRT je přesnější ozáření cílového objemu požadovanou dávkou, menší zatížení zdravé mozkové tkáně zářením, což je důležité pro redukci vedlejších účinků, zvláště pokud jsou v blízkosti kritické struktury (chiasma opticum, optické nervy, kochlea) (94). S novými možnostmi v oblasti diagnostiky (MR a její modality, PET zobrazení, molekulární a genetická analýza) a se zdokonalením technik plánování radioterapie se tak znovu otevírají témata „správné dávky a správného místa ozařování“ (91). Hodně se dnes diskutují možnosti stanovení cílových objemů. Z dob používání WBRT mozku je známo, že až 90 % recidiv vzniká do 2–3 cm od místa původní resekce (95,96). Při plánování RT vycházíme z nádorového objemu (GTV – gross tumor volume), který je dán vlastním nádorem, případně poresekční kavitou a sytícím se reziduem. Poté radiační onkolog určí klinický cílový objem (CTV – clinical target volume), který je tvořen z GTV a lemem okolní makroskopicky normálně vyhlížející tkáně, kde je ale potenciální mikroskopické šíření choroby. CTV je tedy oblast, která by měla dostat předepsanou dávku záření. Poté se ještě stanovuje plánovací cílový objem (PTV – planning target volume), který tvoří CTV plus další bezpečnostní lem, jehož účelem je pokrytí nejistot vzniklých při plánování či odchylkami při každodenním nastavení pacienta před radioterapií. V současné době není stanoven jednotný postup při definici cílových objemů. Nejčastěji se používají dva přístupy. Prvním je americký dle RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) s použitím dvou cílových objemů (větší a menší), kdy se větší objem stanovuje s využitím T2/FLAIR MR zobrazení, menší objem pak především dle T1 váženého postkontrastního MR vyšetření. Co se týče dávky, je v takovémto případě nejčastěji volen režim 46 + 14 Gy (celková dávka 60 Gy). Pokud je vybrán postup evropský dle EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer), je ozařován jeden cílový objem, a to na základě MR T1 postkontrastní sekvence. Který postup je z pohledu místa a četnosti recidiv či vedlejších účinků lepší, není známo. Aktuálně v Masarykově

onkologickém ústavu běží akademická studie GlioART, jejímž úkolem je právě srovnání těchto přístupů (z metodologického pohledu jde o srovnání dvou standardních metod). S rozvojem zobrazovacích metod se v budoucnu objeví řada dalších možností, jak modifikovat cílový objem a případně i dávku. Kromě doplňkových metod MR může být pomocnou metodou při plánování např. PET s  $^{18}\text{F}$ -FDOPA (určení oblastí s vysokým rizikem recidivy).

Hodně diskutovanou otázkou je vliv čekací doby do zahájení pooperační (chemo)radioterapie. (97). V onkologii platí obecné pravidlo, že pooperační radioterapie by měla začít co nejdříve po zhojení operační rány. Zbytečně odložená radioterapie může mít u agresivního onemocnění negativní vliv na celkové přežití. V případě glioblastomu však toto tvrzení není podloženo žádnou prospektivní studií a o optimálním intervalu, dokdy by měla být radioterapie zahájena, se neustále vedou spory. Některé retrospektivní studie prokázaly horší přežití pacientů s glioblastomy při pozdějším startu pooperační radioterapie (98–100), jiné naopak ne (101,102). V dalších studiích byl dokonce mírný odklad radioterapie pro pacienty výhodný (103,104). Dle obsáhlé retrospektivní studie Blumenthalové a kol. s 2 855 pacienty z 16 RTOG studií (před zavedením Stuppova režimu) se zjistilo, že zahájení radioterapie v intervalu 4–6 týdnů po operaci bylo spojeno s lepším celkovým přežitím ve srovnání s radioterapií zahájenou časně do 2 týdnů po operaci. Příčinou mohou být čerstvé pooperační změny s edémem a sekundární hypoxií, které mohou snižovat citlivost nádorových buněk k záření (104). Další velká retrospektivní metaanalýza klinických studií (5 212 pacientů) publikovaná v roce 2016 také neprokázala vliv intervalu do zahájení RT na celkové přežití (HR 0,98;  $p = 0,70$ ) (105). Ke stejným závěrům dospěla i retrospektivní analýza souboru 1 395 pacientů léčených Stuppovým režimem (studie RTOG 0525 a RTOG 0825). Celkové přežití při zahájení CHT/RT  $> 4$  vs.  $\leq 4$  týdny od operace bylo podobné (HR 0,93;  $p = 0,29$ ) (106). Obdobné výsledky přinesla také dosud největší retrospektivní analýza z roku 2019 s 30 298 pacienty (107). Jasnější odpověď nám může přinést jen prospektivní klinická studie. Z etického hlediska je však problém u tak agresivního onemocnění, jakým glioblastom je, takovou studii provést. Na základě výše uvedených retrospektivních analýz je dnes proto doporučováno zahájit adjuvantní (chemo)radioterapii do 4–6 týdnů od operace.

S větší dostupností MR vyšetření a jeho využitím při plánování radioterapie se předmětem zájmu staly časně recidivy glioblastomu po resekcčním výkonu, tedy v období ještě před zahájením adjuvantní radioterapie nebo chemoradioterapie. Diagnostika časně recidivy se opírá o srovnání nálezů na pooperačním MR (do 72 hodin po operaci) a plánovacím MR

vyšetřením před zahájením radioterapie (108). Recidiva glioblastomu se nejčastěji objevuje v lůžku po resekci a incidence se dle publikací pohybuje kolem 50 %. Dle několika retrospektivních analýz bylo shodně potvrzeno, že přítomnost časné recidivy na plánovacím MR vyšetření je spojena s agresivnější formou glioblastomu a horším celkovým přežitím (109–111). Základním problémem je zatím predikce výskytu časné recidivy. Vyšší riziko lze očekávat u pacientů po méně radikálních resekcích (112). Co dále ovlivňuje prognózu pacientů s časnou recidivou, není jasné. V jedné práci bylo celkové přežití signifikantně horší, pokud nebyla přítomna metylace MGMT (113). Jak přistupovat k pacientům s časnou recidivou, také není v současnosti přesně definováno. Zda indikovat reoperaci recidivy, volit akcelerované režimy radioterapie s event. dávkovým boostem na oblast této časné recidivy nebo vsadit na intenzivnější chemoterapii s alkylačními cytostatiky při přítomné metylaci MGMT? Zatím se léčba těchto pacientů neliší od pacientů bez časné recidivy, a pokud ano, jde čistě o individuální přístup. Vzhledem k vysokému počtu pacientů s časnou recidivou glioblastomu a dosud dostupným jen retrospektivním analýzám je důležité prospektivně analyzovat tuto skupinu agresivnějších nádorů a pokusit se léčebně ovlivnit negativní průběh onemocnění. S tímto záměrem jsme v Masarykově onkologickém ústavu v roce 2020 zahájili akademickou studii 2. fáze GlioMET a také získali grantovou podporu AZV ČR. Cílem studie je kromě biomarkerové analýzy i optimalizace ozařovacího plánu pomocí MR a PET zobrazení s <sup>11</sup>C-methioninem. Časná recidiva na plánovacím MR vyšetření je významný negativní prognostický faktor, který by měl být stratifikačním faktorem v budoucích klinických studiích.

Další kontroverzní otázkou v oblasti radioterapie jsou radiační postupy s šetřením hipokampů, jejichž cílem je minimalizace poškození kognitivních funkcí. Tato možnost je dnes zvažována především u pacientů s mozkovými metastázami. U glioblastomu se tento postup nepoužívá pro obavy z přítomnosti nádorových kmenových buněk v ipsilaterálním hipokampu a subventrikulárních zónách, které mohou být příčinou časné recidivy.

Radioterapie, stejně jako chirurgie a chemoterapie má své místo také při léčbě recidiv. Limitací bývá předchozí aplikovaná dávka 60 Gy. Při překročení celkové dávky 100 Gy se významně zvyšuje riziko poradiační nekrózy (114). Cílem paliativní radioterapie je zpomalit průběh onemocnění, udržet dobrou kvalitu života, případně prodloužit přežití. U mladších pacientů v dobrém stavu s menší recidivou do 4–5 cm a delším časovým intervalem od primární radioterapie můžeme zvážit stereotaktické techniky ozařování (115).



## 5.3 Chemoterapie

### 5.3.1 Chemoterapie v pooperační léčbě glioblastomu

Hlavní roli v pooperační léčbě glioblastomu hrála v minulosti samotná radioterapie. Postavení adjuvantní chemoterapie (CHT) bylo dlouho nejasné. Randomizované klinické studie v 70. a 80. letech minulého století, nejčastěji s deriváty nitrosourey, neprokázaly zásadní vliv pooperační chemoterapie na prodloužení celkového přežití. Dle klinické studie Walkera a kol. z roku 1978 byl medián celkového přežití pacientů po operaci v rameni s nejlepší podpůrnou léčbou 14 týdnů, s CHT (karmustin) 18,5 týdne, samotnou RT 35 týdnů a kombinací RT + CHT 34,5 týdne (116). Podobně nepřesvědčivé výsledky přicházely i z dalších studií (117), a to včetně použití kombinované chemoterapie v režimu PCV (prokarbazin, lomustin, vinkristin) (118). Vzhledem k hraničnímu benefitu a riziku především hematologické toxicity byla chemoterapie často metodou volby až při léčbě rekurentního onemocnění. K určité změně názoru přispěly publikované závěry z velké metaanalýzy 12 klinických studií (GMT Group, 2002) zahrnující 3 004 pacientů léčených pooperačně samotnou radioterapií nebo podáním radioterapie a chemoterapie. Při této metaanalýze bylo zjištěno, že kombinace radioterapie a chemoterapie vedla k absolutnímu zvýšení jednoletého přežití ze 40 % na 46 % a prodloužení mediánu celkového přežití o 2 měsíce (HR 0,85;  $p < 0,0001$ ) (119). I když nešlo o dramatické prodloužení celkového přežití, výsledky byly impulsem pro další klinické studie, včetně průlomové Stuppovy studie s konkomitantní chemoradioterapií a adjuvantní chemoterapií s temozolomidem (82). V roce 2002 byla FDA v USA schválena indikace lokální chemoterapie, aplikované do lůžka nádoru po resekci high-grade gliomu (BCNU polymer wafers – Gliadel). Prodloužení celkového přežití sice bylo dle klinické studie 3. fáze statisticky signifikantní (13,9 vs. 11,6 měsíce u placebo, HR 0,71;  $p = 0,03$ ) (120), metoda se ale v praxi příliš neuplatnila. Jedním z důvodů byl problém s následným zařazením pacienta do klinické studie s novými léky, pooperační léčba s Gliadelem byla vylučujícím kritériem. Dalším faktorem byly i obavy z častějších pooperačních komplikací. Na ty například poukázala metaanalýza 19 klinických studií (795 pacientů) publikovaná v roce 2013. Celkové přežití pacientů léčených Gliadelem bylo o cca 2 měsíce delší než s adjuvantní chemoradioterapií (16,2 vs. 14 měsíců), ale za cenu vyššího procenta komplikací z lokální léčby (42,7 %) (121).

### ***Standardní léčebný protokol – konkomitantní chemoradioterapie a adjuvantní chemoterapie s temozolomidem (tzv. Stuppův režim)***

Postavení pooperační chemoterapie v léčbě glioblastomu bylo zásadně přehodnoceno na základě randomizované studie 3. fáze – EORTC 22981/26981 NCIC CE3 publikované Stuppem a kol. v roce 2005 (82). Pacienti ve věku od 18 do 70 let, s WHO PS (performance status) 0–2 byli po resekčním výkonu randomizováni do ramene se samotnou radioterapií nebo chemoradioterapií s temozolomidem, kde temozolomid byl podáván v dávce 75 mg/m<sup>2</sup> během radioterapie (včetně víkendů) a pak adjuvantně v dávce 150–200 mg/m<sup>2</sup>, 1.–5. den ve čtyřtýdenních cyklech, celkem 6krát. Pooperační chemoradioterapie prodloužila celkové přežití a období bez progresu onemocnění. Medián celkového přežití pacientů v rameni s konkomitantní chemoradioterapií a následnou adjuvantní chemoterapií s temozolomidem byl 14,6 měsíců vs. 12,1 měsíců u pacientů bez chemoterapie. Přežití u kombinované léčby bylo ve 2 letech 27,2 %, ve 3 letech 16,0 %, ve 4 letech 12,1 % a v 5 letech 9,8 % ve srovnání s 10,9 %, 4,4 %, 3,0 % a 1,9 % při použití samotné radioterapie (HR 0,6; p < 0,0001) (122). Benefit přidané chemoterapie byl zaznamenán ve všech podskupinách. Nejlepší léčebné výsledky byly dosaženy ve věkové skupině pacientů mladších 50 let, po makroskopicky radikálních resekčních výkonech a u pacientů ve výborném klinickém stavu s WHO PS 0–1. Díky studii byla na základě retrospektivního hodnocení také potvrzena role nového silného molekulárního prognostického faktoru – metylace promotoru genu pro O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA methyltransferázu (MGMT) (69). Pacienti s prokázanou metylací MGMT měli delší celkové přežití bez ohledu na podanou léčbu. Kontroverzní a dosud neuzavřenou otázkou je, zda metylace MGMT má i funkci pozitivního prediktivního faktoru ve vztahu k podané chemoterapii. Kombinace radioterapie a chemoterapie totiž ve studii dosáhla ve srovnání se samotnou radioterapií signifikantně delšího celkového přežití, a to bez ohledu na stav metylace MGMT. Jednoznačně nejlepších výsledků ale dosáhli pacienti s metylací MGMT a s podanou konkomitantní chemoradioterapií a adjuvantní chemoterapií. Většina odborné veřejnosti tak dnes i díky dalším studiím s temozolomidem, zvláště u starších pacientů s glioblastomy (Nordic trial, NOA-08) (75,76), považuje metylaci MGMT za pozitivní prediktivní faktor a přihlíží k němu např. při indikaci chemoradioterapie v hraničních stavech. Stuppův režim se tak díky jasně potvrzenému benefitu adjuvantní chemoterapie stal novým léčebným standardem u glioblastomů, který je platný dodnes a je stále srovnávacím ramenem v klinických studiích s novými léky.

Kombinace chemoterapie a radioterapie je však zatížena vyšším rizikem nežádoucích účinků. Při rozhodování o typu pooperační léčby bychom měli znát prognózu pacienta. K tomu nám slouží různé prognostické modely, které byly vytvořeny již v době používání samotné radioterapie. Příkladem je stále užívaná RPA (Recursive Partitioning Analysis) klasifikace, vytvořená na základě klinických prognostických faktorů ze tří RTOG studií (123,124). K základním pozitivním prognostickým faktorům patří věk (< 50 let), Karnofsky performance status (70 a více), absence neurologického deficitu a další. Pro glioblastomy je vyčleněna RPA třída III–VI. Čím je pacient v prognosticky horší (vyšší) skupině, tím má i menší benefit z konkomitantní chemoradioterapie vs. samotné radioterapie a také pravděpodobnost kratšího celkového přežití (RPA III – 17,9 měsíců, RPA IV – 11,1 měsíců, RPA V – 8,9 měsíců, RPA VI – 4,6 měsíců). Signifikantní benefit z konkomitantní léčby u glioblastomu lze očekávat u pacientů v RPA třídě III a IV. U RPA třídy V je vliv přidané chemoterapie na prodloužení délky života již hraniční. Ve Stuppově studii (EORTC 26981/22981) byla pro glioblastomy provedena modifikace RPA klasifikace (125). Karnofského performance status (KPS) byl nahrazen PS dle WHO (PS 0–2) a neurologický deficit byl hodnocen pomocí testu kognitivních funkcí MMSE (Mini–Mental State Examination), kdy normální hodnota kognitivních funkcí je 27–30 bodů. Na základě hlavních prognostických faktorů, které vyplynuly z četných subanalýz Stuppovy studie, jako je typ podané léčby, věk, rozsah resekce, WHO PS, MMSE a stav metylace MGMT, byly sestrojeny nomogramy, které nám mohou pomoci odhadnout prognózu pacienta s nově léčeným glioblastomem (pravděpodobnost dvouletého a celkového přežití) (126). Nomogramy jsou volně přístupné: <http://www.eortc.be/tools/gbmcalculator>. Jejich poslední validace, která proběhla na základě studií RTOG 0525 a 0825 byla publikována v roce 2017 a je dostupná z: <http://cancer4.case.edu/rCalculator/rCalculator.html> (127).

S cílem dalšího zlepšení léčebných výsledků u pacientů s glioblastomy proběhla od roku 2005 řada klinických studií. Některé studie se snažily o intenzifikaci chemoterapie Stuppova režimu. Zkoušely se například dose-dense režimy adjuvantního temozolomidu (studie 3. fáze RTOG 0525, předpis temozolomidu v dávce 75-100 mg/m<sup>2</sup> 1.–21. den, 28denní cyklus), bohužel s negativními výsledky ve srovnání se standardními dávkami a navíc s vyšší toxicitou (128). Určitou formou intenzifikace Stuppova režimu může být také prodloužené podávání adjuvantního temozolomidu (> 6 cyklů) u pacientů bez průkazu progresu a bez toxicity spojené s chemoterapií. Ačkoliv se jedná o relativně častou formu adaptace původního Stuppova režimu, nejsou k dispozici žádná data podporující prodloužené podávání temozolomidu. Dle publikované metaanalýzy z roku 2017, vycházející z dat více než 2 000

pacientů ze 4 randomizovaných studií (EORTC 22981, CENTRIC, CORE a RTOG 0525) sice došlo k prodloužení času bez progresu onemocnění, ale nebylo prokázáno prodloužení celkového přežití ve skupině s delším užíváním temozolomidu, a to ani v podskupině pacientů s metylací promotoru MGMT (129). Navíc se ukazuje, že dlouhodobé podávání temozolomidu může vést k indukci hypermutačního fenotypu nádorových buněk spojeného s rezistencí k další terapii alkylačními cytostatiky. Kromě toho je dlouhodobé podávání chemoterapie i při absenci klasických nežádoucích účinků (např. hematologická toxicita) spojeno se zvýšenou únavou, nauzeou a anorexií. Nezanedbatelná je také event. chronická imunosuprese a skutečnost, že většina pacientů není schopna se vrátit ke každodennímu běžnému životu. Na druhou stranu je jisté možné v individuálních případech po domluvě s pacientem v adjuvantní chemoterapii temozolomidem pokračovat i po absolvování 6 cyklů. Další myšlenkou, jak zlepšit výsledky pooperační léčby, bylo posílení Stuppova režimu o cílenou léčbu, především z oblasti inhibitorů angiogeneze. S tímto záměrem proběhly studie 3. fáze zkoumající benefit přidaného bevacizumabu (AVAglio, RTOG 0825) nebo inhibitoru integrinů  $\alpha\beta3$  a  $\alpha\beta5$  cilengitidu (studie CENTRIC), výsledky těchto studií bohužel nedopadly pozitivně (130–132). Podobně skončily i další studie s cílenou léčbou a imunoterapií, viz dále.

Určitý posun od roku 2005 u nově diagnostikovaných glioblastomů přinesly až výsledky randomizované klinické studie 3. fáze kombinující adjuvantní temozolomid v rámci Stuppova režimu s přístrojem Optune – TTF (Tumor Treating Fields) (133), viz dále. Zajímavé jsou výsledky studie 3. fáze CeTeG/NOA–09 u pacientů s metylací MGMT publikované v roce 2019, kde Herrlinger a kol. použili v rámci modifikovaného Stuppova režimu místo samotného temozolomidu kombinaci cytostatik temozolomid + lomustin (134). Medián celkového přežití byl prodloužen z 31,4 měsíce při použití standardního Stuppova režimu na 48,1 měsíce při použití temozolomidu + lomustinu (HR 0,60;  $p = 0,0492$ ). Vážná toxicita (3. a 4. stupeň) byla zaznamenána u 32 (51 %) z 63 pacientů se standardním režimem versus u 39 (59 %) z 66 pacientů s intenzivní chemoterapií. Studie však pro relativně malý počet pacientů, obavy z toxicity a omezenou dostupnost lomustinu nenašla dostatek příznivců a režim se v praxi zatím moc nepoužívá.

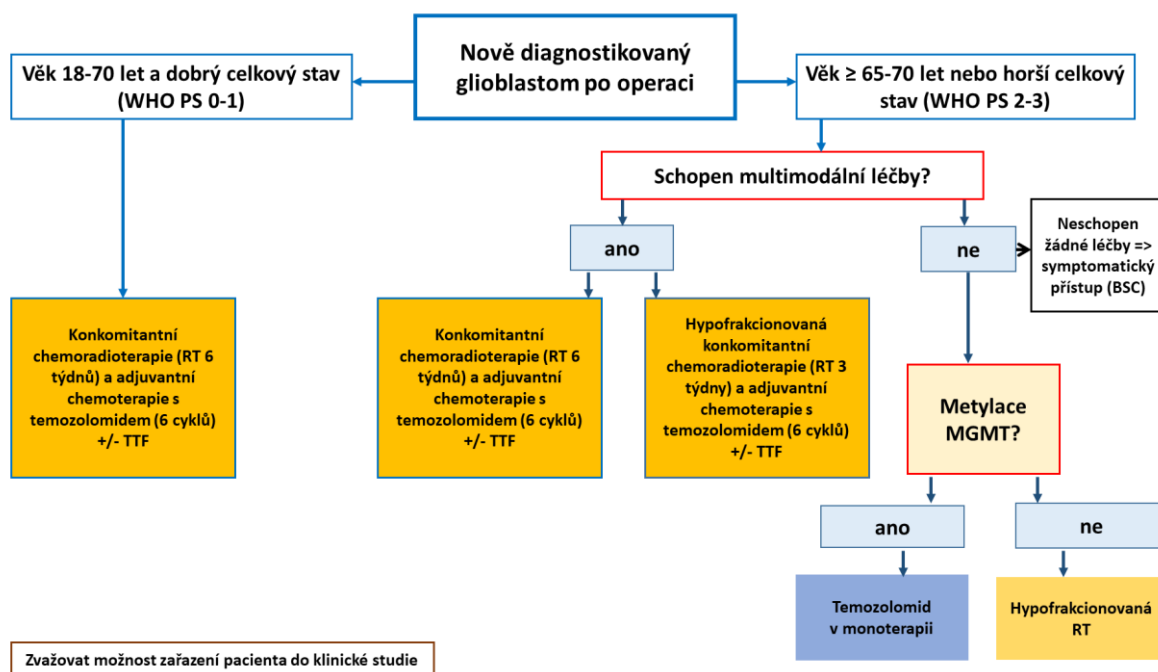
U pacientů nad 65 let v horším klinickém stavu, kteří by nezvládli plný Stuppův režim a mají metylaci MGMT, lze zvážit tzv. Perryho režim (modifikovaný Stuppův režim) s 3týdenní hypofrakcionovanou radioterapií (40 Gy/15 frakcí; 2,67 Gy na frakci) s konkomitantním a adjuvantním temozolomidem, studie EORTC 26062-22061 (135). Pacienti v kombinovaném rameni měli delší celkové přežití (OS) ve srovnání se samotnou radioterapií

(9,3 vs. 7,6 měsíců, HR 0,67;  $p < 0,001$ ). Větší benefit z chemoradioterapie měli pacienti s metylací MGMT (OS 13,5 vs. 7,7 měsíců, HR 0,53;  $p < 0,001$ ) než bez ní (OS 10,0 vs. 7,9 měsíců, HR 0,75;  $p = 0,055$ ). Pokud metylace MGMT není přítomna, volíme u hraničních stavů spíše samotnou radioterapii, nejlépe v hypofrakcionovaném režimu.

### ***Léčba u starších pacientů s glioblastomem***

Přibližně 20–25 % pacientů s glioblastomem je v době diagnózy starší 70 let. Vzhledem ke stárnutí populace ve vyspělých zemích můžeme očekávat rostoucí incidenci onemocnění v této věkové kategorii. Pokud je pacient biologicky mladší, bez vážných komorbidit, můžeme individuálně zvážit standardní Stuppův režim. Jinak by léčebná strategie u pacientů nad 70 let (případně > 65 let nevhodných pro Stuppův režim) dle dnešních doporučení měla být stanovena na základě metylace MGMT a celkového stavu. U pacientů s metylací MGMT volíme mezi hypofrakcionovanou 3týdenní radioterapií s konkomitantním a adjuvantním temozolomidem (Perryho režim) (135) nebo samotnou chemoterapií s temozolomidem. Dle dvou velkých klinických studií 3. fáze – Nordic a NOA-08 měli pacienti s metylací MGMT léčení pouze temozolomidem signifikantně delší přežití než pacienti bez metylace MGMT (75,76). V případě použití samotné radioterapie nebyl rozdíl v přežití dle stavu MGMT významný. Methylace MGMT je proto považována za léčebný prediktor pro použití chemoterapie s alkylačními cytostatiky a měla by být automaticky vyšetřována. Pokud pacient s metylací MGMT není vhodný pro léčbu chemoterapií (komorbidita, problematika spolupráce), indikujeme radioterapii, stejně jako u pacientů bez metylace. Preferujeme spíše hypofrakcionované režimy (30–36 Gy v 10–12 frakcích nebo 40–42 Gy v 15–16 frakcích), které jsou minimálně stejně účinné a především šetrnější ve srovnání se standardním režimem 60 Gy ve 30 frakcích (13,75). Léčebný algoritmus pro pacienty s nově diagnostikovaným glioblastomem byl recentně publikován pod záštitou odborných společností SNO (Society for Neuro-Oncology) a EANO (European Society of Neuro-Oncology), jeho zjednodušená varianta je uvedena na Obr. 6 (13). Pokud je možnost zařazení pacienta do klinické studie, měla by být vždy zvážena.

**Obr. 8: Zjednodušený léčebný algoritmus u nově diagnostikovaného glioblastomu pro praktické použití v ČR, upraveno podle Wena a kol. (13)**

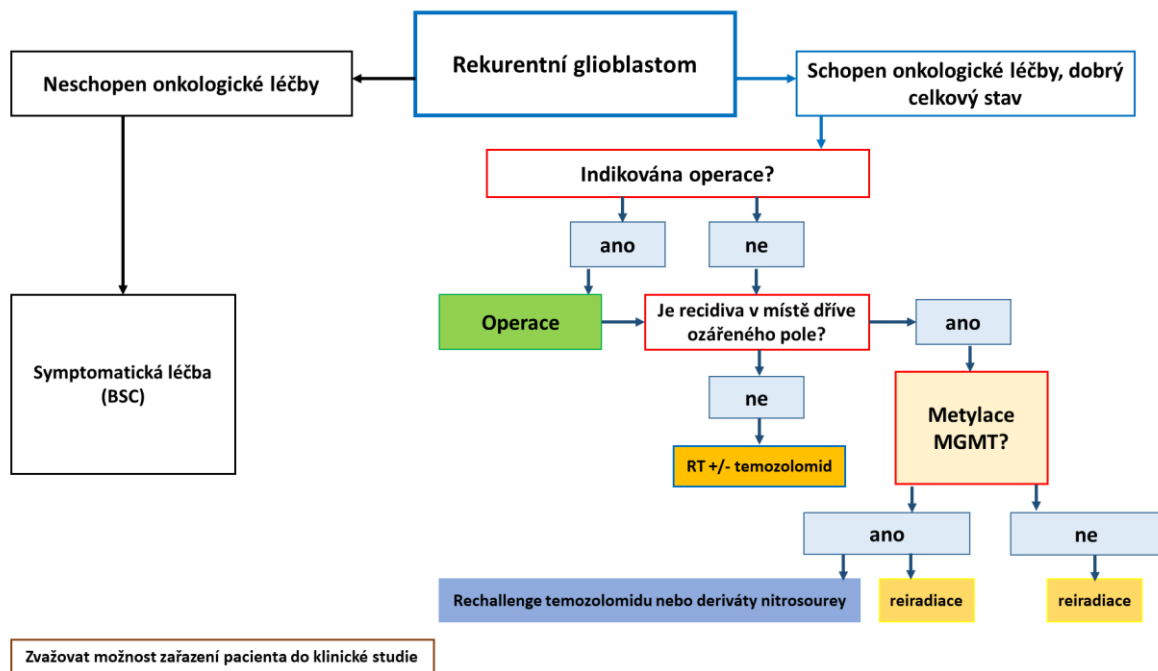


### 5.3.2 Chemoterapie u rekurentního glioblastomu

Ve více než 80 % případů dochází k recidivě glioblastomu do 2–3 cm od okrajů primárního nádoru, multifokální rekurence se objevují u cca 5–6 % případů. Léčba rekurentních glioblastomů je podmíněna více faktory a musí být individuálně zvážena, ideálně cestou multidisciplinární komise pro mozkové nádory. Rozhodování je závislé na věku pacienta, přidružených onemocněních, celkovém výkonnostním stavu, odpovědi na primární léčbu, času bez relapsu od primární léčby a také na velikosti a lokalizaci recidivy. V první řadě má být posouzena možnost reoperace. Dle publikovaných prací je pro indikaci chirurgického výkonu rozhodující předoperační performance status (PS 0–1), mladý věk, příznivá lokalizace recidivy, která umožní odstranění její velké části bez poškození neurologických funkcí pacienta, a také časový interval od první operace (zpravidla > 6 měsíců) (136). Ve správně indikovaných případech může operační výkon prodloužit celkové přežití a zlepšit kvalitu života pacienta. Pokud byla recidiva mimo původní ozařované pole, tak lze po zhojení operační rány doporučit radioterapii, případně i s temozolomidem. Jestliže operační výkon není možný nebo je příliš rizikový, lze zvážit reiradiaci a/nebo chemoterapii (dle stavu metylace MGMT), viz algoritmus (Obr. 7) (13). Limitací reiradiace je často velikost recidivy, již aplikovaná dávka záření a krátký časový interval od předchozí radioterapie (do 12 měsíců)

(136). Ve vybraných případech můžeme s výhodou využít možnosti stereotaktické radioterapie nebo radiochirurgie. Pokud není operace ani reiradiace vhodná, lze pacientovi nabídnout paliativní chemoterapii, ideálně při metylaci MGMT. Většina režimů pro léčbu rekurentních glioblastomů je založena na rechallenge temozolomidu a derivátech nitrosourey (nejčastěji lomustin, méně často karmustin nebo fotemustin). Problémem je nízká četnost a krátké trvání léčebných odpovědí. V případě lomustinu se počet odpovědí pohybuje kolem 10 %, čas bez progresu onemocnění (PFS) mezi 1,5 a 3 měsíci a celkové přežití (OS) mezi 7,1 a 8,6 měsíců. Větší benefit z léčby lomustinem mají pacienti s metylací MGMT (13). Zatím nebylo studii prokázáno, že by kombinovaná chemoterapie byla v případě rekurentních glioblastomů účinnější než monoterapie s nitrosoureu. V minulosti byla publikována řada prací s dose-dense a metronomickými režimy s temozolomidem (137–139). Medián PFS se ve studiích pohyboval kolem 3 měsíců a medián OS od recidivy/progrese mezi 5 a 9 měsíci. Nevýhodou dose-dense režimů s temozolomidem (TMZ) může být častější selektivní CD4+ lymfopenie, která je rizikovým faktorem pro rozvoj oportunních infekcí (např. pneumocystová pneumonie). Výsledky s metronomickými režimy TMZ jsou sice zajímavé, ale nejsou podloženy daty z větších klinických studií 3. fáze. Dle studie 2. fáze – RESCUE – mohou z návratu k temozolomidu v metronomickém režimu profitovat především pacienti, kteří na tomto léku v minulosti nezprogredovali. Tedy ti, co zdárně ukončili první fázi léčby a byli v době recidivy několik měsíců bez léčby (137). Léčebný algoritmus pro rekurentní glioblastom byl recentně publikován pod záštitou odborných společností SNO (Society for Neuro-Oncology) a EANO (European Society of Neuro-Oncology), jeho upravená a zjednodušená verze je na Obr. 7 (13).

**Obr. 9: Zjednodušený léčebný algoritmus u rekurentního glioblastomu pro praktické použití v ČR, upraveno podle Wena a kol. (13)**



### 5.3.3 Vlastní příspěvek k problematice

*Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Postavení chemoterapie v léčbě gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. Gliomy. Současná diagnostika a léčba, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 177–189 (citace 140, příloha 8).*

Knižní kapitola „**Postavení chemoterapie v léčbě gliomů**“ je věnována všem oblastem, kde se chemoterapie u těchto nádorů CNS používá. Cílem bylo uvést zásadní klinické studie s chemoterapií, které proběhly u glioblastomů, anaplastických astrocytomů, anaplastických oligodendrogliomů, nízkostupňových astrocytomů a oligodendrogliomů. Výsledky recentních studií jsou komentovány i z pohledu proběhlé analýzy molekulárních biomarkerů, které hrají stále významnější roli. V závěru kapitoly je léčebný algoritmus, který se odvíjí od EANO doporučení z roku 2017, a především jsou zde shrnuta základní doporučení pro každodenní praxi.



Kazda T, Lakomý R, Poprach A, Hendrych M, Knight A, Šlampa P. Multidisciplinární přístup v léčbě gliomů – astrocytomy a oligodendrogliomy. Postgraduální medicína 2020; 22(2): 137–142 (citace 141, příloha 9).

*Typ časopisu: Jost*

Článek „**Multidisciplinární přístup v léčbě gliomů – astrocytomy a oligodendrogliomy**“, publikovaný v českém recenzovaném neimpaktovaném periodiku, je věnován problematice nechirurgické léčby astrocytomů a oligodendrogliomů a je určen pro širokou lékařskou veřejnost jako prostředek pro postgraduální vzdělávání. Cílem bylo shrnutí základních principů léčby nejčastějších gliomů. Důraz je kladen především na radioterapii a chemoterapii. Prostor je věnován významným klinickým studiím, od nichž se odvíjí praktická doporučení použitelná v každodenní praxi.

Lakomý R, Fadrus P, Šlampa P, Svoboda T, Křen L, Lžičařová E, Belanová R, Siková I, Poprach A, Schneiderová M, Procházková M, Šána J, Slabý O, Smrčka M, Vyzula R, Svoboda M. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsektivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. Klin Onkol. 2011; 24(2): 112–120 (citace 142, příloha 10).

*Typ časopisu: Jsc*

Článek „**Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsektivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009**“ byl publikován v českém recenzovaném neimpaktovaném periodiku (Klinická onkologie) a získal cenu redakce časopisu za nejlepší původní práci v roce 2011. Ve své době představoval významnou publikaci, která hodnotila první zkušenosti s nově zavedeným Stuppovým režimem v naší zemi. Do analýzy bylo zařazeno celkem 86 pacientů léčených v letech 2003–2009. Podmínkou pro zařazení pacienta byl histologicky verifikovaný glioblastom, indikovaný ke konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem. Cílem práce bylo zhodnotit parametry přežití, potenciální klinické prognostické faktory, toxicitu léčby a analyzovat účinnost použité léčby v době rekurence. Přežití našich pacientů bylo podobné s registrační Stuppovou studií (medián PFS 7,0 měsíce, medián OS 13,0 měsíce). Mezi nejvýznamnější pozitivní prognostické faktory patřil výborný celkový stav pacienta (PS 0), makroskopicky radikální resekční výkon, absolvování konkomitantní chemoradioterapie bez zásadní redukce dávek chemoterapie (minimálně

40 dní) a radioterapie (minimálně 54 Gy) a možnost podstoupit reoperaci v době recidivy. Výsledky analýzy byly impulsem pro další výzkum, především na úrovni molekulárních biomarkerů (MGMT, mikroRNA).

Kazda T, Dziacky A, Burkon P, Pospisil P, Slavik M, Rehak Z, Jancalek R, Slampa P, Slaby O, Lakomy R\*. Radiotherapy of Glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp's Trial: More Controversies than Standards? Radiol Oncol. 2018; 52(2): 121–128 (citace 143, příloha 11).

*\* corresponding author*

*Typ časopisu: Jimp*

*IF = 1,846; JCR Category ONCOLOGY Q4 + RADIOLOGY, NUCLEAR MEDICINE Q3*

Práce „**Radiotherapy of Glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp's Trial: More Controversies than Standards?**“ byla publikována v recenzovaném impaktovaném časopise. Jedná se o přehledový článek, jehož cílem je popsat vývoj v léčbě glioblastomu v posledních 15 letech a poukázat na aktuální diskutovaná témata. První část článku je věnována nesporným pokrokům v oblasti diagnostiky a léčby, které se podílí na postupném prodloužení celkového přežití pacientů s glioblastomy i přes použití stále „stejného Stuppova režimu“. Svědčí o tom lepší výsledky přežití pacientů léčených Stuppovým režimem v kontrolních ramenech z recentně publikovaných velkých klinických studií 3. fáze (EF 14, ACT IV). Druhá část je pak zaměřena na možné kontroverze především v oblasti radioterapie, která v posledních 10 letech prodělala ohromný vývoj. Je zde diskutována otázka správné dávky, optimálních cílových objemů, využití moderních technik zobrazování při plánování radioterapie (PET/MR). Kontroverzní je také otázka šetření hipokampů s cílem minimalizovat poškození kognitivních funkcí. Práce poukazuje na důležitost multimodální léčby glioblastomu. Protože i minimální posun napříč všemi obory se může v konečném důsledku sečíst a pozitivně odrazit v prodloužení celkového přežití a zlepšení kvality života našich pacientů. Review pak bylo impulsem pro naši vlastní analýzu srovnávající přežití pacientů dnes a před 10 roky.

Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, Fadrus P, Vybihal V, Smrcka M, Jancalek R, Hynkova L, Muckova K, Hendrych M, Sana J, Slaby O, Slampa P. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. Front Oncol. 2020; 10: 840 (citace 144, příloha 12).

Typ časopisu: *Jimp*

IF = 4,848; JCR Category ONCOLOGY Q2 (pro rok 2019)

V práci „**Real-world evidence in glioblastoma: Stupp's regimen after a decade**“ publikované v zahraničním impaktovaném časopisu jsme prezentovali závěry naší retrospektivní analýzy konsekutivního souboru pacientů s glioblastomem léčených pooperačními radioterapií +/- chemoterapií od 1/2014 do 12/2017. Cílem bylo zhodnotit aktuální léčebné výsledky a provést srovnání s naším historickým souborem z let 2003–2009 a s registračními Stuppovými studiemi z roku 2005. Vstupní kritéria splnilo celkem 155 pacientů. Medián věku byl 61 let, v 61 % se jednalo o muže, 37 % pacientů podstoupilo makroskopicky radikální chirurgický výkon. Ke konkomitantní chemoradioterapii bylo indikováno 90 (58 %) pacientů. Při srovnání celkového přežití mezi soubory pacientů indikovaných ke Stuppově režimu nyní a před 10 lety došlo k prodloužení celkového přežití o více než 2 měsíce (16,0 vs. 13,8 měsíce). Zvýšil se také počet dlouhodoběji žijících pacientů (2leté, 3leté a 4leté přežití bylo 31 % vs. 28 %, 21 % vs. 7 % a 10 % vs. 2 %). Významně delšího přežití bylo dosaženo u pacientů, kteří dokončili alespoň 3 cykly adjuvantní chemoterapie (medián OS 23,3 měsíce, 2leté přežití 44 %). Důvodů pro zlepšení celkových výsledků je více. Díky pokrokům v diagnostice a neurochirurgii máme nyní více pacientů, u kterých je proveden makroskopicky radikální resekční výkon (bez rezidua na pooperační MR). Radikální a bezpečná resekce spolu s lepší podpůrnou léčbou pak přispívají k nekomplikovanému průběhu konkomitantní chemoradioterapie. Díky tomu je více pacientů schopno dále pokračovat v adjuvantním temozolomidu (72 % vs. 40 % před 10 lety). Při analýze jsme také hodnotili vliv intervalu od operace do zahájení radioterapie na celkové přežití. Medián času do zahájení radioterapie byl 6,7 týdne a nebyl prognosticky významný ( $p = 0,825$ ). Naopak jsme u 51 % pacientů potvrdili přítomnost nového negativního prognostického faktoru, kterým je časná progresse glioblastomu na plánovacím MR vyšetření před zahájením radioterapie.

Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, Fadrus P, Smrcka M, Vybihal V, Jancalek R, Kiss I, Muckova K, Hendrych M, Knight A, Sana J, Slampa P, Slaby O. Pre-Radiotherapy Progression after Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma: Corroboration of New Prognostic Variable. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9):E676. Published 2020 Sep 5 (citace 145, příloha 13).

Typ časopisu: *Jimp*

IF = 3,110; JCR Category MEDICINE, GENERAL & INTERNAL SCI Q1 (pro rok 2019)

V práci „**Pre-Radiotherapy Progression after Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma: Corroboration of New Prognostic Variable**“ publikované v zahraničním impaktovaném časopisu jsme prezentovali výsledky naší retrospektivní analýzy konsekutivního souboru pacientů s glioblastomem a časnou progresí onemocnění (REP – rapid early progression) na plánovacím MR vyšetření před zahájením pooperační radioterapie +/- chemoterapie. Jde o práci, která navazuje na předchozí publikaci. Cílem této retrospektivní studie bylo zhodnocení incidence, lokalizace a nalezení potenciálních prediktorů REP. Dalším úkolem bylo porovnání parametrů přežití u pacientů s REP a bez REP ve vztahu k použité léčbě. Vstupní kritéria pro studii (předoperační, pooperační a plánovací MR vyšetření) splnilo 90 ze 155 pacientů s glioblastomem léčených od 1/2014 do 12/2017. Medián věku byl 59 roků, v 59 % se jednalo o muže, 43 % pacientů podstoupilo makroskopicky totální resekci nádoru. Stuppův režim byl indikován u 64 (71 %) pacientů; 26 (29 %) pacientů bylo léčeno samotnou radioterapií. REP byla na plánovacím MR vyšetření zjištěna u 46 (51 %) pacientů, nejčastěji ve stěně resekční dutiny a hlavním prediktorem pro výskyt REP byl neradikální resekční výkon ( $p < 0,001$ ). Potvrdili jsme, že REP je silným negativním prognostickým faktorem. Median celkového přežití pacientů s REP vs. bez REP byl 10,7 vs. 18,7 měsíců a 2leté přežití bylo 15,6 % vs. 37,7 % (hazard ratio HR 0,53 pro pacienty bez REP;  $p = 0,007$ ). Zajímavým zjištěním bylo, že přítomnost REP byla významným negativním prognostickým faktorem především u mladších pacientů ( $\leq 50$  let), pravděpodobně kvůli agresivnějšímu biologickému chování. Pacienti indikovaní ke konkomitantní chemoradioterapii (Stuppův režim) měli dle očekávání delší celkové přežití ve srovnání se skupinou léčenou samotným ozařováním (medián celkového přežití 16,0 vs. 7,5; HR = 0,5,  $p = 0,022$ ; 2leté přežití 22,3 % vs. 5,6 %). Délka intervalu mezi operací a zahájením radioterapie neměla u pacientů s REP vliv na celkové přežití. Naším závěrem je, že přítomnost REP je nutno považovat za nový významný negativní prognostický faktor, který by měl být součástí stratifikačních faktorů při

plánování prospektivních klinických studií. Problematika REP nás velmi zaujala a považujeme ji za potenciální oblast pro další výzkum (prognostické a prediktivní biomarkery, moderní plánování radioterapie s pomocí fúze MR a PET obrazu). S tímto záměrem jsme připravili akademickou studii a získali také grantovou podporu AZV ČR.

## 5.4 Moderní léčebné přístupy

### 5.4.1 Optune

Léčba pomocí přístroje Optune je založena na principu tzv. Tumor Treating Fields (TTF). Spočívá v působení střídavého elektrického proudu středních frekvencí (100–300 kHz) a nízké intenzity ( $< 2$  V/cm) na nádorové buňky. Proud je vysílán z elektrod nalepených na kůži hlavy a negativním působením na proces mitózy snižuje replikaci nádorových buněk (146). Nejprve proběhly klinické studie u pacientů s rekurentními glioblastomy, kdy srovnávacím ramenem byla klasická chemoterapie dle volby zkoušejícího. Metoda v klinické studii 3. fáze neprokázala superioritu v délce přežití nad chemoterapií, nebyla ale zatížena systémovou toxicitou. Medián celkového přežití byl v rameni s Optune 6,6 vs. 6,0 měsíce s chemoterapií (HR 0,86;  $p = 0,27$ ), 1leté přežití 20 % vs. 20 % (147). Tento relativní úspěch pak vedl k iniciaci klinického zkoušení i u nově léčených glioblastomů. Optune jako doplňková metoda byla testována současně s adjuvantním temozolomidem vs. samotný temozolomid (TMZ) po ukončené konkomitantní chemoradioterapii v klinické studii 3. fáze EF-14 (další snaha o intenzifikaci účinku samotné chemoterapie) (133). Randomizace probíhala až po proběhlé chemoradioterapii a základní podmínkou bylo, aby na kontrolním MR vyšetření před randomizací nebyla zaznamenána progresa onemocnění. Tato skutečnost je dnes kritizována odbornou veřejností, protože tak došlo k selekčnímu bias tím, že byli předem vyloučeni pacienti s agresivnějším onemocněním. Navíc studie byla „open-label“ a výsledky mohly být částečně ovlivněny placebo efektem. Autoři argumentují, že k selekčnímu bias před randomizací došlo v obou ramenech, což nebrání vyhodnocení účinnosti nové metody a že zařazení placebového ramene by bylo pro pacienty neetické. Navíc hodnocení MR nálezů bylo prováděno centrálně nezávislými zaslepenými radiology. Do klinické studie EF-14 bylo randomizováno celkem 695 pacientů, 466 pacientů do ramene s Optune + adjuvantní temozolomid, 229 pacientů mělo samotný adjuvantní temozolomid (6–12 cyklů). Medián času bez progresa onemocnění od randomizace byl s TTF + TMZ 6,7 měsíce vs. 4,0 měsíce se samotnou chemoterapií (HR 0,63;  $p < 0,001$ ). Medián celkového přežití od randomizace byl 20,9 měsíců v rameni s TTF a TMZ vs. 16,0 měsíců se samotným

temozolomidem (HR 0,63;  $p < 0,001$ ) a 5leté přežití bylo 13 % vs. 5 %. Pacienti z léčby TTF profitovali bez ohledu na věk či stav metylace MGMT. Rameno s TTF nemělo více vážnějších systémových nežádoucích účinků, jen zde byly zaznamenány mírné kožní reakce v místě nalepených elektrod (133). Autoři výsledky studie hodnotí velmi pozitivně, protože od roku 2005 se jedná v podstatě o jediný nový postup, který překonal klasický Stuppův režim. Optune je dnes v EU schválena pro léčbu nově diagnostikovaných a rekurentních glioblastomů. Tato metoda však není vhodná pro všechny pacienty. Za kontraindikaci je považována infratentoriální lokalizace nádoru a přítomnost kardiostimulátoru. Základní podmínkou je spolupracující motivovaný pacient v dobrém stavu (KI > 70 %), s výborným sociálním a rodinným zázemím. Vzhledem k finanční nákladnosti a nutnosti individuální žádosti o úhradu ze zdravotního pojištění nelze dnes Optune považovat za standardně dostupnou léčebnou metodu. Vývoj běží dále, v přípravě jsou nyní studie, jejichž cílem je zhodnotit efekt časně zahájené léčby s Optune (současně s chemoradioterapií).

#### 5.4.2 Cílená léčba

Díky intenzivnímu výzkumu v oblasti patogeneze gliomů byla objevena celá řada molekulárních a genetických biomarkerů. Jejich diagnostický a prognostický význam byl využit při poslední aktualizaci WHO klasifikace v roce 2016. Další velmi rychlý pokrok lze očekávat s postupným zaváděním genomových sekvenačních technik. Aktuální klinická praxe je však zatím zcela odlišná. Standardní léčebné možnosti se za posledních 15 let zásadně nezměnily. Naděje vkládané do cílené léčby se v případě nově diagnostikovaného i rekurentního glioblastomu zatím nenaplnily. Byly zkoušeny inhibitory receptorů pro růstové faktory – EGFR (gefitinib, erlotinib, lapatinib), PDGFR (imatinib, dasatinib), zkoušely se blokovat nitrobuněčné signální dráhy (inhibitor proteinkinázy C – enzastaurin, inhibitor mTOR – sirolimus, everolimus). Nezdarem u nového i rekurentního glioblastomu nedávno skončil i nadějný preparát ABT-414 (depatuximab mafodotin), což je konjugát monoklonální protilátky proti EGFR (včetně EGFRvIII) s navázaným mikrotubulinovým inhibitorem (148,149). Falešné naděje byly vkládány do blokády angiogeneze pomocí multikinázových inhibitorů (sunitinib, sorafenib, vandetanib), inhibitorů VEGFR (cediranib) a integrinů (cilengitid) (150,151). Největším zklamáním byl asi neúspěch bevacizumabu, protilátky proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru. Ten byl v roce 2009 v USA schválen FDA (Food and Drug Administration) k léčbě rekurentního glioblastomu na základě příznivých radiologických odpovědí a prodloužení PFS (progression free survival) ve studiích 2. fáze.

Bevacizumab byl podáván v monoterapii i v kombinaci s chemoterapií, nejčastěji s irinotekanem (152–154). V monoterapii se šestiměsíční PFS (PFS-6) pohyboval mezi 29–42 % a medián OS (overall survival) od recidivy byl kolem 7–9 měsíců. V kombinaci s chemoterapií byly výsledky podobné (PFS-6 mezi 30–50 %, medián OS mezi 8,7 a 9,8 měsíců). V EU však dosud ke schválení indikace bevacizumabu u rekurentních glioblastomů nedošlo. Důvodem byl jeho neúspěch ve velké randomizované klinické studii 3. fáze EORTC 26101 srovnávající u pacientů s první recidivou glioblastomu kombinaci bevacizumab + lomustin vs. lomustin. V rameni s bevacizumabem nedošlo k významnému prodloužení celkového přežití (medián OS u kombinace 9,1 vs. 8,6 měsíce u lomustinu, HR 0,95;  $p = 0,65$ ). Podobně jako v jiných studiích s bevacizumabem bylo zaznamenáno pouze prodloužení mediánu PFS (4,2 vs. 1,5 měsíce, HR 0,49;  $p < 0,001$ ) (155). Parametry PFS a hodnocení léčebné odpovědi na MR navíc mohou být zkresleny mechanismem účinku bevacizumabu s pseudoodpovědí (snížení cévní propustnosti pro kontrastní látku a zmenšení edému). Vzhledem k pozitivnímu vlivu bevacizumabu na kvalitu života (antiedematózní efekt, zpomalení celkové deteriorace) je bevacizumab v některých zemích EU u rekurentních glioblastomů užíván, a to i bez registrace (off-label indikace). O poznání jasnější je situace kolem bevacizumabu u nově diagnostikovaných glioblastomů. V této indikaci proběhly dvě velké randomizované klinické studie 3. fáze AVAglio a RTOG 0825 srovnávající Stuppův režim + bevacizumab/placebo. Obě studie dopadly podobně s pozitivním vlivem na prodloužení PFS, ale bez ovlivnění OS (130,131). Se stejnými závěry byla publikována také metaanalýza tří studií s 1 738 pacienty, opět bez ovlivnění OS (HR 1,04;  $p = 0,71$ ) (156). Bevacizumab na základě těchto výsledků není indikován pro léčbu nově diagnostikovaného glioblastomu. Zda některá podskupina může z léčby bevacizumabem profitovat, není jasné. Podle retrospektivní biomarkerové analýzy ze studie AVAglio by určitý benefit z léčby bevacizumabem mohli mít pacienti s proneurálním typem glioblastomu (25).

Příčin, proč došlo k opakovanému neúspěchu výše uvedených studií s cílenou léčbou, je pravděpodobně více. Jistou roli hraje intratumorální a interpersonální heterogenita onemocnění, volba špatného terapeutického cíle, nedostatečný průnik preparátu přes neporušenou část hematoencefalické bariéry, aktivace paralelní onkogenní nitrobuňkové signální dráhy vedoucí k rychlému vývoji sekundární rezistence, využití starších ve formalinu fixovaných nádorových tkání místo čerstvých tkání při testování biomarkerů a další. Dnes se pohled na strategii využití cílené léčby mění. Díky pokroku v diagnostice poroste tlak na sekvenování nádorového genomu s úkolem hledání nových potenciálních terapeutických

cílů. Těmi mohou být u glioblastomu také onkogenní fúzní geny (např. NTRK, MET, FGFR) (157–159). Selektivní inhibitory tyrozinkinázových receptorů pak nabízejí možnost cílené léčby nádorů asociovaných s těmito fúzními geny. Příkladem může být léčba entrektinibem a larotrektinibem při průkazu fúze genů pro neurotrofní receptory s tyrozinkinázovou aktivitou (NTRK – neurotrophic receptor kinase). Bohužel podle studií se NTRK fúzní geny u glioblastomu dospělých vyskytují vzácně, a to pouze v 1–3 % případů (160). Aktuálně se odhaduje, že potenciálně léčbou ovlivnitelné fúzní geny lze diagnostikovat u cca 5–10 % glioblastomů (157,161). Poznatky však rychle přibývají jak v oblasti diagnostiky, tak i ve vývoji nových preparátů, takže je reálná naděje, že se toto číslo v budoucnu zvýší. Z moderních léků, které by se mohly uplatnit v léčbě glioblastomu, je potřeba zmínit PARP inhibitory (olaparib, veliparib), které bloádou DNA reparačních mechanismů mohou pomoci překonat rezistenci k temozolomidu. Problémem ale může být zvýšená myelosuprese při kombinaci obou preparátů (13). U IDH mutovaných glioblastomů by mohly v budoucnu sehrát pozitivní roli IDH inhibitory (např. vorasidenib, ivosidenib, olutasidenib), které se nyní intenzivně zkouší hlavně u low-grade IDH mutovaných gliomů (74,162). Bohužel známé a dobře ovlivnitelné onkogenní mutace typu BRAF jsou u glioblastomu vzácné (cca 2 %) (74). Další oblastí vědeckého zájmu je také metabolismus nádorových buněk a možnosti jeho ovlivnění (např. metabolismus cholesterolu) (13).

Hodně se diskutuje o potřebě změnit design klinických studií. Vývoj potenciálního léku by měl být zahájen již testováním ve studii fáze 0, v tzv. prechirurgické fázi. Podstatou těchto studií by bylo podání preparátu před operací. Po operaci by proběhla analýza s měřením dosažené koncentrace zkoumané látky v nádorové tkáni. Tím by se již v této fázi vyseletovaly preparáty s dobrou prostupností přes hematoencefalickou bariéru. Pacienti s glioblastomy by se dále měli více zařazovat do studií 1. fáze. Bude pravděpodobně vyvíjen tlak na masivní testování biomarkerů ve studiích, a to nejen před léčbou, ale také v jejím průběhu a v době recidivy. Snahou bude častěji využívat tekuté biopsie z krve, případně z mozkomíšního moku. Kromě standardního ramene ve studiích 2. fáze by měly mít studie i další experimentální ramena, která by se buďto rozšiřovala, nebo uzavírala dle průběžných výsledků. Snahou je, aby byl proces dynamičtější a rychleji se dospělo k jasným závěrům a účinné léčbě. Plánuje se také častější zařazování pacientů do tzv. basket studií (stejná léčba různých diagnóz s identickou mutací) (13).



### 5.4.3 Imunoterapie

Moderní imunoterapie dnes představuje jednu ze základních léčebných metod u řady nádorů. Velké naděje se do ní vkládají také v případě glioblastomu. Podobně jako u cílené léčby, tak i u imunoterapie glioblastomů bylo dosaženo v oblasti výzkumu velkého pokroku. Výsledkem je množství proběhlých a probíhajících klinických studií s novými preparáty, ve většině případů s rekurentním glioblastomem. Možností, jak využít potenciálu imunitního systému v boji s nádorem, je celá řada. Lze použít metody pasivní imunoterapie s aplikací protilátek či nádorově specifických T-lymfocytů – autologně stimulovaných tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) či geneticky upravených CAR-T-lymfocytů s chimérickým antigenním receptorem cíleným proti specifickému nádorovému antigenu. Z metod aktivní imunoterapie, jejímž cílem je stimulace protinádorové imunity a/nebo potlačení inhibičních mechanismů vyvolaných nádorem, je nutné zmínit cytokiny, protinádorové vakcíny (peptidové, buněčné) a v neposlední řadě, dnes u jiných diagnóz velmi úspěšné, protilátky proti inhibičním receptorům na efektorových cytotoxických T-lymfocytech či jejich ligandům. Intenzivní výzkum probíhá také v oblasti viroterapie s využitím geneticky modifikovaných virů. Po infekci a smrti nádorové buňky dochází k uvolnění nádorově specifických antigenů či jiné látky (genový vektor), které mají aktivovat lokální a případně i systémovou imunitní odpověď. Bohužel podobně jako u cílené léčby, ani u různých forem imunoterapie žádná studie zatím průlom v léčbě glioblastomu nezaznamenala.

Za poslední velmi nadějnou protinádorovou vakcínu byl považován rindopepimut (CDX-110). Jde o specifickou peptidovou vakcínu proti EGFRvIII, což je trvale aktivní mutovaná forma EGFR receptoru s chybějící částí extracelulární domény, vyskytující se u cca 30 % glioblastomů. Přítomnost EGFRvIII je spojena s agresivnějším nádorovým fenotypem a horší prognózou. Intradermální aplikace vakcíny spolu s GM-CSF (růstový faktor pro granulocyty a makrofágy) měla vyvolat nádorově specifickou imunitní odpověď (163). Bohužel slibné výsledky z časných studií 2. fáze u rekurentních (studie ReACT) a nově diagnostikovaných glioblastomů (studie ACTIVATE, ACT II, ACT III) nebyly potvrzeny ve velké randomizované studii 3. fáze s nově diagnostikovanými EGFRvIII glioblastomy (studie ACT IV). Randomizace proběhla po ukončené chemoradioterapii, podmínkou byla absence progresu onemocnění, rindopepimut s GM-CSF byl podáván s adjuvantním temozolomidem. Pacienti s vakcínou měli stejné přežití jako bez ní, se standardním Stuppovým režimem (medián OS 20,1 vs. 20,0 měsíců, HR 1,01; p = 0,93) (164). I přes negativní závěry této velké

studie je na EGFRvIII stále pohlíženo jako na perspektivní cílovou strukturu a určitě bude v budoucnu předmětem dalšího výzkumu.

Dalším potenciálním cílem pro výrobu peptidových vakcín může být aberantní forma enzymu isocitrátdehydrogenázy jako produktu mutace genu *IDH1* (nejčastěji mutace R132H). Zde je vývoj teprve na počátku a v případě úspěchu se bude u glioblastomů týkat jen velmi malé části pacientů (IDH mutovaných), podobně jako u cílené léčby s IDH inhibitory. V oblasti protinádorových vakcín běží intenzivní výzkum s dendritickými buňkami. Ty mohou být připraveny pulsací autologních dendritických buněk s jasně definovanými syntetickými peptidy (antigeny) typickými pro glioblastomy (MAGE-1, HER-2, AIM-2, TRP-2, gp100, IL-13R $\alpha$ 2). Příkladem může být studie 2. fáze ICT-107, která však neprokázala významné prodloužení celkového přežití ve srovnání s kontrolním ramenem (165). Autologní dendritické buňky mohou být také kultivovány přímo s nádorovým lyzátem pacienta, pak jde o přípravu vysoce specifické buněčné nádorové vakcíny (studie 3. fáze DCVax-L). Metody je nutno vzhledem k jejich náročnosti považovat za vysoce experimentální, navíc zatím nebylo prokázáno zásadní prodloužení celkového přežití léčených pacientů (166).

Zlomovým okamžikem v oblasti imunoterapie bylo objevení inhibičních receptorů na buňkách imunitního systému, především na cytotoxických T-lymfocytech. Jedná se o jednu z cest, jak nádor uniká imunitnímu dozoru. Blokadou těchto receptorů (např. CTLA-4, PD-1) nebo jejich ligandů pomocí monoklonálních protilátek (tzv. checkpoint inhibitorů) dochází k restituci nádorem inhibované imunitní kontroly. Zavedení checkpoint inhibitorů (ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab) do léčby pokročilého melanomu v posledních 10 letech způsobilo v podstatě revoluci v onkologii. Díky této moderní léčbě bylo významně prodlouženo celkové přežití a výrazně se zvýšil počet dlouhodobě žijících pacientů s diseminovaným melanomem. V řadě případů se mluví i o vysoké pravděpodobnosti úplného vyléčení. Tento úspěch doslova spustil lavinu klinických studií snad u všech onkologických diagnóz, a to včetně glioblastomu. Bohužel podobné úspěchy s checkpoint inhibitory se u glioblastomu zatím nedostavily. Studie 3. fáze CheckMate 143 u rekurentních glioblastomů neprokázala superioritu nivolumabu nad bevacizumabem. Medián OS u nivolumabu a bevacizumabu byl 9,8 a 10,0 měsíců (HR 1,04;  $p = 0,76$ ), 12měsíční celkové přežití bylo shodné v obou ramenech (42 %), objektivní odpovědi bylo dosaženo častěji u bevacizumabu (23,1 % vs. 7,8 %) (167,168). Podobně, bez prodloužení celkového přežití v rameni s nivolumabem dopadla i velká randomizovaná studie 3. fáze (CheckMate 498) u nově diagnostikovaných glioblastomů bez metylace MGMT srovnávající radioterapii

s nivolumabem vs. chemoradioterapii s temozolomidem (168). Aktuálně se čeká na výsledky celkového přežití ze studie 3. fáze (CheckMate 548) u nově diagnostikovaných glioblastomů s metylací MGMT srovnávající Stuppův režim + nivolumab/placebo (169). Dle předběžných výsledků nebylo dosaženo signifikantního prodloužení PFS v rameni s nivolumabem.

Zklamání z dosavadních výsledků klinických studií s imunoterapií vedla samozřejmě k zamyšlení nad možnými příčinami. Jednou z hlavních příčin bude skutečnost, že glioblastom patří mezi nádory s nízkou mutační náloží a že významnou roli hraje také nádorové mikroprostředí. To je zodpovědné za přirozenou a získanou rezistenci k imunoterapii. Prostřednictvím solubilních mediátorů (např. TGF- $\beta$ , interleukin 10, prostaglandin E2, kynurenin), myeloidních supresorových buněk, T regulačních lymfocytů, makrofágů, mikroglií a dalších faktorů dochází k potlačení aktivity a vyčerpání efektorových T-lymfocytů. Negativní roli hrají jistě i často antiedematózně používané kortikosteroidy. Cílem dalšího výzkumu bude změnit, z pohledu imunitního systému, „studený“ nádor na „horký“ a překonat mechanismy rezistence. Checkpoint inhibitory bude pravděpodobně nutné kombinovat s dalšími léky, které pomohou potlačit imunosupresivní vliv nádorového mikroprostředí. Další cestou bude vhodný výběr pacienta pro imunoterapii. Jednou z možností je aktivní vyhledávání pacientů s nádory s vysokou mutační náloží, u kterých se předpokládá také vyšší četnost neoantigenů a pozitivní odpověď na imunoterapii. K tomu nám může pomoci NGS testování při pátrání po řídicí mutaci. Vyšší mutační nálož mají přirozeně pacienti s poruchou MMR systému – reparačních mutátorových genů (mismatch repair geny – hMSH2, hMLH1, hMS1, hPMS2), u kterých nedochází k dostatečné postreplicative kontrole a opravě vzniklých mutací. Hypermutační fenotyp může být způsoben také samotnou onkologickou léčbou. Bylo popsáno, že se objevuje až u 10 % pacientů v době rekurence po proběhlé chemoradioterapii (13,170,171). Samozřejmostí bude hledání dalších prediktivních biomarkerů, podobně jako u ostatních diagnóz. Důležitá také bude potenciální toxicita imunoterapie (obávané imunitně podmíněné vedlejší účinky).

#### 5.4.4 Vlastní příspěvek k problematice

*Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Klinický výzkum a moderní léčba u gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. Gliomy. Současná diagnostika a léčba, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 199–207 (citace 172, příloha 14).*

V kapitole naší knihy Gliomy „**Klinický výzkum a moderní léčba u gliomů**“ jsme se věnovali perspektivním léčebným modalitám. Cílem bylo shrnutí v dané době aktuálních informací k Optune, cílené léčbě včetně BRAF inhibitorů a pak především k imunoterapii, do které se vkládaly a stále vkládají velké naděje. Nejvíce prostoru bylo věnováno checkpoint inhibitorům, se kterými máme z oblasti moderní imunoterapie největší zkušenosti.

## 6 Závěr

Primární mozkové nádory u dospělých patří k méně častým onkologickým onemocněním. Bohužel i přes relativně nízkou incidenci představují závažný zdravotní problém. Nejčastějším primárním maligním nádorem je glioblastom, který je pro své biologické chování a lokalizaci považován za jeden z nejhůře léčitelných nádorů vůbec. I přes velké pokroky v oblasti diagnostických a terapeutických metod zůstávají výsledky komplexní onkologické léčby neuspokojivé. Současný léčebný standard glioblastomu se od roku 2005 zásadněji nezměnil. Je založen na multimodálním přístupu kombinujícím maximálně možný a současně bezpečný chirurgický výkon následovaný pooperační radioterapií a chemoterapií s alkylačním cytostatikem temozolomidem. Jediným malým pokrokem je léčba pomocí střídavých elektrických polí vysílaných z elektrod nalepených na kůži hlavy (Optune). Větší dostupnost této metody je však omezena enormně vysokou cenou, motivací pacientů a některými diskutabilními otázkami v proběhlých klinických studiích. Medián celkového přežití se přes veškeré úsilí prodloužil za posledních 15 let pouze o pár měsíců, a to především díky medicínskému vývoji napříč všemi obory. Bohužel, na rozdíl od ostatních diagnóz, se nám zatím nepodařilo zařadit do standardních léčebných postupů cílenou terapii a imunoterapii. Proběhlé klinické studie s moderní léčbou dosud neprokázaly vyšší účinnost než klasický Stuppův režim. Dle recentních publikací a vystoupení předních neuroonkologů je zřejmé, že další posun v léčbě glioblastomu se bude opírat především o intenzivní hledání nových biomarkerů a potenciálních terapeutických cílů. K tomu bude stále častěji využíváno moderních technik genomového sekvenování. Získané informace budou zásadní jak pro stanovení individuální léčebné strategie, tak pro zařazování pacientů s glioblastomy do studií časných fází s designem „basket“ a „umbrella trialů“. Další oblastí s velkým potenciálem je imunoterapie. V budoucnu se musíme zaměřit na výběr vhodného pacienta pro tuto formu léčby a snažit se novými přístupy či kombinacemi preparátů potlačit přirozené či získané mechanismy rezistence. I když ve světle proběhlých studií vypadá glioblastom jako téměř

neovlivnitelné onemocnění, je jen otázkou času, kdy dojde k zásadní změně podobně jako u jiných diagnóz.

## 7 Citace

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2020-7-24]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
3. Mužík J, Májek O, Svobodová I, et al. Epidemiologie gliomů podle dat národního onkologického registru. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. Gliomy. Současná diagnostika a léčba, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 14-23.
4. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(10):1985-1996.
5. Braganza MZ, Kitahara CM, Berrington de González A, et al. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol.* 2012;14(11):1316-1324.
6. Bowers DC, Nathan PC, Constine L, et al. Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2013;14(8):e321-e328.
7. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(21):1528-1537.
8. Myung SK, Ju W, McDonnell DD, et al. Mobile phone use and risk of tumors: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2009;27(33):5565-5572.
9. Corle C, Makale M, Kesari S. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J Neurooncol.* 2012;106(1):1-13.
10. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, et al. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;30:1-11.
11. Ostrom QT, Adel Fahmideh M, Cote DJ, et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro Oncol.* 2019;21(11):1357-1375.
12. Ranger AM, Patel YK, Chaudhary N, et al. Familial syndromes associated with intracranial tumours: a review. *Childs Nerv Syst.* 2014;30(1):47-64.
13. Wen PY, Weller M, Lee EQ, et al. Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions [published online ahead of print, 2020 Apr 24]. *Neuro Oncol.* 2020;noaa106.
14. Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, et al. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum Genet.* 2012;131(12):1877-1888.

15. Polívka J, Polívka J.Jr, Rohan V, et al. Multiformní glioblastom – přehled nových poznatků o patogenezi, biomarkerech a perspektivách léčby. *Cesk Slov Neurol N* 2013; 76/109(5): 575-583.
16. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-772.
17. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-773.
18. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, et al. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002-6007.
19. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820.
20. Slabý O, Bešše A, Šána J. Molekulární patologie gliálních nádorů. In: Pavel Šlampa a kol. *Gliomy – současná diagnostika a léčba.* Praha: Maxdorf, 2013, s. 89-113.
21. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(3):603-608.
22. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):157-173.
23. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110.
24. Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, et al. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):434-452.
25. Sandmann T, Bourgon R, Garcia J, et al. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial [published correction appears in *J Clin Oncol.* 2016 Sep 1;34(25):3113]. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2735-2744.
26. Sana J, Hajdúch M, Michálek J, et al. MicroRNAs and glioblastoma: roles in core signalling pathways and potential clinical implications. *J Cell Mol Med.* 2011;15(8):1636-1644.
27. Sana J, Busek P, Fadrus P, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Sci Rep.* 2018;8(1):2836. Published 2018 Feb 12.
28. Besse A, Sana J, Lakomy R, et al. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7719-7727.
29. Chang SM, Parney IF, Huang W, et al. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA.* 2005;293(5):557-564.
30. Whelan LC, Anderson NE, Baker PC, et al. Leptomeningeal infiltration as the presenting manifestation of a malignant glioma. *J Clin Neurosci.* 2006;13(2):298-301.

31. Mujic A, Hunn A, Taylor AB, et al. Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J Clin Neurosci*. 2006;13(6):677-681.
32. Rosen J, Blau T, Grau SJ, et al. Extracranial Metastases of a Cerebral Glioblastoma: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Oncol*. 2018;11(2):591-600. Published 2018 Aug 28.
33. Belanová R. Zobrazovací metody v diagnostice primárních mozkových maligních tumorů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 68-80.
34. Šprláková-Puková A. Pokročilé techniky magnetické rezonance při zobrazení tumorů mozku. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 81-90.
35. Bulík M, Kazda T, Jančálek R. Protonová MR spektroskopie v neuroonkologii. *Neurol. Praxi* 2016;17(5):283-286.
36. Bulík M. Magnetická rezonanční spektroskopie v zobrazování gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 91-100.
37. Adam J, Demlová R, Řehák Z. Pokroky ve vývoji PET radiofarmak pro pacienty v České republice. *Klin Onkol*. 2016;29 (Suppl 4):S95-S100.
38. Hodolič M, Řehák Z. Moderní vyšetřovací metody v oblasti nukleární medicíny. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 101-111.
39. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr, et al. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1990;8(7):1277-1280.
40. Brandsma D, Stalpers L, Taal W, et al. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):453-461.
41. Brandsma D, van den Bent MJ. Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas. *Curr Opin Neurol*. 2009;22(6):633-638.
42. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2192-2197.
43. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1963-1972.
44. Okada H, Weller M, Huang R, et al. Immunotherapy response assessment in neuro-oncology: a report of the RANO working group. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):e534-e542.
45. Chinot OL, Macdonald DR, Abrey LE, et al. Response assessment criteria for glioblastoma: practical adaptation and implementation in clinical trials of antiangiogenic therapy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(5):347.
46. Lin NU, Lee EQ, Aoyama H, et al. Response assessment criteria for brain metastases: proposal from the RANO group. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):e270-e278.
47. Kazda T, Bulík M, Pospisil P, et al. Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy

- and diffusion weighted MR imaging. *Neuroimage Clin.* 2016;11:316-321. Published 2016 Feb 26.
48. Vašina J, Svoboda M, Lakomý R, et al. Využití <sup>11</sup>C-methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku – soubor 16 pacientů. *NuklMed* 2018;7(4):62-68.
  49. Jiang H, Cui Y, Wang J, et al. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget.* 2017;8(12):20354-20361.
  50. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol.* 2017;133(6):1001-1016.
  51. Hermanová M. Klasifikace gliomů a jejich integrovaná diagnostika. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 34-49.
  52. Hendrych M, Valeková H, Kazda T, et al. Integrovaná diagnostika difúzních gliomů. *Klin Onkol.* 2020 Summer;33(4):248-259.
  53. Kramář F, Minárik M, Belšánová B, et al. Genetické a epigenetické faktory podmiňující vznik a prognózu mozkových gliomů – souhrn současných poznatků. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(4): 400-405.
  54. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2481-2498.
  55. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499-2508.
  56. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):867-873.
  57. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66(20):9852-9861.
  58. Meyronet D, Esteban-Mader M, Bonnet C, et al. Characteristics of H3 K27M-mutant gliomas in adults. *Neuro Oncol.* 2017;19(8):1127-1134.
  59. Labussière M, Idbaih A, Wang XW, et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology.* 2010;74(23):1886-1890.
  60. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2015;129(1):133-146.
  61. NCCN Guidelines Version 2.2020, Central Nervous System Cancers, Principles of brain tumor pathology molecular markers [online], [cit. 2020-7-26]. Dostupné z: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cns.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf)
  62. Houdová Megová M, Drábek J, Dwight Z, et al. Mutace isocitrátdehydrogenázy jsou lepší prognostický marker než metylace promotoru O6-metylguanin-DNA-



- metyltransferázy u glioblastomů – retrospektivní molekulárně genetická studie gliomů z jednoho centra. *Klin Onkol.* 2017;30(5):361-371.
63. Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009;27(25):4150-4154.
  64. van den Bent MJ. Practice changing mature results of RTOG study 9802: another positive PCV trial makes adjuvant chemotherapy part of standard of care in low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2014;16(12):1570-1574.
  65. Lakomý R, Kazda T, Poprach A, et al. Postavení chemoterapie v pooperační léčbě low-grade gliomů. *Klin Onkol.* 2017;30(5):343-348.
  66. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):344-350.
  67. Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):337-343.
  68. Polivka J Jr, Polivka J, Repik T, et al. Co-deletion of 1p/19q as Prognostic and Predictive Biomarker for Patients in West Bohemia with Anaplastic Oligodendroglioma. *Anticancer Res.* 2016;36(1):471-476.
  69. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
  70. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol.* 2018;233(1):378-386.
  71. Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):79. Published 2016 Aug 8.
  72. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology.* 2010;75(17):1560-1566.
  73. McDuff SGR, Dietrich J, Atkins KM, et al. Radiation and chemotherapy for high-risk lower grade gliomas: Choosing between temozolomide and PCV. *Cancer Med.* 2020;9(1):3-11.
  74. Ippen FM, Colman H, van den Bent MJ, et al. Precision Medicine for Primary Central Nervous System Tumors: Are We There Yet?. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018;38:158-167.
  75. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-926.
  76. Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):707-715.
  77. Slabý O. 1. část: Technologie genomového sekvenování pro účely precizní onkologie [online], [cit. 2020-7-26]. Dostupné z: [https://www.prolekare.cz/kreditovane-](https://www.prolekare.cz/kreditovane)

kurzy/precizni-medicina-v-onkologii-109447/technologie-genomoveho-sekvenovani-pro-ucely-precizni-onkologie

78. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med.* 2017;377(25):2500-2501.
79. Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma.* 2010;57(3):264-269.
80. Lakomy R, Sana J, Hankeova S, et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* 2011;102(12):2186-2190.
81. Sana J, Radova L, Lakomy R, et al. Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. *Carcinogenesis.* 2014;35(12):2756-2762.
82. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-996.
83. Sanai N, Berger MS. Recent surgical management of gliomas. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:12-25.
84. Hardesty DA, Sanai N. The value of glioma extent of resection in the modern neurosurgical era. *Front Neurol.* 2012;3:140. Published 2012 Oct 18.
85. Hrabalek L, Kalita O, Vaverka M, et al. Resection versus biopsy of glioblastomas in eloquent brain areas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(1):150-155.
86. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014;16(1):113-122.
87. Grabowski MM, Recinos PF, Nowacki AS, et al. Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J Neurosurg.* 2014;121(5):1115-1123.
88. Mansouri A, Mansouri S, Hachem LD, et al. The role of 5-aminolevulinic acid in enhancing surgery for high-grade glioma, its current boundaries, and future perspectives: A systematic review. *Cancer.* 2016;122(16):2469-2478.
89. Nickel K, Renovanz M, König J, et al. The patients' view: impact of the extent of resection, intraoperative imaging, and awake surgery on health-related quality of life in high-grade glioma patients-results of a multicenter cross-sectional study. *Neurosurg Rev.* 2018;41(1):207-219.
90. Jančálek R. Úloha neurochirurgie v léčbě high-grade gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 121-137.
91. Kazda T, Lakomý R, Pospíšil P, et al. Přínos chemoradioterapie v léčbě high-grade gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 138-149.
92. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5(10):1725-1731.

93. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(3):853-860.
94. Narayana A, Yamada J, Berry S, et al. Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;64(3):892-897.
95. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology.* 1980;30(9):907-911.
96. Liang BC, Thornton AF Jr, Sandler HM, et al. Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *J Neurosurg.* 1991;75(4):559-563.
97. Han SJ, Englot DJ, Birk H, et al. Impact of Timing of Concurrent Chemoradiation for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Critical Review of Current Evidence. *Neurosurgery.* 2015;62 (Suppl 1):160-165.
98. Do V, GebSKI V, Barton MB. The effect of waiting for radiotherapy for grade III/IV gliomas. *Radiother Oncol.* 2000;57(2):131-136.
99. Irwin C, Hunn M, Purdie G, et al. Delay in radiotherapy shortens survival in patients with high grade glioma. *J Neurooncol.* 2007;85(3):339-343.
100. Gliński B, Urbański J, Hetnał M, et al. Prognostic value of the interval from surgery to initiation of radiation therapy in correlation with some histo-clinical parameters in patients with malignant supratentorial gliomas. *Contemp Oncol (Pozn).* 2012;16(1):34-37.
101. Lai R, Hershman DL, Doan T, et al. The timing of cranial radiation in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2010;12(2):190-198.
102. Noel G, Huchet A, Feuvret L, et al. Waiting times before initiation of radiotherapy might not affect outcomes for patients with glioblastoma: a French retrospective analysis of patients treated in the era of concomitant temozolomide and radiotherapy. *J Neurooncol.* 2012;109(1):167-175.
103. Wehming FM, Wiese B, Nakamura M, et al. Malignant glioma grade 3 and 4: how relevant is timing of radiotherapy?. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012;114(6):617-621.
104. Blumenthal DT, Won M, Mehta MP, et al. Short delay in initiation of radiotherapy may not affect outcome of patients with glioblastoma: a secondary analysis from the radiation therapy oncology group database. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):733-739.
105. Loureiro LV, Victor Eda S, Callegaro-Filho D, et al. Minimizing the uncertainties regarding the effects of delaying radiotherapy for Glioblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol.* 2016;118(1):1-8.
106. Blumenthal DT, Won M, Mehta MP, et al. Short delay in initiation of radiotherapy for patients with glioblastoma-effect of concurrent chemotherapy: a secondary analysis from the NRG Oncology/Radiation Therapy Oncology Group database. *Neuro Oncol.* 2018;20(7):966-974.
107. Warren KT, Liu L, Liu Y, et al. The Impact of Timing of Concurrent Chemoradiation in Patients With High-Grade Glioma in the Era of the Stupp Protocol. *Front Oncol.* 2019;9:186. Published 2019 Mar 27.

108. Farace P, Amelio D, Ricciardi GK, et al. Early MRI changes in glioblastoma in the period between surgery and adjuvant therapy. *J Neurooncol.* 2013;111(2):177-185.
109. Pirzkall A, McGue C, Saraswathy S, et al. Tumor regrowth between surgery and initiation of adjuvant therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2009;11(6):842-852.
110. Wee CW, Kim E, Kim TM, et al. Impact of interim progression during the surgery-to-radiotherapy interval and its predictors in glioblastoma treated with temozolomide-based radiochemotherapy. *J Neurooncol.* 2017;134(1):169-175.
111. Merkel A, Soeldner D, Wendl C, et al. Early postoperative tumor progression predicts clinical outcome in glioblastoma-implication for clinical trials. *J Neurooncol.* 2017;132(2):249-254.
112. Villanueva-Meyer JE, Han SJ, Cha S, et al. Early tumor growth between initial resection and radiotherapy of glioblastoma: incidence and impact on clinical outcomes. *J Neurooncol.* 2017;134(1):213-219.
113. Palmer JD, Bhamidipati D, Shukla G, et al. Rapid Early Tumor Progression is Prognostic in Glioblastoma Patients. *Am J Clin Oncol.* 2019;42(5):481-486.
114. Mayer R, Sminia P. Reirradiation tolerance of the human brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;70(5):1350-1360.
115. Hynková L, Šlampa P. Stereotaktická radioterapie a radiochirurgie v léčbě recidivujících high-grade gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 160-169.
116. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 1978;49(3):333-343.
117. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, et al. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer.* 1983;52(6):997-1007.
118. Medical Research Council Brain Tumor Working Party. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):509-518.
119. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 2002;359(9311):1011-1018.
120. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003;5(2):79-88.
121. Bregy A, Shah AH, Diaz MV, et al. The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(12):1453-1461.
122. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466.

123. Curran WJ Jr, Scott CB, Horton J, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(9):704-710.
124. Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, et al. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;40(1):51-55.
125. Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006;24(16):2563-2569.
126. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* 2008;9(1):29-38.
127. Gittleman H, Lim D, Kattan MW, et al. An independently validated nomogram for individualized estimation of survival among patients with newly diagnosed glioblastoma: NRG Oncology RTOG 0525 and 0825. *Neuro Oncol.* 2017;19(5):669-677.
128. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4085-4091.
129. Blumenthal DT, Gorlia T, Gilbert MR, et al. Is more better? The impact of extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of EORTC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro Oncol.* 2017;19(8):1119-1126.
130. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709-722.
131. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):699-708.
132. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1100-1108.
133. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial [published correction appears in *JAMA*. 2018 May 1;319(17):1824]. *JAMA.* 2017;318(23):2306-2316.
134. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, et al. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393(10172):678-688.
135. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1027-1037.
136. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2017 Nov;18(11):e642]. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e315-e329.

137. Perry JR, Bélanger K, Mason WP, et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3543]. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2051-2057.
138. Weller M, Tabatabai G, Kästner B, et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res*. 2015;21(9):2057-2064.
139. Chen C, Xu T, Lu Y, et al. The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. *Eur J Neurol*. 2013;20(2):223-230.
140. Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Postavení chemoterapie v léčbě gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 177-189.
141. Kazda T, Lakomý R, Poprach A, et al. Multidisciplinární přístup v léčbě gliomů – astrocytomy a oligodendrogliomy. *Postgraduální medicína* 2020;22(2):137-142.
142. Lakomý R, Fadrus P, Šlampa P, et al. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsektivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. *Klin Onkol*. 2011;24(2):112-120.
143. Kazda T, Dziacky A, Burkon P, et al. Radiotherapy of Glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp's Trial: More Controversies than Standards?. *Radiol Oncol*. 2018;52(2):121-128. Published 2018 Jun 6.
144. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol*. 2020;10:840. Published 2020 Jul 3.
145. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, et al. Pre-Radiotherapy Progression after Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma: Corroboration of New Prognostic Variable. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9):E676. Published 2020 Sep 5.
146. Vymazal J. Optune – nová cesta v léčbě glioblastomu. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 170-176.
147. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2192-2202.
148. Lassman A, Pugh S, Wang A, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial Of Depatuxizumab Mafodotin (ABT-414) In Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplified (Amp) Newly Diagnosed Glioblastoma (nGBM). *Neuro-Oncology*. 2019; 21:vi17.
149. Van Den Bent M, Eoli M, Sepulveda JM, et al. INTELLANCE 2/EORTC 1410 randomized phase II study of Depatux-M alone and with temozolomide vs temozolomide or lomustine in recurrent EGFR amplified glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2020;22(5):684-693.
150. Lakomý R, Burkoň P, Burkoňová D, et al. Nové možnosti léčby glioblastoma multiforme. *Klin Onkol*. 2010;23(6):381-387.
151. Polivka J Jr, Polivka J, Holubec L, et al. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res*. 2017;37(1):21-33.

152. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2007;25(30):4722-4729.
153. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4733-4740.
154. Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):740-745.
155. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1954-1963.
156. Fu P, He YS, Huang Q, et al. Bevacizumab treatment for newly diagnosed glioblastoma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Mol Clin Oncol.* 2016;4(5):833-838.
157. Ferguson SD, Zhou S, Huse JT, et al. Targetable Gene Fusions Associate With the IDH Wild-Type Astrocytic Lineage in Adult Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(6):437-442.
158. Parker BC, Engels M, Annala M, et al. Emergence of FGFR family gene fusions as therapeutic targets in a wide spectrum of solid tumours. *J Pathol.* 2014;232(1):4-15.
159. Kim J, Lee Y, Cho HJ, et al. NTRK1 fusion in glioblastoma multiforme [published correction appears in *PLoS One.* 2014;9(6):e101140. Cho, Hee-Jin [corrected to Cho, Hee Jin]]. *PLoS One.* 2014;9(3):e91940. Published 2014 Mar 19.
160. Gambella A, Senetta R, Collemi G, et al. NTRK Fusions in Central Nervous System Tumors: A Rare, but Worthy Target. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):753. Published 2020 Jan 23.
161. Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, et al. The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene.* 2015;34(37):4845-4854.
162. Konteatis Z, Artin E, Nicolay B, et al. Vorasidenib (AG-881): A First-in-Class, Brain-Penetrant Dual Inhibitor of Mutant IDH1 and 2 for Treatment of Glioma. *ACS Med Chem Lett.* 2020;11(2):101-107. Published 2020 Jan 22.
163. Schuster J, Lai RK, Recht LD, et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol.* 2015;17(6):854-861.
164. Weller M, Butowski N, Tran DD, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1373-1385.
165. Wen PY, Reardon DA, Armstrong TS, et al. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Trial of Dendritic Cell Vaccine ICT-107 in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2019;25(19):5799-5807.
166. Hdeib A, Sloan AE. Dendritic cell immunotherapy for solid tumors: evaluation of the DCVax® platform in the treatment of glioblastoma multiforme. *CNS Oncol.* 2015;4(2):63-69.
167. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial [published online ahead of print, 2020 May 21]. *JAMA Oncol.* 2020;6(7):1-8.

168. Sampson JH, Gunn MD, Fecci PE, et al. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):12-25.
169. Weller M, Le Rhun E. Immunotherapy for glioblastoma: quo vadis? *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(7):405-406.
170. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet*. 2016;48(7):768-776.
171. Draaisma K, Chatzipli A, Taphoorn M, et al. Molecular Evolution of IDH Wild-Type Glioblastomas Treated With Standard of Care Affects Survival and Design of Precision Medicine Trials: A Report From the EORTC 1542 Study. *J Clin Oncol*. 2020;38(1):81-99.
172. Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Klinický výzkum a moderní léčba u gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 199-207.

## 8 Seznam zkratek

|        |   |
|--------|---|
| ADC    | apparent diffusion coefficient, aparentní difuzní koeficient                                  |
| AIM-2  | human interferon-inducible protein, lidský interferonem indukovatelný protein                 |
| AKT    | alpha serine/threonine-protein kinase, alfa serin/threonin proteinkináza                      |
| ALA    | aminolevulinic acid, aminolevulinová kyselina   |
| ATRX   | alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X linked  |
| AZV ČR | Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky  |
| BCNU   | cytostatikum karmustin  |
| BRAF   | B-Raf serine/threonine-specific protein kinase, B-Raf serin/threonin specifická proteinkináza |
| BSC    | best supportive care, nejlepší podpůrná léčba   |
| BTSG   | Brain Tumour Study Group  |
| CAR    | chimeric antigen receptor, chimérický antigenní receptor                                      |
| CBTRUS | Central Brain Tumor Registry of the United States, Centrální registr mozkových nádorů USA     |
| CCDC26 | coiled-coil domain-containing protein 26, protein obsahující doménu coiled-coil               |
| CD     | cluster of differentiation, buněčný membránový antigen (diferenciační skupina)                |
| CDK4   | cyclin-dependent kinase 4, cyklin-dependentní kináza 4  |
| CDKN2A | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A                  |
| CGH    | comparative genomic hybridization, srovnávací genomická hybridizace                           |



|           |  |
|-----------|--|
| 11C-MET   | 11C-methionin, radiofarmakum   |
| CNS       | centrální nervový systém   |
| CNV       | copy number variation, variace počtu kopií   |
| Cr        | kreatinin  |
| CT        | computed tomography, počítačová tomografie   |
| CTLA-4    | cytotoxic T lymphocyte antigen 4, cytotoxický T lymfocytární antigen 4                                 |
| CTV       | clinical target volume, klinický cílový objem  |
| ČLS       | Česká lékařská společnost  |
| ČOS       | Česká onkologická společnost   |
| DAXX      | death-domain associated protein, protein asociovaný s doménou smrti                                    |
| DNA       | deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina  |
| DWI       | diffusion weighted imaging, difuzně vážené zobrazení   |
| EANO      | European Association of Neuro-Oncology   |
| EGFR      | epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor                              |
| EGFRvIII  | epidermal growth factor receptor variant III, varianta III receptoru pro epidermální růstový faktor    |
| EORTC     | European Organisation for Research and Treatment of Cancer   |
| EU        | European Union, Evropská unie  |
| FDA       | Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv                                       |
| 18F-FDG   | 18F-fluorodeoxyglukóza, radiofarmakum  |
| 18F-FET   | 18F-fluoroethyltyrosin, radiofarmakum  |
| 18F-FDOPA | 18F-fluorodihydroxyphenylalanin, radiofarmakum   |
| 18F-FLT   | 18F-fluorothymidin, radiofarmakum  |
| FGFR      | fibroblast growth factor receptor, receptor pro fibroblastový růstový faktor                           |
| FISH      | fluorescence in situ hybridization, fluorescenční in situ hybridizace                                  |
| FLAIR     | fluid attenuated inversion recovery, zobrazení s potlačením signálu volné tekutiny a mozkomíšního moku |
| FUBP1     | far upstream element binding protein 1   |
| G         | grade, stupeň diferenciacie nádoru   |
| G-CIMP    | glioma CpG island methylator phenotype, hypermetylační stav ostrůvků cytozin-guanin nádorového genomu  |
| Glx       | glutamát-glutamin  |
| GM-CSF    | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, růstový faktor pro granulocyty a makrofágy           |

|           |   |
|-----------|---|
| GMT Group | Glioma Meta-Analysis Trialists Group  |
| GTR       | gross total resection, totální resekce  |
| GTV       | gross tumor volume, nádorový cílový objem   |
| Gy        | Gray  |
| HER-2     | receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor   |
| 2-HG      | 2-hydroxyglutarát   |
| HGG       | high grade glioma, vysokostupňový gliom   |
| HIV       | human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti   |
| H3-K27M   | histone H3 K27M mutant, mutace K27M v genech pro histon 3   |
| HR        | hazard ratio, poměr rizik   |
| HRM       | high resolution melting analysis, analýza křivek tání s vysokým rozlišením  |
| Cho       | cholin  |
| CHT       | chemoterapie  |
| CHT/RT    | chemoradioterapie   |
| IDH       | isocitrate dehydrogenase, isocitrátdehydrogenáza  |
| IDHmt     | IDH mutant, mutace genu pro IDH přítomna  |
| IDHwt     | IDH wild-type, mutace genu pro IDH nepřítomna   |
| IF        | impakt faktor   |
| IGFR      | insulin-like growth factor receptor, receptor pro růstový faktor podobný inzulínu   |
| IHC       | immunohistochemistry, imunohistochemie  |
| IMRT      | intensity modulated radiotherapy, radioterapie s modulovanou intenzitou ozařovaného svazku  |
| iRANO     | immunotherapy response assesment criteria in neuro-oncology, kritéria hodnocení imunoterapeutické odpovědi v neuronkologii                        |
| JAK/STAT  | Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, transduktor signalizace prostřednictvím Janusových kináz a aktivátor transkripce |
| JEP       | Jan Evangelista Purkyně   |
| kHz       | kilohertz   |
| KI        | Karnofski index, Karnofského index  |
| KPS       | Karnofski performance status, Karnofského stav tělesné výkonnosti   |
| Lac       | laktát  |
| LGG       | low grade glioma, nízkostupňový gliom   |

|        |  |
|--------|--|
| Lip    | lipidy   |
| LOH    | loss of heterozygosity, ztráta heterozygosity  |
| MAGE-1 | melanoma-associated antigen 1, antigen 1 spojený s melanomem   |
| MAPK   | mitogen-activated protein kinase, mitogenem aktivovaná proteinkináza   |
| MBq    | megaBecquerel  |
| MDM2   | murine double minute 2, E3 ubikvitin protein ligáza  |
| MET    | mesenchymal epithelial transition receptor tyrosine kinase, mezenchymální epitelová přechodná receptorová tyrozinkináza                          |
| MGMT   | O6-methylguanine DNA methyltransferase, O6-methylguanin DNA methyltransferáza  |
| mI     | myoinositol  |
| miR    | microRNA, mikroRNA (krátké řetězce nekódující RNA)   |
| MLPA   | multiplex ligation-dependent probe amplification, multiplexní ligace závislá amplifikace sondy, variace multiplexní polymerázové řetězové reakce |
| MMR    | mismatch repair, oprava chybného párování bází DNA   |
| MMSE   | mini-mental state examination, krátký test kognitivních funkcí   |
| MR     | magnetická rezonance   |
| mRNA   | messenger RNA  |
| MRS    | magnetická rezonanční spektroskopie  |
| mTOR   | mammalian target of rapamycin, savčí cíl rapamycinu, serin/threonin proteinkináza  |
| NAA    | N-acetylaspartát   |
| NCIC   | National Cancer Institute of Canada  |
| NF1    | gen pro neurofibromin 1  |
| NGS    | next generation sequencing, sekvenování nové generace  |
| NOS    | not otherwise specified, není uvedeno jinak  |
| NTR    | near total resection, téměř kompletní resekce  |
| NTRK   | neurotrophic receptor kinase, neutrofinový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou   |
| OS     | overall survival, celkové přežití  |
| PARP   | poly (ADP-ribose) polymerase, poly (ADP-ribóza) polymeráza   |
| PCR    | polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce  |
| PCV    | kombinovaný cytostatický režim (prokarbazin, lomustin, vinkristin)   |
| PD-1   | programmed cell death 1 receptor, receptor 1 programované buněčné smrti  |

|         |   |
|---------|---|
| PDGFR   | platelet derived growth factor receptor, receptor pro destičkový růstový faktor   |
| PET     | pozitronová emisní tomografie   |
| PFS     | progression free survival, přežití bez progresu onemocnění  |
| PFS-6   | 6měsíční přežití bez progresu onemocnění  |
| PHLDB1  | pleckstrin homology like domain family B member 1, protein  |
| PI3K    | phosphatidylinositol 3-kinase, fosfatidylinositol 3-kináza  |
| PS      | performance status, stav tělesné výkonnosti   |
| PTEN    | phosphatase and tensin homolog, fosfatázový a tenzinový homolog   |
| PTV     | planning target volume, plánovací cílový objem  |
| PXA     | pleomorphic xanthoastrocytoma, pleomorfní xantoastrocytom   |
| RANO    | response assesment criteria in neuro-oncology, kritéria hodnocení léčebné odpovědi v neuronkologii  |
| RANO-MB | response assessment criteria in neuro-oncology brain metastases, kritéria hodnocení léčebné odpovědi v neuronkologii u mozkových metastáz |
| RAS     | Rous adenosarcoma, onkogen RAS  |
| RB1     | human retinoblastoma gene, gen pro lidský retinoblastom   |
| RECIST  | response evaluation criteria in solid tumours, kritéria hodnocení léčebné odpovědi u solidních nádorů                                     |
| RELA    | v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, v-rel retikuloendotelióza virový onkogen homolog A                                  |
| RHEB    | ras homolog enriched in brain, homolog RAS  |
| RNA     | ribonucleic acid, ribonukleová kyselina   |
| RPA     | recursive partitioning analysis, statistická metoda pro analýzu s více proměnnými   |
| RR      | response rate, počet léčebných odpovědí   |
| RT      | radioterapie  |
| RTEL1   | regulator of telomere elongation helicase 1, regulátor prodlužování telomer   |
| RTK     | receptor tyrosine kinase, receptor s tyrozinkinázovou aktivitou   |
| RTOG    | Radiation Therapy Oncology Group  |
| SNO     | Society for Neuro-Oncology  |
| STR     | subtotal resection, subtotální resekce  |
| SUV     | standartized uptake value, semikvantitativní ukazatel utilizace radiofarmaka  |
| TACC    | transforming acidic coiled-coil gene, gen kódující protein TACC   |
| TCGA    | The Cancer Genome Atlas, atlas nádorového genomu  |

|               |  |
|---------------|--|
| TERT          | telomerase reverse transcriptase, reverzní transkriptáza telomerázy                              |
| TGF- $\beta$  | transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta                              |
| TIL           | tumor infiltrating lymphocytes, tumor infiltrující lymfocyty                                     |
| TKI           | tyrosine kinase inhibitor, inhibitor tyrozinkinázy   |
| TMZ           | cytostatikum temozolomid   |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy alfa  |
| TNM           | tumor, lymph nodes, metastasis; nádor, uzliny, metastázy   |
| TRP-2         | tyrosinase-related protein-2, protein-2 související s tyrosinázou                                |
| TTF           | tumor treating fields, pole léčící nádor   |
| UZ            | ultrazvukové vyšetření   |
| V/cm          | volt na centimetr  |
| VEGF          | vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor                       |
| VEGFR         | vascular endothelial growth factor receptor, receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor |
| VMAT          | volumetric modulated arc therapy, volumetrické rotační IMRT                                      |
| WBRT          | whole brain radiotherapy, ozařování celého mozku   |
| WHO           | World Health Organization, Světová zdravotnická organizace                                       |

## 9 Seznam příloh

### Příloha 1

Sana J, Busek P, Fadrus P, Besse A, Radova L, Vecera M, Reguli S, Stollinova Sromova L, Hilser M, Lipina R, Lakomy R, Kren L, Smrcka M, Sedo A, Slaby O. Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Sci Rep.* 2018;8(1):2836.

### Příloha 2

Besse A, Sana J, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, Hermanova M, Jancalek R, Reguli S, Lipina R, Svoboda M, Slampa P, Slaby O. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7719-7727.

### **Příloha 3**

Kazda T, Bulik M, Pospisil P, Lakomy R, Smrcka M, Slampa P, Jancalek R. Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging. *Neuroimage Clin.* 2016;11:316-321.

### **Příloha 4**

Vašina J, Svoboda M, Lakomý R, Kazda T, Adam J, Řehák Z. Využití 11C-methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku - soubor 16 pacientů. *NuklMed* 2018;7(4):62-68.

### **Příloha 5**

Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, Smrcka M, Svoboda M, Dolezalova H, Novakova J, Valik D, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma.* 2010;57(3):264-269.

### **Příloha 6**

Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* 2011;102(12):2186-2190.

### **Příloha 7**

Sana J, Radova L, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, Besse A, Nekvindova J, Hermanova M, Jancalek R, Svoboda M, Hajduch M, Slampa P, Vyzula R, Slaby O. Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. *Carcinogenesis.* 2014;35(12):2756-2762.

### **Příloha 8**

Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Postavení chemoterapie v léčbě gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 177-189.

## **Příloha 9**

Kazda T, Lakomý R, Poprach A, Hendrych M, Knight A, Šlampa P. Multidisciplinární přístup v léčbě gliomů – astrocytomy a oligodendrogliomy. *Postgraduální medicína* 2020;22(2):137-142.

## **Příloha 10**

Lakomý R, Fadrus P, Šlampa P, Svoboda T, Křen L, Lžičařová E, Belanová R, Siková I, Poprach A, Schneiderová M, Procházková M, Šána J, Slabý O, Smrčka M, Vyzula R, Svoboda M. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsektivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. *Klin Onkol.* 2011;24(2):112-20.

## **Příloha 11**

Kazda T, Dziacky A, Burkon P, Pospisil P, Slavik M, Rehak Z, Jancalek R, Slampa P, Slaby O, Lakomy R. Radiotherapy of Glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp's Trial: More Controversies than Standards? *Radiol Oncol.* 2018;52(2):121-128.

## **Příloha 12**

Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, Fadrus P, Vybihal V, Smrcka M, Jancalek R, Hynkova L, Muckova K, Hendrych M, Sana J, Slaby O, Slampa P. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol.* 2020;10:840.


## **Příloha 13**

Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, Fadrus P, Smrcka M, Vybihal V, Jancalek R, Kiss I, Muckova K, Hendrych M, Knight A, Sana J, Slampa P, Slaby O. Pre-Radiotherapy Progression after Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma: Corroboration of New Prognostic Variable. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(9):E676. Published 2020 Sep 5.

## **Příloha 14**

Lakomý R, Kazda T, Poprach A. Klinický výzkum a moderní léčba u gliomů. In: Lakomý R, Kazda T, Šlampa P a kol. *Gliomy. Současná diagnostika a léčba*, 2. vydání, Praha: Maxdorf, 2018, s. 199-207.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival

Jiri Sana<sup>1,2</sup>, Petr Busek<sup>3</sup>, Pavel Fadrus<sup>4</sup>, Andrej Besse<sup>1</sup>, Lenka Radova<sup>1</sup>, Marek Vecera<sup>1</sup>, Stefan Reguli<sup>5</sup>, Lucie Stollinova Sromova<sup>3</sup>, Marek Hilser<sup>3</sup>, Radim Lipina<sup>4</sup>, Radek Lakomy<sup>2</sup>, Leos Kren<sup>6</sup>, Martin Smrcka<sup>4</sup>, Aleksí Sedo<sup>3</sup> & Ondrej Slaby<sup>1,2</sup>

Glioblastoma stem-like cells (GSCs) are critical for the aggressiveness and progression of glioblastoma (GBM) and contribute to its resistance to adjuvant treatment. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs controlling gene expression at the post-transcriptional level, which are known to be important regulators of the stem-like features. Moreover, miRNAs have been previously proved to be promising diagnostic biomarkers in several cancers including GBM. Using global expression analysis of miRNAs in 10 paired *in-vitro* as well as *in-vivo* characterized primary GSC and non-stem glioblastoma cultures, we identified a miRNA signature associated with the stem-like phenotype in GBM. 51 most deregulated miRNAs classified the cell cultures into GSC and non-stem cell clusters and identified a subgroup of GSC cultures with more pronounced stem-cell characteristics. The importance of the identified miRNA signature was further supported by demonstrating that a Risk Score based on the expression of seven miRNAs overexpressed in GSC predicted overall survival in GBM patients in the TCGA dataset independently of the IDH1 status. In summary, we identified miRNAs differentially expressed in GSCs and described their association with GBM patient survival. We propose that these miRNAs participate on GSC features and could represent helpful prognostic markers and potential therapeutic targets in GBM.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequently occurring primary brain tumor of astrocytic origin in adults. Despite complex therapy consisting of maximal surgical resection, adjuvant concomitant chemoradiotherapy with temozolomide followed by temozolomide in monotherapy, the prognosis remains dismal<sup>1</sup>. The short survival of GBM patients is caused by both the impossibility of achieving “biologically” radical surgical resection and tumor resistance to adjuvant therapy. Glioblastoma stem-like cells (GSCs) are thought to be an important contributor to the poor response to the adjuvant therapy due to the higher expressions of the DNA repair enzymes, antiapoptotic factors, and multidrug transporters<sup>2,3</sup>. These rather slow proliferating cells are also capable of self-renewal and multilineage differentiation, are highly invasive, modulate immune response and promote angiogenesis. GSCs form gliomaspheres in serum-free media *in vitro*<sup>4,5</sup> and have strong tumorigenic potential in immunodeficient animals recapitulating the hallmarks of the original tumors<sup>6</sup>. GSCs express, although to a variable extent, specific stemness markers such as the transcription factor Sox-2, the cytoskeletal protein nestin,

<sup>1</sup>Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. <sup>4</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. <sup>5</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>6</sup>Department of Pathology, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. Jiri Sana and Petr Busek contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S. (email: [aleksi@cesnet.cz](mailto:aleksi@cesnet.cz)) or O.S. (email: [on.slaby@gmail.com](mailto:on.slaby@gmail.com))



and/or the cell surface glycoprotein CD133<sup>7,8</sup>, which are generally used for their identification. According to some studies, the presence of GSCs as determined by functional assays as well as the expression of GSC markers is associated with the prognosis in GBM patients<sup>9–12</sup>. Several studies have shown that microRNAs (miRNAs) are important molecular players closely related to the biological features of GSCs. MiRNAs are highly conserved, 18–25 nucleotide long non-coding RNAs that function as post-transcriptional regulators of gene expression by silencing their mRNA targets. It is estimated that miRNAs could regulate up to 60% of human genes including genes associated with the maintenance of the stem-like phenotype, differentiation, and chemo- and radioresistance<sup>13,14</sup>. Thus, miRNAs play significant roles in the functions of various types of healthy as well as cancer stem-like cells including GSCs<sup>15–17</sup>. Indeed, changes in miRNA expression were observed during the transition of GSCs to more differentiated phenotypes<sup>18</sup> and e.g. the miR-302-367 cluster was shown to be able to abolish the stem cell characteristics of GSCs<sup>19</sup>. Our previous studies also demonstrated that miRNAs are able to predict the survival in GBM patients<sup>20,21</sup>.

In this study, we identified a set of miRNAs that is closely associated with the stem-like phenotype of GBM cells. We further corroborated the importance of the most differentially expressed miRNAs by showing their potential to predict overall survival in GBM patients independently of the IDH1 mutation status. These miRNAs may thus play an important role in the pathogenesis of brain tumors and represent potential therapeutic targets affecting GSCs and overcoming the therapeutic resistance of GBM.

## Results

**Characterization of the paired glioblastoma cell cultures.** We successfully derived paired primary cell cultures from several GBMs (8 men and 2 women; median age 64 years - min 52, max 78 years), which were propagated in both defined serum-free medium favoring the expansion of GSCs and in medium supplemented with 10% FBS (non-stem cells). The cells cultured in serum-free medium initially formed gliomaspheres (Fig. 1A) and were subsequently propagated on laminin or geltrex (Fig. 1B). The matched paired primary cell cultures propagated in serum containing media grew adherently (Fig. 1C). The majority of the GSC cultures exhibited CD133 expression as determined by flow cytometry (Fig. 1D) and could undergo differentiation into GFAP and beta III tubulin expressing cells when transferred into serum containing media (Fig. 1E). All of the paired GBM cell cultures were IDH1/2 wild-type, their characteristics are summarized in Supplementary Table S1.

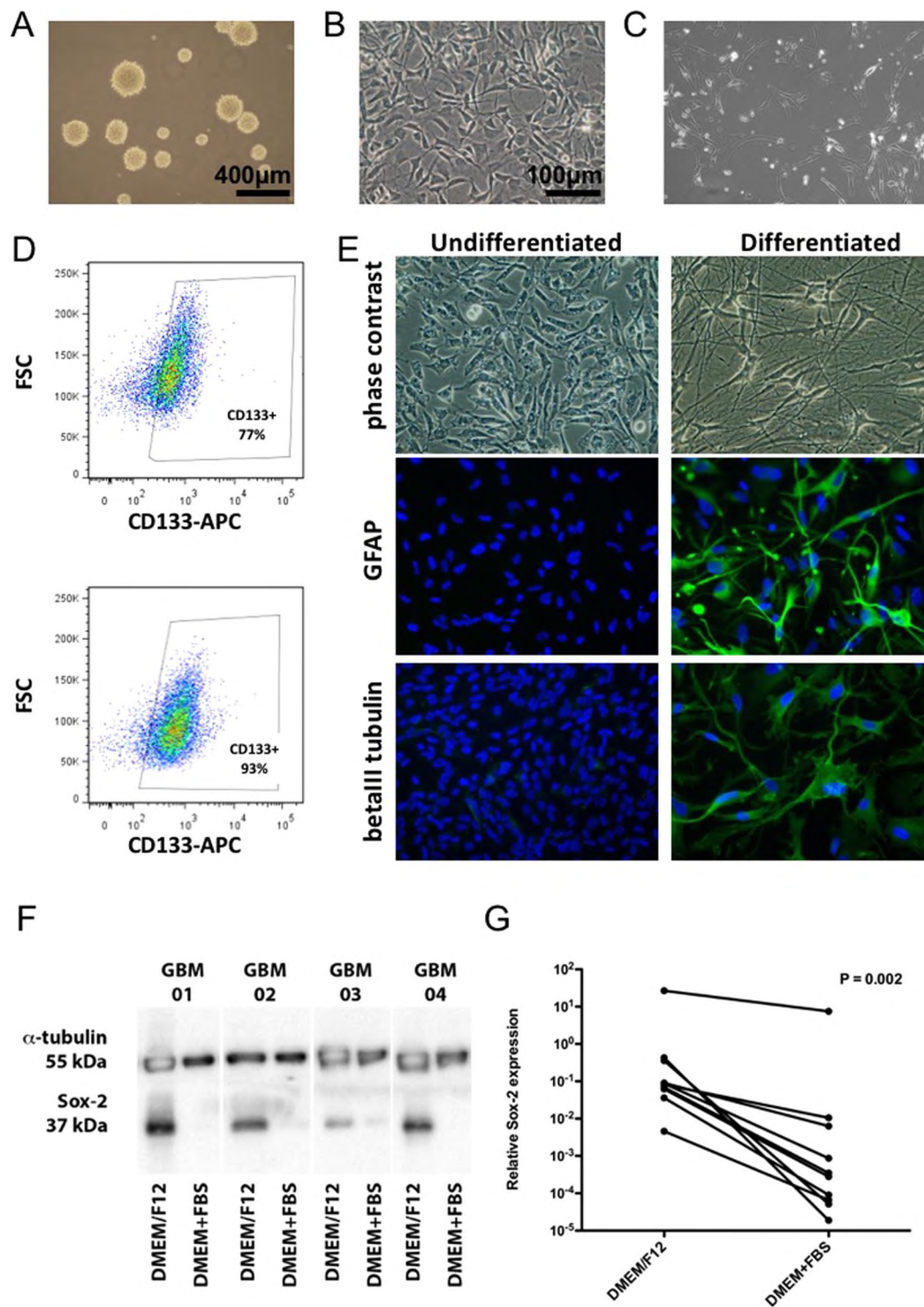
Western blot (Fig. 1F) and qRT-PCR ( $P = 0.002$ ; Wilcoxon paired test) (Fig. 1G) analyses revealed substantially higher Sox-2 expression in the cells cultured in serum-free conditions in comparison to the cells derived from the same patient sample propagated in serum containing medium. The expression of nestin, another stem cell marker, correlated with Sox-2 expression ( $r = 0.7955$ ;  $P < 0.0001$ ) and there was a trend for higher nestin expression in the GBM primary cells derived in serum-free conditions ( $P = 0.065$ ; Wilcoxon paired test) (see Supplementary Figure S1).

The large majority of the cultures propagated in serum-free as well as serum containing media were tumorigenic in immunodeficient mice (7/8 and 6/8 cultures, respectively). Nevertheless, the paired GBM cell cultures formed xenograft tumors with distinct features. The tumors derived from the glioma primary cell cultures propagated in serum containing media were characteristically well demarcated and GFAP negative (Fig. 2C,D). In contrast, the paired cultures derived in serum-free conditions typically produced GFAP positive tumors with single cell infiltration into the surrounding brain tissue including the contralateral hemisphere, white matter tracts and tropism towards the periventricular regions (Fig. 2A,B).

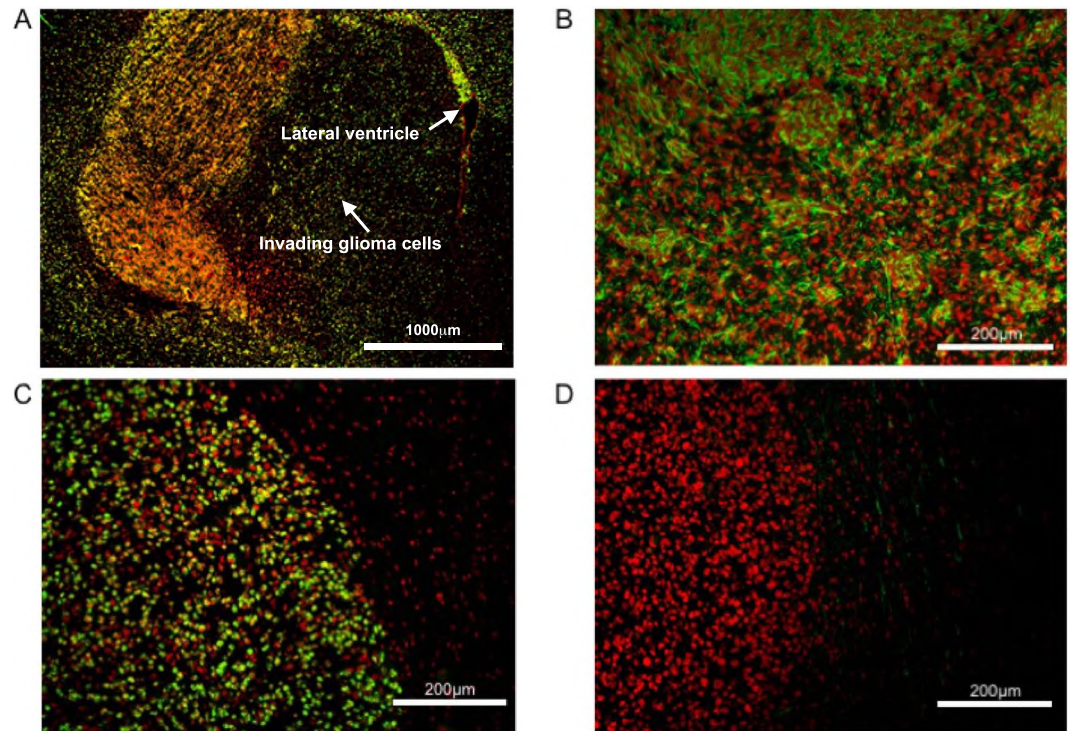
In summary, we verified that the cell cultures derived in serum-free conditions have typical characteristics of glioma stem-like cells (GSCs).

**MicroRNAs differentially expressed in the paired GSC and non-stem glioblastoma cell cultures.** To identify a set of miRNAs characteristic for glioma stem-like cells we performed a genome-wide expression profiling of 2578 human miRNAs in the 10 paired GSC and non-stem GBM cell cultures derived in serum-free and serum supplemented medium, respectively. LIMMA analysis for paired samples revealed 431 significantly deregulated miRNAs in the GSCs in comparison with the non-stem GBM cells ( $P < 0.05$ ) (see Supplementary Table S2). 51 miRNAs were deregulated at a significance level below 0.001 (25 miRNAs were upregulated and 26 miRNAs were downregulated). Importantly, among the 51 most deregulated miRNAs expression of 23 miRNAs correlated with Sox-2 expression at a significance level lower than 0.001, and 14 miRNAs correlated with both Sox-2 ( $P < 0.001$ ) and nestin expression ( $P < 0.05$ ) (Table 1). These data strongly suggest that several of the identified miRNAs are closely linked to the stemness of the glioma cell lines cultured in serum-free media.

Cluster analysis based on the 51 most differentially expressed miRNAs correctly classified all GSC and 80% of the non-stem cell cultures (Fig. 3A). This analysis also revealed that the main cluster I containing all GSC samples was divided into two subclusters. Subcluster IA was exclusively composed of GSC cultures and the pattern of miRNA expression was more distinct from serum cultures contained in cluster II. All analyzed cultures in subcluster IA were tumorigenic and exhibited pronounced multilineage differentiation. Subcluster IB, which contained the remaining four serum-free derived GSC cultures, also included two serum derived non-stem cell cultures; moreover, the serum-free derived cultures in this subcluster exhibited only little differentiation when exposed to 10% serum and one of them did not form tumors in immunodeficient mice. Collectively, these data suggest somewhat less pronounced stemness characteristics of GSC cultures in subcluster IB (Table 2, Supplementary Table S1). Statistical analysis comparing only cell cultures from subcluster IA, which exhibited more pronounced stemness characteristics, and cluster II samples containing the non-stem cell cultures revealed nine miRNAs (miR-9-3p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p, miR-124-3p, miR-153-3p, miR-301a-3p, miR-345-5p, and miR-652-3p), which were all upregulated in GSCs at a significance level below 0.0001 (Fig. 3B).



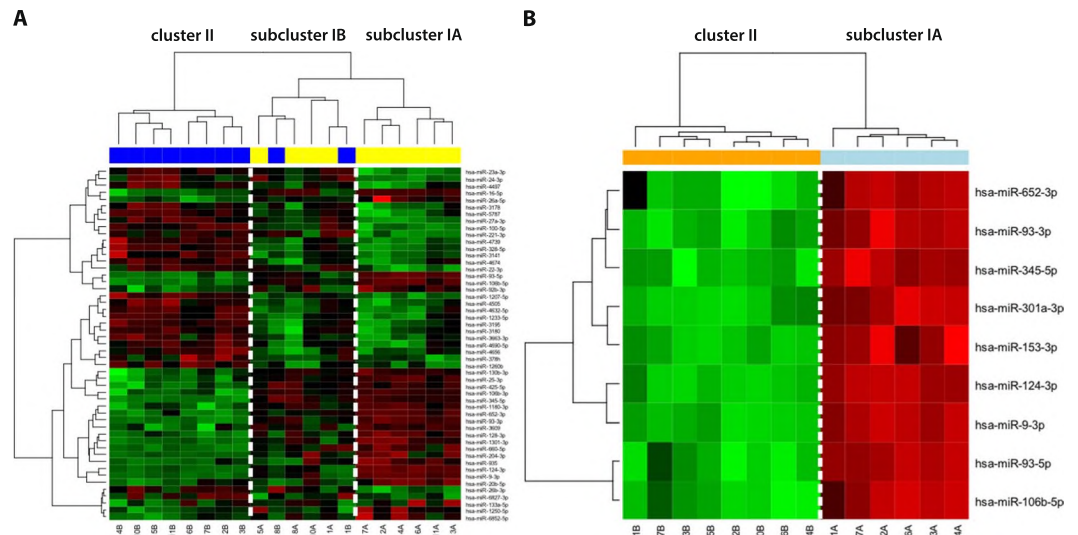
**Figure 1.** Characterization of the primary GBM cell cultures propagated in serum-free and serum containing media. (A) Cells growing in serum-free medium as gliomaspheres, (B) cells growing in serum-free medium on laminin, (C) adherent cell growing in serum containing medium, (D) detection of CD133 in two independent serum-free medium cultures, (E) differentiation of serum-free medium cultured cells induced by 10% fetal calf serum, (F) western blot analysis of Sox-2 and  $\alpha$ -tubulin and (G) qRT-PCR of Sox-2 expression in GBM cells propagated in serum-free (DMEM/F12) and serum containing (DMEM + FBS) media. The P value signifies the statistical significance of the difference between the paired primary cell lines as assessed by the Wilcoxon paired test.



**Figure 2.** Characteristics of orthotopic xenotransplants derived from primary GBM cell cultures propagated in serum-free (A,B) and serum containing (C,D) media. (A and C) Detection of human glioma cells by an antibody against human nuclei (in green). (B and D) Detection of GFAP expression (in green). ToPro3 was used for nuclear counterstaining (red).

|                      | miRNA       | Sox-2             |                   | Nestin     |         |
|----------------------|-------------|-------------------|-------------------|------------|---------|
|                      |             | Spearman r        | P value           | Spearman r | P value |
| Negative correlation | miR-3195    | -0.85             | <10 <sup>-5</sup> | -0.60      | 0.006   |
|                      | miR-3141    | -0.83             | <10 <sup>-5</sup> | -0.47      | 0.036   |
|                      | miR-4656    | -0.81             | <10 <sup>-4</sup> | -0.51      | 0.023   |
|                      | miR-100-5p  | -0.79             | <10 <sup>-4</sup> | -0.39      | NS      |
|                      | miR-4739    | -0.77             | <10 <sup>-3</sup> | -0.42      | NS      |
|                      | miR-3180    | -0.75             | <10 <sup>-3</sup> | -0.55      | 0.013   |
|                      | miR-1260b   | -0.75             | <10 <sup>-3</sup> | -0.46      | 0.043   |
|                      | miR-1233-5p | -0.74             | <10 <sup>-3</sup> | -0.49      | 0.029   |
|                      | miR-4674    | -0.73             | <10 <sup>-3</sup> | -0.54      | 0.015   |
|                      | miR-328-5p  | -0.73             | <10 <sup>-3</sup> | -0.48      | 0.032   |
|                      | miR-378h    | -0.72             | <10 <sup>-3</sup> | -0.48      | 0.034   |
|                      | miR-4505    | -0.71             | <10 <sup>-3</sup> | -0.46      | 0.045   |
|                      | miR-5787    | -0.71             | <10 <sup>-3</sup> | -0.47      | 0.036   |
|                      | miR-1207-5p | -0.70             | <10 <sup>-3</sup> | -0.37      | NS      |
| Positive correlation | miR-345-5p  | 0.82              | <10 <sup>-5</sup> | 0.57       | 0.011   |
|                      | miR-1180-3p | 0.78              | <10 <sup>-4</sup> | 0.45       | 0.048   |
|                      | miR-9-3p    | 0.76              | <10 <sup>-3</sup> | 0.40       | NS      |
|                      | miR-124-3p  | 0.75              | <10 <sup>-3</sup> | 0.34       | NS      |
|                      | miR-106b-3p | 0.73              | <10 <sup>-3</sup> | 0.42       | NS      |
|                      | miR-1301-3p | 0.73              | <10 <sup>-3</sup> | 0.41       | NS      |
|                      | miR-130b-3p | 0.71              | <10 <sup>-3</sup> | 0.49       | 0.029   |
|                      | miR-93-3p   | 0.70              | <10 <sup>-3</sup> | 0.37       | NS      |
| miR-106b-5p          | 0.70        | <10 <sup>-3</sup> | 0.32              | NS         |         |

**Table 1.** MiRNAs correlating with Sox-2 and nestin expression in paired primary GBM cell cultures.



**Figure 3.** Hierarchical clustergram discriminating paired primary GSC (yellow) and non-stem glioblastoma cell cultures (blue) propagated in serum-free and serum containing medium, respectively. **(A)** Based on 51 differentially ( $P < 0.001$ ) expressed miRNAs, **(B)** Based on 9 miRNAs differentially ( $P < 0.0001$ ) expressed in GSC and non-stem cell cultures contained in subclusters IA and II, respectively. A gradient of green and red colors is used in the heatmap (green color indicates lower expression whereas red color indicates higher expression of individual miRNAs in analyzed samples).

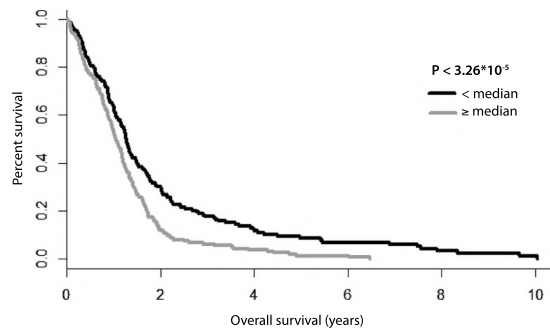
| Cluster | No. of GSC cultures | No. of non-stem cell cultures | Multilineage differentiation <sup>‡</sup> | Tumorigenicity                    |
|---------|---------------------|-------------------------------|---|-----------------------------------|
| IA      | 6                   | 0                             | 4/4**                                     | 5/5                               |
| IB      | 4                   | 2                             | 0/3                                       | 2/3 (GSC)<br>1/2 (non-stem cells) |
| II      | 0                   | 8                             | n.d.                                      | 5/6                               |

**Table 2.** Characteristics of the clusters identified based on the 51 most differentially expressed miRNAs.

<sup>‡</sup>Number of cell cultures exhibiting pronounced differentiation in serum containing media/number of analyzed cell cultures, \*\* $P < 0.05$ , Pearson's chi-squared test compared to cluster IB, n.d. - not determined.

Expression of all these miRNAs positively and statistically significantly correlated with Sox2 expression suggesting their close association with the stem cell-like phenotype of the GSCs.

**MiRNAs differentially expressed in GSCs are associated with survival of GBM patients.** To further support the potential importance of these miRNAs in GBM, we analyzed their relation to overall survival (OS) using the TCGA dataset comprising 485 GBM patients for whom OS and miRNA expression profiles were available. Seven out of nine of the miRNAs most differentially expressed between the GSC cluster IA and non-stem cell cluster II (Fig. 3B, miR-9-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p, miR-153-3p, miR-301a-3p, miR-345-5p, and miR-652-3p) were represented in the TCGA dataset. First, we performed Z-score transformation on expression levels across all GBM samples for each of the aforementioned seven miRNAs; then, the seven-miRNA signature was used to calculate the Risk Score for each patient based on a linear combination of the miRNA expression level weighted by the regression coefficient derived from the multivariate Cox regression analysis<sup>22,23</sup> as follows: risk score =  $0.08270698 * \text{hsa-miR-652} + 0.15074626 * \text{hsa-miR-345} - 0.11310809 * \text{hsa-miR-301} - 0.15450420 * \text{hsa-miR-153} + 0.09238838 * \text{hsa-miR-9} - 0.18565873 * \text{hsa-miR-93} - 0.04894894 * \text{hsa-miR-106b}$ . This composite miRNA Risk Score was a statistically significant prognostic factor in the univariate Cox regression analysis (HR = 2.718; 95% CI (1.814–4.073),  $P < 1.26 * 10^{-6}$ ). Correspondingly, using the median value of the miRNA Risk Score as the threshold, GBM patients could be divided into a high-risk and a low-risk group. Kaplan–Meier analysis confirmed that OS of the high-risk patients was significantly lower in comparison with low-risk patients ( $P < 3.26 * 10^{-5}$ , log-rank test) (Fig. 4). We further tested the prognostic power of the seven-miRNA signature with respect to the IDH1 mutation status in a subset comprising 296 GBM patients for whom exome somatic mutation data were available. The univariate Cox regression analysis revealed that the seven-miRNA signature predicted OS in these patients with higher statistical significance ( $P = 1.064 * 10^{-4}$ ; HR = 2.718; 95% CI (1.642–4.501)) in comparison with IDH1 status ( $P = 3.3 * 10^{-3}$ ; HR = 0.3147; 95% CI (0.1393–0.7109)). These results were underscored using the multivariate Cox regression analysis ( $P = 6.53 * 10^{-4}$ ; HR = 2.442; 95% CI (1.461–4.080) for the seven-miRNA signature and  $P = 1.67 * 10^{-2}$ ; HR = 0.367; 95% CI (0.162–0.834) for IDH1 status). The whole model based on the seven-miRNA signature and IDH1 status predicted OS in GBM patients with a  $P$



**Figure 4.** Kaplan-Meier survival curves estimating OS in GBM patients from the TCGA data set according to the 7-miRNA based Risk Score.

value  $4.24 \times 10^{-5}$  (see Supplementary Table S3). Importantly, the seven-miRNA signature was able to predict OS in both IDH1 wild-type ( $n = 280$ ) and IDH1 mutated ( $n = 16$ ) GBM patients ( $P < 1.01 \times 10^{-3}$  and  $P < 4.62 \times 10^{-2}$ , respectively; log-rank test) (see Supplementary Figure S2).

## Discussion

Glioblastoma multiforme (GBM), the most common malignant primary brain tumor arising from glial cells, is associated with fatal prognosis caused not only by its localization in the central nervous system, but especially by the high invasiveness and resistance to conventional therapies. This biological behavior is associated with the cellular and molecular heterogeneity, which is characteristic for this disease<sup>24,25</sup>. Recent studies have suggested that GBM is driven and maintained by a subpopulation of clonogenic cells called glioblastoma stem-like cells (GSCs), which seem to play a crucial role in GBM biology<sup>26,27</sup>. These cells also contribute to GBM chemoradioresistance through the activation of DNA damage checkpoint responses and the increase in DNA repair capacity<sup>28,29</sup>. The small non-coding microRNAs (miRNAs) playing an important role in the posttranscriptional regulation of gene expression have been previously described in association with GBM initiation, progression, and resistance to therapy as well as with the maintenance of glioma stem-like cells<sup>30</sup>.

In this study, we firstly successfully derived and characterized paired GBM cell cultures from several GBMs, which were propagated either under defined serum-free conditions, or in serum containing medium. These differing cell culture conditions most likely lead to the isolation of distinct cell subpopulations from the original tumor. Consistently with the literature, the paired cell lines displayed profound biological differences<sup>31</sup>. Glioma cells cultured in serum-free conditions frequently expressed CD133, although as described by others<sup>6</sup> the quantity was variable in individual cell lines. The serum-free medium cultured cells also showed the potential to form gliomaspheres and differentiate into GFAP and beta III tubulin positive cells. In comparison with the paired glioma cultures derived in serum containing medium, the serum-free medium derived cells expressed significantly more Sox-2, the stemness marker crucial for the tumorigenicity of GSCs<sup>32</sup>, on both mRNA and protein levels. As previously reported<sup>31</sup>, the serum-free cultured cells characteristically formed highly infiltrative tumors when implanted into immunodeficient mice.

Having established that the cell lines cultured under serum-free conditions used in this study exhibit features typical of GSC, the paired GSC and non-stem cell cultures were utilized to uncover the miRNA expression pattern specific for GSC. Using global miRNA expression analysis, we revealed 51 most differentially expressed miRNAs. These miRNAs were able to classify the cell cultures into non-stem cell cluster II and two GSC subclusters IA and IB (Fig. 3A). Analysis of these two GSC subclusters showed that the first of them (IA) consisted of cultures with more pronounced GSC features compared to the second subcluster (IB) containing among others also two non-stem cell cultures. Subsequent analysis focusing on the miRNAs most differentially expressed between the GSC cluster IA and the non-stem cell cluster II highlighted nine miRNAs (miR-9-3p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p, miR-124-3p, miR-153-3p, miR-301a-3p, miR-345-5p, and miR-652-3p) that were strongly upregulated in GSCs. Several of these miRNAs were previously described to be associated with the regulation of the stemness maintenance as well as with the biological behavior of GBM and survival of patients. MiR-9-3p (referred to as miR-9\*) and its hairpin counterpart miR-9-5p (referred to as miR-9), which was also upregulated in GSCs though with lower statistical significance ( $p < 3.3 \times 10^{-3}$ ;  $\log_2 FC = 2.1$ ), seem to be specifically expressed in the brain<sup>33,34</sup>, are evolutionary conserved from insects to human and are involved in vertebrate neural development<sup>35–37</sup>. Their activities are probably carried out through the effect on the Notch signaling pathway, especially by the targeting of Notch2 and the transcription factor Hes1, resulting in an enhanced differentiation and proliferation of neural stem cells (NSCs)<sup>38,39</sup>. These data seem to be somewhat contradictory to our findings as we observed higher expression of both miRNAs in GSCs. The explanation may lie in the mutual regulation of miR-9/9\* and Notch signaling. It was demonstrated that expression levels of miR-9/9\* depend on the activation status of Notch signaling. While Notch inhibits differentiation of NSCs, it also induces miR-9/9\*<sup>38</sup>. Moreover, Hes1 expression oscillates with a period of 2–3 hours in NSCs and this oscillation is important not only for cell differentiation but also for proliferation as sustained Hes1 expression inhibits both processes<sup>39,40</sup>. Thus, it can be assumed that miR-9/9\* expression levels vary in time to allow cell proliferation. It also seems that the control mechanisms in GSCs are different from those in NSCs. In line with our findings, Schraivogel *et al.* reported that both miRNAs were highly abundant in CD133+ GSCs and their inhibition led to the reduced neurosphere formation and

stimulated cell differentiation<sup>41</sup>. Finally, the higher levels of miR-9/9\* hairpin counterparts in GSCs could also contribute to the increased resistance of these cells to the conventional therapy. Munoz *et al.* recently showed that CD133+ GSCs expressed greater levels of miR-9 which led to the activation of the SHH/PTCH1/MDR1 axis. This axis has been shown to impart TMZ resistance. In the case of the CD133+ cells, the resistance is not acquired but seems to be inherent<sup>42</sup>.

Interestingly, miR-9 and miR-9\* seem to be functionally linked with the miR-124, another most differentially expressed miRNA identified in our study. Staahl *et al.* published that mitotic exit in neurogenesis is inter alia partially driven by these three matured miRNAs<sup>43</sup>. Another study described the synergistic effect of miR-9 and miR-124 on the strong suppression of the GTP-binding protein Rap2a and consequent promotion of neuronal differentiation of NSCs and dendritic branching of differentiated neurons<sup>44</sup>. A very similar effect of the overexpression of miR-9/9\* and miR-124 on the self-renewal and differentiation was observed by Roese-Koerner *et al.* in neuroepithelial-like stem cells derived from human pluripotent stem cells<sup>40</sup>.

MiR-106b-5p, miR-93-5p as well as miR-93-3p are members of the same miRNA gene cluster miR-106b~25 and it is thus not surprising that these miRNAs were jointly upregulated. Interestingly, this cluster seems to be linked to the biology of stem cells. Serum induced differentiation of GSCs was previously demonstrated to decrease the expression levels of miRNAs which belong to this cluster<sup>18</sup> and Brett *et al.* showed that the expression of the entire miR-106b~25 cluster in adult mouse neuronal stem/progenitor cells increases their ability to generate new neurons<sup>45</sup>. In the CD44+ gastric cancer stem-like cells, the entire cluster was significantly upregulated and inhibition of miR-106b led to a decreased self-renewal capacity and cell invasiveness through the suppression of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway<sup>46</sup>.

Only few studies suggesting a direct link between the other miRNAs identified in our study and stem cell biology are available so far. Chang *et al.* described miR-345 to be enriched in mesenchymal stem cells found in Wharton's jelly matrix of human umbilical cord which were able to transdifferentiate into neuronal lineage cells<sup>47</sup>. The miR-301 family has been recently shown to be the direct target of the SFRS2 splicing factor, an OCT4 regulated gene required for the pluripotency in human pluripotent stem cells<sup>48</sup>. Stappert *et al.* demonstrated that miR-153 contributes to the shift of long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells from self-renewal to neuronal differentiation<sup>49</sup>. Similarly, Tezcan *et al.* also demonstrated that miR-153 overexpression reduced tumorigenic capacity of GSCs by targeting the Nrf-2/GPx1/ROS pathway<sup>50</sup>. In contrast with these data, we observed higher expression of both miR-153 and the members of the miR-301 family (miR-301a-3p, miR-130b-3p, and miR-130a-3p) in GSCs. Unfortunately, there are no studies which could help to explain these discrepancies. However, it seems that the stem cell-like state is dependent on many interacting molecules in feedback loops mutually balancing one another over time.

The Risk Score utilized in this study proved that the set of the identified miRNAs is associated with GBM prognosis independently of IDH1 mutation status, further suggesting their involvement in the disease pathogenesis. Higher tissue levels of miR-652, miR-345 and miR-9\* positively contributed to increased values of the risk score and thus worse prognosis; nevertheless, miR-301, miR-153, miR-93 and miR-106b which were also upregulated in GSCs were in fact negative contributors. The explanation for these results is at present speculative but may involve the following aspects. Firstly, the relation between GSCs and survival is somewhat unclear as various studies failed to show a correlation between the GSC quantity assessed by CD133, nestin or CD15 staining and survival<sup>51,52</sup>. Further, Pallini *et al.* observed that the percentage of CD133-positive cells somewhat paradoxically correlated with longer survival in recurrent glioblastoma, likely due to the higher presence of normal neural stem cells with possible antitumor properties, which may also apply to some newly diagnosed tumors<sup>53</sup>. Another study described that the CD133-low GBMs showed more invasive growth and gene expression profiles characteristic of mesenchymal or proliferative subtypes, whereas the CD133-high GBMs showed features of cortical and well-demarcated tumors and gene expressions typical of proneuronal subtypes. Moreover, in contrast to various reports claiming that only CD133-positive GBM cells can initiate tumor formation *in vivo*, Joo *et al.* showed that CD133-negative cells also possess tumor-initiating potential<sup>54</sup>. It should be further noted that CSCs are rather quiescent and slow-cycling, and some of the identified miRNAs may be regulators of this dormant state<sup>55</sup>. Last but not least, non-transformed stromal cells may contribute to the tissue levels of miRNAs and the function of the particular miRNAs may be different in these cells compared to glioma cells.

Taken together, we identified a set of miRNAs that are differentially expressed in GSCs as compared to non-stem glioblastoma cells, several of which correlated with the expression of the stem cell markers Sox-2 and nestin. Our findings thus suggest that a complex set of miRNAs is involved in the regulation of the stem-like characteristics in glioblastoma. Moreover, a set of the most differentially expressed miRNAs correlated with the survival of GBM patients independently of the IDH1 status indicating that they might be prognostic markers and possibly new therapeutic targets.

## Material and Methods

**GBM samples and primary cell cultures.** The 10 paired primary GBM cell cultures were derived from fresh tumor tissues samples obtained from GBM patients who underwent surgically resection at the Departments of Neurosurgery of the Hospital Na Homolce in Prague, University Hospital Brno, and University Hospital Ostrava. Study has been approved by the local Ethical Board at Hospital Na Homolce in Prague, University Hospital Brno, and University Hospital Ostrava. Written informed consent was obtained from all patients included in the study. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

The fresh tissue sample was enzymatically dissociated with TrypLE (ThermoFisher Scientific) for 20 min at 37 °C with agitation or using the Papain Dissociation System (Worthington) according to manufacturer's instructions. Single cell suspensions were seeded into 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Techno Plastic Products AG) and cultured in either Dulbecco's modified essential medium supplemented with 10% FBS, 1% Glutamax (both ThermoFisher Scientific), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, sodium pyruvate and non-essential

amino acids (all GE Healthcare), or in DMEM/F12 containing bFGF 20 ng/mL, EGF 20 ng/mL (both PeproTech), B27-supplement 1:50 (ThermoFisher Scientific), 1% Glutamax, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. After 1–3 weeks, adherent cells, which covered more than 2/3 of the culture flask in DMEM, were passaged using Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich). After approximately the same time, tumor spheres formed in DMEM/F12, and these were dissociated using Accutase (Sigma-Aldrich) and up and down pipetting and then passaged. Cells that initially formed spheres were dissociated and transferred to laminin (Sigma-Aldrich) or Geltrex (ThermoFisher Scientific) coated culture flasks and propagated as monolayer cultures<sup>56,57</sup>. For the subsequent analyses, early passage cultures were used.

**qRT-PCR quantification.** Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1000 ng small RNA enriched total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. qRT-PCR was performed using the LightCycler 480 Instrument II (Roche) in accordance with the standard TaqMan manufacturer's protocol using TaqMan Gene Expression Assays (GAPDH #Hs03929097\_g1, SOX2 #Hs01053049\_s1, NES #Hs00707120\_s1; ThermoFisher Scientific). The data were evaluated using the second derivative maximum method with the arithmetic baseline adjustment. All qRT-PCR reactions were run in triplicate and average Cp and SD values were calculated. Relative expression levels were determined by the  $2^{-\Delta C_p}$  method, where  $\Delta C_p$  was calculated as follows:  $\Delta C_p = C_p$  (gene of interest) –  $C_p$  (GAPDH).

**Western blot analysis.** Cell pellets were lysed with RIPA buffer (Sigma-Aldrich). Protein concentration was measured using a DC Protein Assay (Bio-Rad), samples were diluted with RIPA buffer to attain the same concentration of total protein and boiled for 10 min with the Laemmli sample buffer. Proteins (15 µg per well) were separated on 10% SDS-PAGE gels, and electrophoretically transferred to the polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck Millipore). The membranes were blocked with 5% nonfat milk in PBS with 0.1% Tween 20 (PBS-T), then incubated either with an anti-Sox2 rabbit mAb or anti-alpha/beta-tubulin rabbit mAb (No. 3579 and 2148, respectively; both Cell Signaling Technology) diluted 1:1000 in blocking solution at 4 °C overnight. Subsequently, the membranes were incubated with anti-rabbit IgG antibody HRP conjugate (No. 7074, Cell Signaling Technology) diluted 1:2500 (60 min/RT). Each step was followed by washes in PBS-T. ECL-Plus detection was performed according to the manufacturer's instructions (Amersham).

**Flow cytometry.** Accutase (Sigma-Aldrich) was used to harvest adherent cells and dissociate gliomaspheres. The cell suspension was fixed with 2% paraformaldehyde for 1 hour at 4 °C, permeabilized (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer, Biolegend) and stained using an anti-CD133 APC conjugated antibody (Miltenyi Biotec).

**Differentiation of stem-like cell cultures, immunocytochemistry.** To induce differentiation,  $13 \times 10^3$  cells per  $\text{cm}^2$  were plated on geltrex coated coverslips and cultured in differentiation medium (DMEM/F12, 10% FBS, 1% Glutamax, 100 µg/mL Streptomycin and 100 U/mL Penicillin G). The medium was exchanged every 2–3 days for 10–14 days. The coverslips were subsequently fixed with 4% paraformaldehyde (10 minutes at room temperature) and stained overnight at 4 °C using the antibodies against GFAP (GF-01, Exbio, 1:200) and beta III tubulin (Exbio, 1:250).

**Orthotopic xenotransplantation glioma model, immunohistochemistry.** The experimental use of animals was approved by The Commission for Animal Welfare of the First Faculty of Medicine of the Charles University in Prague and The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic according to the animal protection laws. Generation of xenotransplants was performed as described previously<sup>58</sup>.  $5 \times 10^5$  cells in 5 µL of serum free medium were injected into 6–10 week old male NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J mice (The Jackson Laboratory) with a Hamilton syringe 1.2 mm anterior from the bregma and 2.5 mm lateral from the midline to a depth of 3 mm using a stereotactic device (Stoelting Co.). Immunohistochemistry was performed on 10 µm thick frozen sections using antibodies against human nuclei (Chemicon, 1:500) and GFAP (GF-01, Exbio, 1:200) as described<sup>59</sup>.

**MIRNA microarray analysis.** Small RNA enriched total RNA was isolated using the mirVana miRNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific). Nucleic acid concentrations and purities were controlled by UV spectrophotometry using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). To assess miRNA expression in Sox-2 high- and low-expressing GBM cells, the samples were analyzed with Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 arrays (Affymetrix) containing 5607 probe sets for human small RNAs. Out of these probe sets the 2578 probe sets of human mature miRNAs were filtered. All steps of the procedure were performed according to the Affymetrix standardized protocol for miRNA 4.0 arrays. Intensity values for each probe cell (.cel file) were calculated using Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC). Quality control of the microarray was performed with the Affymetrix miRNA QC Tool, version 1.1.1.0.

**Microarray expression data analysis.** All data were pre-processed and further analyzed by the software packages included in the R/Bioconductor<sup>60</sup>. Pre-processing was performed by the RMA method with default parameters as implemented in the Bioconductor package oligo<sup>61</sup>. All data were log<sub>2</sub>-transformed. To identify differentially expressed miRNAs, the LIMMA approach<sup>62</sup> for paired samples was applied with additional Benjamini-Hochberg correction of P values. To determine the correlation between miRNA and Sox-2 or nestin expression, the Spearman rank correlation coefficient was used.

**IDH1/2 mutation status analysis.** DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions. Fragments of 254 bp and 293 bp lengths spanning the sequences encoding the catalytic domains of IDH1 including codon 132 and IDH2 including codon 172, respectively were amplified using 12,5 pmol each of the primers: IDH1-F ACCAAATGGCACCATACGA, IDH1-R TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT, IDH2-F GCTGCAGTGGGACCACTATT, and IDH2-R TGTGGCCTTGACTGCAGAG (primer sequences according to Hartmann *et al.*, 2009). PCR was performed using standard buffer conditions, 50–250 ng of DNA input and Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA). PCR consisted of 35 cycles with denaturing at 95 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min in a total volume of 25 µl. Two microliters of the PCR amplification product were subjected to sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Twenty-five cycles were performed employing 0,5 µl of 10 µM primer IDH1-F ACCAAATGGCACCATACGA or IDH2-R TGTGGCCTTGACTGCAGAG, with denaturing at 96 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 15 s and extension at 60 °C for 4 min in a total volume of 10 µl. Sequences were determined using the sequencer (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) and the Mutation surveyor V4.0.9 software (SoftGenetics, USA).

**Survival analysis.** The relationship between overall survival and expression levels of the selected miRNAs was analyzed on The Cancer Genome Atlas (TCGA) data set (485 GBM patients)<sup>63</sup>. To assess the miRNAs that were identified in this study for survival prediction, a Risk Score formula for predicting survival was developed based on a linear combination of the miRNA expression level weighted by the regression coefficient derived from the multivariate Cox regression analysis<sup>22,23</sup>. Patients with high Risk Score are expected to have poor survival. Cox proportional hazards regression analysis was performed to assess the contribution of the miRNA signature to survival prediction<sup>64</sup>. Patients were further stratified into a high-risk group and a low-risk group according to the Risk Score (cutoff value median) and survival was analyzed using the Kaplan-Meier method. Subsequently, both univariate and multivariate Cox regression analyses including seven-miRNA signature and IDH1 status were performed on the data subset comprising 296 GBM patients for whom exome somatic mutation data were available.

## References

- Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **29**, 1203–1217 (2015).
- Jackson, M., Hassiotou, F. & Nowak, A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* **36**, 177–185 (2015).
- Rahman, M. *et al.* Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. *Anat. Cell Biol.* **48**, 25–35 (2015).
- Pavon, L. F. *et al.* *In vitro* Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front. Neurol.* **4** (2014).
- Wakimoto, H. *et al.* Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells. *Neuro-Oncol.* **14**, 132–144 (2012).
- Iacopino, F. *et al.* Isolation of Cancer Stem Cells from Three Human Glioblastoma Cell Lines: Characterization of Two Selected Clones. *PLoS ONE* **9**, e105166 (2014).
- Brescia, P. *et al.* CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells Dayt. Ohio* **31**, 857–869 (2013).
- Zhang, W., Chen, H., Lv, S. & Yang, H. High CD133 Expression Is Associated with Worse Prognosis in Patients with Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9187-1> (2015).
- Dahlrot, R. H. *et al.* Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 3739–3751 (2014).
- Miconi, G. *et al.* Immunophenotypic characterization of human glioblastoma stem cells: correlation with clinical outcome. *J. Cell. Biochem.* **116**, 864–876 (2015).
- Kong, B. H. *et al.* Prognostic value of glioma cancer stem cell isolation in survival of primary glioblastoma patients. *Stem Cells Int.* **2014**, 838950 (2014).
- Virant-Klun, I., Ståhlberg, A., Kubista, M. & Skutella, T. MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int.* **2016**, 3984937 (2016).
- Besse, A., Sana, J., Fadrus, P. & Slaby, O. MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 1969–1978 (2013).
- Yang, H. W., Xing, H. & Johnson, M. D. A major role for microRNAs in glioblastoma cancer stem-like cells. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 423–434 (2015).
- Kleinová, R., Slabý, O. & Šána, J. The Relevance of MicroRNAs in Glioblastoma Stem Cells. *Klin. Onkol. Cas. České Slov. Onkol. Spolecnosti* **28**, 338–344 (2015).
- Brower, J. V., Clark, P. A., Lyon, W. & Kuo, J. S. MicroRNAs in cancer: glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem. Int.* **77**, 68–77 (2014).
- Aldaz, B. *et al.* Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* **8**, e77098 (2013).
- Fareh, M. *et al.* The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ.* **19**, 232–244 (2012).
- Sana, J. *et al.* Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. *Carcinogenesis* **35**, 2756–2762 (2014).
- Lakomy, R. *et al.* MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* **102**, 2186–2190 (2011).
- Therneau T. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. *Springer*, New York 2000.
- Therneau T. A Package for Survival Analysis in S. R Package Version 2.37-6, <http://CRAN.R-project.org/package=survival> (30 October 2014, date last accessed) 2014.
- Aum, D. J. *et al.* Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurg. Focus* **37**, E11 (2014).
- Eder, K. & Kalman, B. Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol. Oncol. Res. POR* **20**, 777–787 (2014).
- Bayin, N. S., Modrek, A. S. & Placantonakis, D. G. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J. Stem Cells* **6**, 230–238 (2014).
- Yin, C., Lv, S., Chen, X. & Guo, H. The role of glioma stem cells in glioma tumorigenesis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **19**, 818–824 (2014).



28. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
29. Cheng, L. *et al.* L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* **30**, 800–813 (2011).
30. Floyd, D. & Purow, B. Micro-masters of glioblastoma biology and therapy: increasingly recognized roles for microRNAs. *Neuro-Oncol.* **16**, 622–627 (2014).
31. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
32. Gangemi, R. M. R. *et al.* SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 40–48 (2009).
33. Yuva-Aydemir, Y., Simkin, A., Gascon, E. & Gao, F.-B. MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biol.* **8**, 557–564 (2011).
34. Lagos-Quintana, M. *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol. CB* **12**, 735–739 (2002).
35. Bonev, B., Pisco, A. & Papalopulu, N. MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev. Cell* **20**, 19–32 (2011).
36. Bonev, B., Stanley, P. & Papalopulu, N. MicroRNA-9 Modulates Hes1 ultradian oscillations by forming a double-negative feedback loop. *Cell Rep.* **2**, 10–18 (2012).
37. Coolen, M., Thieffry, D., Drivenes, Ø., Becker, T. S. & Bally-Cuif, L. miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev. Cell* **22**, 1052–1064 (2012).
38. Roeske-Koerner, B. *et al.* Reciprocal Regulation between Bifunctional miR-9/9(\*) and its Transcriptional Modulator Notch in Human Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Rep.* **7**, 207–219 (2016).
39. Tan, S.-L., Ohtsuka, T., González, A. & Kageyama, R. MicroRNA9 regulates neural stem cell differentiation by controlling Hes1 expression dynamics in the developing brain. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **17**, 952–961 (2012).
40. Roeske-Koerner, B., Stappert, L., Koch, P., Brüstle, O. & Borghese, L. Pluripotent stem cell-derived somatic stem cells as tool to study the role of microRNAs in early human neural development. *Curr. Mol. Med.* **13**, 707–722 (2013).
41. Schraivogel, D. *et al.* CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9\* in glioblastoma stem cells. *EMBO J.* **30**, 4309–4322 (2011).
42. Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V. & Rameshwar, P. High expression of miR-9 in CD133(+) glioblastoma cells in chemoresistance to temozolomide. *J. Cancer Stem Cell Res.* **3** (2015).
43. Staahl, B. T. *et al.* Kinetic analysis of npBAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 10348–10361 (2013).
44. Xue, Q. *et al.* miR-9 and miR-124 synergistically affect regulation of dendritic branching via the AKT/GSK3 $\beta$  pathway by targeting Rap2a. *Sci. Rep.* **6**, 26781 (2016).
45. Brett, J. O., Renault, V. M., Rafalski, V. A., Webb, A. E. & Brunet, A. The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Aging* **3**, 108–124 (2011).
46. Yu, D., Shin, H.-S., Lee, Y. S. & Lee, Y. C. miR-106b modulates cancer stem cell characteristics through TGF- $\beta$ /Smad signaling in CD44-positive gastric cancer cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **94**, 1370–1381 (2014).
47. Chang, S.-J. *et al.* MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC Med. Genomics* **4**, 65 (2011).
48. Lu, Y. *et al.* Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **15**, 92–101 (2014).
49. Stappert, L. *et al.* MicroRNA-based promotion of human neuronal differentiation and subtype specification. *PLoS One* **8**, e59011 (2013).
50. Tezcan, G. *et al.* microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **34**, 679–692 (2014).
51. Melguizo, C. *et al.* MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *J. Transl. Med.* **10**, 250 (2012).
52. Kim, K.-J. *et al.* The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* **31**, 494–502 (2011).
53. Pallini, R. *et al.* Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* **117**, 162–174 (2011).
54. Joo, K. M. *et al.* Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **88**, 808–815 (2008).
55. Li, L. & Bhatia, R. Stem cell quiescence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 4936–4941 (2011).
56. Fael Al-Mayhany, T. M. *et al.* An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. *J. Neurosci. Methods* **176**, 192–199 (2009).
57. Pollard, S. M. *et al.* Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* **4**, 568–580 (2009).
58. Busek, P. *et al.* Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 738–747 (2012).
59. Trylcova, J. *et al.* Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells *in vitro*. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 5873–5879 (2015).
60. Team, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/> (Foundation for Statistical Computing, 2013).
61. Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 2363–2367 (2010).
62. Smyth, G. Limma: linear models for microarray data In Gentleman R, Carey V, Dudoit S, et al. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor (Gentleman, R. *et al.*) 397–420 (Springer, 2005).
63. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).
64. Lauss M. rocc: ROC Based Classification. R Package Version 1.2. <http://CRAN.R-project.org/package=rocc> (30 October 2014, date last accessed) (2010).

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Czech Ministry of Health grants no. 15-34553A, 15-33158A, and 15-31379A; by the project MZ CR – RVO (MOU, 00209805); Grant No. LM2015064 of the EATRIS-CZ.; by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the project CEITEC 2020 (LQ1601), and by the projects UNCE 204013 and Progres Q28/ILFUK. We also acknowledge the cooperation of the staff at the Nemocnice na Homolce hospital during tissue sampling, and Kvetoslava Vlasicova and Karin Roubickova for excellent technical assistance.

### Author Contributions

Conception and design: J. Sana, P. Busek, A. Sedo, O. Slaby; Development of methodology: J. Sana, P. Busek; Acquisition of data (acquired and managed patients, laboratory measurements, provided facilities, etc.): J. Sana, P. Busek, P. Fadrus, A. Besse, M. Vecera, S. Reguli, L. Sromova, M. Hilser, R. Lipina, R. Lakomy, L. Kren, M. Smrcka; Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Radova, J. Sana, P. Busek, O. Slaby, A. Besse; Study supervision: O. Slaby, A. Sedo; Writing, review, and/or revision of the manuscript: J. Sana, P. Busek, O. Slaby, A. Sedo.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20929-6>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



## Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging



Tomas Kazda<sup>a,b,c</sup>, Martin Bulik<sup>a,d,e</sup>, Petr Pospisil<sup>b,c</sup>, Radek Lakomy<sup>f,g</sup>, Martin Smrcka<sup>h</sup>, Pavel Slampa<sup>b,c</sup>, Radim Jancalek<sup>i,j,\*</sup>

<sup>a</sup>International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, 656 91 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Diagnostic Imaging, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>e</sup>Department of Diagnostic Imaging, St. Anne's University Hospital Brno, 656 91 Brno, Czech Republic

<sup>f</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic

<sup>g</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>h</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Brno, Brno 625 00, Czech Republic

<sup>i</sup>Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>j</sup>Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, 656 91 Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form 14 February 2016

Accepted 22 February 2016

Available online 26 February 2016

#### Keywords:

Glioma

Recurrence

Imaging sensitivity

Spectroscopy

Apparent diffusion coefficient

### ABSTRACT

The accurate identification of glioblastoma progression remains an unmet clinical need. The aim of this prospective single-institutional study is to determine and validate thresholds for the main metabolite concentrations obtained by MR spectroscopy (MRS) and the values of the apparent diffusion coefficient (ADC) to enable distinguishing tumor recurrence from pseudoprogression. Thirty-nine patients after the standard treatment of a glioblastoma underwent advanced imaging by MRS and ADC at the time of suspected recurrence – median time to progression was 6.7 months. The highest significant sensitivity and specificity to call the glioblastoma recurrence was observed for the total choline (tCho) to total N-acetylaspartate (tNAA) concentration ratio with the threshold  $\geq 1.3$  (sensitivity 100.0% and specificity 94.7%). The ADCmean value higher than  $1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$  was associated with the pseudoprogression (sensitivity 98.3%, specificity 100.0%). The combination of MRS focused on the tCho/tNAA concentration ratio and the ADCmean value represents imaging methods applicable to early non-invasive differentiation between a glioblastoma recurrence and a pseudoprogression. However, the institutional definition and validation of thresholds for differential diagnostics is needed for the elimination of setup errors before implementation of these multimodal imaging techniques into clinical practice, as well as into clinical trials.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

The critical biological characteristic of a glioblastoma (GBM), the most frequent and serious primary brain tumor in adults is an inevitable progression after standard therapy with the median of 6.9 months (Dusek et al., 2014; Stupp et al., 2005). Tumor recurrence develops in almost all patients despite the aggressive standard first line treatment, which comprised of radiotherapy and temozolomide usage (RT and TMZ) (Stupp et al., 2005). GBM recurrence, however, has often similar radiologic characteristics on conventional MRI as therapy-related

changes, like a pseudoprogression (PsP). Thus, the early and accurate diagnosis of GBM relapse constitutes to be an important clinical need, especially when more and more potentially active drugs are currently being investigated for salvage treatment.

In comparison with standard structural MRI techniques, advanced imaging methods, such as diffusion-weighted imaging (DWI) with apparent diffusion coefficient (ADC) mapping, and the proton MR spectroscopy (MRS), allow much deeper and still non-invasive insight into the interpretation of brain lesions, resulting in greater specificity of diagnostic imaging (Ahmed et al., 2014; Bulik et al., 2015; Kao et al., 2013; Roy et al., 2013). In our previous report of the consecutive series of 24 patients with GBM, we described significant differences in ADC and MRS data between those with GBM relapse and PsP after standard RT and TMZ treatment (Bulik et al., 2015). However, thresholds with

\* Corresponding author at: Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic.  
E-mail address: [radim.jancalek@fnusa.cz](mailto:radim.jancalek@fnusa.cz) (R. Jancalek).

higher statistical power and intra-institutional validation have been required before these methods can be implemented into our institutional imaging protocols on a routine basis and used in the decision-making process. In this report, we present our final results of this prospective study with extended number of patients, as well as the results from an independent retrospective intra-institutional validation.

## 2. Methods

### 2.1. Characteristics of patients

Patients suitable for this study included the ones with histologically proven GBM after gross total resection, as stated by an early post-surgery MRI examination, who underwent the standard adjuvant treatment consisting of concurrent RT (dose 60 Gy) and TMZ followed by adjuvant TMZ alone (Stupp et al., 2009). The standard follow-up imaging protocol at our institution is the classic structural MRI after 6 weeks and every 3 months thereafter. Patients were eligible for study enrollment when suspected radiographic progression on the structural MRI was found based on the neuro-radiologist's discretion. After they signed an informed consent, the patients underwent the investigational advanced MRI, namely MRS and DWI. The final evidence of the disease status was realized by means of biopsy/resection or early repeated structural MRI depending on the clinical situation, patient's performance status, de facto his or her best interest. The advanced imaging protocol was approved by the Institutional Review Board of the St. Anne's University Hospital Brno. Patients previously described in our initial analysis are also included in the current study cohort (Bulik et al., 2015). The validation cohort consisted of the independent series of previous patients with GBM treated by surgery and adjuvant RT and TMZ, who underwent MRS and DWI/ADC exams according to the same protocol. Initially, the derived thresholds for pertinent MRS spectra and ADCmean values were subsequently applied to predict a GBM recurrence or treatment related changes, such as PsP and radionecrosis.

### 2.2. MR data acquisition

The advanced MRI examination was performed at 3.0T clinical MR scanner (GE Medical Systems Discovery MR750), following the same setup parameters as in our initial report (Bulik et al., 2015). MRS was focused on gadolinium-enhanced lesions suspected of recurrence by means of the chemical shift imaging (CSI) technique in two orthogonal planes respecting the long axis of the lesion and the proximity to structures increasing noise in MR spectra (point-resolved spectroscopy sequence – PRESS, TR/TE 1800/144 ms, 16-cm FOV, 15-mm slice thickness, and voxel size  $10 \times 10 \times 15 \text{ mm}^3$ ). Automatic prescanning was performed prior to each spectroscopic scan to ensure adequate water suppression. The MR spectra of all measured voxels were automatically post-processed for each patient by LCModel version 6.3 (Provencher, 2001). The output of MRS processing by LCModel were the concentrations of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate (tNAA), choline-containing compounds (tCho), total creatine (tCr), lipids at 0.9–1.3 ppm, and lactate (Lac). Afterwards, the ratios of the metabolite concentrations (tCho/tNAA, tCho/tCr, tNAA/tCr, Lac + Lip1.3/tCr, Lac + Lip0.9–1.3/tCr) were calculated and visualized by jSIPRO 1.0 beta version (Jiru et al., 2013). The signal-to-noise ratio for each MR spectrum and an error map showing the error in a measured concentration for each metabolite were calculated by using the jSIPRO software. The concept of error images in jSIPRO was developed to help rejection of low quality spectra (Jiru et al., 2006). From the voxels covering gadolinium-enhancing region, these with the signal-to-noise ratio > 3 and the error of measured metabolite concentrations < 20% were selected and arranged based on the value of the Cho/NAA ratio. The voxels with the highest Cho/NAA ratio were selected for further analyses.

An axial echo planar SE sequence (TR/TE 6000/100 ms), 5-mm slice thickness, and diffusion gradient encoding in three orthogonal

directions ( $b = 0$  and  $1000 \text{ mm}^2/\text{s}$ , and 240-mm FOV) were utilized for DWI imaging. ADC maps were calculated using the OsiriX software version 6.0.2 64-bit (Pixmeo SARL, Switzerland) with the ADC Map Calculation plugin version 1.9 (Stanford University). The mean ADC value (ADCmean) of the voxel corresponding to the measured MRS voxel was calculated.

### 2.3. Data analysis

The optimal diagnostic cut-offs and the description of their sensitivity and specificity for the final diagnosis of recurrence were derived from the receiver operating characteristic (ROC) analysis with the area under the ROC curve (AUC) for distinguishing between the two diagnostic groups (GBM relapse and PsP). Fisher's exact test for categorical data and Mann–Whitney  $U$  test for continuous variables were used to estimate the significance of measured differences. Censoring the patients who were lost for the follow up, the overall survival was defined as the time elapsed between the GBM diagnosis and death from any cause. The time to progression was measured since the end of RT and TMZ with suspected progression at structural MRI as the event of interest. The probability value  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all tests. All statistical evaluations were performed using the statistical software Statistica 12 (StatSoft, Inc.).

## 3. Results

### 3.1. Study patient characteristics

Between May 2013 and March 2015, the total of 39 patients (median age 51, 72% men) with suspected GBM progression on the structural MRI was prospectively included into this study. The basic characteristics of patients are summarized in Table 1. The median time to suspected progression and the median overall survival were 6.7 months (95% CI 2.9–9.6) and 14.5 months (95% CI 12.9–17.4), respectively. The final diagnosis was established by a biopsy in 26 patients (67%) and by follow-up imaging in 13 patients (33%). The diagnosis of a GBM recurrence yielded in 29 patients (75%) with the rest having PsP. No case of radionecrosis was found in our cohort of patients.

**Table 1**

Basic characteristics of the study cohort: T = temporal, F = frontal, P = parietal, O = occipital, F-P = frontoparietal, 3D-CRT = Three-Dimensional Conformal Radiotherapy, IMRT = Intensity-Modulated Radiotherapy.

| Basic characteristics                       | Study cohort<br>n = 39 | Validation<br>n = 16 | p   |
|---|------------------------|----------------------|-----|
| <i>Age at initial diagnosis (years)</i>     |                        |                      |     |
| Median                                      | 51                     | 54                   | 0.7 |
| Range                                       | 29–66                  | 35–64                |     |
| <i>Sex (n)</i>                              |                        |                      |     |
| Men   | 28 (72%)               | 10 (63%)             | 0.5 |
| <i>GBM location (%)</i>                     |                        |                      |     |
| T/F/P/O/F-P                                 | 38/29/19/5/9           | 34/31/14/7/14        | 0.7 |
| <i>Radiotherapy</i>                         |                        |                      |     |
| Median dose (Gy)                            | 60                     | 60                   | 0.9 |
| Technique 3D-CRT/IMRT (%)                   | 30/70                  | 40/60                | 0.8 |
| <i>Cycles of adjuvant TMZ</i>               |                        |                      |     |
| Median                                      | 6                      | 6                    | 0.9 |
| Range                                       | 1–12                   | 4–10                 |     |
| <i>Time to graphic progression (months)</i> |                        |                      |     |
| Median (95% CI)                             | 6.7 (2.9–9.6)          | 6.1 (4.8–8.8)        | 0.8 |
| <i>Diagnosis validation</i>                 |                        |                      |     |
| Biopsy/subsequent imaging (%)               | 67/33                  | 75/25                | 0.6 |
| <i>Final diagnosis</i>                      |                        |                      |     |
| Tumor recurrence                            | 29 (75%)               | 12 (75%)             | 1   |
| Pseudoprogression                           | 10 (25%)               | 4 (25%)              |     |
| <i>Overall survival (months)</i>            |                        |                      |     |
| Median (95% CI)                             | 14.5 (12.9–17.4)       | 14.0 (13.1–15.2)     | 0.8 |

**Table 2**  
Calculated cut-offs for the diagnosis of a tumor recurrence with related sensitivity and specificity for the most important concentration ratios of the metabolites measured by MRS and for ADCmean.

| Metabolite                              | AUC (95% CI)         | <i>p</i> | Cut-off for recurrence | Sensitivity | Specificity |
|---|----------------------|----------|------------------------|-------------|-------------|
| tCho/tNAA                               | 0.993 (0.978; 1.000) | <0.001   | ≥1.3                   | 100.0       | 94.7        |
| tCho/tCr                                | 0.691 (0.539; 0.843) | 0.013    | ≥0.7                   | 74.6        | 63.2        |
| tNAA/tCr                                | 0.949 (0.873; 1.000) | <0.001   | ≤0.7                   | 96.6        | 94.7        |
| Lac + Lip 1.3/tCr                       | 0.714 (0.559; 0.868) | 0.003    | ≥1.6                   | 76.3        | 68.4        |
| Lac + Lip 0.9–1.3/tCr                   | 0.723 (0.568; 0.879) | 0.004    | ≥2.0                   | 78.0        | 68.4        |
| ADCmean [ $10^{-6}$ mm <sup>2</sup> /s] | 0.998 (0.993; 1.000) | <0.001   | ≤1313                  | 98.3        | 100.0       |

### 3.2. Advanced imaging characteristics

The values of metabolite concentration ratios are summarized in Table 2, the percentage distribution of patients in Table 3, and typical imaging findings are presented in Fig. 1. The mean and standard deviation of the signal-to-noise ratios of MR spectra in the analyzed voxels was  $4.75 \pm 0.80$ . The average number of voxels with acceptable spectra quality per patient was  $3.75 \pm 1.13$  and varied based on the proximity of the skull and a resection cavity as the most significant noise-conducting factors.

A significant difference in the tCho/tNAA and tNAA/tCr ratios was found between the GBM relapse and PsP. The GBM relapse was characterized by the tCho/tNAA ratio  $\geq 1.3$  with sensitivity of 100% and specificity of 94.7% ( $p < 0.001$ ). All patients with GBM recurrence had the value of tCho/tNAA above this cut-off; yet, there were still 5.3% (1/19) lesion assigned as PsP reaching the same tCho/tNAA cut-off as GBM recurrence. Another metabolite ratio with statistical significance was tNAA/tCr characterized by the threshold  $\leq 0.7$  for calling the GBM recurrence with sensitivity of 96.6% and specificity of 94.7% ( $p < 0.001$ ). There were 93.2% (55/59) lesion considered as the GBM recurrence that had the tNAA/tCr values below the cut-off, just as 5.3% (1/19) as PsP.

The calculated ADCmean values were significantly lower in the GBM relapse group than in the PsP group ( $p < 0.001$ ), with the cut-off of  $1313 \times 10^{-6}$  mm<sup>2</sup>/s (sensitivity 98.3% and specificity 100.0%). Ninety-eight percent of patients with the GBM relapse had the ADCmean  $\leq 1313 \times 10^{-6}$  mm<sup>2</sup>/s while all the patients with PsP had the ADCmean  $> 1313 \times 10^{-6}$  mm<sup>2</sup>/s.

### 3.3. Characteristics of the patients in the validation cohort

The basic characteristics of the patients in the validation cohort are summarized in Table 1 and are balanced with the study cohort. Their

**Table 3**  
The percentage distribution of patients with the pseudoprogression and glioblastoma recurrence as the function of calculated cut-offs.

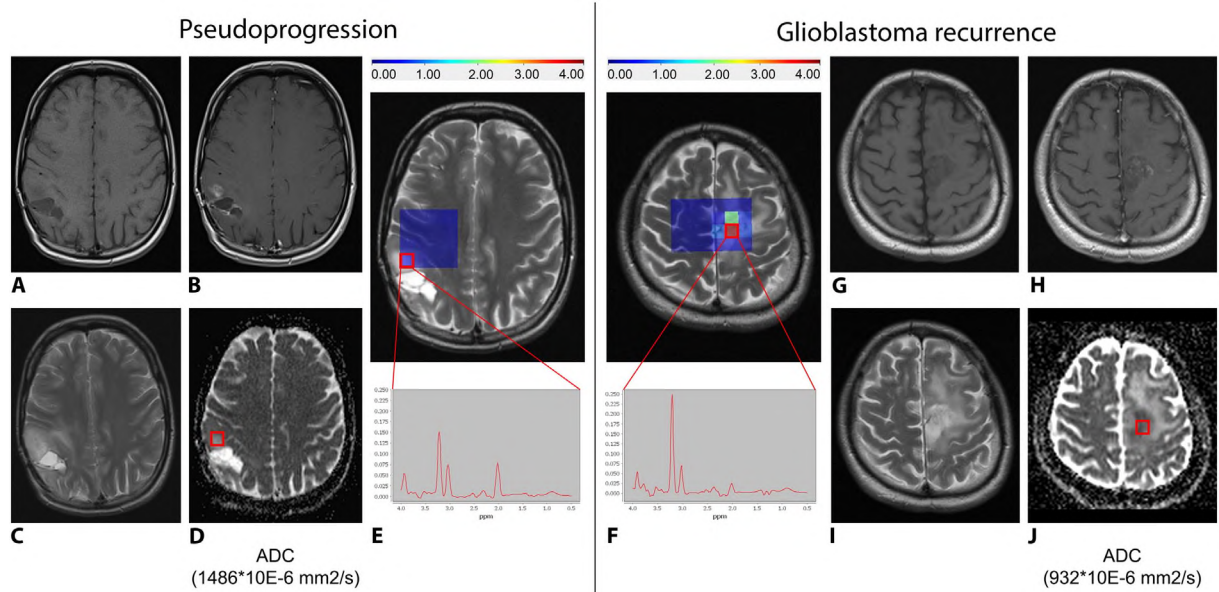
|                   |                       | Pseudoprogression<br>(n = 19) | Recurrence<br>(n = 59) | <i>p</i> |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|----------|
| tCho/tNAA         | <1.3                  | 18 (94.7%)                    | 0                      | <0.001   |
|                   | ≥1.3                  | 1 (5.3%)                      | 59 (100.0%)            |          |
| Median (min; max) |                       | 0.74 (0.33–1.77)              | 2.13 (1.35–9.60)       | <0.001   |
|                   | tCho/tCr              |                               |                        |          |
|                   | <0.7                  | 11 (57.9%)                    | 15 (25.4%)             | 0.013    |
|                   | ≥0.7                  | 8 (42.1%)                     | 44 (74.6%)             |          |
| Median (min; max) |                       | 0.64 (0.28–1.37)              | 0.89 (0.44–2.83)       | 0.013    |
|                   | tNAA/tCr              |                               |                        |          |
|                   | >0.7                  | 18 (94.7%)                    | 4 (6.8%)               | <0.001   |
|                   | ≤0.7                  | 1 (5.3%)                      | 55 (93.2%)             |          |
| Median (min; max) |                       | 0.99 (0.28–1.59)              | 0.41 (0.11–0.96)       | <0.001   |
|                   | Lac + Lip 1.3/tCr     |                               |                        |          |
|                   | <1.6                  | 12 (63.2%)                    | 14 (23.7%)             | 0.004    |
|                   | ≥1.6                  | 7 (36.8%)                     | 45 (76.3%)             |          |
| Median (min; max) |                       | 1.13 (0.07–10.65)             | 2.69 (0.40–15.63)      | 0.005    |
|                   | Lac + Lip 0.9–1.3/tCr |                               |                        |          |
|                   | <2.0                  | 13 (68.4%)                    | 13 (22.0%)             | <0.001   |
|                   | ≥2.0                  | 6 (31.6%)                     | 46 (78.0%)             |          |
| Median (min; max) |                       | 1.33 (0.08–12.35)             | 3.26 (0.54–17.42)      | 0.004    |
|                   | ADCmean               |                               |                        |          |
|                   | >1313                 | 19 (100.0%)                   | 1 (1.7%)               | <0.001   |
|                   | ≤1313                 | 0                             | 58 (98.3%)             |          |
| Median (min; max) |                       | 1372 (1317–1476)              | 1155(756–1344)         | <0.001   |

pertinent metabolite concentrations and ADCmean values are reported in Table 4 together with the level of success in the prediction of diagnosis by each measured characteristic. The tCho/tNAA ratio assigned diagnosis correctly in 15/16 (94%) patients, the ADCmean value in 15/16 (94%) patients, the concentration ratio of tNAA/tCr in 13/16 (81%) patients, while tCho/tCr, Lac + Lip 1.3/tCr and Lac + Lip 0.9–1.3/tCr only in 8/16 (50%) patients. These results confirm expected specificity for the measured MR characteristics. The combination of tCho/tNAA and ADCmean led to the highest accuracy while establishing the final diagnosis.

### 4. Discussion

The accurate and timely identification of a tumor relapse is the most essential prerequisite of an efficient salvage therapy emphasizing the importance of precise assessment of the response to the initial treatment. Well-known difficulties with distinguishing between a GBM recurrence and treatment related changes caused by the administration of concomitant RT and TMZ (pseudoprogression) or angiogenesis inhibitors (pseudoresponse) (Hygino da Cruz et al., 2011; Chakravarti et al., 2006) are already expressed in the current RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology) criteria (Wen et al., 2010). Nevertheless, the evolution of the response criteria that is a continuing process and implementation of advanced MRI methods is expected, most likely by MRS and DWI because of their high availability. Especially for these advanced MRI methods, the standardization of MRI protocols is needed in order to be used optimally in the evaluation of results from multicentric studies. The topicality of this need is expressed by the current consensual recommendations for the standard brain tumor imaging protocol in clinical trials published in September 2015, which already include pre-contrast, axial 2D, 3-directional DWI (Ellingson et al., 2015). Before similar recommendations for other advanced MRI modalities are established, centers utilizing these methods to resolve ambiguous findings in the classic structural MRI should develop their own thresholds and cut-offs for a valid image description.

The MRS seems to be a promising method that is complementary to the widely used structural MRI and can be used to increase the diagnostic accuracy of the brain tumor imaging protocol. The results of this study proved very high sensitivity and specificity of the tCho/tNAA concentration ratio (100.0% and 94.7%, respectively) for a non-invasive differentiation between a GBM recurrence and PsP. The underlying pathophysiology of the MRS observations is well described especially from the experience with glioma grading (Bulik et al., 2013). Choline represents the marker of cell membrane integrity and turnover and is associated with the presence of an increased tumor cell proliferation, while NAA is the marker of the density and viability of neurons. Thus, their mutual ratio forms the best approach when using the MRS for brain tumor diagnostics. The result of the MRS, though, depends on the type of the MR scanner, specific acquisition setup parameters, and is very sensitive to the proximity of FOV to the surrounding structures decreasing signal/noise ratio of the brain spectra (i.e. bone). As the spectrum quality is also highly influenced by the personal experience of a radiologist, it is useful to establish an institutional protocol with the adjustment of thresholds and cut-offs for the main metabolite concentrations measured by the MRS. Moreover, there is the significant



**Fig. 1.** The pseudoprogression and glioblastoma recurrence findings on MRI. Representative MRI examples of the pseudoprogression (A–E) and glioblastoma relapse (F–J): (A) + (G) show T1WI, (B) + (H) show T1WI with gadolinium, (C) + (I) show T2WI, (D) + (J) show the ADC maps with marked VOI and corresponding ADC mean values, and (E) + (F) show the proton MR spectroscopy maps focused on tCho/tNAA concentration ratio with marked VOI, corresponding values and spectra. The MR spectra illustrate concentrations of the main metabolites within the selected voxel. The color scale for the tCho/tNAA ratio corresponds to the color map shown for the MRSI grids overlaid on top of the MR images. The signal-to-noise ratio of the presented MR spectra is 4.98 in pseudoprogression and 4.86 in glioblastoma recurrence as well as the error of tCho/tNAA concentration 7% and 4%, respectively.

heterogeneity of glial tumor tissue and many suspected recurrences are localized in close proximity to the bone increasing noise in the acquired MR spectra. Thus, it is useful to perform the MRS by means of a Spectroscopic Imaging technique in two orthogonal planes covering most of the enhancing brain regions. We faced all the described difficulties in MRS voxel analysis since the patients of our cohort underwent gross total resection (GTR). This patients' selection was needed, whether we wanted to analyze the ability of MRS and ADC maps to distinguish strictly between the pseudoprogression and tumor recurrence with no bias by a residual tumor. The probability to achieve GTR is higher in the case of small and superficial tumors located in the proximity of the skull. In addition, the majority of gadolinium-enhancing lesions were heterogeneous, irregular in shape, and small due to a frequent follow-up that further underline necessity to use the Spectroscopic Imaging technique and strict voxel selection. Compare to our methodology, Single Voxel MR spectroscopy is often used in published studies but it is highly influenced by the partial volume effect where the obtained spectra are distorted by surrounding tissue (Lee et al., 2013).

There are several studies focusing on MRS for the purpose of differentiating glioma recurrence from treatment related changes. The current meta-analysis by Zhang et al., involving 18 studies and 455 patients, showed only moderate sensitivity and specificity of the tCho/tNAA ratio (88% and 86%, respectively) for differentiating a recurrent glioma from radiation necrosis (Zhang et al., 2014). However, the late treatment related changes of RT and TMZ have some similar histopathologic features as a high-grade glioma relapse (e.g. the presence of necrosis) that can lead to a decreased accuracy of MRS diagnostic and can explain our superior results because we observed only patients with PsP. Moreover, most studies reviewed by Zhang and colleagues used Single Voxel MRS where average values from larger voxels are produced. The analysis of individual small voxels may also explain higher sensitivity and specificity observed in the presented study. Nevertheless, as we can expect lower sensitivity and specificity of the MRS in the general diagnostic protocol for differential diagnostic in neuro-oncology, we agree with the recommendation of Zhang et al. to combine MRS with other multimodal imaging methods. For example, that would be definitely the case of the patient number 12 from our validation cohort where conflicting results of MRS and DWI were presented.

Fortunately, this patient was able to undergo biopsy validation confirming the tumor recurrence. Otherwise, close follow-up with early repeated imaging studies would be indicated.

Diffusion-weighted imaging describes changes in water diffusivity mainly as the function of changes in cell density. The diffusion changes can be quantified by the ADC. Generally speaking, decreased diffusivity is the consequence of an enhanced tumor cell proliferation and is reflected by the water diffusion restriction that lowers ADC values. In the present study, the evaluation of mean ADC values led to the highest sensitivity and specificity with the cut-off of  $1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$  in distinguishing between a GBM recurrence and PsP that was proved in our validation cohort of patients. For all patients with PsP from this study cohort, the ADC mean value was  $>1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ . However, evaluating the diagnostic quality of DWI in differentiating glioma recurrence from radiation necrosis, the current meta-analysis by Zhang et al. from April 2015 pooled and weighted data from 284 patients, and showed only moderate diagnostic performance in differentiating the glioma recurrence with sensitivity of 82% (95% CI: 75,87) and specificity of 84% (95% CI: 76,91) (Zhang et al., 2015). In the present study, the higher sensitivity and specificity observed can be explained by the same way as in the case of the MRS mentioned above – treatment related changes represented exclusively by PsP with no case of radionecrosis.

The lack of radionecrosis in our cohort can be explained by a time factor. The aim of our study was to describe early MRI changes after oncology treatment; however, radionecrosis is more often related to the late effect of radiotherapy. Regardless of low radionecrosis incidence in selected group of patients after RT and TMZ (9.3% of patients), Ruben with co-authors described that mean interval from the completion of radiotherapy to the diagnosis of radionecrosis was 11.6 months in the cohort of 426 patients treated for glioma (Ruben et al., 2006). The lack of radionecrosis may be also related to the gross total extent of resections and generally less aggressive strategy in delivery of radiotherapy (normalization to 95% of prescribed dose, strict limitations of Dmax, less generous target definition strategy with reference to RTOG rather than to EORTC approach).

This study has also some inherent limitations. The fact that a biopsy for proving the final diagnosis (recurrence vs. treatment related

**Table 4**  
The validation of the calculated metabolite concentration ratios and ADCmean cut-offs for the GBM recurrence by the respective cohort of patients. The gray color indicates discrepancy between the predicted value and the real measured value. R – recurrence, PsP – pseudoprogression.

| Validation cohort<br>n = 16                 | 1    | 2    | 3   | 4    | 5    | 6    | 7    | 8   | 9   | 10   | 11  | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   |
|---|------|------|-----|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|------|------|------|------|------|
| Final diagnosis<br>R / PsP                  | R    | R    | R   | R    | PsP  | R    | R    | R   | R   | R    | R   | R    | R    | PsP  | PsP  | PsP  |
| tCho/tNAA<br>cut-off $\geq 1.3$             | 1.5  | 2.0  | 2.4 | 2.7  | 1.1  | 2.7  | 5.1  | 3.3 | 3.6 | 1.8  | 5.1 | 1.2  | 2.0  | 0.5  | 1.0  | 1.0  |
| tCho/tCr<br>cut-off $\geq 0.7$              | 0.6  | 0.7  | 0.6 | 0.6  | 0.4  | 0.5  | 0.3  | 0.5 | 0.7 | 0.8  | 0.8 | 0.4  | 0.4  | 0.5  | 0.5  | 0.6  |
| tNAA/tCr<br>cut-off $\leq 0.7$              | 0.4  | 0.3  | 0.2 | 0.2  | 0.4  | 0.2  | 0.1  | 0.2 | 0.2 | 0.4  | 0.2 | 0.4  | 0.2  | 1.1  | 0.6  | 0.6  |
| Lac + Lip 1.3/tCr<br>cut-off $\geq 1.6$     | 0.5  | 1.1  | 3   | 0.6  | 2.2  | 0.8  | 1    | 0.7 | 1.7 | 1.4  | 2.8 | 0.9  | 1.7  | 0.4  | 0.5  | 0.4  |
| Lac + Lip 0.9–1.3/tCr<br>cut-off $\geq 2.0$ | 0.6  | 1.3  | 4.7 | 0.9  | 3.8  | 2    | 1.7  | 1.1 | 2.2 | 1.8  | 3.4 | 1.6  | 2.1  | 0.7  | 0.8  | 0.7  |
| ADCmean<br>cut-off $\leq 1313$              | 1248 | 1157 | 928 | 1189 | 1387 | 1287 | 1038 | 917 | 838 | 1348 | 937 | 1197 | 1298 | 1503 | 1425 | 1398 |

changes) was missing in 33% of patients, as their best interest was reflected, may prevent the deeper explanation of the observed metabolite concentrations or the ADC data. It may be assumed that some patients develop the overlapping imaging features of both PsP and early GBM recurrence at the same time, which lowers the tCho/tNAA ratio and increases the ADCmean value due to the predominance of initial PsP changes. On the other hand, patients with PsP are more often those with a favorable prognosis and the concurrent presence of PsP and early GBM progression is not a case of all patients with PsP. Moreover, the use of biopsy samples may also be difficult to interpret because of the above mentioned tissue mixture, as well as the post radiotherapy changes. It means that the single target stereotactic needle biopsy of the lesion suspected of a tumor recurrence may be inaccurate (Hygino da Cruz et al., 2011). Patients who are not able to undergo tumor resection or at least biopsy validation may most benefit from the non-invasive nature of advanced MRI methods and, in clinical practice, they may be candidates for further imaging studies including MR perfusion or positron emission tomography examination. With this consideration, we can agree with the recommendation of Zhang et al. to combine DWI imaging results with other multimodal imaging methods (Zhang et al., 2014, 2015). Thus, combination of ADC values and metabolite concentrations measured by MRS could produce a single prediction with a significant clinical impact; however, other studies with more patients included are needed for valid recommendations.

## 5. Conclusion

In conclusion, there is the increasing evidence for routine utilization of advanced MRI methods such as DWI and MRS in brain tumor imaging protocols. This study has proved that the combination of ADCmean values  $\leq 1313 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$  and the tCho/tNAA concentration ratio  $\geq 1.3$  have the high validity for a non-invasive differentiation between a GBM recurrence and pseudoprogression. However, institutional definition and validation of the thresholds of the advanced MR methods is needed in order to implement the multimodal imaging into routine clinical practice, as well as clinical trials.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Funding/Acknowledgments

The study was supported by the Czech Ministry of Health Grants No. NT14120-3/2013 and NT14600-3/2013, as well as the European Regional Development Fund, Project FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123), and MH CZ-DRO (MMCI, 00209805).

## References

- Ahmed, R., Oborski, M.J., Hwang, M., Lieberman, F.S., Mountz, J.M., 2014. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag. Res.* 6, 149–170. <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S54726>.
- Bulik, M., Jancalek, R., Vanicek, J., Skoch, A., Mechl, M., 2013. Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115 (2), 146–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.11.002> (2013 Feb).
- Bulik, M., Kazda, T., Slampa, P., Jancalek, R., 2015. The diagnostic ability of follow-up imaging biomarkers after treatment of glioblastoma in the temozolomide era: implications from proton MR spectroscopy and apparent diffusion coefficient mapping. *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015), 641023. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/641023>.
- Chakravarti, A., Erkinen, M.G., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., Gilbert, M.R., Black, P.M., Loeffler, J.S., 2006. Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 12 (15), 4738–4746 (2006 Aug 1).
- Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., Majek, O., Pavlik, T., Koptikova, J., Melichar, B., Buchler, T., Finek, J., Cibula, D., Babjuk, M., Svoboda, M., Vyzula, R., Ryska, A., Ryska, M., Petera, J., Abrahamova, J., 2014. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.* 27 (6), 406–423.
- Ellingson, B.M., Bendszus, M., Boxerman, J., Barboriak, D., Erickson, B.J., Smits, M., Nelson, S.J., Gerstner, E., Alexander, B., Goldmacher, G., Wick, W., Vogelbaum, M., Weller, M., Galanis, E., Kalpathy-Cramer, J., Shankar, L., Jacobs, P., Pope, W.B., Yang, D., Chung, C., Knopp, M.V., Cha, S., Van Den Bent, M.J., Chang, S., Yung, W.K. Al, Cloughesy, T.F., Wen, P.Y., Gilbert, M.R., 2015. Consensus recommendations for a standardized Brain Tumor Imaging Protocol in clinical trials. *Neuro-Oncology* 17 (9), 1188–1198. <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nov095> (2015 Sep).
- Hygino da Cruz, L.C., Rodriguez, I., Domingues, R.C., Gasparotto, E.L., Sorensen, A.G., 2011. Pseudoprogression and pseudoresponse: imaging challenges in the assessment of posttreatment glioma. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 32 (11), 1978–1985. <http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A2397> (2011 Dec).
- Jiru, F., Skoch, A., Klose, U., Grodd, W., Hajek, M., 2006. Error images for spectroscopic imaging by LCModel using Cramer–Rao bounds. *MAGMA* 19 (1), 1–14. <http://dx.doi.org/10.1007/s10334-005-0018-7> (2006 Feb).
- Jiru, F., Skoch, A., Wagnerova, D., Dezortova, M., Hajek, M., 2013. jSIPRO – analysis tool for magnetic resonance spectroscopic imaging. *Comput. Methods Prog. Biomed.* 112 (1), 173–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2013.06.018> (2013 Oct).
- Kao, H.-W., Chiang, S.-W., Chung, H.-W., Tsai, F.Y., Chen, C.-Y., 2013. Advanced MR imaging of gliomas: an update. *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013), 970586. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/970586>.
- Lee, H., Caparelli, E., Li, H., Mandal, A., Smith, S.D., Zhang, S., Bilfinger, T.V., Benveniste, H., 2013. Computerized MRS voxel registration and partial volume effects in single voxel 1H-MRS. *Magn. Reson. Imaging* 31 (7), 1197–1205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2013.04.001> (2013 Sep).
- Provencher, S.W., 2001. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 14 (4), 260–264 (2001 Jun).

- Roy, B., Gupta, R.K., Maudsley, A.A., Awasthi, R., Sheriff, S., Gu, M., Husain, N., Mohakud, S., Behari, S., Pandey, C.M., Rathore, R.K.S., Spielman, D.M., Alger, J.R., 2013. Utility of multiparametric 3-T MRI for glioma characterization. *Neuroradiology* 55 (5), 603–613. <http://dx.doi.org/10.1007/s00234-013-1145-x> (2013 May).
- Ruben, J.D., Dally, M., Bailey, M., Smith, R., McLean, C.A., Fedele, P., 2006. Cerebral radiation necrosis: incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65 (2), 499–508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.12.002> (2006 Jun).
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A. a, Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352 (10), 987–996. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043330> (2005 Mar 10).
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. a, Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10 (5), 459–466. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7) (2009 May).
- Wen, P.Y., Macdonald, D.R., Reardon, D. a, Cloughesy, T.F., Sorensen, a G., Galanis, E., Degroot, J., Wick, W., Gilbert, M.R., Lassman, A.B., Tsien, C., Mikkelsen, T., Wong, E.T., Chamberlain, M.C., Stupp, R., Lamborn, K.R., Vogelbaum, M. a, van den Bent, M.J., Chang, S.M., 2010. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J. Clin. Oncol.* 28 (11), 1963–1972. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3541> (2010 Apr 10).
- Zhang, H., Ma, L., Wang, Q., Zheng, X., Wu, C., Xu, B.N., 2014. Role of magnetic resonance spectroscopy for the differentiation of recurrent glioma from radiation necrosis: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Radiol.* 83 (12), 2181–2189 (2014 Dec).
- Zhang, H., Ma, L., Shu, C., Wang, Y.B., Dong, L.Q., 2015. Diagnostic accuracy of diffusion MRI with quantitative ADC measurements in differentiating glioma recurrence from radiation necrosis. *J. Neurol. Sci.* 351 (1–2), 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.038> (2015 Apr 15).



# Využití <sup>11</sup>C-methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku – soubor 16 pacientů

Assessment of <sup>11</sup>C-methionine for PET/CT examination of patients with a brain tumor – group of 16 patients

J. Vašina<sup>1</sup>, M. Svoboda<sup>2</sup>, R. Lakomý<sup>2</sup>, T. Kazda<sup>3</sup>, J. Adam<sup>4</sup>, Z. Řehák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddělení nukleární medicíny a PET centrum MOÚ, Brno, ČR

<sup>2</sup> Klinika komplexní onkologické péče MOÚ, Brno, ČR

<sup>3</sup> Klinika radiační onkologie MOÚ, Brno, ČR

<sup>4</sup> Ústav jaderného výzkumu, Řež, ČR

rehak@mou.cz

## ABSTRAKT:

**Úvod:** FDG PET/CT vyšetření mozku neposkytuje u pacientů s tumory mozku optimální výsledky pro vysokou akumulaci FDG obvykle měřenou v mozku. Tyto suboptimální výsledky vedou k hledání a testování jiných radiofarmak pro lepší zobrazení tumorů mozku.

**Cíl:** Ověření možnosti využití <sup>11</sup>C-methioninu pro PET/CT vyšetření pacientů s tumory mozku.

**Metoda:** Do klinické studie fáze I bylo zařazeno celkem 18 pacientů s tumory mozku, z toho hodnoceno bylo 16 pacientů, 12 s glioblastomem, 2 s astrocytomem, po jednom pacientu s oligodendrogliomem a metastázou testikulárního tumoru. Všichni pacienti podstoupili po aplikaci <sup>11</sup>C-methioninu PET snímání v odstupu 5, 20 a 35 minut ke stanovení akumulace methioninu v tumoru. V rámci studie proběhlo i zhodnocení bezpečnosti aplikovaného přípravku.

**Výsledky:** U všech hodnocených pacientů byla zobrazena zvýšená akumulace methioninu v tumoru s hodnotami 2,5x vyššími než v normální mozkové tkáni měřenými pomocí maximální hodnoty "standardized uptake value" (SUVmax).

**Závěr:** Methionin je vhodným radiofarmakem pro stanovení rozsahu postižení u pacientů s high-grade gliomy nebo rekurentními či progredujícími gliomy s nízkým stupněm gradingu, u kterých lze předpokládat transformaci do high-grade gliomů.

**Klíčová slova:** PET/CT, <sup>11</sup>C-methionin, tumory CNS

NuklMed 2018;7:62-67

## ABSTRACT:

**Introduction:** FDG PET imaging of the brain is not ideal in patients with a brain tumor due to a high physiological accumulation of FDG in the brain tissue. These suboptimal results stimulated seeking for different radiopharmaceuticals for better imaging of brain tumors.

**Goal:** To verify a possibility of the use of <sup>11</sup>C-methionine for evaluation of patients with brain tumors.

**Method:** 18 patients with brain tumors were included to the phase I clinical trial; 16 of them were evaluated, 12 had a glioblastoma, 2 an astrocytoma, 1 an oligodendroglioma and 1 a testicular tumor metastasis. PET acquisition of all patients was performed after injection of <sup>11</sup>C-methionine at 5, 20 and 35 minutes post injection, respectively, to assess the accumulation in the tumors. Safety evaluation of injected tracer was a part of this study.

**Results:** Increased accumulation of <sup>11</sup>C-methionine in the tumor was detected in all evaluated patients; it reached 2.5fold higher values comparing to a normal brain tissue measured by a maximal value of standardized uptake value (SUVmax).

**Conclusion:** <sup>11</sup>C-methionine is a useful radiopharmaceutical for the assessment of the brain tumor extent in patients with a high-grade gliomas or recurrent or progressive gliomas with a low grade in which a transformation to the high-grade gliomas can be considered.

**Key words:** PET/CT, <sup>11</sup>C-methionine, brain tumors

## ÚVOD

Incidence primárních tumorů centrálního nervového systému (CNS) je v České republice 7,8–8,5 případů na 100 000 obyvatel a rok.<sup>1</sup> Dle histologické klasifikace jsou nejčastějšími maligními primárními tumory CNS gliomy se 40 až 50 %.<sup>2</sup>

2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glukóza (<sup>18</sup>F-FDG, FDG) je nejčastěji užívaným radiofarmakem v PET/CT diagnostice. V případě vyšetření CNS ale neposkytuje u pacientů s většinou typů primárních a sekundárních mozkových tumorů optimální výsledky. Jedním z důvodů těchto suboptimálních výsledků je vysoké metabolické pozadí aktivity FDG měřené v mozku, zvláště v šedé hmotě.<sup>3</sup> Distribuce akumulace FDG je závislá na lokální perfúzi mozkové tkáně a po přestupu přes buněčnou membránu i na intenzitě aerobní glykolýzy. FDG je po intracelulární fosforylaci zachycena uvnitř buněk a je proto nespecifický marker glykolytického metabolismu, nikoliv buněčné proliferace. Na rozdíl od normálních diferencovaných buněk je energetickým zdrojem pro většinu nádorových buněk aerobní glykolýza, jde o tzv. Warburgův efekt. Intenzita glykolýzy pak může korelovat s agresivitou tumoru.<sup>4,5</sup> Variabilní intenzita akumulace FDG může být přítomna u všech typů gliomů jak ve smyslu vzrůstu, tak poklesu její akumulace oproti nepostižené mozkové tkáni. Variabilita bývá zvláště významná u gliomů nízkého gradu (LGG), ze sekundárních tumorů CNS například také u karcinomu ledvin a jeho metastáz, testikulárních tumorů, ale i mozkových metastáz jiných malignit. Důsledkem variability akumulace FDG je snížená senzitivita a méně významně i specifita detekce mozkových metastáz pomocí FDG PET ve srovnání s MR/CT hlavy – například u malobuněčného karcinomu plic (senzitivita 46 % oproti 100 % pro MR, specifita 97 % oproti 100 % pro MR)<sup>6</sup>, nebo v jiné studii udávaná senzitivita 45 % a specifita 80 % pro mozkové metastázy non-CNS tumorů bez rozlišení typu tumoru.<sup>7</sup> K vzrůstu akumulace FDG oproti šedé hmotě dochází zvláště u dediferencovaných tumorů a tumorů vysokého gradu – anaplastické oligodendrogliomy, astrocytomy nebo glioblastoma multiforme. Ze sekundárních tumorů pak nejčastěji u lymfomů nebo melanomu.

K překonání limitů FDG PET/CT zobrazení a pro přidání informace o proliferační aktivitě nebo jiných metabolických cestách je možné využít různých radiofarmak.<sup>8</sup> <sup>18</sup>F-fluorothymidin (FLT), analog thymidinu inkorporovaného do DNA při její replikaci, slouží k hodnocení proliferační aktivity a buněčného dělení.<sup>9</sup> <sup>18</sup>F-fluorocholin (FCh) je stavebním kamenem fosfolipidových buněčných membrán a může sloužit k hodnocení lipidového metabolismu, v omezené míře i buněčné proliferace. [18F]-O-(2-fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)<sup>10,11</sup>, <sup>18</sup>F-fluorodihydroxyfenylalanin (FDOPA) a L[methyl-<sup>11</sup>C]-methionin (methionin, MET)<sup>12</sup> jsou analogy aminokyselin a jejich akumulace odpovídá intenzitě proteosyntézy. Většinu mozkové tkáně tvoří buňky nepodstupující dělení, jejich úroveň proteosyntézy je nižší než v proliferujících buňkách tumorů. Důsledkem je pak nízká akumulace radioizotopem značených aminokyselin v normální mozkové tkáni (pozadí) oproti jejich zvýšené akumulaci v tumoru. Cílem naší studie bylo ověřit jednak možnost provedení vlastního vyšetření s MET, a jednak zhodnotit diagnostický výstup PET/CT vyšetření s MET.

## METODA

### Soubor pacientů

Soubor pacientů byl generován v rámci nerandomizované klinické studie I. fáze, která probíhala v MOÚ v období mezi říjnem 2012 a březnem 2014. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do klinické studie a byli do souboru zařazeni ve shodě s protokolem klinické studie. Zařazeno bylo celkem 18 pacientů, z toho u 16 byly výsledky plně hodnotitelné ve vztahu ke stanoveným cílům. V případě 1 subjektu nebylo z technických důvodů radiofarmakum vůbec aplikováno a vyšetření neproběhlo. U dalšího 1 pacienta nebylo možné vyhodnotit parametry akumulace radiofarmaka, neboť nádorové onemocnění, v daném případě renální karcinom metastazující do mozku, radiofarmakum nevyčtyávalo. Primárním cílem bylo prokázat akumulaci podaného <sup>11</sup>C-methioninu v aktivitě 500 MBq v nádorové tkáni přítomné v mozku, sekundární cíle byly: 1. hodnocení bezpečnosti aplikovaného přípravku a 2. použití radiofarmaka v aktivitě 350 MBq a srovnání s vyšší aktivitou. Základním vstupním kritériem byl histologicky potvrzený primární mozkový nádor nebo extrakraniálně lokalizovaný primární nádor sekundárně postihující CNS a postižení mozku nádorovým procesem potvrzené MRI vyšetřením provedeným během 28 dnů před studiovým PET/CT. Z hlediska sledování bezpečnosti přípravku bylo u všech subjektů provedeno komplexní vstupní fyzikální a laboratorní vyšetření, včetně měření základních fyziologických funkcí. Toto bylo opakováno za 24 hod. po vyšetření, měření krevního tlaku, pulsu a teploty i za 15 min. po vyšetření.

Z 16 hodnocených pacientů v souboru bylo 5 žen (31 %) a 11 mužů (69 %), věk pacientů byl průměrně 53,4 roku (odchylka ±14,0 roku, medián 51,3 roku, rozpětí 37 až 80 roků). Histologicky bylo 12 pacientů s glioblastomem G4 (nález u 3 z nich byl podrobněji histologicky hodnocen jako glioblastom s rysy gliosarkomu), 2 pacienti měli astrocytom G2, 1 pacient byl s oligodendrogliomem G2 a jeden pacient s mozkovou metastázou smíšeného testikulárního tumoru (90 % embryonální karcinom, 5 % choriokarcinom, 5 % yolk sac tumor).

Z 15 pacientů s primárním mozkovým tumorem bylo u 2 pacientů (13 %) PET/CT vyšetření provedeno v rámci primárního stagingu při rozhodování o rozsahu léčby, 13 pacientů (87 %) bylo vyšetřeno pro recidivu již léčeného nádoru. Z těchto 13 předléčených pacientů byli 4 pacienti (31 %) po subtotální resekci tumoru, 1 pacient (7 %) po parciální resekci tumoru, 8 pacientů (62 %) bylo po provedené totální resekci tumoru. Všichni následně podstoupili minimálně jeden cyklus konkomitantní chemo-radioterapie. U všech byl dle kontrolní magnetické rezonance patrný relaps onemocnění nebo progresse poléčebného residua, z čehož vyplynula indikace pro provedení MET PET vyšetření.

### Radiofarmakum

Pro vyšetření bylo použito radiofarmakum L-[methyl-<sup>11</sup>C]-methionin připravené na objednávku vždy pro konkrétního pacienta na pracovišti ÚJV Řež, a. s. – PET Centrum Brno v komerčně dostupných modulech GE TRACERlab FXC.

## Původní práce

Příprava radiofarmaka byla cílena pro aktivitu 500 MBq u prvních 12 pacientů, u posledních 4 pacientů pak byla zvolena cílená aktivita 350 MBq. Vzhledem k praktickým možnostem přípravy radiofarmaka bylo u pacientů s cílenými 500 MBq skutečně aplikováno  $545,1 \text{ MBq} \pm 37,4 \text{ MBq}$ , medián 556 MBq a u pacientů s cílenými 350 MBq pak skutečná aktivita  $389 \text{ MBq} \pm 15,5 \text{ MBq}$ , medián 386 MBq MET. Při přepočtení na hmotnost pacientů byla aplikovaná aktivita průměrně  $6,67 \text{ MBq/kg}$  pro prvních 12 pacientů s vyšší aplikovanou aktivitou a  $5,2 \text{ MBq/kg}$  pro zbývajících 4 pacienty s nižší aplikovanou aktivitou. V celém souboru je to pak průměrně  $6,3 \text{ MBq/kg} \pm 1,45 \text{ MBq/kg}$ , medián  $6,28 \text{ MBq/kg}$ .

### Přístroj a akvizice

K akvizici dat byla použita kamera Siemens Biograph 64 (Siemens, Německo), vyhodnocení pak probíhalo na vyhodnocovacích konzolích Siemens se softwarem Siemens Syngo MultiModality WorkPlace (Siemens) s fúzí obrazových dat PET a low-dose CT. Pro všechny pacienty bylo také v nemocničním obrazovém archívu dostupné MR vyšetření mozku ne starší 1 měsíce, se kterým byla provedena fúze.

Pět minut po i. v. aplikaci radiofarmaka bylo zahájeno 12 minut trvající PET/CT snímání mozku, které bylo shodně zopakováno od 20. a 35. minuty po aplikaci. PET snímky mozku byly rekonstruovány iterativní metodou s 6 iteracemi, 21 subsety, image size 168, FWHM 4,0 mm. Snímání PET předcházela akvizice low-dose CT k anatomické orientaci a korekci atenuace v rozsahu shodném s rozsahem PET snímku s následujícími parametry snímání: 120 kV, 100 mAs, pitch 0,8, CARE Dose 4D vypnuta, rotation time 1 s, slice 5 mm. Rekonstrukce řezů proběhla standardní filtrovanou zpětnou projekcí.

### Hodnocení

Hodnocena byla intenzita akumulace MET v patologickém ložisku pomocí SUVmax (maximální hodnoty "standardized uptake value" pro vybranou oblast zájmu), poměr intenzity akumulace MET v patologickém ložisku (T – tumour) vzhledem k pozadí (B – background). Za pozadí byla vždy vy-

brána nepostižená oblast kontralaterálně k tumoru ve shodné topografické oblasti. V případě, že i kontralaterální oblast byla považována za patologickou, byla jako pozadí zvolena jiná dle MR nepostižená oblast mozku. Dále byla sledována změna intenzity akumulace MET při snímání mozku v 5., 20. a 35. minutě po aplikaci, měřeno pomocí SUVmax.

### VÝSLEDKY

Vyšetření pomocí MET proběhlo u všech pacientů bez komplikací, nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky ani reakce po podání radiofarmaka.

U všech pacientů s primárním mozkovým tumorem bylo patrné zvýšení akumulace MET v patologickém ložisku určeném dle magnetické rezonance. Výsledky jednoho ze 2 pacientů s metastatickým mozkovým tumorem, jehož tkáň nevykazovala zvýšenou akumulaci MET, nebyly pro další hodnocení uvažovány. Mimo jiné také proto, že nebylo možné přesně stanovit adekvátní oblast měření SUVmax. Hodnoty sledovaných parametrů jsou vyjádřeny v tabulce č. 1. Akumulace methioninu i poměr akumulace v patologickém ložisku vzhledem k pozadí normální („zdravé“) mozkové tkáně nebyl v jednotlivých časech snímání odlišný v případě zhodnocení celého souboru.

Při rozdělení souboru do skupiny s glioblastomem a s ostatními diagnózami jsou hodnoty uvedeny v tabulce č. 2.

Nebyl zaznamenán významný rozdíl v měřených hodnotách SUVmax mezi pacienty s aplikovanými 500 MBq a 350 MBq MET, ale pro statistické zpracování nebylo do souboru zařazeno dostatek pacientů.

### DISKUZE

Methionin značený uhlíkem-11 je markerem syntézy proteinů a jako takový je možno jej využít k zobrazení patologických procesů v mozku, kde má v porovnání s glukózou (FDG) nižší metabolické pozadí. Pro tuto indikaci je používán již od 80. let minulého století.<sup>13,14</sup> Výraznějším

|               | Akumulace v patologickém ložisku SUVmax | Akumulace v normální mozkové tkáni SUVmax | Poměr T/B                            |
|---------------|---|---|--------------------------------------|
| v 5. minutě   | prům. $5,50 \pm 1,55$<br>medián 5,83    | prům. $2,08 \pm 0,56$<br>medián 2,01      | prům. $2,62 \pm 0,56$<br>medián 2,49 |
| ve 20. minutě | prům. $5,06 \pm 1,9$<br>medián 5,51     | prům. $1,99 \pm 0,49$<br>medián 1,91      | prům. $2,52 \pm 0,73$<br>medián 2,42 |
| ve 35. minutě | prům. $4,91 \pm 1,74$<br>medián 5,44    | prům. $1,99 \pm 0,54$<br>medián 2,01      | prům. $2,46 \pm 0,61$<br>medián 2,32 |

Tab. 1 Intenzita akumulace MET v patologickém ložisku hodnocená pomocí SUVmax a poměr (T/B) akumulace v patologickém ložisku (T – tumour) vzhledem k normální mozkové tkáni (B – background) – celý soubor.

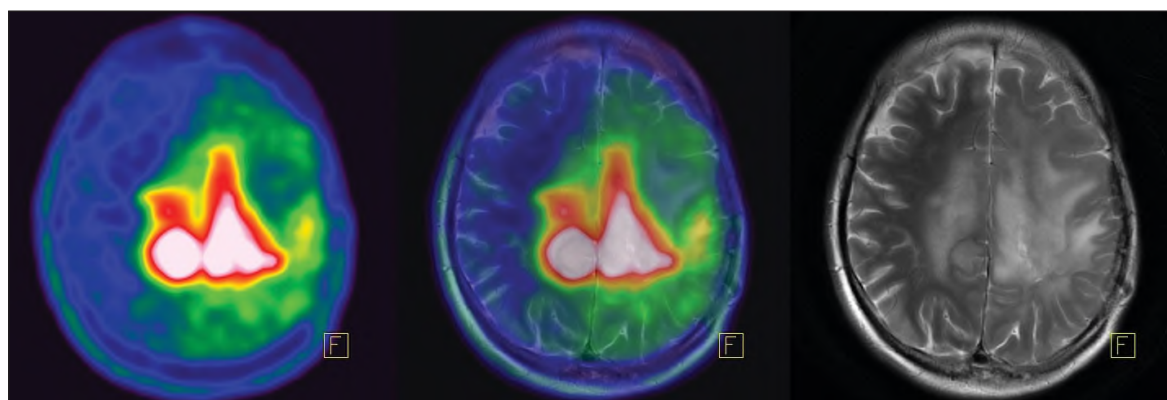
Původní práce

|               | Akumulace v patologickém ložisku<br>SUVmax |             | Akumulace v normální mozkové tkáni<br>SUVmax |             | Poměr T/B      |             |
|---------------|--|-------------|--|-------------|----------------|-------------|
|               | glioblastom G4                             | ostatní     | glioblastom G4                               | ostatní     | glioblastom G4 | ostatní     |
| v 5. minutě   | 5,33 ± 1,69                                | 6,01 ± 0,88 | 2,03 ± 0,4                                   | 2,25 ± 0,34 | 2,58 ± 0,52    | 2,75 ± 0,66 |
| ve 20. minutě | 4,76 ± 2,08                                | 5,98 ± 0,66 | 1,96 ± 0,54                                  | 2,09 ± 0,22 | 2,41 ± 0,81    | 2,86 ± 0,17 |
| ve 35. minutě | 4,62 ± 1,86                                | 5,71 ± 1,01 | 1,91 ± 0,59                                  | 2,21 ± 0,25 | 2,41 ± 0,70    | 2,57 ± 0,16 |

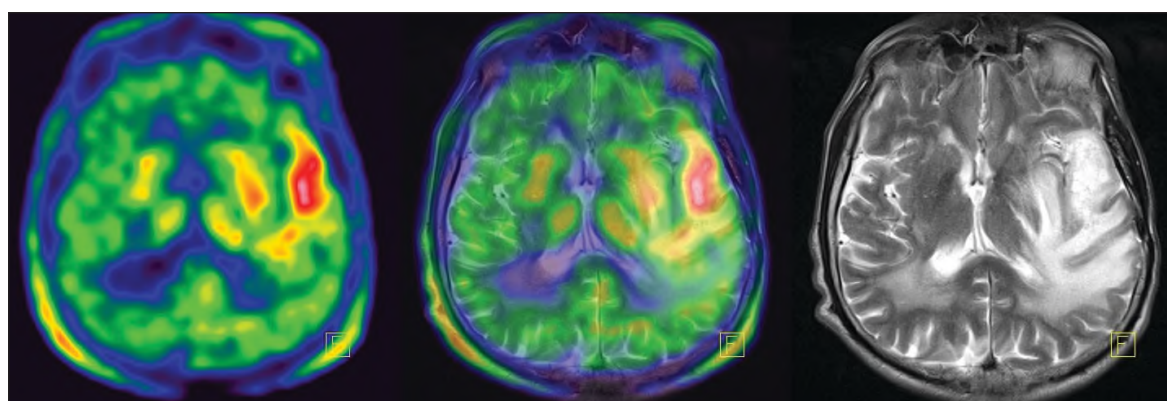
Tab. 2 Intenzita akumulace MET v patologickém ložisku hodnocená pomocí SUVmax a poměr akumulace v patologickém ložisku vzhledem k normální mozkové tkáni (background) – rozděleno dle diagnózy na skupinu s glioblastomem G4 a ostatní histologické typy.

rozšíření ale brání relativně krátký poločas rozpadu 20 minut pro uhlík-11 oproti 110 minutám pro fluor-18. Doprava radiofarmaka připraveného k aplikaci je možná k pacientovi v PET centru dostupném maximálně v řádu několika málo desítek minut od cyklotronu, nejlépe však v rámci jedné budovy.

Výhodou <sup>11</sup>C-methioninu je možnost přípravy radiofarmaka dle potřeby přímo pro jednotlivého pacienta dle požadavků indikujícího lékaře (a technických a technologických možností dodavatele). V takovém případě by bylo možno reagovat přímo na potřeby ošetřujícího lékaře v upřesnění nálezu u pacientů bez nutnosti odkládání léčby z důvo-



Obr. 1 Pacient s astrocytmem G2 vlevo. V MET PET obrazu patrný přesah patologické akumulace přes střední čáru a větší rozsah než v MR obrazu.



Obr. 2 Pacient s glioblastoma multiforme temporálního laloku vlevo, po resekcí tumoru. Lokální recidiva s vysokou akumulací <sup>11</sup>C-methioninu.

## Původní práce

du dlouhé objednací doby – z pohledu nukleární medicíny a objednacích dob na  $^{18}\text{F}$ -FDG a zvláště  $^{18}\text{F}$ -FLT vyšetření by mohlo vyšetření  $^{11}\text{C}$ -methioninem být prováděno takřka „akutně“.  $^{18}\text{F}$ -FLT tuto možnost nemá; vzhledem k možnostem dodavatelů, ekonomickým podmínkám a relativně omezeným indikacím jsou objednací doby pro toto vyšetření spíše ve většině pracovišť v řádu týdnů až měsíců.

Akumulace MET v nádorových buňkách v mozku závisí na jeho koncentraci v krvi, na intracelulárním metabolismu aminokyselin a nepřímo i na stavu hematoencefalické bariéry. Tím nepřímo odpovídá proliferační aktivitě tumoru a může posloužit k neinvazivnímu stanovení gradingu tumoru a také potvrzení transformace LGG do agresivnější formy.<sup>12,15</sup> Porušení hematoencefalické bariéry není nutností pro zvýšení akumulace MET v tumoru, její poškození ale může akumulaci MET ovlivnit zvýšeným průsakem do extracelulárního prostoru.<sup>16</sup>

Při vizuálním hodnocení obrazů byla patrná v případě použití methioninu lehce nižší ostrost snímků.<sup>17</sup> Tato lehká neostrost může být na vrub fyzikálními vlastnostmi radioizotopu  $^{11}\text{C}$  a při jeho rozpadu vzniklém pozitronu. Pozitron vzniklý rozpadem fluoru-18 má takovou energii, že v měkkých tkáních doletí 50 % pozitronů do vzdálenosti 0,19 mm a 10 % pozitronů až 0,91 mm než dojde k anihilaci s elektronem a vznikne gama záření. Až toto sekundárně vzniklé gama záření je následně detekováno kamerou. V případě použití uhlíku-11 je energie vzniklého pozitronu vyšší a s tím souvisí i delší dolet v měkkých tkáních. 50 % pozitronů doletí do vzdálenosti až 0,28 mm a 10 % až 1,7 mm. Z tohoto srovnání je zřejmé, že zhruba o 50 % delší dolet pozitronu bude mít vliv na ostrost a prostorové rozlišení obrazu. Toto ovlivnění prostorového rozlišení obrazu je tím výraznější, čím lepší je prostorové rozlišení kamery dané její konstrukcí a technickými parametry. Jelikož pozitronová emisní tomografie principiálně nezobrazuje vznik pozitronu (a tedy přesnou lokalitu značeného radiofarmaka v buňkách/tkáních/organismech), ale až anihilaci takto vzniklého pozitronu s elektronem a následný vznik fotonů gama, je tato vlastnost fyzikálně neovlivnitelná a je atributem nikoliv použitého radiofarmaka ( $^{11}\text{C}$ -methionin na jedné straně a  $^{18}\text{F}$ -FDG,  $^{18}\text{F}$ -FLT,  $^{18}\text{F}$ -FDOPA,  $^{18}\text{F}$ -FET na straně druhé), ale atributem použitého radioizotopu (zda je tracer označen uhlíkem [ $^{11}\text{C}$ ] nebo fluorem [ $^{18}\text{F}$ ]). Toto ovlivnění obrazové ostrosti ale nijak nesnižuje možnost hodnocení MET PET obrazů, což potvrzuje i naše zkušenost.

Dle literatury je v MET PET obrazu rozsah tumorů s nízkým<sup>18</sup> i vysokým<sup>19</sup> gradíngem obvykle větší než v T1 vážných obrazech magnetické rezonance a přesněji odpovídá skutečnému rozsahu tumoru. Je proto také vhodným doplňkem MRI v plánování radioterapie, který přináší dodatečnou informaci v rámci multiparametrického vyšetření.<sup>20,21</sup> V našem souboru pacientů nebyl vztah mezi rozsahem tumoru v MET PET obrazu a v MRI obrazu sledován.

U všech pacientů byla v patologickém ložisku patrná zvýšená akumulace MET s hodnotami SUVmax okolo 5–5,5. Tyto hodnoty jsou nižší než absolutní hodnoty SUVmax obvyklé v případě PET vyšetření mozku s FDG, ale také je výrazně nižší akumulace MET v normální nepatologické mozkové tkáni. Měřené hodnoty akumulace MET v nepato-

logické mozkové tkáni („pozadí“) byly s SUVmax okolo 2,0. Výsledkem je relativně vysoký poměr akumulace MET v tumoru vzhledem k pozadí – obrazový kontrast s hodnotami 2,5x vyššími pro tumor.

Vzhledem k malému počtu pacientů s LGG v našem souboru není možné statistické zhodnocení rozdílu kontrastu v LGG a glioblastomu (to ostatně ani nebylo cílem naší studie).<sup>22</sup> Nebyl ale patrný významný rozdíl v kontrastu mezi snímky z 5., 20. a 35. minuty. Chybění statisticky významného rozdílu v akumulaci MET gliomy s rozdílným gradem je uváděno i v literatuře.<sup>23</sup> Hodnocená oblast tumoru ale nebyla rozdělena na podoblasti, je tedy možné se zamýšlet na vývoji akumulace MET v jednotlivých oblastech tumoru a jejich vztahu k MRI obrazu.

Malý počet pacientů v souboru také neumožňuje statistické zhodnocení rozdílu obrazů mezi pacienty s aplikovanou aktivitou 350 MBq a 500 MBq MET. Dle nasnímaných obrazů 4 pacientů s nižší aplikovanou aktivitou ale není patrné významné zhoršení hodnotitelnosti. Je tedy možné zvážit použití nižší aktivity pro snížení radiační zátěže pacientů. V literatuře je uvedeno jak použití radiofarmaka s vyšší aktivitou<sup>24</sup>, tak s aktivitou nižší<sup>25</sup> než námi zvolené hodnoty.

## ZÁVĚR

$^{11}\text{C}$ -Methionin je vhodným radiofarmakem pro hodnocení rozsahu tumoru mozku před zvažovanou léčbou i při kontrole jejího efektu. Tak jak naše studie potvrzuje, jeho využití je přínosné jak u gliomů s nízkým, tak vysokým gradem. Limitem je dostupnost pouze na pracovištích s cyklotronem. Volba množství radiofarmaka při dolní hranici literárně uváděného rozmezí není na vrub zhoršení obrazové kvality a hodnotitelnosti provedeného vyšetření.

Podpořeno: MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805)

## Literatura

- Dušek L, Mužík J, Malúšková D, et al. Cancer Incidence and Mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol.* 2014;27:406-423. doi:10.14735/amko2014406.
- Fadrus P, Lakomý R, Hübnerová P, et al. Intrakraniální nádory - diagnostika a terapie. *Interní Med.* 2010;12:376-381
- Segtnan EA, Hess S, Grupe P, Høilund-Carlson PF.  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose PET/computed tomography for primary brain tumors. *PET Clin.* 2015;10:59-73. doi:10.1016/j.cpet.2014.09.005.
- Warburg O, Posener K, Negelein E VIII. The metabolism of cancer cells. *Biochem Zool* 1924;152:129–169
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324:1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
- Brink I, Schumacher T, Mix M et al. Impact of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET on the primary staging of small-cell lung cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1614 [online]. [cit. 2018-08-22]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1606-x>
- Kitajima K, Nakamoto Y, Okizuka H et al. Accuracy of whole-body FDG-PET/CT for detecting brain metastases from non-central nervous system tumors. *Ann Nucl Med* 2008;22:595 [online]. [cit. 2018-08-22]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s12149-008-0145-0>

## Původní práce

8. Ferda J, Ferdová E, Baxa J, et al. Lekce z molekulárního zobrazování: hodnocení mozkových nádorů pomocí PET/MR. *Ces Radiol*. 2016;70:205-218
9. Choi SJ, Kim JS, Kim JH, et al. [18F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine PET for the diagnosis and grading of brain tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:653-659
10. Kratochwil C, Combs SE, Leotta K, et al. Intra-individual comparison of 18F-FET and 18F-DOPA in PET imaging of recurrent brain tumors. *Neuro-Oncol*. 2014;16:434-440. doi:10.1093/neu-onc/not199
11. Filss CP, Galdiks N, Stoffels G, et al. Comparison of 18F-FET PET and perfusion-weighted MR imaging: a PET/MR imaging hybrid study in patients with brain tumors. *J Nucl Med*. 2014;55:540-545. doi:10.2967/jnumed.113.129007.
12. Glaudemans AWJM, Enting RH, Heesters MAAM, et al. Value of 11C-methionine PET in imaging brain tumours and metastases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40:615-635. doi:10.1007/s00259-012-2295-5
13. Bergström M, Collins VP, Ehrin E, et al. Discrepancies in brain tumor extent as shown by computed tomography and positron emission tomography using [68Ga]EDTA, [11C]glucose, and [11C]methionine. *J Comput Assist Tomogr*. 1983;7:1062-1066
14. Ericson K, Lilja A, Bergström M, et al. Positron emission tomography with ([11C]methyl)-L-methionine, [11C]D-glucose, and [68Ga]EDTA in supratentorial tumors. *J Comput Assist Tomogr*. 1985;9:683-689
15. Derlon JM, Bourdet C, Bustany P, et al. [11C]L-methionine uptake in gliomas. *Neurosurgery*. 1989;25:720-728
16. Sasaki M, Kuwabara Y, Yoshida T, et al. A comparative study of thallium-201 SPET, carbon-11 methionine PET and fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET for the differentiation of astrocytic tumours. *Eur J Nucl Med*. 1998;25:1261-1269
17. Sánchez-Crespo A, Andreo P, Larsson SA. Positron flight in human tissues and its influence on PET image spatial resolution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:44-51
18. Smits A, Baumert BG. The Clinical Value of PET with Amino Acid Tracers for Gliomas WHO Grade II. *Int J Mol Imaging*. 2011;2011:372509. doi: 10.1155/2011/372509
19. Kawai N, Maeda Y, Kudomi N, et al. Correlation of biological aggressiveness assessed by 11C-methionine PET and hypoxic burden assessed by 18F-fluoromisonidazole PET in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:441-450. doi:10.1007/s00259-010-1645-4
20. Iuchi T, Hatano K, Uchino Y, et al. Clinical Investigation: Methionine Uptake and Required Radiation Dose to Control Glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;93:133-140. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.04.044
21. Lee IH, Piert M, Gomez-Hassan D, et al. Clinical Investigation: Association of 11C-Methionine PET Uptake With Site of Failure After Concurrent Temozolomide and Radiation for Primary Glioblastoma Multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;73:479-485. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.04.050
22. Lakomý R, Fadrus P, Slampa P, et al. Multimodal treatment of glioblastoma multiforme: results of 86 consecutive patients diagnosed in period 2003-2009. *Klin Onkol*. 2011;24:112-120
23. Chung JK, Kim Y, Kim S et al. Usefulness of 11C-methionine PET in the evaluation of brain lesions that are hypo- or isometabolic on 18F-FDG PET. *Eur J Nucl Med* 2002;29:176 [online]. [cit. 2018-08-22]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00259-001-0690-4>
24. Harris SM, Davis JC, Snyder SE et al. Evaluation of the Biodistribution of 11C-Methionine in Children and Young Adults. *J Nucl Med* 2013;54:1902-1908 [online]. [cit. 2018-08-22]. Dostupné na: <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.118125>
25. Vander Borgh T, Asenbaum S, Bartenstein P et al. EANM procedure guidelines for brain tumour imaging using labelled amino acid analogues. *Eur J Nucl Med* 2006;33:1374-1380 [online]. [cit. 2018-08-22]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00259-006-0206-3>

*Příjemné prožití Vánočních svátků,  
do nového roku hodně zdraví,  
štěstí a spokojenosti  
přejí čtenářům časopisu  
členové redakce.*



foto Mgr. František Zahradka

## MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients

O. SLABY<sup>1,5\*</sup>, R. LAKOMY<sup>1\*</sup>, P. FADRUS<sup>6</sup>, R. HRSTKA<sup>2</sup>, L. KREN<sup>7</sup>, E. LZICAROVA<sup>2</sup>, M. SMRCKA<sup>6</sup>, M. SVOBODA<sup>1</sup>, H. DOLEZALOVA<sup>3</sup>, J. NOVAKOVA<sup>8</sup>, D. VALIK<sup>4</sup>, R. VYZULA<sup>1</sup>, J. MICHALEK<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Comprehensive Cancer Care, Brno, Zlutý kopec, 656 53 Brno, Czech Republic, e-mail: slaby@mou.cz, Czech Republic; <sup>2</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Oncological and Experimental Pathology, Brno; <sup>3</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Radiation Oncology, Brno; <sup>4</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Laboratory Medicine, Brno; <sup>5</sup>Babak Research Institute, University Cell Immunotherapy Center, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; <sup>6</sup>University Hospital Brno, Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; <sup>7</sup>University Hospital Brno, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; <sup>8</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Received July 7, 2009

MicroRNAs are endogenously expressed regulatory noncoding RNAs. Previous studies showed altered expression levels of several microRNAs in glioblastomas. In this study, we examined the expression levels of selected microRNAs in 22 primary glioblastomas and six specimens of adult brain tissue by real-time PCR method. In addition, we examined methylation status of MGMT promoter by methylation-specific real-time PCR, as this has been shown to be a predictive marker in glioblastomas. MGMT methylation status was not correlated with response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide (RT/TMZ). MiR-221 ( $p=0,016$ ), miR-222 ( $p=0,038$ ), miR-181b ( $p=0,036$ ), miR-181c ( $p=0,043$ ) and miR-128a ( $p=0,001$ ) were significantly down-regulated in glioblastomas. The most significant change was observed for up-regulation in miR-21 expression in glioblastomas ( $p<0,001$ ). MiR-181b and miR-181c were significantly down-regulated in patients who responded to RT/TMZ ( $p=0,016$ ;  $p=0,047$ , respectively) in comparison to patients with progredient disease. Our data indicate for the first time that expression levels of miR-181b and miR-181c could serve as a predictive marker of response to RT/TMZ therapy in glioblastoma patients.

*Key words: microRNA; MGMT methylation; glioblastoma; chemoradiotherapy; temozolomide;*

Glioblastomas are the most common form of primary malignant tumors in the central nervous system of adults, accounting for 50–60% of primary brain tumors [1]. Despite a cytoreductive surgery and intense combined chemoradiotherapy, glioblastomas are the most lethal tumors with dismal prognosis. A marked and significant benefit of a 2-year overall survival (27% versus 11%) has been achieved in patients treated with a concomitant chemoradiotherapy with temozolomide (RT/TMZ) [2]. Because of an extremely short median survival time of glioblastoma patients and a diversity in therapy response, it is extremely important to find new biomarkers that can be used in prediction of clinical outcome in patients treated with RT/TMZ.

One of a number of novel approaches to molecular characterization of tumors is based on the expression profiling of

microRNAs (miRNAs) which are short (18–25 nucleotides in length), noncoding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally. Bioinformatic tools predict that miRNAs are able to regulate approximately one-third of mammalian genes, including a significant number of oncogenes, tumor suppressor genes and genes associated with the invasion, dissemination and chemoresistance of tumors [3]. MiRNAs have been studied in association with a broad spectrum of oncological diseases [4]. Further, significant differences have been noticed in miRNA expression profiles of glioblastomas and normal brain tissues. Among others, miR-125b, miR-128a and miR-181a-c were found to be extremely down-regulated and miR-221/222 and miR-21 highly up-regulated in glioblastomas [5]. Following the discovery of specific glioblastoma miRNA expression profiles, several studies were undertaken that focused on the functional validation of each miRNA identified separately: miR-21 [6–10], miR-221/222 [11, 12], miR-181a/181b [13], miR-128 [14, 15],

\* Both authors contributed equally to this work.

miR-124 and miR-137 [16]. From these the anti-apoptotic effects of miR-21 were repeatedly verified on established glioblastoma cell lines *in vitro* [6, 7, 8] and *in vivo* using the athymic nude mouse model [9] and clinical samples [9, 10].

Recently, the most frequently studied predictive marker in glioblastomas has been the ubiquitous DNA-repair enzyme, O<sup>6</sup>-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) [17]. Epigenetic silencing of the MGMT gene by a promoter methylation has been shown to be an independent predictor of response to alkylating chemotherapy and prognosis of patients with newly diagnosed glioblastomas treated with RT/TMZ [17–21].

The purpose of this study is, firstly, to identify the methylation status of an MGMT promoter and to quantify expression levels of selected miRNAs (miR-21, miR-221/222, miR-125b, miR-128a and miR-181a-c) as glioblastoma biomarkers through a quantitative real-time PCR, and, secondly, to evaluate their possible relationship in regards to the response to a standard RT/TMZ treatment in glioblastoma patients.

## Patients and methods

**Patients and treatment.** A retrospective study was conducted by two centers (Masaryk Memorial Cancer Institute and University Hospital Brno, Czech Republic). The study included 22 patients with primary glioblastomas who underwent surgery at the Department of Neurosurgery of the University Hospital Brno. After surgery patients were treated at the Masaryk Memorial Cancer Institute under a standard protocol, receiving radiation therapy (2 Gy per fraction for 6 weeks; total dose of 60 Gy) plus concomitant chemotherapy with temozolomide (RT/TMZ) at 75 mg/m<sup>2</sup> daily, for 6 weeks. A response was evaluated at the first MRI scan performed 1 month after the concomitant RT/TMZ. A lesion enlargement was recorded in 11 (50%) patients (non-responders) while 11 (50%) patients indicated a response to the therapy. In the responding group of patients, the course followed an adjuvant treatment with temozolomide (150–200 mg/m<sup>2</sup> for 5 days in 4 week cycles). Informed consent approved by the local Ethical Commission was obtained from each patient before the treatment. Clinical data were retrieved from the hospital's patient records.

**Tissue sample preparation and nucleic acid extraction** Under a supervision of two experienced neuropathologists, 22 samples of tumor tissue were collected from, surgically

resected glioblastomas and six samples of an adult brain tissue were taken from areas surrounding arteriovenous malformations (AVM). The glioblastoma and brain formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens (containing either >90% tumor or >90% normal tissue) were dissected and placed into nuclease-free microcentrifuge tubes. Total RNA isolation and small RNA enrichment procedures were performed with the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA was extracted using the Qiagen DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), again following the manufacturer's instructions. Nucleic acid concentration and purity were controlled by UV spectrophotometry (A260:A280

> 2.0; A260:A230 > 1.8) using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

**Methylation-specific polymerase chain reaction.** Real-time quantitative, methylation-specific PCR (QMSP) was performed using a methodology previously described by Hattermann et al. [21]. Bisulfite conversion was performed using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Germany), as described by the manufacturer. For each conversion reaction, 1 µg DNA was employed. CG Genome Universal Unmethylated DNA (S7822; Vial A; Millipore, Germany) and CG Genome Universal Methylated DNA (S7821; Millipore, Germany) were used for positive controls (100% values) and standard curves. The QuantiTect SYBR green PCR Kit (Qiagen, USA) and primers specific for fully methylated and fully unmethylated MGMT promoter sequences were used for QMSP. The primer pair corresponding to a specific β-actin sequence was used as an internal standard to assess bisulfite conversion efficiency [21].

**Real-time quantification of miRNAs by stem-loop RT-PCR.** Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using gene-specific primers according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). Reverse transcriptase (RT) reactions utilized 10 ng of RNA sample, 50 nM of stem-loop RT primer, 1 x RT buffer and 0.25 mM each of dNTPs, 3.33 U/µl MultiScribe RT and 0.25 U/µl RNase inhibitor (all from the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit of Applied Biosystems; 4366597). Reaction mixtures (15 µl) were incubated in a TGradient thermal cycler (Biometra) for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C, and then held at 4°C. Real-time PCR was performed using the Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System. The 20-µl PCR reaction mixture included 1.3 µl of RT product, 1 x TaqMan (NoUmpErase UNG) Universal PCR Master Mix and 1 µl of primer and probe mix of the TaqMan MicroRNA Assay protocol (PE Applied Biosystems). Reactions were incubated in a 96-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 10 min. The threshold cycle data were determined using the default threshold settings. All real-time PCR reactions were run in triplicate and average Ct and SD values were calculated.

**Statistical analysis.** Expression data were normalized according to the expression of the RNU6B (Assay no. 4373381; Applied Biosystems). Statistical differences between miRNA levels in glioblastomas and adult brain tissue and differences in therapy response in relation to miRNA levels were evaluated using the nonparametric Mann-Whitney U test between 2 groups. Contingency tables were analyzed using Fisher's exact test. All calculations were performed using Statistica software version 6.0 (StatSoft Inc., USA).

## Results

**The MGMT promoter methylation status.** The MGMT promoter was methylated in 10 cases (45%) and unmethylated in 12 cases (55%) and it was not related to any other clinical char-



**Table 1. Patient characteristics and their relation to methylation status of MGMT<sup>1</sup> promotor.**

|                              | Total<br>n = 22 | %  | Unmethylated<br>n = 12 (55%) | %  | Methylated<br>n = 10 (45%) | %  | Association with methylation status<br>(Fischer's exact test) |
|------------------------------|-----------------|----|------------------------------|----|----------------------------|----|---|
| <b>Age</b>                   |                 |    |                              |    |                            |    |   |
| ≤50                          | 7               | 32 | 4                            | 34 | 3                          | 30 | P = 0.7059  |
| >50                          | 15              | 68 | 8                            | 66 | 7                          | 70 |   |
| Median = 55<br>Range = 28-65 |                 |    |                              |    |                            |    |   |
| <b>Gender</b>                |                 |    |                              |    |                            |    |   |
| Male                         | 14              | 64 | 9                            | 75 | 5                          | 50 | P = 0.3467  |
| Female                       | 8               | 36 | 3                            | 25 | 5                          | 50 |   |
| <b>Karnofsky score</b>       |                 |    |                              |    |                            |    |   |
| ≥90                          | 17              | 77 | 9                            | 75 | 8                          | 80 | P = 0.8123  |
| <90                          | 5               | 33 | 3                            | 25 | 2                          | 20 |   |
| <b>RT/TMZ response</b>       |                 |    |                              |    |                            |    |   |
| Responders                   | 11              | 50 | 5                            | 42 | 6                          | 60 | P = 0.4716  |
| Non-responders               | 11              | 50 | 7                            | 58 | 4                          | 40 |   |

<sup>1</sup>MGMT = O-6-methylguanine-DNA methyltransferase.

**Table 2. Median fold changes of miRNAs in glioblastomas, their possible association with cancer and their putative targets.**

| microRNA | Fold change | Chromosome localization | Connection to cancer in previous reports  | Putative targets <sup>1</sup>   |
|----------|-------------|-------------------------|---|---|
| miR-221  | 0.25        | Xp11.3                  | ↑ glioblastoma [11,12], ↑ thyroid cancer, ↑ hepatocellular carcinoma, ↑ prostate carcinoma, ↑ pancreatic cancer,                            | CDKN1B (p27)*, CDKN1C (p57)*, KIT*, MYBL1, RECK, SOCS3, APAF1, TIMP3, TIMP2, TCF12  |
| miR-222  | 0.22        | Xp11.3                  | ↑ breast cancer - tamoxifen resistance (see [4] for review)   |   |
| miR-181a | 0.4         | 1q31.3                  | ↓ glioblastoma [5,13], ↓ chronic lymphocytic leukemia [22],   | HOXA11*, TCL1*, TGFBR1, TGFBI, TGFBRAP1, TGIF2, PLAU, MMP7, MMP14, MYBL1, SMAD2, SMAD7, MAPK1, KLK13, HLA-DR, CD14, SAP30, RAB38, HSPA9, CYTC, E2F5, MGMT |
| miR-181b | 0.28        | 1q31.3                  | ↑ associated with better response to S-1 in colorectal cancer [23]  |   |
| miR-181c | 0.29        | 19p13.12                |   |   |
| miR-125b | 1.45        | 11q24.1                 | ↓ glioblastoma [5], ↓ prostate cancer, ↑ ovarian cancer, ↓ associated with better survival in hepatocellular carcinoma (see [4] for review) | E2F3*, MCL1*, BCL2*, NTRK3*, ERBB2*, TP53INP1, SMAD2, RAB6B, CASP2, ETS1, ABL2, STAT3   |
| miR-128a | 0.03        | 2q21.3                  | ↓ glioblastoma [5,14,15]  | BMI1*, TGFBR1, TGIF2, SMAD2, RARA, NOVA1, BAG2, EGFR, ITGA5, GSPT1, VEGFB, CA7  |
| miR-21   | 8.35        | 17q23.2                 | ↑ glioblastoma [5-10], ↑ colorectal cancer [3], ↑ lung cancer, ↑ breast cancer and other solid cancers (see [4] for a review)               | PDCD4*, TGFBI, TIMP3*, RHOB, RECK, PPARA, ASPN  |

<sup>1</sup> Human mRNAs displaying imperfect complementarity with particular miRNAs were selected according to the potential function in carcinogenesis using TargetScan, PicTar and miR-Base target prediction algorithms (3).

\* The predicted target was verified by in-vitro functional analysis.

acteristic of glioblastoma, i.e. age, gender, performance status assessed by Karnofsky score or a response to a concomitant chemoradiotherapy with temozolomide (Table 1). The MGMT methylation proved to be independent of any of the miRNAs analyzed in this study.

*Comparison of miRNA expression levels in glioblastomas and adult brain samples.* The fold change of the miRNAs in glioblastoma samples, their possible relationship to cancer, and their putative and validated targets are all presented in Table 2. Both, the levels of significance and the medians of the relative expression values with their ranges defined by the 25th and 75th percentiles, are presented in Table 3. The Real-time

PCR analysis indicated no significant difference in expression levels of miR-181a and miR-125b between glioblastomas and the normal brain tissue. In contrast, the expression level of miR-21 was significantly up-regulated (by nearly eight times) in the tumor compared with the normal brain tissue (Table 3). Conversely, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-181c, were all significantly down-regulated in glioblastomas (Table 3). The most significant difference was observed in miR-128a with levels in glioblastomas approximately 40 times lower than in a normal brain tissue.

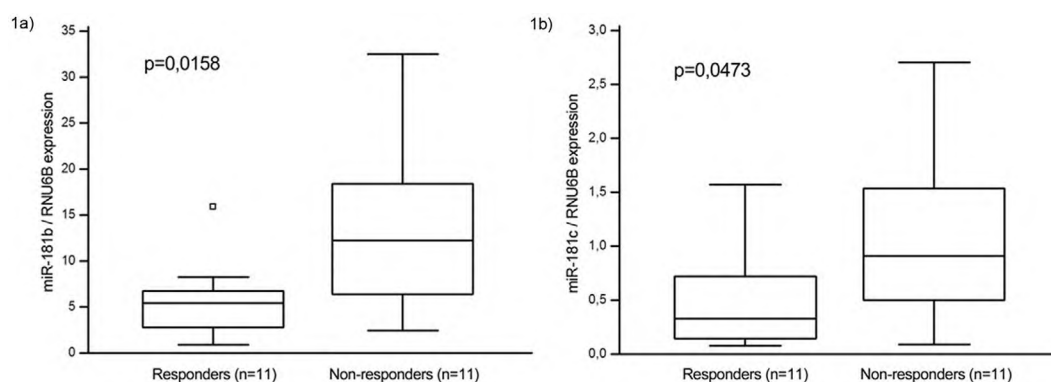
*Correlation of patient response to RT/TMZ with miRNA expression levels.* To evaluate the potential association of

**Table 3.** Comparison of normalized miRNA expression levels in glioblastomas and control brain tissue and their association with response to RT/TMZ.

| microRNA | Glioblastoma vs. brain tissue <sup>1</sup> |                           |                  | RT/TMZ response <sup>2</sup> |                          |                |
|----------|--|---------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|----------------|
|          | Glioblastoma<br>n = 22                     | CBT <sup>1</sup><br>n = 6 | P <sup>3</sup>   | Responders<br>n = 11         | Non-responders<br>n = 11 | P <sup>3</sup> |
| miR-221* | 2.26 (1.43-6.90)                           | 8.88 (8.21-21.76)         | <b>0.016</b>     | 1.85 (1.60-3.40)             | 2.85 (1.15-9.86)         | 0.562          |
| miR-222  | 4.81 (2.29-13.06)                          | 22.01 (9.25-42.62)        | <b>0.038</b>     | 4.62 (1.50-7.09)             | 10.34 (2.42-29.90)       | 0.243          |
| miR-181a | 1.97 (0.99-3.87)                           | 4.89 (2.83-7.84)          | 0.073            | 1.52 (0.68-2.82)             | 2.88 (1.32-5.22)         | 0.116          |
| miR-181b | 6.28 (3.23-15.09)                          | 22.62 (7.46-50.39)        | <b>0.036</b>     | 5.17 (2.78-6.77)             | 12.59 (6.59-18.43)       | <b>0.016</b>   |
| miR-181c | 0.57 (0.21-1.05)                           | 1.95 (0.58-2.52)          | <b>0.043</b>     | 0.33 (0.14-0.72)             | 0.91 (0.50-1.54)         | <b>0.047</b>   |
| miR-125b | 50.36 (22.50-84.76)                        | 34.76 (17.79-56.30)       | 0.502            | 45.5 (10.98-76.41)           | 55.2 (33.92-84.82)       | 0.519          |
| miR-128a | 0.02 (0.01-0.06)                           | 0.76 (0.12-1.16)          | <b>0.001</b>     | 0.02 (0.01-0.04)             | 0.04 (0.01-0.06)         | 0.652          |
| miR-21   | 219.26 (75.24-562.87)                      | 26.26 (18.68-30.84)       | <b>&lt;0.001</b> | 266.87 (79.29-424.53)        | 165.04 (76.87-830.85)    | 0.747          |

\*Medians of expression level related to RNU6B with 25th and 75th percentiles in parentheses.

<sup>1</sup>Control brain tissue from arteriovenous malformation surgeries; <sup>2</sup>Response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide; <sup>3</sup>Mann-Whitney U-test between 2 groups, bold indicate significance at the P = 0.05 level.



**Figure 1.** Response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide based on miR-181b (a) and miR-181c (b) expression levels (Mann-Whitney U test). Central box represents values from lower to upper quartile (25 to 75 percentile). Middle line represents the median. A line extends from minimum to maximum value, excluding outstanding values which are displayed as separate squares.

individual miRNAs with a patient response to RT/TMZ, the expression levels of each miRNA in the response group of patients were compared with their levels in the group of patients with the progressive disease. Patients who responded to RT/TMZ tended to have lower expression levels of members of the microRNA-181 family than those with the progressive disease. MiR-181b and miR-181c were significantly down-regulated in the glioblastomas of patients with response (Table 3, Figure 1a and 1b). On the other hand, no association was found between the treatment response and miR-221, miR-222, miR-181a, miR-125b, miR-128a, and miR-21 (Table 3).

## Discussion

The most extensively studied predictive factor in glioblastoma patients is the epigenetic silencing of the MGMT gene by a promoter methylation. It has been associated with

longer survival in patients who received alkylating agents. However, recent studies that have focused on the MGMT predictive potential have provided ambiguous results [17–20]. In this study, we used QMSP, the most sensitive method for the methylation analysis [21]. A positive methylation status of the MGMT promoter was detected in 45% of tumors. According to recent literature, the frequency of the MGMT promoter methylation in glioblastoma patients ranged from 45% to 65% [17–20]. Using this highly sensitive QMSP assay, we did not identify any relationship between the methylation status of the MGMT promoter and age, gender, performance status or response to RT/TMZ. Our observations are in accordance with data published by Sadones *et al.* [18] and Blanc *et al.* [19] and do not lead us to consider promoter methylation of the MGMT gene as a predictive factor of responsiveness to RT/TMZ in glioblastoma patients.

There are several advantages of using miRNAs instead of mRNAs as biomarkers. It is relatively easier to discover reliable biomarkers from approximately 1,000 miRNA candidates discovered to date than from over 40,000 genes. A further advantage is that, due to their small size and stem-loop structure, miRNAs are relatively more stable and less subjected to degradation during fixation and sample processing. This can also be of benefit for large retrospective studies based on archived FFPE samples. MiRNA-specific real-time PCR assays are very sensitive and require only a small amount (10–25 ng) of the total RNA from archived FFPE patient samples.

Our study confirmed the up-regulation of miR-21 in glioblastoma tissue that has been noted previously by others [6–10]. MiR-21 was the most up-regulated miRNA with an almost eight-fold expression increase in glioblastoma tissue. Chan *et al.* [6] have shown that inhibition of miR-21 expression led to a caspase activation and an associated apoptotic cell death in multiple glioblastoma cell lines, suggesting an anti-apoptotic function of miR-21. We did not observe higher levels of miR-221/222 in glioblastomas despite a previous study [11] showing that miR-221/222 were over-expressed in gliomas, with the tumor suppressor p27Kip1 proven to be their direct target [11, 12]. In contrast, we observed approximately four-fold lower levels of miR-221/222 in glioblastomas in comparison to the adult brain tissue (Table 3). The adult brain tissue was, for our purposes, collected during an AVM surgery. It is likely that the brain tissue, though excised from the margin of resection material, contained traces of micro-capillaries from around the AVM. It is generally known that miR-221/222 is found in the highest levels in endothelial cells. This could be responsible for the apparently low levels of miR-221/222 in the glioblastomas of our group of patients despite their absolute levels being comparable with those of previous reports [11, 12]. The down-regulation of MiR-125b noticed by Ciafre *et al.* [5] was not detected in glioblastomas in this study. However, the deregulation of miR-128a first identified by the same authors, was verified by our data. The miR-128a was, indeed, the most down-regulated miRNA in glioblastomas showing an approximately 40-fold decrease which is in concordance with observations of Godlewski *et al.* [14].

MiR-181a and miR-181b have been shown to function as tumor suppressors that trigger growth inhibition, induced apoptosis and inhibited invasion in glioma cells [13]. Accordingly, the expression levels of miR-181a-c in glioblastomas were, in our case, lower, whereas a down-regulation of miR-181b and miR-181c was statistically significant. Lower levels of miR-181b and miR-181c in glioblastomas, however, were positively correlated with response to RT/TMZ in glioblastoma patients. Nakajima *et al.* [23] were able to demonstrate similar results using the colorectal cancer model and its response to chemotherapy with fluoropyrimidine based drug S-1. Significantly lower levels of miR-181b ( $P = 0.02$ ) were noticed in tumors of patients responding to S-1 treatment [23]. The potential of all microRNA-181 family members to regulate MGMT levels suggests a relationship with the chemosensitivity

to alkylating agents such as temozolomide. The down-regulation of microRNA-181 family leads to an up-regulation of MGMT and, therefore, its association with a response to RT/TMZ through MGMT post-transcriptional regulation is implausible. Our data indicate that an alternative and efficient molecular mechanism exists by which microRNA-181 family sensitizes glioblastoma cells to a chemoradiotherapy. As a robust translational regulator, the microRNA-181 family can mediate a number of genes in response to an acute cellular stress caused by a drug treatment or radiation (Table 3).

To our knowledge, it is noted for the first time that the expression of miR-181b and miR-181c has shown a negative correlation with a response to RT/TMZ. Our findings also support the importance of miR-128a and miR-21 in pathogenesis of glioblastomas. Further studies and validations are needed but we suggest that microRNA-181 family might be used for prediction of RT/TMZ response in clinical practice. If validated, it would pave the way to better treatment decisions and, ultimately, an improvement in the survival rate of glioblastoma patients.

Acknowledgement. This work was supported by grant IGA NR 9875-4 of the Czech Ministry of Health and Project No. MZMOMOU2005 of the Czech Ministry of Health.

## References

- [1] SCHVARTZBAUM JA, FICHER JL, ALDAPE KD, WRENSCH M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 494–503.
- [2] STUPP R, MASON WP, van den BENT MJ, WELLER M, FISHER B *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- [3] ESQUELA-KERSCHER A, SLACK FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259–69. doi:10.1038/nrc1840
- [4] ZHANG B, FARWELL MA. microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 3–21. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00196.x
- [5] CIAFRE SA, GALARDI S, MANGIOLA A, FERACCIN M, LIU CG *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1351–8. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.030
- [6] CHAN JA, KRICHEVSKY AM, KOSIK KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0137
- [7] CHEN Y, LIU W, CHAO T, ZHANG Y, YAN X *et al.* MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett* 2008; 272: 197–205. doi:10.1016/j.canlet.2008.06.034
- [8] GABRIELY G, WUDINGER T, KESARI S, ESAU CC, BURCHARD J *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5369–80. doi:10.1128/MCB.00479-08

- [9] CORSTEN MF, MIRANDA R, KASMIEH R, KRICHEVSKY AM, WEISSELEDER R et al. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* 2007; 67: 8994–9000. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1045](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1045)
- [10] PAPAGIANNAKOPOULOS T, SHAPIRO A, KOSIK KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 8164–72. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1305](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1305)
- [11] GILLIES JK, LORIMER IA. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 2007; 6: 2005–9.
- [12] LUKIW WJ, CUI JG, LI YY, CULICCHIA F. Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* 2009; 91: 27–32. [doi:10.1007/s11060-008-9688-0](https://doi.org/10.1007/s11060-008-9688-0)
- [13] SHIL L, CHENG Z, ZHANG J, LIR, ZHAO P et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 2008; 1236: 185–93. [doi:10.1016/j.brainres.2008.07.085](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.085)
- [14] GODLWESKI J, NOWICKI MO, BRONISZ A, WILLIAMS S, OTSUKI A et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008; 68: 9125–30. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2629](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2629)
- [15] ZHANG Y, CHAO T, LI R, LIU W, CHEN Y et al. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med* 2009; 87: 43–51. [doi:10.1007/s00109-008-0403-6](https://doi.org/10.1007/s00109-008-0403-6)
- [16] SILBER J, LIM DA, PETRITSCH C, PERSSON AI, MAUNAKEA AK et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 2008; 6: 14. [doi:10.1186/1741-7015-6-14](https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-14)
- [17] HEGI ME, LIU L, HERMAN JG, STUPP R, WICK W et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4189–99. [doi:10.1200/JCO.2007.11.5964](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.5964)
- [18] SADONES J, MICHOTTE A, VELD P, CHASKIS C, SCIOT R et al. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 2009; 45: 146–53. [doi:10.1016/j.ejca.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.002)
- [19] BLANC JL, WAGER M, GUILHOT J, KUSY S, BATAILLE B et al. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J Neurooncol* 2004; 68: 275–83. [doi:10.1023/B:NEON.0000033385.37098.85](https://doi.org/10.1023/B:NEON.0000033385.37098.85)
- [20] BRANDES AA, FRANCESCHI E, TOSONI A, BLATT V, PESSION A et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2192–7. [doi:10.1200/JCO.2007.14.8163](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8163)
- [21] HATEERMANN K, MEHDORN HM, MENTLEIN R, SCHULTKA S, HELD-FEINDT J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal Biochem* 2008; 377: 62–71. [doi:10.1016/j.ab.2008.03.014](https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.014)
- [22] PEKARSKY Y, SANTANAM U, CIMMINO A, PALAMAR-CHUK A, EFANOV A et al. Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006; 66: 11590–3. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3613](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3613)
- [23] NAKAJIMA G, HAYASHI K, XI Y, KUDO K, UCHIDA K et al. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2006; 3: 317–24.

# MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients

Radek Lakomy,<sup>1</sup> Jiri Sana,<sup>1,2</sup> Simona Hankeova,<sup>1</sup> Pavel Fadrus,<sup>3</sup> Leos Kren,<sup>4</sup> Eva Lzicarova,<sup>5</sup> Marek Svoboda,<sup>1</sup> Hana Dolezelova,<sup>6</sup> Martin Smrcka,<sup>3</sup> Rostislav Vyzula,<sup>1</sup> Jaroslav Michalek,<sup>7</sup> Marian Hajduch<sup>8</sup> and Ondrej Slaby<sup>1,2,8,9</sup>

<sup>1</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno; <sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno; <sup>3</sup>Department of Neurosurgery; <sup>4</sup>Department of Pathology, University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; <sup>5</sup>Department of Oncologicals and Experimental Pathology; <sup>6</sup>Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno; <sup>7</sup>Advance Cell Immunotherapy Unit, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; <sup>8</sup>Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Czech Republic

(Received June 9, 2011/Revised July 15, 2011; August 8, 2011; August 18, 2011/Accepted August 30, 2011/Accepted manuscript online September 5, 2011/Article first published online October 12, 2011)

**Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequently occurring primary malignant brain tumor; patients with GBM often have a very poor prognosis and differing responses to treatment. Therefore, it is very important to find new biomarkers that can predict clinical outcomes and help in treatment decisions. MicroRNAs are small, non-coding RNAs that function as post-transcriptional regulators of gene expression and play a key role in the pathogenesis of GBM. In a group of 38 patients with primary GBM, we analyzed the expression of eight microRNAs (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221, and miR-222). In addition, we examined the methylation status of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter by high-resolution melting analysis, as this has been shown to be a predictive marker in GBM. MGMT methylation status correlated with progression-free survival ( $P = 0.0201$ ; log-rank test) as well as with overall survival ( $P = 0.0054$ ; log-rank test). MiR-195 ( $P = 0.0124$ ; log-rank test) and miR-196b ( $P = 0.0492$ ; log-rank test) positively correlated with overall survival. Evaluation of miR-181c in combination with miR-21 predicted time to progression within 6 months of diagnosis with 92% sensitivity and 81% specificity ( $P < 0.0001$ ). Our data confirmed that the methylation status of MGMT but also miR-21, miR-181c, miR-195, and miR-196b to be associated with survival of GBM patients. Above all, we suggest that the combination of miR-181c and miR-21 could be a very sensitive and specific test to identify patients at high risk of early progression after surgery. (Cancer Sci 2011; 102: 2186–2190)**

**G**lioblastoma multiforme (GBM) is the most frequently occurring primary malignant brain tumor of astrocytic origin.<sup>(1)</sup> Despite the introduction of modern therapeutic approaches, this cancer remains generally associated with very poor prognosis.<sup>(2)</sup> A significant benefit of overall survival (OS) has been achieved in patients treated with concomitant chemoradiotherapy with temozolomide (RT/TMZ), an alkylating agent. However, not all patients are sensitive to this therapy.<sup>(3,4)</sup> Because of an extremely short median survival time of glioblastoma patients and diversity in therapy response, it is very important to identify new biomarkers that can be used in prognosis and prediction of therapeutic response and/or clinical outcome in GBM patients in order to rationalize treatment decisions.

MicroRNAs (miRNAs) are highly conserved, small, non-coding RNAs, 18–25 nucleotides in length, that function as post-transcriptional regulators of gene expression by silencing their mRNA targets. Bioinformatics tools estimate that miRNAs

regulate up to one-third of human genes including a significant number of oncogenes, tumor suppressor genes, and genes associated with the invasion, dissemination, and chemoresistance of tumors.<sup>(5)</sup> Therefore, these molecules play significant roles in the pathogenesis of many cancers, including GBM.<sup>(6,7)</sup> In the context of this tumor, recent published reports have proposed that some miRNAs that could be used to predict disease outcome and therapy response. As we previously described, miR-21, miR-128a, miR-181b, miR-181c, miR-221, and miR-222 were significantly altered in glioblastomas. Moreover, miR-181b and miR-181c were significantly downregulated in patients who responded to RT/TMZ compared to patients with progressive disease.<sup>(8)</sup> In another study, miR-195, miR-455-3p, and miR-10a\* were the most upregulated miRNAs in TMZ-resistant cell lines.<sup>(9)</sup> MiR-196a and miR-196b expression levels are increased in glioblastomas relative to both anaplastic astrocytomas and normal brain tissues. Furthermore, patients with high miR-196 expression levels showed significantly poorer OS.<sup>(10)</sup>

Another frequently studied predictive marker in GBM is the O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT).<sup>(11)</sup> This protein with DNA repair activity removes mutagenic O-6-alkylguanine induced by alkylating agents. Therefore, MGMT partially contributes to alkylating chemotherapy resistance, and epigenetic silencing of the *MGMT* gene by a promoter methylation has been shown to be an independent predictor of prognosis and response to RT/TMZ and adjuvant TMZ treatment of GBM patients.<sup>(12–14)</sup>

The aims of this study were to quantify expression levels of eight miRNAs (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221, and miR-222) that have been previously described as associated with GBM pathogenesis in the clinical samples, and to determine the methylation status of MGMT gene promoter. The results were correlated to clinical data in order to obtain prognostic and predictive biomarkers for GBM patients treated with RT/TMZ and adjuvant TMZ.

## Materials and Methods

**Patients and treatment.** The retrospective study included 38 patients with primary glioblastomas who were resected at the Department of Neurosurgery (University Hospital Brno, Brno, Czech Republic). After resection, patients underwent adjuvant

<sup>9</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: slaby@mou.cz

therapy at the Masaryk Memorial Cancer Institute (Brno, Czech Republic) according to the standard Stupp protocol: radiotherapy (2 Gy per fraction for 6 weeks, total dose of 60 Gy) plus concomitant chemotherapy with RT/TMZ at 75 mg/m<sup>2</sup> daily, for 6 weeks. Nineteen patients received an adjuvant treatment with temozolomide (150–200 mg/m<sup>2</sup> for 5 days in 4-week cycles) (Table 1). Informed consent approved by the local Ethical Commission was obtained from each patient before the treatment. Clinical data were retrieved from the hospital's patient records.

**Tissue sample preparation and nucleic acid extraction.** The 38 tumor samples were obtained from surgically resected glioblastomas. As a control, six non-tumor samples of adult brain tissue were taken from areas surrounding arteriovenous malformations (AVM) and four commercially available RNAs from adult brain tissues (540005, total brain; 540117, frontal cortex; 540137, occipital cortex; 540135, striatum; Agilent-Stratagene, Santa Clara, CA, USA). Glioblastoma clinical samples were evaluated by two experienced neuropathologists. For subsequent analysis were used dissected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples containing more than 90% tumor tissue. Small RNA-enriched total RNA was isolated using mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA). DNA was extracted using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Nucleic acid concentration and purity were controlled by UV spectrophotometry (A260:A280 > 2.0; A260:A230 > 1.8) using Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

**Real-time quantification of miRNAs by stem-loop RT-PCR.** Complementary DNA was synthesized from 10 ng small RNA-enriched total RNA using gene-specific primers and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-Time PCR was carried out using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System in accordance with the TaqMan MicroRNA Assay protocol. The threshold cycle data were determined using the default threshold settings. All real-time PCR reactions were run in triplicate and average Ct and SD values were calculated.

**Bisulfite conversion of DNA and high-resolution melting (HRM) analysis of MGMT promoter.** Bisulfite conversion was carried out using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) with 1000 ng DNA per reaction. High-resolution melting was carried out on the LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) using a LightCycler 480 High Resolution Melting Master kit (Roche) with 30 ng bisulfite converted DNA on each reaction, 4 nM Mg<sup>2+</sup>, and previously described primers MGMT MS-HRM2.<sup>(15)</sup> CpGenome Universal Methylated DNA and CpGenome Universal

Unmethylated DNA set (Millipore, Darmstadt, Germany) were used for dilution of standard samples (0, 10, 25, 50, 75, 90, and 100% methylated DNA). All HRM reactions were run in triplicate.

**Statistical analysis.** Expression data were normalized according to the expression of RNU6B (Assay no. 4373381; Applied Biosystems). Statistical analysis of differences between miRNA levels in glioblastomas and non-tumor adult brain tissues, and differences in therapy response and time to progression in relation to miRNA levels, were evaluated using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test between two groups. Survival analyses were carried out by the Kaplan–Meier method and significance was calculated by the log–rank test. Sensitivity and specificity were evaluated and significance of the patient stratification according to a particular miRNA marker was assessed by Fischer's exact test. For all calculations we used MedCalc version 11.4.2.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

## Results

**Methylation status of MGMT promoter.** Twenty-five percentage methylation status of MGMT promoter was used as cut-off for stratification of GBM patients into (un)methylated groups. The MGMT promoter was unmethylated in 26 cases (68%) and methylated in 12 cases (32%) (Table 2). In patients with methylated promoter of the *MGMT* gene, there was an observed benefit in OS (hazard ratio [HR] 0.4012; 95% confidence interval [CI] 0.2068–0.7783; *P* = 0.0054, log-rank test) as well as in progression-free survival (HR 0.4799; 95% CI 0.2516–0.9153; *P* = 0.0201, log-rank test) (Fig. 1). The MGMT methylation status was not associated with any of the miRNA expression levels analyzed in this study (Table 3).

**Comparison of miRNA expression levels in GBM tissues and non-tumor brain tissue samples.** Medians of relative expression levels of all examined miRNAs with their 25th and 75th percentile ranges, GBM samples and non-tumor brain tissue samples, as well as *P*-values indicating statistical significance of differences, are summarized in Table 3. Our data indicated significant overexpression of miR-21 and miR-196a/b in GBM samples compared to control non-malignant brain tissues, and downregulation of miR-181c, miR-221, miR-222, miR-195, and miR-128a. Of these, miR-128a showed the most significant change (*P* < 0.0001).

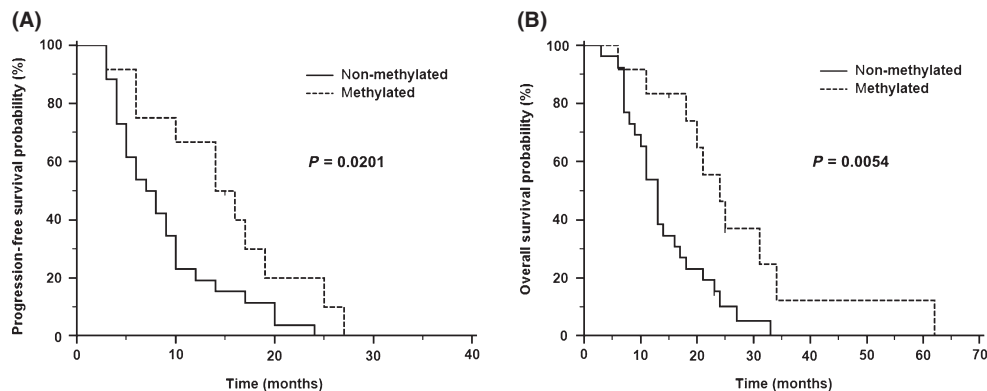
**Correlation of miRNA expression levels with prognosis and prediction of response to RT/TMZ treatment in GBM patients.** Higher levels of miR-195 (HR 0.4249; 95% CI 0.2167–0.8332; *P* = 0.0124, log-rank test) and miR-196b (HR 0.5470; 95% CI 0.2776–1.0776; *P* = 0.0492, log-rank test) expression have been significantly associated with longer OS of GBM patients. For these analyses, the 75th percentile range and median of relative expression levels have been used as cut-offs for miR-195 and miR-196b, respectively (Fig. 2). Significantly

**Table 1. Characteristics of patients with glioblastoma multiforme who participated in this study (n = 38)**

|                         | Total<br>n = 38 | %  |
|-------------------------|-----------------|----|
| Age (years)             |                 |    |
| ≤50                     | 14              | 37 |
| >50                     | 24              | 63 |
| Median (range)          | 53 (28–67)      |    |
| Gender                  |                 |    |
| Male                    | 19              | 50 |
| Female                  | 19              | 50 |
| ECOG performance status |                 |    |
| 0 and 1                 | 36              | 95 |
| 2                       | 2               | 5  |
| Extent of resection     |                 |    |
| Total                   | 9               | 24 |
| Subtotal                | 29              | 76 |

**Table 2. Characteristics of patients with glioblastoma multiforme (n = 38), based on methylguanine-DNA methyltransferase methylation status**

|                           | Promoter status |                 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
|                           | Unmethylated    | Methylated      |
| No. of patients           | 26 (68%)        | 12 (32%)        |
| Progression-free survival |                 |                 |
| Median duration (months)  | 8.0 (3.0–24.0)  | 14.5 (3.0–27.0) |
| Rate at 6 months (%)      | 61.5            | 83.3            |
| Overall survival          |                 |                 |
| Median duration (months)  | 13.0 (3.0–33.0) | 22.5 (6.0–62.0) |
| Rate at 24 months (%)     | 11.5            | 58.3            |

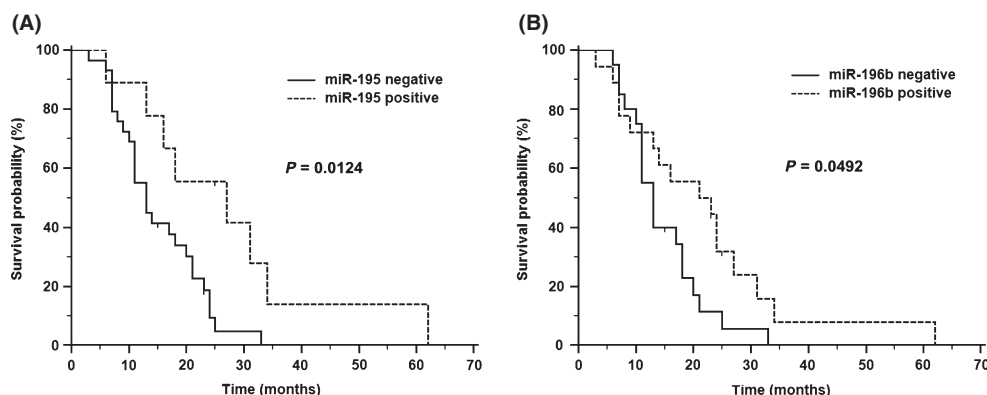


**Fig. 1.** Kaplan–Meier survival curves estimating progression-free survival (A) and overall survival (B) in patients with glioblastoma multiforme, according to methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation status.

**Table 3.** Comparison of normalized microRNA expression levels in glioblastoma multiforme and non-tumor brain tissues and their association with methylation status of methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter

| MicroRNA | Glioblastoma<br><i>n</i> = 38  | Non-tumor brain tissue†<br><i>n</i> = 10 | Fold change | <i>P</i> -value‡  | MGMT association§ ( <i>P</i> ) |
|----------|--------------------------------|--|-------------|-------------------|--------------------------------|
| miR-21   | 78.5814¶<br>(33.1469–237.7333) | 22.7989<br>(19.2862–30.8386)             | 3.45        | <b>0.02550</b>    | 0.4142                         |
| miR-128a | 0.01534<br>(0.005892–0.05036)  | 1.1798<br>(0.7614–7.7713)                | 0.01        | <b>&lt;0.0001</b> | 0.8494                         |
| miR-181c | 0.4805<br>(0.1345–0.9141)      | 2.2363<br>(0.6974–3.1595)                | 0.21        | <b>0.0005</b>     | 0.4232                         |
| miR-195  | 5.4032<br>(0.8845–33.2029)     | 38.5964<br>(17.8927–46.8118)             | 0.14        | <b>0.0290</b>     | 0.2928                         |
| miR-196a | 0.14790<br>(0.06040–0.7335)    | 0.01511<br>(0.00022–0.04707)             | 9.79        | <b>0.0021</b>     | 0.2573                         |
| miR-196b | 0.09182<br>(0.01690–0.57340)   | 0.01978<br>(0.00022–0.11020)             | 4.64        | <b>0.0330</b>     | 0.4795                         |
| miR-221  | 2.3737<br>(1.0943–6.7427)      | 23.2871<br>(8.2249–67.7547)              | 0.10        | <b>0.0001</b>     | 0.9749                         |
| miR-222  | 7.0326<br>(3.2716–14.4534)     | 46.1839<br>(18.2944–99.2503)             | 0.15        | <b>0.0010</b>     | 0.1092                         |

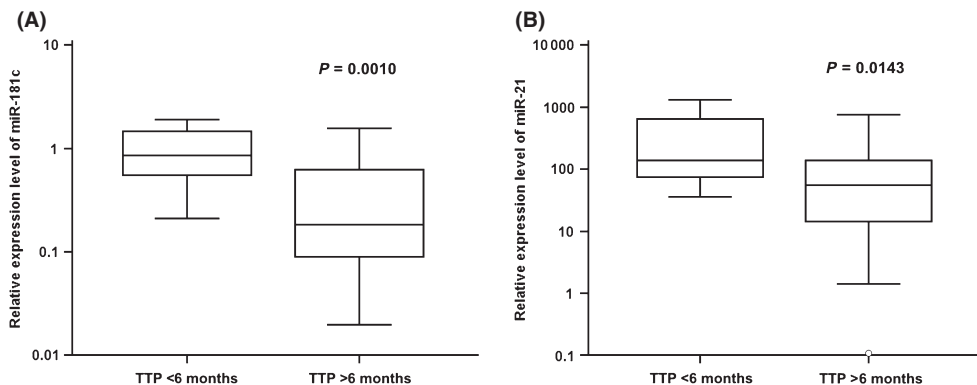
†Non-tumor brain tissue from arteriovenous malformation surgeries (×6) and commercially available adult brain RNAs (×4). ‡Mann–Whitney *U*-test (bold indicates significance at *P* < 0.05). §Association with methylation status of MGMT promoter (Mann–Whitney *U*-test). ¶Median of expression level related to RNU6B with 25th and 75th percentiles.



**Fig. 2.** Kaplan–Meier survival curves estimating overall survival in patients with glioblastoma multiforme, according to miR-195 (A) and miR-196b (B) expression levels.

higher miR-181c expression levels were observed in the group of patients with time to progression shorter than 6 months (TPP6) (*P* = 0.0010, Mann–Whitney *U*-test) (Fig. 3A). Identifi-

cally, miR-21 was significantly upregulated in this high risk group of patients (*P* = 0.0143, Mann–Whitney *U*-test) (Fig. 3B). Analysis of the miR-181c in combination with miR-21 (cut-offs



**Fig. 3.** Time to progression (TTP) up to 6 months in patients with glioblastoma multiforme, based on miR-181c (A) and miR-21 (B) expression levels. Central box represents values from the lower to upper quartiles (25th to 75th percentiles), and the middle line represents the median (Mann-Whitney *U*-test). Vertical line extends from minimum to maximum values.

were median and 25th percentile, respectively) predicted significantly TPP6 (sensitivity = 92%, specificity = 81%,  $P < 0.0001$ ; see Table 4). However, neither prognostic nor predictive associations were found for miR-128a, miR-196a, miR-221, or miR-222.

### Discussion

In this study, we have confirmed the impact of MGMT promoter methylation status on the favorable outcome after RT/TMZ therapy in GBM patients. Patients with MGMT promoter hypermethylation in >25% tumor DNA showed significantly longer OS as well as progression-free survival. These observations fully correlate with the results of many authors.<sup>(12,16–18)</sup> The percentage of MGMT methylated samples has been smaller in our cohort (32%) than in other studies, where it ranged from 35% to 47%.<sup>(8,12,17)</sup> However, we analyzed MGMT methylation status using the HRM method, which is a more suitable approach for methylation analysis in routine practice compared to methylation-specific PCR, used in most of the other published studies, which can easily generate PCR false-positive results.

There are several reports that discuss the use of miRNAs as potential predictive and prognostic factors in GBM.<sup>(6)</sup> In this study, we analyzed the expression of eight miRNAs in primary GBM and we correlated the obtained data with clinical characteristics of GBM patients. In concordance with Guan *et al.*,<sup>(10)</sup> we observed significantly lower levels of miR-196a,b in normal brain compared to glioblastoma tissue. This group also described a significant correlation between higher expression of miR-196a,b with poor survival in a group of GBM and anaplastic astrocytoma patients.<sup>(10)</sup> Another study described miR-195 as one of the most upregulated miRNAs in TMZ-resistant GBM cell lines, and their knockdown led to reversal of TMZ resis-

tance and increased cytotoxicity of TMZ.<sup>(9)</sup> Accordingly, we expected a negative correlation between miR-195 and miR-196a,b expression and OS. However, our analyses suggest that there is more likely an opposite association between miR-195 and miR-196b and OS in GBM patients, which is in agreement with several other reports in colorectal, hepatocellular, and adrenocortical cancers.<sup>(19–22)</sup> The number of GBM patients in Guan's study was 39, which is comparable to the size of our group. Larger studies need to be carried out to establish the prognostic significance of miR-196b in glioblastoma. Interestingly, miR-196a showed no significance in OS in our study.

The miR-181 family has many predicted targets and some of these have been verified by *in vitro* functional analysis (HOXA11, TCL1, TGFBR1, and MAPK1).<sup>(8)</sup> Therefore, it is a robust translational regulator and can mediate a number of genes in response to an acute cellular stress caused by a drug treatment or radiation. In this study, we have shown that higher levels of miR-181c is significantly associated with disease progression within 6 months. In fact, we confirmed results from our previous pilot study where we described positive correlation between lower miR-181c levels and the response to RT/TMZ in GBM.<sup>(8)</sup> We did not observe an association between MGMT methylation status and miR-181c levels, nor with any other examined miRNAs. Our study also confirmed the upregulation of miR-21 in glioblastoma tissue, noted previously by others.<sup>(8,23–26)</sup> MiR-21 is the most frequently explored miRNA in GBM, and it has been found to act as an oncogene. It is evident that this molecule influences multiple important components of oncogenic signaling pathways.<sup>(6)</sup> Similar to miR-181c, we found that higher expression of miR-21 is associated with early progression. Moreover, the combination of miR-181c and miR-21 predicted progression within 6 months with 92% sensitivity and 81% specificity. This study also partially confirmed the downregulation of miR-221 and miR-222, described in our previous publication.<sup>(8)</sup> In the current study, significant downregulation of miR-221, and a similar trend for miR-222, were observed. However, results from both of our studies conflict with another report showing miR-221 and miR-222 as overexpressed in primary GBM.<sup>(23)</sup> In our study, we combined tissue from AVM surgeries and commercially available RNAs from adult brain tissue as the control group. The miRNA expression changes tended to have identical trends in total RNA from AVM samples and commercially available adult brain RNAs, therefore, we integrated them together in further statistical analyses. In the study by Ciafre *et al.*,<sup>(23)</sup> which reported opposite changes in miR-221/222 expression levels, peripheral tissue of glioblastomas were used as the control tissue. We suggest that this is not an ideal control tissue, and could partially explain the contradiction in results. Our data did

**Table 4.** Contingency table of glioblastoma patients stratified according to time to progression (TTP) and miR-21/miR-181c positivity

|                                   | No. of patients with TTP > 6 months | No. of patients with TTP < 6 months |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| miR-21 and miR-181c positivity    | 5                                   | 11                                  |
| miR-21 and/or miR-181c negativity | 21                                  | 1                                   |



not indicate the potential of miR-221/222 for survival prediction in GBM patients, as observed by Srinivasan *et al.*<sup>(27)</sup>

In conclusion, we have verified two previous reports describing miR-128a deregulation in GBM compared to non-tumor adult brain tissue.<sup>(8,23)</sup> Interestingly, this miRNA showed approximately 50-fold higher expression in non-tumor brain tissue than in GBM ( $P < 0.0001$ ), suggesting its role in glioblastoma pathogenesis. Both miR-195 and miR-196b demonstrated prognostic significance, showing a positive correlation with OS. We suggest that the combination of miR-181c and miR-21 expression levels is a highly sensitive and specific indicator for identification of early progressing (high risk) patients, who would require specific attention, in order to improve their survival, through the use of more intensive therapy immediately after surgery. This fact is all the more important when bevacizumab is introduced for glioblastoma patients and evaluated in clinical trials combined with concomitant chemoradiotherapy.

## References

- 1 Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD *et al.* Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; **2**: 494–503; quiz 1 p following 16.
- 2 Ohgaki H, Dessen P, Jourde B *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; **64**: 6892–9.
- 3 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–96.
- 4 Stupp R, Hegi ME, Mason WP *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 459–66.
- 5 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 259–69.
- 6 Sana J, Hajdich M, Michalek J *et al.* MicroRNAs and glioblastoma: roles in core signaling pathways and potential clinical implications. *J Cell Mol Med* 2011; **15**: 1636–44.
- 7 Novakova J, Slaby O, Vyzula R *et al.* MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 1–5.
- 8 Slaby O, Lakomy R, Fadrus P *et al.* MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma* 2010; **57**: 264–9.
- 9 Ujifuku K, Mitsutake N, Takakura S *et al.* miR-195, miR-455-3p and miR-10a(\*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett* 2010; **296**: 241–8.
- 10 Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K *et al.* MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 4289–97.
- 11 Hegi ME, Liu L, Herman JG *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 4189–99.
- 12 Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A *et al.* MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 2192–7.
- 13 Sadones J, Michotte A, Veld P *et al.* MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 2009; **45**: 146–53.

## Acknowledgements

This work was supported by grants IGA NT/11214-4/2010 and IGA NR 9875-4 from the Czech Ministry of Health (project no. MZ0MOU2005) and by the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. The infrastructure of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported by the Operational Program Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030 and project CZ.1.07/2.4.00/17.0100).

## Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest.

- 14 Blanc JL, Wager M, Guilhot J *et al.* Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J Neurooncol* 2004; **68**: 275–83.
- 15 Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: e41.
- 16 Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 997–1003.
- 17 Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG *et al.* Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2606–13.
- 18 Weller M, Felsberg J, Hartmann C *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5743–50.
- 19 Wang X, Wang J, Ma H *et al.* Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol* 2011; DOI: 10.1007/s12032-011-9880-5 [Epub ahead of print].
- 20 Xu T, Zhu Y, Xiong Y *et al.* MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2009; **50**: 113–21.
- 21 Liu L, Chen L, Xu Y *et al.* microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **400**: 236–40.
- 22 Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ *et al.* miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7684–92.
- 23 Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **334**: 1351–8.
- 24 Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 8164–72.
- 25 Chen Y, Liu W, Chao T *et al.* MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett* 2008; **272**: 197–205.
- 26 Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 6029–33.
- 27 Srinivasan S, Patric IR, Somasundaram K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. *PLoS ONE* 2011; **6**: e17438.

## Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients

Jiri Sana<sup>1,2,3</sup>, Lenka Radova<sup>3</sup>, Radek Lakomy<sup>1,2</sup>,  
Leos Kren<sup>2,4</sup>, Pavel Fadrus<sup>2,5</sup>, Martin Smrcka<sup>2,5</sup>,  
Andrej Besse<sup>3</sup>, Jana Nekvindova<sup>6</sup>, Marketa Hermanova<sup>2,7</sup>,  
Radim Jancalek<sup>2,8</sup>, Marek Svoboda<sup>1,2</sup>, Marian Hajdich<sup>9</sup>,  
Pavel Slampa<sup>2,10</sup>, Rostislav Vyzula<sup>1,2</sup> and Ondrej Slaby<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno 65653, Czech Republic, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno 62500, Czech Republic, <sup>3</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno 62500, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno 62500, Czech Republic, <sup>5</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Brno, Brno 62500, Czech Republic, <sup>6</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove 50005, Czech Republic, <sup>7</sup>First Department of Pathological Anatomy, St. Anne's University Hospital, Brno 65691, Czech Republic, <sup>8</sup>Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital, Brno 65691, Czech Republic, <sup>9</sup>Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc 77900, Czech Republic and <sup>10</sup>Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno 65653, Czech Republic

\*To whom correspondence should be addressed. Central European Institute of Technology (CEITEC), Molecular Oncology II, Masaryk University, University Campus Bohunice, Building A35, Kamenice 5, 62500 Brno, Czech Republic. Tel: +420549496876; Fax: +420543146902; Email: on.slaby@gmail.com

**Glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant primary brain tumor. The prognosis of GBM patients varies considerably and the histopathological examination is not sufficient for individual risk estimation. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that function as post-transcriptional regulators of gene expression and were repeatedly proved to play important roles in pathogenesis of GBM. In our study, we performed global miRNA expression profiling of 58 glioblastoma tissue samples obtained during surgical resections and 10 non-tumor brain tissues. The subsequent analysis revealed 28 significantly deregulated miRNAs in GBM tissue, which were able to precisely classify all examined samples. Correlation with clinical data led to identification of six-miRNA signature significantly associated with progression free survival [hazard ratio (HR) 1.98, 95% confidence interval (CI) 1.33–2.94,  $P < 0.001$ ] and overall survival (HR 2.86, 95% CI 1.91–4.29,  $P < 0.001$ ). O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status was evaluated as reference method and Risk Score based on six-miRNA signature indicated significant superiority in prediction of clinical outcome in GBM patients. Multivariate Cox analysis indicated that the Risk Score based on six-miRNA signature is an independent prognostic classifier of GBM patients. We suggest that the Risk Score presents promising prognostic algorithm with potential for individualized treatment decisions in clinical management of GBM patients.**

### Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant primary brain tumor that arises by transformation of astrocytes. Because of its aggressive nature and common therapeutic resistance, GBM exhibits the worst prognosis among all gliomas. The median survival of patients is ~13 months from diagnosis; nevertheless, the survival ranges from 2.5

**Abbreviations:** FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; GBM, glioblastoma multiforme; MGMT, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase; miRNAs, microRNAs; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

to 70 months. Although the short- and long-term surviving patients with GBMs have histologically similar tumors, biological and molecular characteristics of these tumors vary significantly. This was evidenced by integrated genomic analyses of large set of GBMs, which identified clinically relevant molecular subtypes showing different treatment efficacy (1–3). Until recently, adjuvant chemotherapy with alkylating agents (temozolomide or carmustine) was the common GBM therapy following surgical resection and radiation with concomitant temozolomide (RT/TMZ). Currently, an angiogenesis inhibitor bevacizumab is evaluated in phase III clinical trials. Unfortunately, data suggest that bevacizumab in monotherapy improved progression free survival with preservation of quality of life and reduction of corticosteroids use, but did not improved overall survival (OS). Therefore, another agents, such as cilengitide, are used in combination with bevacizumab aiming to prolong OS (4,5). Thus, one of the important aims of GBM research is to find powerful prognostic biomarkers for GBM patients enabling sensitive prediction of clinical outcome and their suitability for implementation of new drugs.

One of the most modern and progressive approaches for molecular characterization of tumors today is based on microRNA (miRNA) expression profiling. miRNAs are highly conserved, small, non-coding RNAs, 18–25 nucleotides in length that function as post-transcriptional regulators of gene expression through silencing of their mRNA targets. Bioinformatic tools estimate that miRNAs could regulate up to 60% of human genes including a significant number of oncogenes, tumor suppressor genes and genes associated with the chemoresistance of tumors. Therefore, these molecules play significant roles in pathogenesis of many cancers, including GBM, and it is not surprising that their levels are frequently deregulated in tumor tissue (6,7). Moreover, some recent studies described miRNA signatures with ability to predict clinical outcome in GBM patients (6). From the analytical perspective, it is important to note that, due to their small size, miRNAs are subjected to significantly less degradation than mRNAs and, thus, also formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues indicate sufficient quality for miRNA analyses (8).

The aim of this study was to define signature of miRNAs significantly deregulated in GBM tissues compared with non-tumor brain tissues, and to identify miRNA signature with ability to efficiently predict progression-free and survival OS of GBM patients treated with concomitant RT/TMZ. Potential of miRNA signature to predict clinical outcome of GBM patients was compared with O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation status as reference method and evaluated in multivariate model.

### Material and methods

#### Patients

The retrospective one-center study included 58 patients with primary GBM who were surgically treated at the Department of Neurosurgery, University Hospital Brno. After resection of the tumor, patients underwent adjuvant therapy at the Masaryk Memorial Cancer Institute accordingly to the standard Stupp protocol; radiation (2 Gy per fraction for 6 weeks, total dose of 60 Gy) plus concomitant chemotherapy with temozolomide (75 mg/m<sup>2</sup> daily, for 6 weeks). After completion of the concomitant chemoradiotherapy, 31 patients received adjuvant temozolomide in monotherapy (150–200 mg/m<sup>2</sup> for 5 days in six cycles or until disease progression). Clinicopathologic characteristics of GBM patients are summarized in [Supplementary Table S1](#), available at *Carcinogenesis* Online. Portions of the non-dominant anterior temporal cortexes resected during surgery for intractable epilepsy of 10 patients were used as non-tumor control brain tissues. Control brain tissues have no signs of dysplastic changes. Informed consent approved by the local Ethical Commission was obtained from each patient before the treatment. Clinical data were retrieved from the hospital's patient records. The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset (485 GBM patients) was used for independent validation of the prognostic miRNA signature (2).

### Tissue sample preparation and nucleic acid extraction

The GBM tissues samples and non-tumor brain tissue samples were surgically resected and immediately fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). Histopathological diagnosis of GBM and evaluation of control brain tissues were performed independently by two experienced neuropathologists. Total RNA with enriched fraction of small RNAs was purified from FFPE samples by xylene deparaffinization and mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion). miRNA extracted from FFPE samples are commonly used for high-throughput miRNA analyses (9). DNA was extracted using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany). Nucleic acid concentrations and purities were controlled by UV spectrophotometry using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### MicroRNA expression profiling

MicroRNA expression profiling was performed using TaqMan Low Density Array Human MicroRNA technology. In brief, 350 ng of total RNA was reverse transcribed into cDNA by the Taq-Man MicroRNA Reverse Transcription Kit and microRNA Megaplex RT set pool A and B version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA product was loaded into TaqMan Human MicroRNA A and B Cards Set version 3.0 (Applied Biosystems) enabling simultaneous quantification of 754 human miRNAs. TaqMan Low Density Array Assays and analysis were performed on the ABI 7900 HT Instrument (Applied Biosystems). All reactions were performed according to the standard manufacturers' protocols.

### Bisulfite conversion of DNA and high-resolution melting analysis of MGMT promoter

Bisulfite conversion was performed using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, MD) with utilization of 1000 ng DNA per reaction. High-resolution melting was performed on the LightCycler 480 (Roche, Germany) using LightCycler 480 High Resolution Melting Master kit (Roche) with utilization of 30 ng bisulfite converted DNA on each reaction, 4 mM Mg<sup>2+</sup>, and described previously primers MGMT MS-HRM2 (6,10). CpGenome Universal Methylated DNA and CpGenome Universal Unmethylated DNA set (Millipore, Germany) were used for dilution of standard samples (0%, 25%, 50%, 75% and 100% methylated DNA).

### Cell cultures and growth conditions

The human GBM cell lines A172, T98G, U87MG and U251 were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 mM L-glutamin and 1 mM sodium pyruvate (all purchased from Invitrogen, Gibco) in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### Transfection of GBM cells

Cells were transfected with 6 pmol of hsa-miR-31 mimic (assay ID MC12887, Life Technologies) or mirVana miRNA Mimic Negative Control (cat. no. 4464058, Life Technologies) oligonucleotides and equimolar concentration of Lipofectamine 2000 accordingly to the manufacturer's recommendations (Life Technologies).

### MTT assay

Cell viability of transfected cells was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay (MTT, Sigma-Aldrich). GBM cells were seeded in 24-well plate at a density of 2 × 10<sup>4</sup> (A172, T98G, U87MG) and 1 × 10<sup>4</sup> (U251) cells per well 24h prior to transfection with hsa-miR-31 mimic or miRNA mimic negative control oligonucleotides. Subsequently, 96h after transfection, 60 µl of 5 mg/ml MTT solution in phosphate-buffered saline was added to each well, and plates were incubated for 1h at 37°C. The precipitate was solubilized in 100% dimethyl sulfoxide (500 µl per well), and absorbance was measured on ELISA Multi-detection Microplate Reader (BIO-TEK) at 570 nm wavelength. All experiments were run in tetraplicates.

### Statistical analysis

Quantitative miRNA expression data were acquired by use of ABI 7900 HT SDS version 2.0.1 software (Applied Biosystems) (settings: automatic baseline, threshold 0.2) and, subsequently, normalized to the expression level of miR-1233 that showed the highest expression stability across all examined samples by use of GeneNorm and NormFinder algorithms. The relative miRNA expression levels were determined by 2<sup>-ΔCT</sup> method, where ΔCTs were calculated as follows: ΔCT = CT<sub>(miRNA of interest)</sub> - CT<sub>(miR-1233)</sub>. Normalized miRNA expression data were statistically evaluated in the environment of statistical language R (11) using the Bioconductor LIMMA package concerning miRNA profiling combined with hierarchical clustering (12).

To assess the miRNAs that were identified for survival prediction, a Risk Score formula for predicting survival was developed based on a linear combination of the miRNA expression level weighted by the regression coefficient

derived from the univariate Cox regression analysis (13,14). The Risk Score for each patient was calculated as follows: Risk Score = (-0.14745 \* expression level of miR-224) + (0.09530 \* expression level of miR-31) + (0.54293 \* expression level of miR-454) + (0.21673 \* expression level of miR-672) + (0.10605 \* expression level of miR-885-5p) + (-0.05557 \* expression level of miR-432\*). Patients with high Risk Score are expected to have poor survival.

According to the Risk Score (cutoff value, 0.348), patients were stratified into a high-risk group and a low-risk group. The Risk Score threshold was set as a value, which significantly separates KaplanMeier survival curves. Cox proportional hazards regression analyses were performed to assess the independent contribution of the miRNA signature-based Risk Score and clinicopathologic variables to survival prediction (15). Our patient population was evaluated as large enough to allow multivariate survival analysis.

Viability was statistically analyzed using *t*-test and GraphPad Prism software. *P* ≤ 0.05 value was considered to be significant.

## Results

### MicroRNAs differentially expressed in glioblastoma and non-tumor brain tissues

We performed a genome-wide expression profiling of 754 human miRNAs in 58 GBM and 10 non-tumor brain FFPE tissue samples. LIMMA analysis revealed 108 significantly upregulated and 108 downregulated miRNAs in GBMs in comparison with non-tumor brain samples (*P* < 0.05) (see [Supplementary Table S2](#), available at *Carcinogenesis* Online). Among them, 28 miRNAs showed *P* value < 10<sup>-9</sup> and were able to discriminate GBMs and non-tumor brain samples with 100% sensitivity and 100% specificity ([Figure 1](#)). The most significantly upregulated miRNAs in GBM tissue were miR-21\* and miR-155 (both *P* < 10<sup>-17</sup>; fold change = 8.44 and 4.59, respectively). On the other side, miR-220 and miR-1247 were the most significantly downregulated in tumor tissue (both *P* < 10<sup>-21</sup>; fold change = 9.15 and 8.35, respectively).

### MGMT promoter methylation status

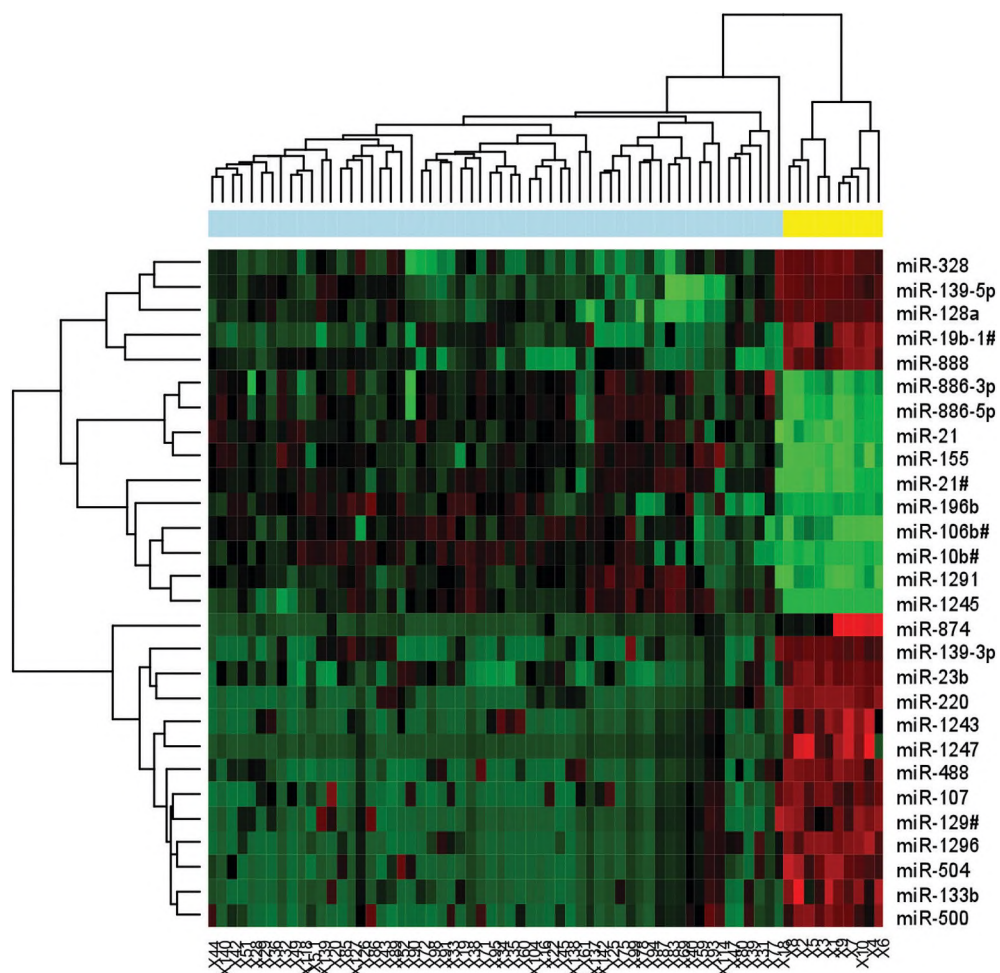
We have examined MGMT promoter methylation status in our cohort of GBM patients and have identified methylated promoter in 22 (38%) cases. Methylated promoter of MGMT was significantly associated with longer progression-free survival (PFS) (*P* = 0.0309, log-rank test; PFS medians of patients with methylated and non-methylated MGMT promoter were 9 and 6.75 months from diagnosis, respectively) ([Figure 3A](#)) and longer OS (*P* = 0.0202, log-rank test; OS medians of patients with methylated and non-methylated MGMT promoter were 18.5 and 12 months from diagnosis, respectively) ([Figure 3B](#)) in GBM patients. However, MGMT promoter methylation status has not reached statistical significance in multivariate Cox regression analysis.

### Identification of miRNA prognostic signature

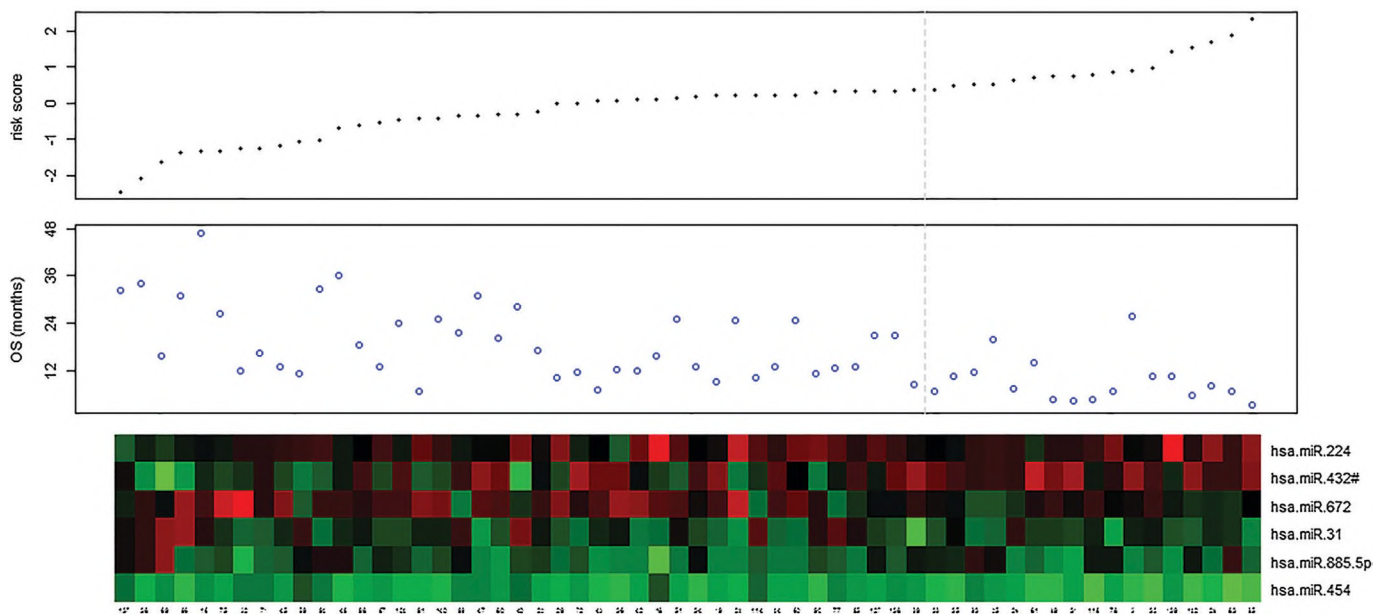
We used univariate Cox regression to analyze each miRNA as predictor of OS in 58 GBM patients and identified 15 miRNAs (*P* < 0.15), from which were subsequently, using bidirectional stepwise regression, selected six miRNAs (miR-31, miR-224, miR-432\*, miR-454, miR-672 and miR-885-5p) ([Supplementary Table S3](#), available at *Carcinogenesis* Online). This six-miRNAs signature was used to calculate the Risk Score for each patient ([Figure 2](#)). Higher Risk Score has been significantly associated with shorter PFS (*P* < 0.0001, log-rank test; median PFS for low-risk and high-risk patients were 9.4 and 4.4 months since diagnosis, respectively) ([Figure 3C](#)) and shorter OS (*P* < 0.0001, log-rank test; median OS of low-risk and high-risk patients were 16.2 and 7.5 months since diagnosis, respectively) ([Figure 3D](#)) in GBM patients.

### Risk Score based on six-miRNAs signature is an independent prognostic factor

We performed univariate Cox regression analysis using clinical and molecular factors for whole set of 58 GBM patients and observed that the Risk Score based on six-miRNA signature and methylation status of MGMT gene promoter were significantly associated with OS and PFS. Moreover, PFS also correlated with adjuvant TMZ in monotherapy ([Table 1](#)). Performance status and extent of resection were significantly associated with neither OS nor PFS. A multivariate Cox regression analyses showed that Risk Score based on six-miRNA



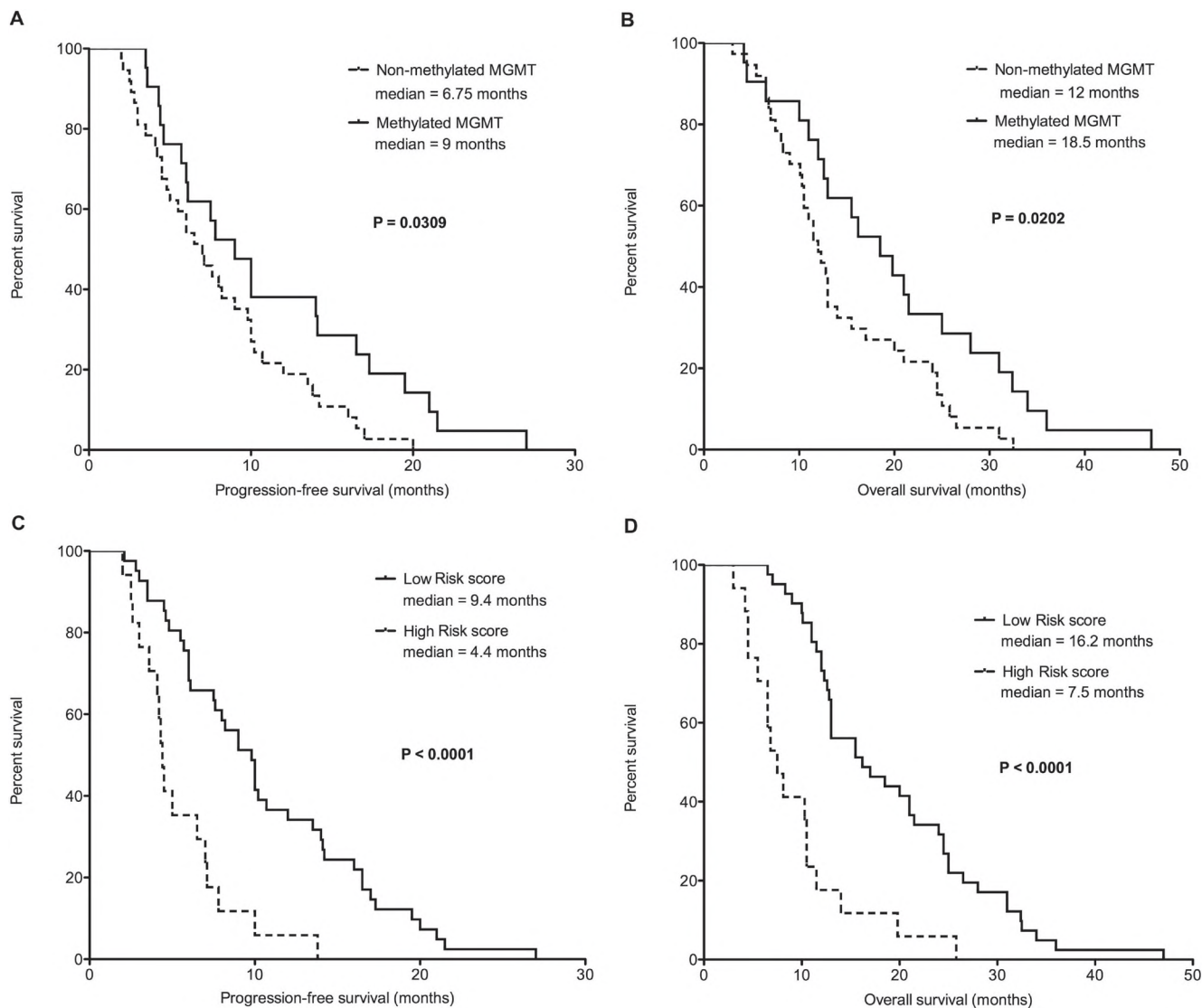
**Fig. 1.** Hierarchical clustergram discriminating GBM and non-tumor brain tissues according to differentially expressed miRNAs (blue color indicate GBM tissues, yellow color indicate non-tumor brain tissues,  $P < 10^{-9}$ ).



**Fig. 2.** Analysis of the 6-miRNA-based Risk Score for overall survival in GBM patients; top—Risk Score distribution, middle—overall survival of GBM patients, bottom—heat map of six-miRNA expression levels in GBM tissues, the black dotted lines on the top and middle represent the Risk Score cutoff value.

signature is independent prognostic factors in relation to both OS [hazard ratio (HR) 2.86; 95% confidence interval (CI) 1.914.29;  $P < 0.001$ ] and PFS (HR 1.98; 95% CI 1.332.94;  $P < 0.001$ ). As 2758

another independent factor associated with PFS was confirmed adjuvant TMZ in monotherapy (HR 0.56; 95% CI 0.320.97;  $P = 0.039$ ) observed also in univariate Cox regression (Table I).



**Fig. 3.** Kaplan–Meier survival curves estimating PFS (A) and OS (B) in patients with GBM accordingly to MGMT methylation status; and PFS (C) and OS (D) in patients with GBM based on six-miRNA (miR-31, miR-224, miR-432\*, miR-454, miR-672 and miR-885-5p) prognostic Risk Score.

**Table I.** Cox hazard regression analysis of common GBM prognostic factors and 6-miRNA-based Risk Score effects on survival of GBM patients

| Factors                          | Univariate Cox regression |                  |                  | Multivariate Cox regression |                  |                  | Long-rank test <i>P</i> |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|
|                                  | HR                        | 95% CI           | <i>P</i> value   | HR                          | 95% CI           | <i>P</i> value   |                         |
| <b>Progression free survival</b> |                           |                  |                  |                             |                  |                  |                         |
| Risk Score                       | <b>2.00</b>               | <b>1.37–2.91</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>1.98</b>                 | <b>1.33–2.94</b> | <b>&lt;0.001</b> | <0.001                  |
| TMZ                              | <b>0.48</b>               | <b>0.28–0.82</b> | <b>0.007</b>     | <b>0.56</b>                 | <b>0.32–0.97</b> | <b>0.039</b>     |                         |
| PS                               | 1.69                      | 0.70–4.04        | 0.242            | 2.17                        | 0.89–5.30        | 0.090            |                         |
| MGMT                             | 0.54                      | 0.23–0.96        | 0.035            |                             |                  |                  |                         |
| <b>Overall survival</b>          |                           |                  |                  |                             |                  |                  |                         |
| Risk Score                       | <b>2.72</b>               | <b>1.84–4.02</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>2.86</b>                 | <b>1.91–4.29</b> | <b>&lt;0.001</b> | <0.001                  |
| Extent of resection              | 1.00                      | 0.49–2.04        | 0.991            |                             |                  |                  |                         |
| TMZ                              | 0.64                      | 0.37–1.08        | 0.096            |                             |                  |                  |                         |
| PS                               | 1.79                      | 0.76–4.22        | 0.186            | 2.31                        | 0.96–5.57        | 0.061            |                         |
| MGMT                             | 0.51                      | 0.29–0.91        | 0.022            |                             |                  |                  |                         |

Bolded values are factors significant in multivariate cox regression analysis. CI, confidence interval; HR, hazard ratio; MGMT, methylation status of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter; PS, performance status; TMZ, adjuvant temozolomide in monotherapy.

*Validation of the six-miRNA prognostic signature by use of The Cancer Genome Atlas data*

We used TCGA dataset of 485 GBM patients for whom OS information and miRNA expression profiles were available for validation of our

prognostic six-miRNAs signature. Unfortunately, only four miRNAs (miR-31, miR-224, miR-432\* and miR-454-3p) from signature were represented in the TCGA dataset. First, we performed Z-score transformation on expression levels across the all GBM samples for each of

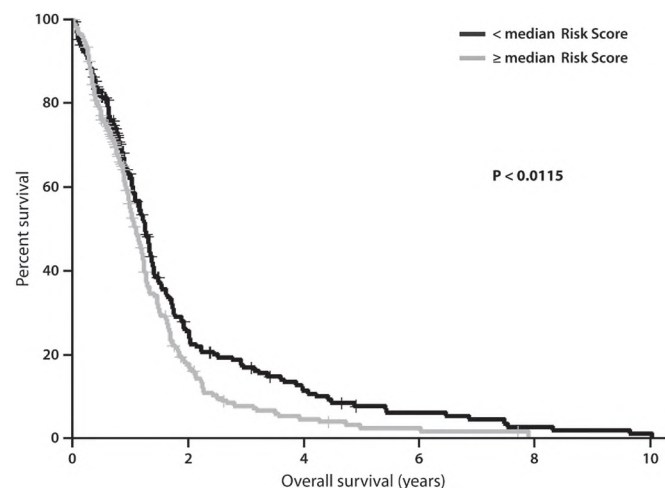
the aforementioned four miRNAs; then, the four-miRNAs signature was used for calculation of the individual Risk Score for each patient. By using the median value of the Risk Scores as the threshold, we divided GBM patients into high-risk and low-risk groups. Kaplan–Meier analysis confirmed that OS of the high-risk patients was significantly lower in comparison with low-risk patients ( $P < 0.0115$ , log-rank test) (Figure 4).

#### Ectopic expression of miR-31 decreases proliferation of GBM cells in vitro

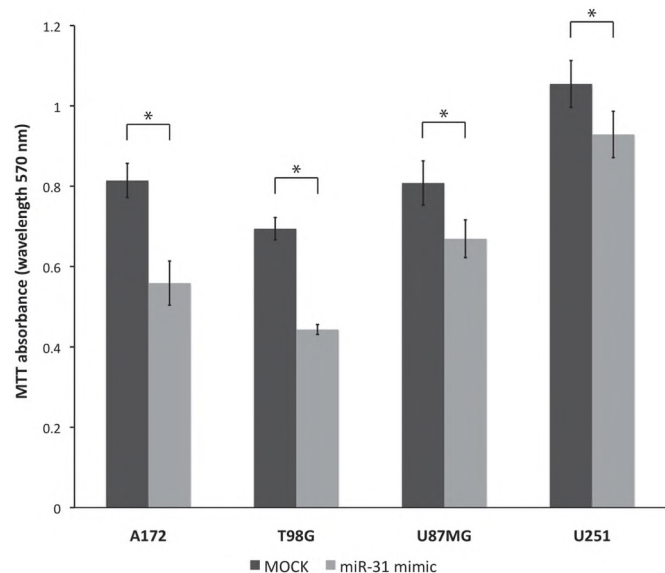
We performed *in vitro* transient transfection of miR-31 mimic in A172, T98G, U87MG and U251 cell lines to investigate effect of miR-31 levels on GBM cells proliferation. MTT assay showed that miR-31 mimic transfection leads to the significant decrease of proliferation in all examined GBM cell lines when compared with control oligonucleotide ( $P < 0.05$ , *t*-test) (Figure 5).

## Discussion

Comparison of miRNA expression profiles in GBMs and non-tumor brain tissues revealed a signature of 28 most significantly deregulated



**Fig. 4.** KaplanMeier survival curves estimating OS in GBM patients from TCGA dataset accordingly to four-miRNA (miR-31, miR-224, miR-432\* and miR-454-3p)-based Risk Score.



**Fig. 5.** MiR-31 replacement reduces proliferation of GBM cells A172, T98G, U87MG and U251. \* indicates  $P < 0.05$ ; 'dark' grey indicates mimic negative control (MOCK) transfected cells; 'pale' indicates miR-31 mimic transfected cells.

miRNAs, which were able to precisely discriminate both of the investigated tissue categories accordingly to their origin. Nine miRNAs (miR-10b\*, miR-21, 128a, miR-133b, miR-139-3p, miR-139-5p, miR-155, 196b and miR-328) were described previously to be deregulated in GBM (16–19). In this regard, the most frequently studied miRNA in cancer research and well-known oncogenic miRNA in GBM is miR-21. This miRNA was many times observed to be upregulated in GBM in comparison with non-tumor brain tissue and its expression level is positively correlated with increased grading of glioma tumors (16–19). These facts undoubtedly highlight miR-21 to be promising GBM biomarker. miR-21\* (also called miR-21-3p) that shares the same stem-loop precursor as miR-21 was another significantly upregulated miRNAs in GBM. Although miR-21\* is not as famous as its precursor counterpart, there are studies indicating that this molecule play a role in breast cancer, head and neck squamous cell carcinoma, and multiple myeloma (20–22). Moreover, recent data suggest that miR-21\*, similarly to miR-21, positively regulate p-AKT level; and activation of AKT results in cell growth and survival of GBM cells (20,23,24). From one stem-loop precursor originate also miR-139-3p and miR-139-5p, which were both significantly downregulated in GBM tissue in our study. These findings were several times confirmed previously in both GBM and some other cancers. In addition, miR-139-5p expression negatively correlates with survival of high-grade glioma patients. However, their functional participation on tumor cell biology remains unknown (25–27).

We have confirmed recently described reduction in expression levels of miR-128a, miR-133b and miR-328 in GBM tissue. From these, miR-128a has been the most frequently observed miRNA to be downregulated in GBM (6,17,18), where it is involved in negative regulation of mesenchymal signaling pathway and, thus, could be an useful biomarker of novel clinically relevant molecular taxonomy of GBM (1,28). In agreement with our results, several authors described downregulation of miR-328 in GBM and, moreover, there are studies showing negative correlation between miR-328 expression and malignant progression of gliomas and positive relationship with prognosis (17,29). This is probably due to the ability of miR-328 to participate on regulation of Wnt signaling pathway and/or ABCG2 expression (30,31). In concordance with our work, Silber *et al.* described downregulation of miR-133b in GBM suggesting its tumor suppressive functioning (17). Decreased expression levels of miR-133b in other cancers and its tumor suppressive role mainly through targeting CXCR4 and EGFR signaling were recently published (32–34), which both were several times described also in relation to GBM molecular pathology.

Excepting miR-21, we observed higher expression levels of miR-10b\*, miR-155 and miR-196b in GBM tissue in accordance with the earlier published works (6,16,17). Oncogenic functioning of miR-155 in GBM is well described. In addition to generally observed increased levels in tumor tissue, its expression inversely correlated with both OS and PFS in GBM patients (35–37). miR-155 regulates glioma cell proliferation, apoptosis, migration, invasiveness as well as chemoresistance to taxol through targeting MX11 (antagonist of c-Myc), FOXO3 and/or GABA receptors (36–39). Much less is known about the two other upregulated miRNAs: miR-196b and miR-10\*. High expression of miR-196b GBM tissue was recently observed, and upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in GBM patients (40,41). miR-10\* (miR-10b-3p), unlike its stem-loop precursor counterpart miR-10b-5p, is not well known and was not described in GBM yet and there are only a few references available in other cancers till now. This miRNA has been upregulated in saliva samples of esophageal carcinoma patients and in older melanoma patients (42,43). On the other hand, this miRNA has been downregulated in breast carcinoma and endometrial serous adenocarcinoma (44,45). If we consider miR-10b\* to have similar functional properties as miR-10b, which functioning in cancer cell is well described, its role in GBM would be more probably oncogenic (46,47).

In the second part of our study, logistic regression revealed six-miRNAs signature (miR-31, miR-224, miR-432\*, miR-454, miR-672 and miR-885-5p) that is associated with clinical outcome of GBM patients treated with chemoradiotherapy. Interestingly, all miRNAs, except miR-454, were significantly deregulated in tumor tissue

in our GBM patient cohort (Supplementary Table S2, available at *Carcinogenesis* Online). Three miRNAs (miR-31, miR-224 and miR-885-5p) were studied earlier in relation to gliomas (Supplementary Table S3, available at *Carcinogenesis* Online). In accordance with our findings, miR-224 was described to be significantly upregulated in glioma tissues and associated with survival of GBM patients (48). On the contrary, miR-31 and miR-885-5p showed lower expression levels in glioma cells, which also in agreement with our findings (47–50). Because of its significant downregulation in GBM tissues as well as its tumor suppressive character in relation to the GBM patient's survival, miR-31 was chosen for the following *in vitro* functional analyses. In accordance with the earlier observation, ectopic expression level of miR-31 led to the significant decrease of cell proliferation in all examined GBM cell lines indicating its tumor suppressive function in GBM. Moreover, in recent studies was observed that both miR-31 and miR-885-5p reduced migration and/or invasiveness of glioma cell lines suggesting their role in progression of gliomas and their prognosis (47–50). To our knowledge, miR-432\*, miR-454 and miR-672 have not been observed till now as associated with any type of cancer.

Risk Score calculated on the basis of this six-miRNAs signature has been significantly associated with PFS and OS in KaplanMeier analyses. Our data showed that patients with higher Risk Score have statistically worse prognosis than patients with Risk Score under cut-off value. Our study confirmed well-described prognostic potential of methylation status of MGMT promoter in GBM patients, who underwent adjuvant concomitant RT/TMZ therapy. Ability of MGMT methylation status to predict clinical outcome of GBM patients was considerably lower in comparison with our six-miRNA-based Risk Score. Furthermore, univariate Cox regression analysis revealed that Risk Score and methylation status of MGMT gene promoter significantly correlate with OS and following multivariate Cox regression analysis confirmed Risk Score to be the independent prognostic factor. Similar results were reached also in relation to the PFS. Interestingly, common prognostic factors in GBM like performance status or extent of resection have not been associated with PFS and OS. This is probably due to the fact, that our cohort of GBM patients is highly homogenous and total/subtotal resection and performance status 1 or 2 comprised 86 and 90 percentages of cases, respectively.

Finally, we performed independent validation analysis of our results by use of TCGA dataset for OS prediction. Despite the fact that only four miRNAs (miR-31, miR-224, miR-432\* and miR-454-3p) from six-miRNA prognostic signature were available in TCGA datasets for calculation of Risk Score, GBM patients having Risk Score below the median survived significantly longer time in KaplanMeier analysis. This confirmed our findings from explorative part of this study where higher Risk Score was associated with poor prognosis of GBM patients.

Overall, Risk Score based on six-miRNA signature showed significant superiority in prediction of clinical outcome of GBM patients when compared with MGMT methylation status as reference method. Multivariate Cox analysis indicated that the Risk Score based on six-miRNA signature is an independent prognostic classifier of GBM patients. Therefore, we suggest that the Risk Score presents promising prognostic algorithm with potential for individualized treatment decisions in clinical management of GBM patients.

### Supplementary material

Supplementary Tables S1–S3 can be found at <http://carcin.oxford-journals.org/>.

### Funding

NT11214-4/2010, NT13514-4/2012 and NT13581-4/2012 of the Czech Ministry of Health; the project CEITEC–Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068); the project MZ CR–RVO (MOU, 00209805).

Conflict of Interest Statement: None declared.

### References

- Verhaak,R.G. *et al.* (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, **17**, 98–110.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, **455**, 1061–1068.
- Phillips,H.S. *et al.* (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, **9**, 157–173.
- Chamberlain,M.C. (2011) Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin. Med. Insights. Oncol.*, **5**, 117–129.
- Thomas,A.A. *et al.* (2014) Current role of anti-angiogenic strategies for glioblastoma. *Curr Treat Options Oncol.*
- Lakomy,R. *et al.* (2011) MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.*, **102**, 2186–2190.
- Sana,J. *et al.* (2011) MicroRNAs and glioblastoma: roles in core signaling pathways and potential clinical implications. *J. Cell. Mol. Med.*, **15**, 1636–1644.
- Hall,J.S. *et al.* (2012) Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *Br. J. Cancer*, **107**, 684–694.
- Hedegaard,J. *et al.* (2014) Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One*, **9**, e98187.
- Wojdacz,T.K. *et al.* (2007) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e41.
- Team,R.C. (2013) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (30 October 2014, date last accessed).
- Smyth,G. (2005) Limma: linear models for microarray data. In Gentleman,R.,Carey,V., Dudoit,S., Irizarry,R. and Hubert,W. (eds) *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Springer, New York, pp. 397–420.
- Therneau,T. *et al.* (2000) *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York.
- Therneau,T. (2014) *A Package for Survival Analysis in S. R Package Version 2.37-6*. <http://CRAN.R-project.org/package=survival> (30 October 2014, date last accessed).
- Lauss,M. (2010) *rocc: ROC Based Classification. R Package Version 1.2*. <http://CRAN.R-project.org/package=rocc> (30 October 2014, date last accessed).
- Rao,S.A. *et al.* (2010) Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod. Pathol.*, **23**, 1404–1417.
- Silber,J. *et al.* (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.*, **6**, 14.
- Slaby,O. *et al.* (2010) MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma*, **57**, 264–269.
- Wang,L. *et al.* (2012) MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1. *FEBS Lett.*, **586**, 1312–1317.
- Aure,M.R. *et al.* (2013) Individual and combined effects of DNA methylation and copy number alterations on miRNA expression in breast tumors. *Genome Biol.*, **14**, R126.
- Ganci,F. *et al.* (2013) Expression of TP53 mutation-associated microRNAs predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Ann. Oncol.*, **24**, 3082–3088.
- Cirstea,D. *et al.* (2013) Small-molecule multi-targeted kinase inhibitor RGB-286638 triggers P53-dependent and independent anti-multiple myeloma activity through inhibition of transcriptional CDKs. *Leukemia*, **27**, 2366–2375.
- Besse,A. *et al.* (2013) MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas. *Tumour Biol.*, **34**, 1969–1978.
- Gallia,G.L. *et al.* (2009) Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 386–393.
- Skalsky,R.L. *et al.* (2011) Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One*, **6**, e24248.
- Liu,R. *et al.* (2013) Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*, **8**, e77068.

27. Jia, A.Y. *et al.* (2013) A common microRNA signature consisting of miR-133a, miR-139-3p, and miR-142-3p clusters bladder carcinoma in situ with normal umbrella cells. *Am. J. Pathol.*, **182**, 1171–1179.
28. Ma, X. *et al.* (2012) Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, **14**, 1153–1162.
29. Wu, Z. *et al.* (2012) MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma. *PLoS One*, **7**, e47270.
30. Li, W.Q. *et al.* (2010) Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. *Med. Sci. Monit.*, **16**, HY27–HY30.
31. Delic, S. *et al.* (2014) MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation. *Neuro. Oncol.*, **16**, 179–190.
32. Duan, F.T. *et al.* (2013) miR-133b, a muscle-specific microRNA, is a novel prognostic marker that participates in the progression of human colorectal cancer via regulation of CXCR4 expression. *Mol. Cancer*, **12**, 164.
33. Wen, D. *et al.* (2013) miR-133b acts as a tumor suppressor and negatively regulates FGFR1 in gastric cancer. *Tumour Biol.*, **34**, 793–803.
34. Sciacaluga, M. *et al.* (2013) Functional cross talk between CXCR4 and PDGFR on glioblastoma cells is essential for migration. *PLoS One*, **8**, e73426.
35. Qiu, S. *et al.* (2013) Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J. Transl. Med.*, **11**, 10.
36. Zhou, J. *et al.* (2013) MicroRNA-155 promotes glioma cell proliferation via the regulation of MXI1. *PLoS One*, **8**, e83055.
37. Ling, N. *et al.* (2013) microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma. *Oncol. Rep.*, **30**, 2111–2118.
38. D'Urso, P.I. *et al.* (2012) miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *Int. J. Oncol.*, **41**, 228–234.
39. Meng, W. *et al.* (2012) Anti-miR-155 oligonucleotide enhances chemosensitivity of U251 cell to taxol by inducing apoptosis. *Cell Biol. Int.*, **36**, 653–659.
40. Guan, Y. *et al.* (2010) MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 4289–4297.
41. Ma, R. *et al.* (2012) Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PLoS One*, **7**, e38096.
42. Xie, Z. *et al.* (2013) Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PLoS One*, **8**, e57502.
43. Jukic, D.M. *et al.* (2010) MicroRNA profiling analysis of differences between the melanoma of young adults and older adults. *J. Transl. Med.*, **8**, 27.
44. Biagioni, F. *et al.* (2012) miR-10b\*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. *EMBO Mol. Med.*, **4**, 1214–1229.
45. Hiroki, E. *et al.* (2010) Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci.*, **101**, 241–249.
46. Gabriely, G. *et al.* (2011) Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res.*, **71**, 3563–3572.
47. Visani, M. *et al.* (2014) Expression of 19 microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I–III. *Mol. Oncol.*, **8**, 417–430.
48. Lu, S. *et al.* (2013) Upregulation of microRNA-224 confers a poor prognosis in glioma patients. *Clin. Transl. Oncol.*, **15**, 569–574.
49. Hua, D. *et al.* (2012) Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. *Oncol. Rep.*, **27**, 700–706.
50. Yan, W. *et al.* (2011) Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res.*, **1411**, 108–115.

Received May 9, 2014; revised September 18, 2014; accepted October 8, 2014



# Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsektivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009

## Multimodal Treatment of Glioblastoma Multiforme: Results of 86 Consecutive Patients Diagnosed in Period 2003–2009

Lakomý R.<sup>1,2</sup>, Fadrus P.<sup>2,3</sup>, Šlampa P.<sup>1,2</sup>, Svoboda T.<sup>2,3</sup>, Křen L.<sup>2,3</sup>, Lžičarová E.<sup>1,2</sup>, Belanová R.<sup>1,2</sup>, Šiková I.<sup>1,2</sup>, Poprach A.<sup>1,2</sup>, Schneiderová M.<sup>1,2</sup>, Procházková M.<sup>1,2</sup>, Šána J.<sup>1,2</sup>, Slabý O.<sup>1,2</sup>, Smrčka M.<sup>2,3</sup>, Vyzula R.<sup>1,2</sup>, Svoboda M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno

<sup>3</sup> Fakultní nemocnice, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Glioblastoma multiforme patří k nejčastějším primárním nádorům mozku u dospělých. Standardní léčba spočívá v maximální resekci nádoru, adjuvantní konkomitantní chemoradioterapii a následné chemoterapii s temozolomidem. Tento postup zlepšuje medián celkového přežití ve srovnání se samotnou radioterapií. **Soubor pacientů a metody:** Retrospektivně jsme vyhodnotili konsektivní soubor pacientů s histologicky potvrzeným glioblastomem, kteří v období od ledna 2003 do prosince 2009 podstoupili po primárním chirurgickém zákroku konkomitantní radioterapii (1,8–2,0 Gy/den, plánováno celkem 60 Gy) s chemoterapií (temozolomid 75 mg/m<sup>2</sup>/den) s následným záměrem podání 6 cyklů adjuvantní chemoterapie (temozolomid 150–200 mg/m<sup>2</sup> D1–5, interval 28 dní). Primárním cílem bylo zhodnotit vliv klinických faktorů a použité léčby na základní parametry přežití, jako je čas bez progresu onemocnění (PFS) a celkové přežití (OS). Dále jsme se zaměřili na toxicitu léčby a vyhodnocení její bezpečnosti. **Výsledky:** Do souboru bylo zařazeno celkem 86 pacientů. Medián věku byl 56 let (rozmezí 24–69), převažovali muži (60%). Většina pacientů byla v době zahájení chemoradioterapie v dobrém fyzickém stavu, u více než 80% byl performance status (PS) 0–1. U 20% pacientů byla iniciálně provedena makroskopicky totální resekce nádoru, v 65% subtotální resekce, v 9% parciální resekce a v 6% se jednalo pouze o biopsii. Medián PFS byl 7,0 měsíců (2,0–35,5), medián OS byl 13,0 měsíců (2,5–70,0). Pooperační PS, rozsah resekce a absolvování plánované konkomitantní léčby bez nutnosti její redukce měly statisticky signifikantní vliv na PFS i OS. Medián PFS a OS byl u pacientů s PS 0, 1 a 2 22,0, 7,0 a 6,0 měsíců v případě PFS ( $p = 0,0018$ ) a 32,0, 13,0 a 9,0 měsíců v případě OS ( $p = 0,0023$ ). Pacienti, u kterých bylo dosaženo totálního odstranění tumoru, měli delší PFS (14,0 vs 6,0 měsíců, HR = 0,5688,  $p = 0,0301$ ) i OS (23,0 vs 12,0 měsíců, HR 0,4977,  $p = 0,0093$ ), stejně jako pacienti, kteří absolvovali konkomitantní chemoradioterapii bez výraznější redukce. Pokud celková dávka radioterapie přesáhla 54 Gy, byl PFS 8,0 vs 3,0 měsíce (HR = 0,3313,  $p = 0,0001$ ) a OS 15,0 vs 5,0 měsíce (HR = 0,1730,  $p < 0,0001$ ). Podobně pokud počet dnů chemoterapie přesáhl 40, byl PFS 8,0 vs 5,0 měsíců (HR = 0,5300,  $p = 0,0023$ ) a OS 17,0 vs 9,5 měsíců (HR = 0,5943,  $p = 0,0175$ ). Věk, pohlaví a lokalizace nádoru nedosáhly statistické významnosti. U hematologické toxicity hodnocené 3. nebo 4. stupněm závažnosti (grade 3 nebo 4) byla relativně často zaznamenána trombocytopenie (9%), leukopenie (6%), neutropenie (6%) a selektivní lymfopenie (25%). U nehematologické toxicity jednoznačně dominovaly tromboembolické příhody (12%). Toxicita byla častější především u pacientů s horším PS (PS 2). V léčbě recidivy nebo progresu onemocnění přinášel pacientovi benefit zejména neurochirurgický výkon (OS 24,0 vs 12,5 měsíce, HR = 0,5325,  $p = 0,0111$ ). **Závěr:** Performance status, rozsah resekce, úspěšné podání většiny plánované dávky konkomitantní chemoradioterapie a možnost chirurgického řešení případné recidivy/progresu onemocnění významně ovlivnily prognózu našich pacientů s glioblastomem. Dle našich zkušeností má být hlavním faktorem pro rozhodování o typu použité léčby především celkový stav nemocného. Léčba maligních gliomů vyžaduje multidisciplinární přístup.

### Klíčová slova

glioblastoma multiforme – chemoterapie – radioterapie – přežití – toxicita

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví ČR: FUNDIN MZ0MOU2005.

This study was supported by the following research programme of the Ministry of Health of the Czech Republic: FUNDIN MZ0MOU2005.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: msvoboda@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 25. 2. 2011

Přijato/Accepted: 21. 3. 2011

## Summary

**Backgrounds:** Glioblastoma multiforme is the most common malignant primary tumor of the brain in adults. Standard therapy consists in maximal surgical resection and adjuvant concurrent chemoradiotherapy and adjuvant therapy with temozolomid. This approach improves survival in comparison with postsurgical radiotherapy alone. **Patients and Methods:** Consecutive patients with histologically confirmed glioblastoma multiforme in the period from January 2003 to December 2009 underwent postoperative radiotherapy (1.8–2.0 Gy/d, total of 60 Gy) plus concurrent daily chemotherapy (temozolomide 75 mg/m<sup>2</sup>/d), followed by 6 cycles of temozolomide (150 to 200 mg/m<sup>2</sup> for 5 days, every 28 days) and were analyzed retrospectively. The primary end point was to describe the correlation between known clinical factors, treatment and progression free survival (PFS) and overall survival (OS). We assessed the toxicity and safety of the chemoradiotherapy. **Results:** Eighty-six patients (median age, 56 years; 60% male) were included. Most of them (> 80%) were of performance status (PS) 0-1 at the beginning of chemoradiotherapy. Total macroscopic resection was performed in 20% of the patients, subtotal in 65%, partial in 9%, and just biopsy in 6%. Median PFS was 7.0 months (2.0–35.5), median OS was 13.0 months (2.5–70). Postoperative performance status (PS), the extent of resection, and administration of planned treatment without reduction had statistically significant influences on PFS and OS. Median PFS and OS were 22.0, 7.0 and 6.0 months for PFS ( $p = 0.0018$ ) in patients with PS 0, 1 and 2 respectively and 32.0, 13.0 and 9.0 months for OS ( $p = 0.0023$ ). Patients with total removal of tumor had longer PFS (14.0 vs 6.0 months, HR = 0.5688;  $p = 0.0301$ ) and OS (23.0 vs 12.0 months, HR 0.4977;  $p = 0.0093$ ), as did patients without dose reduction of radiotherapy and/or chemotherapy. Patients with radiotherapy dose of over 54 Gy had PFS 8.0 vs 3.0 months (HR = 0.3313;  $p = 0.0001$ ) and OS 15.0 vs 5.0 months (HR = 0.1730;  $p < 0.0001$ ). Similarly, treatment with concurrent chemotherapy for more than 40 days was also important: PFS 8.0 vs 5.0 months (HR = 0.5300;  $p = 0.0023$ ) and OS 17.0 vs 9.5 months (HR = 0.5943;  $p = 0.0175$ ). Age, gender and position of tumor had no significant influence. Treatment-related hematology toxicity grades 3 and 4 occurred relatively often: thrombocytopenia (9%), leukopenia (6%), neutropenia (6%) and lymphopenia (25%). Thrombo-embolic events were dominant in non-hematology toxicity. Serious toxicity occurred mainly in the subgroup of patients with PS 2. Treatment of progression was useful in selected patients. Second surgery was of the most benefit (OS 24.0 vs 12.5 months, HR = 0.5325;  $p = 0.0111$ ). **Conclusion:** Postoperative performance status, extent of resection, successful administration of the majority of planned concurrent chemoradiotherapy and possibility of surgical treatment at the time of recurrence correlate with better prognosis for our patients with glioblastoma. Our experience indicates that performance status should be the main factor in decisions about treatment intensity. Treatment of malignant glioma requires a multidisciplinary team.

## Key words

glioblastoma multiforme – chemotherapy – radiotherapy – survival – toxicity

## Východiska

Glioblastoma multiforme patří k nejčastějším primárním nádorům mozku u dospělých. Incidence se pohybuje mezi 3 a 4 případy na 100 000 obyvatel za rok. Postihuje převážně dospělé mezi 45 a 75 lety, více než 80 % pacientů je v době diagnózy starší 50 let. Radikální operačního výkonu je důležitým prognostickým faktorem [1,2]. Maximální resekční výkon a pooperační radioterapie byla po léta léčebným standardem. Indikace pooperační chemoterapie nejčastěji s deriváty nitrosourey byla sporná, její vliv na prodloužení přežití nebyl významný, léčba byla navíc zatížena vyšší toxicitou [3–6].

V roce 2005 byly publikovány výsledky Stuppovy studie fáze III, kde byla jasně potvrzena účinnost chemoterapie (temozolomid) v konkomitantním podání s frakcionovanou radioterapií a s její následnou adjuvantní aplikací [7]. Pooperační chemoradioterapie s temozolomidem v této studii prodloužila medián celkového přežití z 12,1 měsíce na 14,6 měsíce a dle poslední aktualizace dat sledovaných pacientů zvyšuje i prav-

děpodobnost pětiletého přežití, a to bez ohledu na věk či rozsah výkonu [7,8]. Dle retrospektivního hodnocení této průlomové studie mají největší benefit z léčby pacienti po makroskopicky totální resekci, mladší 50 let, s performance statusem (PS) 0–1 a přítomností metylace promotoru genu reparačního enzymu O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-methyltransferázy (MGMT) [9].

Léčba primárních nádorů mozku má v Masarykově onkologickém ústavu (MOU) dlouholetou tradici. Důležitým faktorem je úzká spolupráce s Neurochirurgickou klinikou Fakultní nemocnice Brno (FN Brno) a dalšími pracovišti. Za zásadní považujeme komisionální řešení každého pacienta.

V následující retrospektivní analýze bude vyhodnocen soubor pacientů s glioblastomou, kteří byli diagnostikováni a léčeni naším multioborovým týmem v letech 2003–2009.

## Soubor pacientů a metody

Do retrospektivního hodnocení byli zařazeni všichni pacienti starší 18 let s histologicky potvrzeným glioblastomem, kteří v období od ledna 2003 do pro-

since 2009 zahájili po chirurgickém zákroku konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem s následným záměrem podání 6 cyklů adjuvantní chemoterapie. Více než 95 % pacientů bylo primárně operováno na Neurochirurgické klinice FN Brno, následná léčba probíhala v Masarykově onkologickém ústavu. Resekce primárního nádoru byla považována za makroskopicky totální (bez přítomnosti evidentního rezidua), pokud bylo dosaženo shody neurochirurga i pooperační zobrazovací metody. V ostatních případech byla resekce vyhodnocena buď jako subtotalní (reziduum do 20 %), nebo parciální (reziduum nad 20 %).

## Schéma konkomitantní chemoradioterapie a adjuvantní chemoterapie

Temozolomid byl podáván v dávce 75 mg/m<sup>2</sup>, den 1.–42., p.o., po celou dobu radioterapie, včetně víkendů.

Konformní radioterapie byla prováděna standardní frakcionací (5 × 1,8–2,0 Gy / týden, celková dávka 60 Gy za 6 týdnů). Nejčastěji byla použita technika dvou la-

terolaterálních nebo konvergentních polí brzdného záření lineárního urychlovače o energii 6 MV a 18 MV. Plánovací cílový objem (PTV 1) zahrnoval lůžko nádoru a reziduum (GTV) s bezpečnostním lemlem 2–3 cm. Po 4 týdnech léčby (aplikovaná dávka  $20 \times 1,8$ –2,0 Gy) byl bezpečnostní lem zmenšen na 1–2 cm (PTV 2) a bylo pokračováno v radioterapii ( $10 \times 1,8$ –2,0 Gy) do celkové dávky 60 Gy. Adjuvantní léčba temozolomidem v monoterapii byla indikována po ukončení konkomitantní chemoradioterapie (ve 4. týdnu po ukončení ozařování) v dávce 150–200 mg/m<sup>2</sup>, p.o., den 1.–5., interval 28 dní, celkem 6 cyklů nebo do progresu onemocnění. Toto léčebné schéma bylo totožné s postupem, který ve své studii uplatnili Stupp et al [7].

#### Schéma sledování pacientů

##### v průběhu léčby a po jejím ukončení

K hodnocení velikosti pooperačního rezidua bylo prováděno časné CT nebo MRI vyšetření (do 72 hod po výkonu). Další CT nebo MRI vyšetření k hodnocení efektu proběhlé konkomitantní chemoradioterapie bylo standardně indikováno za 4 týdny po jejím ukončení. V průběhu adjuvantní chemoterapie s temozolomidem a/nebo následného sledování bylo CT nebo MRI prováděno každé 3 měsíce, pokud aktuální stav pacienta nevyžadoval kontrolu dříve. Ze zobrazovacích metod bylo vždy jednoznačně preferováno MRI vyšetření, CT bylo použito v případech, kdy nebylo MRI dostupné nebo nebylo z medicínských důvodů možné. Odborné neurologické vyšetření atestovaným neurologem bylo standardně prováděno před zahájením konkomitantní chemoradioterapie, dále za 4 týdny po jejím ukončení a poté každé 3 měsíce. V případě klinických potíží byl neurolog konzultován kdykoliv mimo původní plán.

V případě progresu onemocnění (progrese tumoru o 25 % a více, nové satelitní léze, klinické zhoršení s nutností navýšení kortikosteroidů) byl další postup posouzen multidisciplinární komisí pro mozkové nádory. Zde byly zváženy alternativy následné léčby: operace, reiradiace (včetně stereotaktické radioterapie a radiochirurgie), paliativní chemoterapie, symptomatická léčba.

Tab. 1. Charakteristika souboru a orientační srovnání se Stuppovým souborem.

| Sledované parametry   |                                      | CHT/RT<br>n = 86                           | CHT/RT(Stupp)<br>n = 287 |
|---|--------------------------------------|--|--------------------------|
| věk (roky)<br>n (%)   | < 50                                 | 27 (31 %)                                  | 90 (31 %)                |
|   | > 50                                 | 59 (69 %)                                  | 197 (69 %)               |
|   | 50–60                                | 37 (43 %)                                  |                          |
|   | > 60                                 | 22 (26 %)                                  |                          |
| věk – medián (roky)   |                                      | 56 (24–69)<br>m 56 (28–68)<br>ž 51 (24–69) | 56                       |
| pohlaví<br>n (%)  | muži                                 | 51 (60 %)                                  | 185 (64 %)               |
|   | ženy                                 | 35 (40 %)                                  | 102 (36 %)               |
| performance status (PS)<br>dle WHO a Karnofsky<br>index (KI)<br>n (%) | PS 0<br>(KI 100 %)                   | 11 (13 %)                                  | 113 (39 %)               |
|   | PS 1<br>(KI 90 %)<br>(KI 80 %)       | 64 (74 %)<br>27 (31 %)<br>37 (43 %)        | 136 (47 %)               |
|   | PS 2<br>(KI 70 %)<br>(KI 60 %)       | 11 (13 %)<br>11 (13 %)<br>0                | 38 (13 %)                |
|   | rozsah resekčního<br>výkonu<br>n (%) | totální resekce                            | 17 (20 %)                |
|   | subtotální a parciální<br>resekce    | 56 (65 %)<br>8 (9 %)                       | 126 (44 %)               |
|   | biopsie                              | 5 (6 %)                                    | 48 (17 %)                |
| adjuvantní CHT n (%)  |                                      | 34/86 (40 %)                               | 223/287 (78 %)           |
| medián cyklů<br>adjuvantní CHT  |                                      | 4 (1–7)                                    | 3 (0–7)                  |
| ukončeno 6 cyklů CHT  |                                      | 32 % (11/34)                               | 47 %                     |

CHT/RT – chemoradioterapie, CHT – chemoterapie, n – počet

Primárním cílem studie bylo zhodnotit vliv klinických faktorů (rozsah resekce, celkový stav pacienta, věk, pohlaví, lokalizace nádoru) a použité primární a následné léčby na základní parametry přežití, jako je čas bez progresu onemocnění (PFS), celkové přežití (OS) a čas přežití od zjištění recidivy/progrese (EFS). Parametr PFS je definován jako doba od operace do recidivy/progrese nádoru nebo úmrtí. Parametr OS je definován jako doba od operace do úmrtí pacienta. Parametr EFS je definován jako doba od recidivy/progrese do úmrtí.

Druhotným cílem bylo vyhodnocení bezpečnosti/toxicity léčby. Toxicita léčby byla stanovena na základě klasifikace dle National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 3.0.

K základní charakteristice dat byly použity běžné statistické funkce (např. medián, procentuální vyjádření výsledku).

V analýzách přežití byl při porovnání přežívání jednotlivých skupin pacientů využit Gehanův-Wilcoxonův test, případně Ln-pořadový test. Křivky přežití byly sestaveny klasickou Kaplan-Meierovou metodou. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty  $p \leq 0,05$ . Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu MedCalc, verze 9.3.9.0. Práce byla zpracována programovými produkty společnosti Microsoft (Microsoft Word, Microsoft Excel).

Charakteristiku souboru pacientů a jeho srovnání se souborem Stuppovy studie uvádí tab. 1.

## Výsledky

### Výsledky léčby

V době od ledna 2003 do prosince 2009 bylo ke konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem a následné adjuvantní léčbě indikováno

**Tab. 2. Celkové přežití (OS) a čas bez progresu (PFS), orientační srovnání se Stuppovým souborem.**

|  | CHT/RT (MOU)<br>n = 86 | CHT/RT (Stupp)<br>n = 287 |
|--|------------------------|---------------------------|
| <b>medián OS (měsíce)</b>              | <b>13,0</b>            | <b>14,6</b>               |
| <b>overall survival v (%)</b>          |                        |                           |
| 6 měsíců                               | 84,0                   | 86,3                      |
| 12 měsíců                              | 57,0                   | 61,1                      |
| 18 měsíců                              | 39,0                   | 39,4                      |
| 24 měsíců                              | 26,0                   | 27,2                      |
| 3 letech                               | 7,0                    | 16,0                      |
| 4 letech                               | 3,0                    | 12,1                      |
| 5 letech                               | 3,0                    | 9,8                       |
| <b>medián PFS (měsíce)</b>             | <b>7,0</b>             | <b>6,9</b>                |
| <b>progression-free survival v (%)</b> |                        |                           |
| 6 měsíců                               | 62,0                   | 53,9                      |
| 12 měsíců                              | 29,0                   | 26,9                      |
| 18 měsíců                              | 15,0                   | 18,4                      |
| 24 měsíců                              | 8,0                    | 10,7                      |

CHT/RT – chemoradioterapie, n – počet

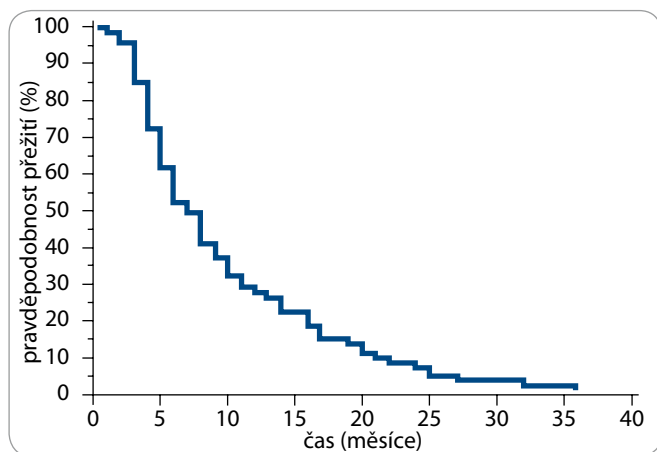
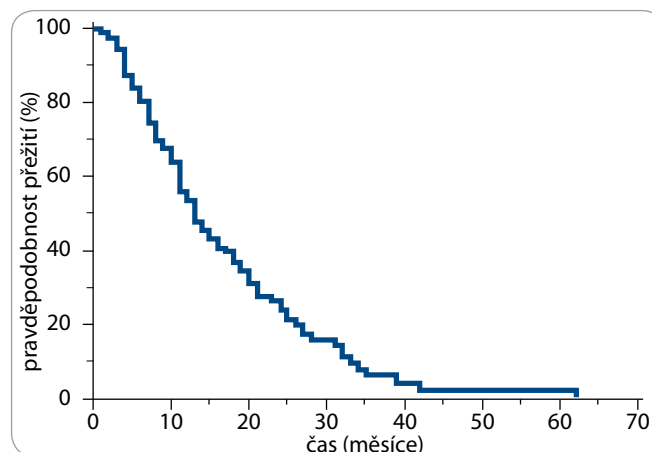
a chemoterapie. Dle očekávání pooperační PS, rozsah resekce a absolvování plánované konkomitantní léčby bez nutnosti její redukce měly statisticky signifikantní vliv na PFS i OS. Medián PFS a OS byl u pacientů s PS 0, 1 a 2 22,0, 7,0 a 6,0 měsíců v případě PFS ( $p = 0,0018$ ) a 32,0, 13,0 a 9,0 měsíců v případě OS ( $p = 0,0023$ ), viz graf 3. Pacienti, u kterých bylo dosaženo makroskopicky totálního odstranění tumoru, měli ve srovnání s pacienty s jakýmkoliv pooperačním reziduem delší PFS (14,0 vs 6,0 měsíců, HR = 0,5688,  $p = 0,0301$ ) i OS (23,0 vs 12,0 měsíců, HR 0,4977,  $p = 0,0093$ ), viz graf 4. V případě hodnocení vlivu dávek konkomitantně aplikované radioterapie a chemoterapie jsme zjistili, že lepší výsledky léčby zaznamenali pacienti, u nichž celková dávka radioterapie přesáhla 54 Gy a počet dnů chemoterapie přesáhl 40. V prvním případě byl PFS 8,0 vs 3,0 měsíce (HR = 0,3313,  $p = 0,0001$ ) a OS 15,0 vs 5,0 měsíců (HR = 0,1730,  $p < 0,0001$ ), ve druhém případě byl PFS 8,0 vs 5,0 měsíců (HR = 0,5359,  $p = 0,0023$ ) a OS 17,0 vs 9,5 měsíce (HR = 0,5943,  $p = 0,0175$ ), viz tab. 3. Naopak věk (tab. 3, graf 5) a pohlaví pacienta nebo lokalizace tumoru neměly v naší studii signifikantní vliv ani na PFS, ani na OS.

Podobně jako v případě primární léčby i možnost pokračovat v adjuvantním podávání temozolomidu měla vliv na přežití pacientů. Dle statistického hodnocení byl PFS u pacientů, kteří pokračovali v adjuvantním temozolomidu, signifikantně delší (10,0 vs 5,0 mě-

celkem 86 pacientů s nově diagnostikovaným glioblastoma multiforme. Medián věku pacientů byl 56 let, převažovali muži (60%). Většina pacientů byla v době zahájení chemoradioterapie v dobrém fyzickém stavu, více než 80% mělo PS 0–1. U 20% pacientů byla iniciálně provedena makroskopicky totální resekce nádoru, v 65% subtotální resekce, v 9% parciální resekce a v 6% se jednalo pouze o biopsii (tab. 1). Medián PFS v našem souboru byl 7,0 měsíců

(2,0–35,5) a medián OS byl 13,0 měsíců (2,5–70,0), viz křivky přežití (graf 1 a 2). V prvním a druhém roce od diagnózy choroby přežívalo 57% a 26% pacientů, ve stejném období bylo bez progresu onemocnění 29% a 8% pacientů (podrobně viz tab. 2).

Data přežití byla podrobena analýze z pohledu PS (stavu fyzické výkonnosti), věku a pohlaví pacienta, lokalizace nádoru, radikality neurochirurgického výkonu, aplikované dávky radioterapie

**Graf 1. Kaplan-Meierova analýza – přežití bez progresu onemocnění (PFS).****Graf 2. Kaplan-Meierova analýza – celkové přežití (OS).**

**Tab. 3. Parametry přežití (medián OS a medián PFS) ve vztahu k věku, rozsahu resekce, stavu výkonnosti po operaci (PS), dávce podané radioterapie a počtu dní chemoterapie při konkomitantní fázi léčby.**

|                     | Věk (roky) |      | Rozsah resekce |             | Performance status (PS) |      |     | Radioterapie (Gy) |      | Chemoterapie (počet dní) |      |
|---------------------|------------|------|----------------|-------------|-------------------------|------|-----|-------------------|------|--------------------------|------|
|                     | < 50       | > 50 | radikální      | neradikální | 0                       | 1    | 2   | < 54              | > 54 | < 40                     | > 40 |
| <b>OS (měsíce)</b>  | 16,0       | 11,0 | 23,0           | 12,0        | 32,0                    | 13,0 | 9,0 | 5,0               | 15,0 | 9,5                      | 17,0 |
| <b>p</b>            | p = 0,6159 |      | p = 0,0093     |             | p = 0,0023              |      |     | p < 0,0001        |      | p = 0,0175               |      |
| <b>HR</b>           | 0,8933     |      | 0,4977         |             | -                       |      |     | 0,1730            |      | 0,5943                   |      |
| <b>PFS (měsíce)</b> | 8,0        | 6,0  | 14,0           | 6,0         | 22,0                    | 7,0  | 6,0 | 3,0               | 8,0  | 5,0                      | 8,0  |
| <b>p</b>            | p = 0,5217 |      | p = 0,0301     |             | p = 0,0018              |      |     | p = 0,0001        |      | p = 0,0023               |      |
| <b>HR</b>           | 0,8674     |      | 0,5688         |             | -                       |      |     | 0,3313            |      | 0,5300                   |      |

síců, HR = 0,6480, p = 0,0393) než ve skupině, která adjuvantní léčbu z různých důvodů neabsolvovala. V případě OS byl sice rovněž patrný rozdíl mezi oběma skupinami, nicméně nebyl statisticky signifikantní (18,0 vs 11,0 měsíců, HR = 0,6874, p = 0,0896). Výsledky však mohou být ovlivněny relativně nízkým počtem pacientů, kteří pokračovali v adjuvantním temozolomidu (40%). K hlavním příčinám přerušeni léčby již po konkomitantní části patřila progresse onemocnění a především toxicita léčby, která byla vyšší než ve Stuppově studii. K adjuvantnímu temozolomidu byli indikováni jen pacienti, kteří absolvovali konkomitantní chemoradioterapii bez závažnější G3/4 toxicity, bez jasné progresse nádoru na kontrolním CT nebo MRI vyšetření a bez významného zhoršení stavu fyzické výkonnosti.

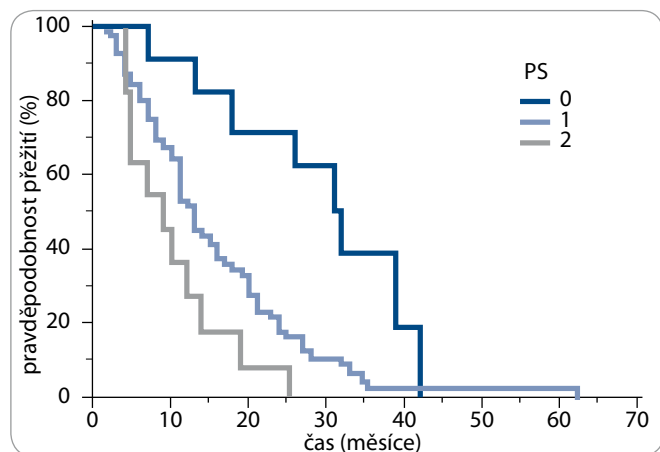
**Tab. 4. Léčba recidivy/progrese po chemoradioterapii a adjuvantní chemoterapii.**

| Léčebná metoda                 | MOU – n (%)  | Stupp – n (%)  |
|--------------------------------|--------------|----------------|
| <b>operace</b>                 | 21/86 (24 %) | 64/272 (24 %)  |
| <b>reiradiace</b>              | 8/86 (9 %)   | 13/272 (5 %)   |
| <b>paliativní chemoterapie</b> | 39/86 (45 %) | 148/272 (54 %) |

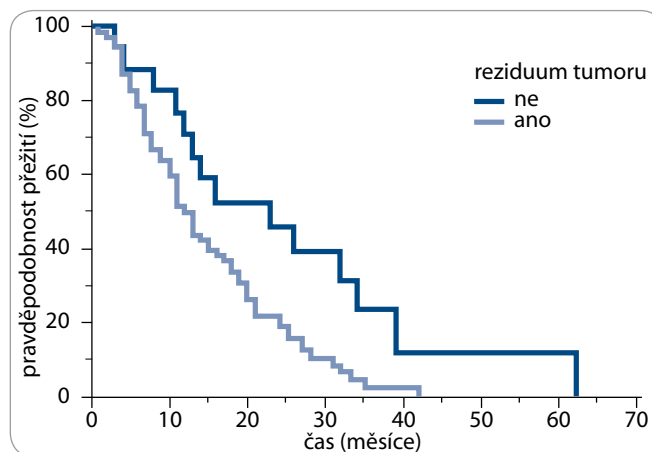
n – počet

Na podskupině 67 pacientů, u kterých byla zobrazovacími metodami (CT nebo MRI) potvrzena recidiva nebo progresse onemocnění, jsme hodnotili vliv dalšího postupu na celkové přežití a na čas přežití od zjištění recidivy/progrese (EFS). V našem souboru byla reoperace provedena u 24% pacientů, v ostatních případech pacienti podstoupili buď paliativní chemoterapii, radioterapii, nebo symptomatickou léčbu. Využití jednotlivých modalit ukazuje tab. 4. Přestože je hod-

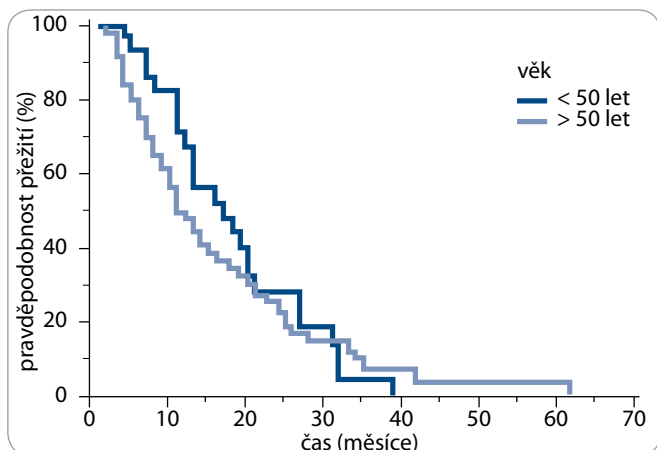
nocení výsledků léčby recidivy/progrese značně problematické, neboť charakter progresse významně ovlivňuje celkový stav pacienta a možnost použít protinádorovou léčbu, naše výsledky potvrzují její pozitivní vliv na další vývoj nemoci. Skupina léčených pacientů, bez ohledu na použitou modalitu léčby, znamenala signifikantně delší přežití od recidivy/progrese než pacienti na symptomatické terapii (7,0 vs 3,0 měsíce, HR = 0,5675, p = 0,0187), viz graf 6.



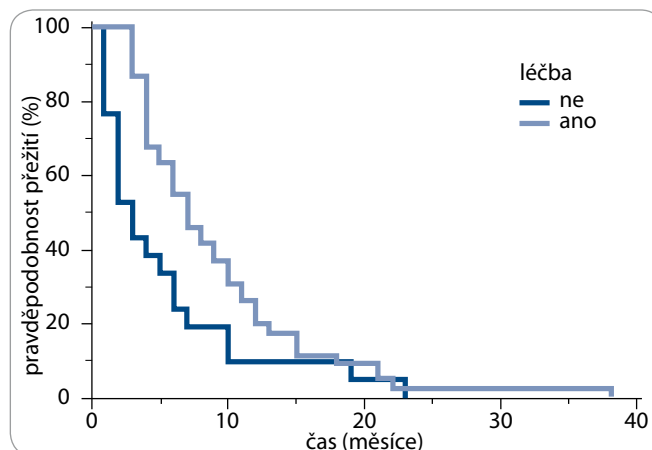
**Graf 3. Kaplan-Meierova analýza – celkové přežití (OS) v závislosti na celkovém stavu výkonnosti (PS).**



**Graf 4. Kaplan-Meierova analýza – celkové přežití (OS) v závislosti na přítomnosti pooperačního rezidua tumoru.**



Graf 5. Kaplan-Meierova analýza – celkové přežití (OS) v závislosti na věku.



Graf 6. Kaplan-Meierova analýza – čas přežití od recidivy/progrese (EFS) v závislosti na léčbě.

Tab. 5. Použitá léčba v době recidivy/progrese a ovlivnění délky života (EFS).

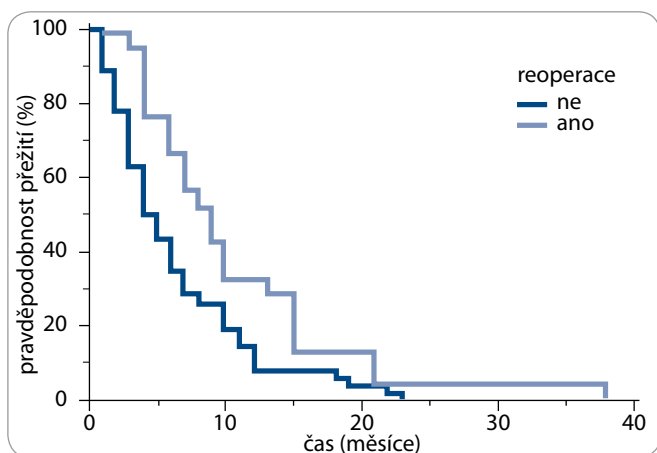
|                                       | Léčba relapsu/progrese |     | Reoperace  |     | Reiradiace |     | Paliativní chemoterapie |     |  |
|---------------------------------------|------------------------|-----|------------|-----|------------|-----|-------------------------|-----|--|
|                                       | ano                    | ne  | ano        | ne  | ano        | ne  | ano                     | ne  |  |
| n                                     | 46                     | 21  | 21         | 46  | 8          | 59  | 39                      | 28  |  |
| přežití od progrese do úmrtí (měsíce) | 7,0                    | 3,0 | 9,0        | 4,0 | 11,0       | 5,0 | 6,0                     | 4,5 |  |
| p                                     | p = 0,0187             |     | p = 0,0247 |     | p = 0,1207 |     | p = 0,4008              |     |  |
| HR                                    | 0,5675                 |     | 0,5855     |     | 0,5883     |     | 0,8286                  |     |  |
| n – počet                             |                        |     |            |     |            |     |                         |     |  |

### Toxicita léčby

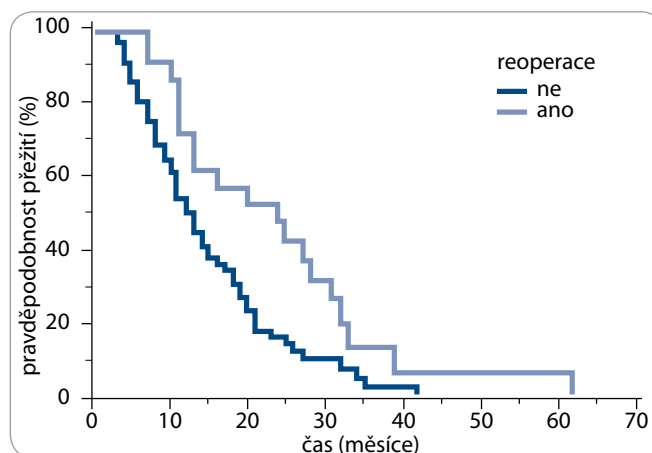
Kromě výsledků léčby jsme se rovněž zajímali o její toxicitu. Výskyt závažné hematologické a nehematologické toxicity, hodnocené stupněm 3 a 4 (G3/4), je uveden v tab. 6. U hematologické toxicity byla ve srovnání se Stuppovým souborem častěji zaznamenána trombocytopenie (celkem 8 pacientů, 9%), ve třech případech s krvácivými projevy s nutností aplikací trombonápravů. Leukopenie a neutropenie G3/4 byla také častější (celkem 5 pacientů, 6%), ve dvou případech kvůli probíhajícímu infektu s nutnou podporou myelopoézy (G-CSF). Důležité je také poukázat na často podceňovanou G3/4 lymfopenii. V našem souboru se vyskytla u celkem 22 pacientů (25%), ve 4 případech mohla mít podíl na rozvoji infekce (bez dopro-

Z pohledu významnosti použité metody měl největší benefit operační výkon. Pacienti, kteří podstoupili reoperaci, měli ve srovnání s ostatními pacienty EFS 9,0 vs 4,0 měsíce (HR = 0,5855, p = 0,0247)

a OS 24,0 vs 12,5 měsíce (HR = 0,5325, p = 0,0111), viz graf 7 a 8. Samostatný vliv paliativní chemoterapie nebo reiradiace na prodloužení délky života od progrese nedosáhl statistické významnosti (tab. 5).



Graf 7. Kaplan-Meierova analýza – čas přežití od recidivy/progrese (EFS) v závislosti na operabilitě.



Graf 8. Kaplan-Meierova analýza – celkové přežití (OS) v závislosti na možnosti chirurgické léčby progrese nemoci.

**Tab. 6. Závažná toxicita (G3/4) dle NCI-CTC version 3.0 a komplikace konkomitantní chemoradioterapie (v průběhu a do 1 měsíce od ukončení).**

| Toxicita                                 | G3  | G4                       | G3+4 (MOU)   | G3+4 (Stupp)                       |
|--|---|--------------------------|--------------|------------------------------------|
| <b>Hematologická</b>                     |   |                          |              |                                    |
| anémie                                   | 1   | 0                        | 1/86 (1 %)   | 1 (< 1 %)                          |
| leukopenie                               | 1   | 4                        | 5/86 (6 %)   | 7/284 (2 %)                        |
| neutropenie                              | 1   | 4                        | 5/86 (6 %)   | 12/284 (4 %)                       |
| lymfopenie                               | 16  | 6                        | 22/86 (25 %) | neuveďeno                          |
| trombocytopenie                          | 4   | 4                        | 8/86 (9 %)   | 9/284 (3 %)                        |
| <b>Nehematologická</b>                   |   |                          |              |                                    |
| hepatopatie                              | 3   | 0                        | 3/86 (3 %)   | neuveďeno                          |
| pneumonie                                | 6/86 (7 %), 4x nekomplikovaná, 2x atypická  |                          |              | 3/284 (1 %)                        |
| plicní embolizace +<br>flebotrombózy DKK |   | 4/86 (5 %)<br>6/86 (7 %) |              | 12/284 (4 %)                       |
| úmrtí                                    | * 2x atypická pneumonie ( <i>Pneumocystis carinii</i> )<br>* 1x plicní embolizace |                          |              | 2/284 (1 %)<br>* krvácení do mozku |

vodné G3/4 neutropenie) i přes profylaxi sumetrolimem u většiny pacientů. U nehematologické toxicity jednoznačně dominovaly tromboembolické příhody, z nichž jedna byla fatální. Zanedbatelná nejsou ani dvě úmrtí na pneumocystovou pneumonii, z nichž jedna vznikla v terénu lymfopenie G4. Tento relativně vysoký výskyt toxicity měl zcela jistě vliv na indikaci adjuvantní léčby a tím pravděpodobně ovlivnil i medián PFS a OS a zřejmě i snížil procento pacientů žijících déle než 2 roky. Na základě známých vstupních klinických faktorů jsme se proto snažili blíže popsat skupinu pacientů, která je vystavena vyššímu riziku vážných nežádoucích účinků léčby. Dle našich zkušeností je evidentní, že především pacienti s PS 2 mají vyšší riziko komplikací při probíhající chemoradioterapii a tím i vyšší pravděpodobnost jejího předčasného ukončení.

Opačná situace nastala v případě adjuvantní léčby temozolomidem, tj. po ukončení chemoradioterapie, kde jsme závažnou toxicitu (G3/4) nepozorovali. Důvodem byla jistě selekce pacientů pro pokračování v adjuvantní léčbě.

## Diskuze

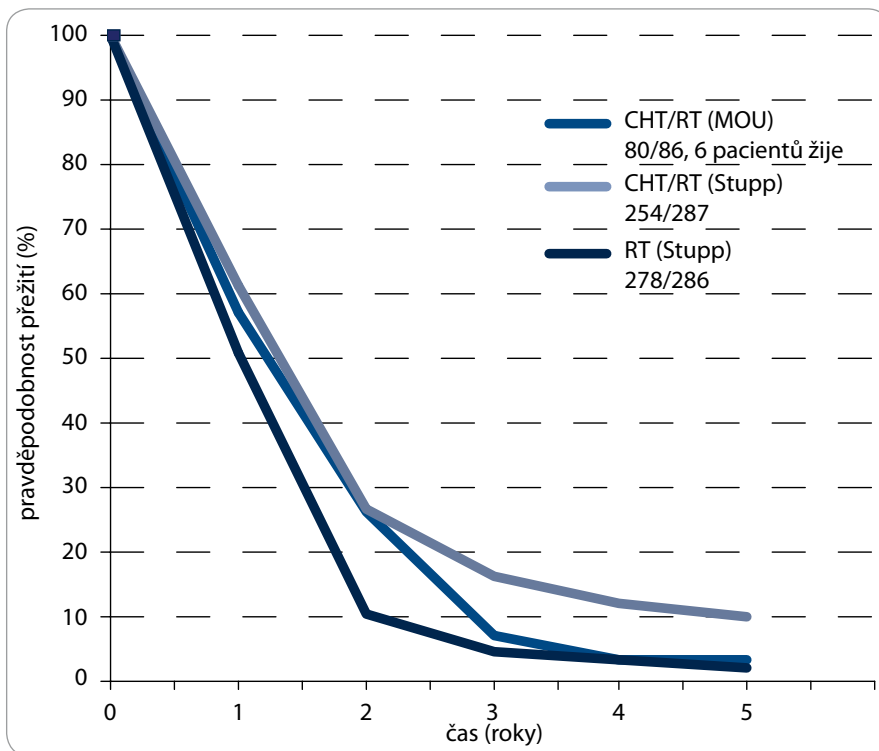
I v případě protinádorové léčby glioblastomů došlo v průběhu posledních 20 let k postupnému vývoji v otázce zařazení chemoterapie a typu cytostatik. Na počátku byly klinické studie zamě-

řeny zejména na hodnocení významu chemoterapie na bázi derivátů nitrosourey aplikovaných po chirurgickém zákroku a radioterapii u pacientů s high-grade gliomy. Dle metaanalýzy 12 klinických studií (GMT Group, 2002) zahrnujících přes 3 000 pacientů léčebných pooperačně samotnou radioterapii nebo současným podáním radioterapie a chemoterapie bylo zjištěno, že díky chemoterapii dochází k absolutnímu navýšení jednoletého přežití ze 40 % na 46 % a hraničnímu prodloužení mediánu přežití o 2 měsíce [6].

Od konce 90. let se začaly objevovat výsledky ze studií fáze II s konkomitantní chemoradioterapií s temozolomidem. V roce 2005 byly Stuppem publikovány výsledky průlomové studie fáze III, které potvrdily významný vliv konkomitantní chemoradioterapie a následné adjuvantní chemoterapie s temozolomidem na prodloužení času bez progresu i mediánu celkového přežití ve srovnání s pacienty léčenými jen operací a radioterapií [7]. Režim použitý v této studii se stal novým standardem léčby pacientů s glioblastomy a je i základem srovnávacím režimem v klinických studiích s novými léky, především z oblasti cílené léčby. Diskuze, která stále probíhá, se týká zejména počtu cyklů adjuvantní chemoterapie po ukončení konkomitantní léčby a také dávkového schématu temozolomidu. Iničiální Stup-

pova studie byla opakovaně podrobena retrospektivním analýzám, jejichž cílem bylo popsat jednotlivé podskupiny pacientů a nalézt zásadní prognostické a prediktivní faktory. Poslední hodnocení s výsledky pětiletého sledování bylo publikováno v březnu roku 2009 [8]. Signifikantní vliv chemoradioterapie na délku přežití byl zaznamenán ve všech analyzovaných podskupinách, bez ohledu na věk či rozsah výkonu. Největší benefit z léčby z pohledu klinických faktorů měli pacienti po makroskopicky totální resekci, mladší 50 let, s performance statusem (PS) 0–1. V případě resekčního výkonu a následné kombinované chemoradioterapie se 5 let dožívalo cca 10 % pacientů versus 1–2 % pacientů, u kterých byla pooperačně aplikována pouze samotná radioterapie. Pokud pacient podstoupil pouze biopsii, byly jeho šance na pětileté přežití při použití konkomitantní chemoradioterapie cca 5 %, kdežto s pouhou radioterapií téměř nulové [8].

V našem souboru jsme rovněž zaznamenali významný vliv radikality resekce a PS na celkové přežití. Věk byl jako prognostický faktor nesignifikantní, což mohlo být ovlivněno skladbou pacientů, kdy v souboru výrazně převažovali pacienti s PS 1 (74 %). Při srovnávání s výsledky Stuppova souboru jsme u našich pacientů dosáhli podobného dvouletého přežití, nicméně v pětiletém přežití



Graf 9. Křivky celkového přežití a orientační srovnání se Stuppovou studií.

jsou naše výsledky horší (podrobně viz tab. 2 a graf 9). Příčinou může být menší podíl pacientů po totálních resekcích (20% vs 39%) a nižší procento pacientů adjuvantně léčených temozolomidem po ukončené konkomitantní chemoradioterapii (40% vs 78%, viz tab. 1).

Naše studie má rovněž určité limity v možnosti přesného hodnocení léčebné odpovědi bezprostředně po primární chirurgické léčbě a po chemoradioterapii. V období od ledna 2003 až června 2005 nebylo vždy možné provádět pooperační MRI vyšetření k posouzení rezidua nádoru (bylo pouze CT vyšetření) a u části těchto pacientů nebylo k dispozici ani MRI za měsíc po ukončení konkomitantní chemoradioterapie. K hodnocení léčebné odpovědi bylo proto nejčastěji používáno CT vyšetření s i.v. kontrastem, u některých nejasných nálezů v kombinaci s PET vyšetřením, což nelze pokládat za optimální algoritmus poléčebného sledování. Dle dnešních doporučení má být pooperační MRI vyšetření provedeno do 24–72 hod po výkonu, další MRI vyšetření s odstupem 2–6 týdnů po ukončení konkomitantní chemoradioterapie a následné MRI kontroly v intervalu 2–4 měsíců

v průběhu adjuvantního temozolomidu a sledování.

Zajímavé bylo i srovnání výskytu závažné hematologické a nehematologické toxicity. V průběhu konkomitantní chemoradioterapie byla zaznamenána častější hematologická toxicita stupně G3/4, a to především trombocytopenie (9% vs 3%) a lymfopenie (25%), což opodstatňuje doporučení profylaktického podávání sumetrolimu. U nehematologické toxicity dominovaly tromboembolické příhody, viz tab. 6. Pacienti s PS 2 častěji konkomitantní léčbu nedokončili a jejich přežití bylo v řadě případů kratší než u podobných pacientů indikovaných k samotné radioterapii. Z toho vyplývá, že indikace konkomitantní chemoradioterapie u pacientů, kteří jsou po operaci v celkově horším klinickém stavu, musí být dobře zvážena. V případě, že kromě PS 2 jsou přítomny další negativní prognostické faktory, např. četné a závažné interkurence nebo inoperabilní nádor, je vhodnější volit pouze samotnou radioterapii.

Kromě klasických klinických prognostických faktorů je v současnosti diskutován i význam molekulárních prognostických a prediktivních faktorů. Za nadějný

prediktivní molekulární faktor se považuje stav metylace promotoru genu reparačního enzymu O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-methyltransferázy (MGMT) [9–12]. Bohužel problémy se standardizací vyšetřovací metody komplikují zavedení vyšetřování tohoto faktoru do rutinní klinické praxe. Stav metylace MGMT u části našich pacientů je právě testován a výsledky budou publikovány později.

Další velmi významnou problematikou v této oblasti je léčba recidivy/progrese glioblastomu po předchozí primární léčbě. Pro určité pacienty může být metodou volby další neurochirurgický výkon, reiradiace nebo chemoterapie. Výsledky paliativní chemoterapie založené na derivátech nitrosourey v našem souboru nebyly nijak přesvědčivé. Četnost léčebných odpovědí se pohybovala do 10%, trvání bylo krátkodobé, medián času do progresu se pohyboval kolem 3 měsíců. Podobné výsledky byly dosaženy i v případě opakovaní radioterapie, jejíž aplikace je omezena předchozím ozařováním. Naopak i naše zkušenosti jednoznačně potvrzují, že u vybraných pacientů může být významným přínosem reoperace.

Určité zlepšení léčebných výsledků u rekurentních glioblastomů by mohly přinést dose-dense a metronomické režimy s temozolomidem [13,14]. Jejich potenciální účinnost i po selhání režimů se standardně dávkovaným temozolomidem je vysvětlována odlišným patofyziologickým mechanismem působení metronomické protinádorové léčby. Metronomické režimy převyšují dávkovou intenzitou standardní režimy, mohou působit antiangiogenně a díky kontinuálnímu podávání mohou způsobovat chronickou depleci reparačního enzymu MGMT. K dnešnímu datu však neproběhla žádná klinická studie fáze III, která by tyto hypotézy potvrdila. V současné době probíhá řada klinických studií s cílenou léčbou a v této souvislosti jsou i hledány nové molekulární prognostické faktory [15]. Nejčastěji se jedná o léčiva cílená proti mechanismům angiogeneze [16,17], signálním drahám receptorů pro růstové faktory [18–20], m-TOR [21], integrinům [22]. V tomto směru nejnadějnějších výsledků dosáhl bevacizumab [23,24], který je v USA již doporučen



k léčbě rekurentních high-grade gliomů jak v monoterapii, tak v kombinaci s chemoterapií. Začlenění bevacizumabu do první linie léčby ke komokomitantní chemoradioterapii s temozolomidem je nyní předmětem probíhajících klinických studií fáze III (AVAGlio, RTOG 0825) [25]. Z dalších testovaných léčiv měl nadějný výsledky ve studiích fáze II orální inhibitor receptorů pro VEGF – cediranib [26]. Bohužel studie fáze III tato očekávání nepotvrdila [27]. Další studie fáze III probíhá také s inhibitorem integrinů – cilengitidem. Tento preparát je zkoušen v rámci první linie léčby se Stuppovým režimem u pacientů s přítomnou metylací promotoru genu pro MGMT.

### Závěr

K dosažení optimálních výsledků léčby pacientů s glioblastoma multiforme je nutné, aby léčebná strategie byla vedena multidisciplinárním týmem. Standardní komplexní léčba je v současnosti založena na chirurgickém výkonu s maximální radikalitou při současném zachování kvality života, následováním komokomitantní aplikací radioterapie a chemoterapie s temozolomidem, který dále pokračuje i v adjuvantní léčbě. Větší benefit z uvedené léčby lze očekávat u pacientů po makroskopicky totální resekci, mladších 50 let, s performance statusem 0–1 a přítomností metylace promotoru genu reparačního enzymu MGMT. Důležitým faktorem pro rozhodování o indikaci komokomitantní chemoradioterapie je i potenciální toxicita léčby vedoucí k jejímu předčasnému ukončení a v konečném důsledku kratšímu přežití než při radioterapii samotné. Proto je nezbytné každého pacienta posuzovat individuálně. Dle našich zkušeností musíme být zvláště opatrní s indikací chemoradioterapie u pacientů s PS 2. Dalším důležitým faktorem je také léčba recidivy/progrese onemocnění po předchozí primární léčbě. Na zá-

kladě našich výsledků je evidentní, že u vybraných pacientů může být významným přínosem reoperace. Ve snaze zlepšit léčebné výsledky proběhla a probíhá v posledních letech řada klinických studií s cílenou léčbou. Nejdále je výzkum v oblasti inhibice angiogeneze, především s bevacizumabem. Výsledky těchto studií mohou zlepšit obecně špatnou prognózu pacientů s glioblastomy.

### Literatura

1. Laws ER, Parney IF, Huang W et al. Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 2003; 99(3): 467–473.
2. Hentschel SJ, Sawaya R. Optimizing outcomes with maximal surgical resection of malignant gliomas. *Cancer Control* 2003; 10(2): 190–114.
3. Walker MD, Green SB, Byar DP et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303(23): 1323–1329.
4. Kala M, Cwiertka K, Hajdúch M. Nové trendy v chemoterapii nádorů mozku – léčba dle histologických diagnóz. *Klin Onkol* 2000; 13(4): 107–111.
5. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS et al. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; 71(8): 2585–2597.
6. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; 359(9311): 1011–1018.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 987–996.
8. Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(5): 459–466.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 997–1003.
10. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19): 1350–1354.
11. Hegi ME, Diserens AC, Godard S et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6): 1871–1874.
12. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10(15): 4933–4938.
13. Perry JR, Bélanger K, Mason WP et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *J Clin Oncol* 2010; 28(12): 2051–2057.
14. Wick A, Pascher C, Wick W et al. Rechallenge with temozolomide in patients with recurrent gliomas. *J Neurol* 2009; 256(5): 734–741.
15. Nečaslová E, Kuglík P, Cejpek P et al. Studium polyzomie chromozomu 7, monozomie chromozomu 10, amplifikace genu EGFR a delece genu p53 u multiformního glioblastomu pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH). *Klin Onkol* 2006; 19(1): 9–14.
16. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21): 1182–1186.
17. Fine HA, Figg WD, Jaeckle K et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 1999; 18(4): 708–715.
18. Neyns B, Sadones J, Joosens E et al. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* 2009; 20(9): 1596–1603.
19. Rich JN, Reardon DA, Peery T et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(1): 133–142.
20. Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS et al. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2010; 98(1): 93–99.
21. Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2005; 23(23): 5294–5304.
22. Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T et al. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2008; 26(34): 5610–5617.
23. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; 25(30): 4722–4729.
24. Friedman HS, Prados MD, Wen PY et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(28): 4733–4740.
25. Radiation Therapy Oncology Group 0825, American College of Radiology. Phase III double-blind placebo-controlled trial of conventional concurrent chemoradiation and adjuvant temozolomide plus bevacizumab versus conventional concurrent chemoradiation and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma [online]. September 29, 2009. Cited 2010-01-20. Available from: <http://www.rtog.org/members/protocols/0825/0825.pdf>.
26. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; 28(17): 2817–2823.
27. Batchelor T, Mulholland P, Neyns B et al. A phase III randomized study comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, with lomustine alone in recurrent glioblastoma patients. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl 8): vii4.

*review*

# Radiotherapy of glioblastoma 15 years after the landmark Stupp's trial: more controversies than standards?

Tomas Kazda<sup>1,2,3</sup>, Adam Dziacky<sup>4</sup>, Petr Burkon<sup>1,2</sup>, Petr Pospisil<sup>1,2</sup>, Marek Slavik<sup>1,2</sup>, Zdenek Rehak<sup>5,6,7,8</sup>, Radim Jancalek<sup>9,10</sup>, Pavel Slampa<sup>1,2,6</sup>, Ondrej Slaby<sup>3,7,8</sup>, Radek Lakomy<sup>7,8</sup>

<sup>1</sup> Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of Nuclear Medicine and PET Center, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

<sup>6</sup> Regional Center for Applied Molecular Oncology (RECAMO), Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

<sup>7</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>8</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

<sup>9</sup> Department of Neurosurgery - St. Anne's University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>10</sup> Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Radiol Oncol 2018; 52(2): 121-128.

Received 7 November 2017

Accepted 12 March 2018

Correspondence to: Radek Lakomy M.D., Ph.D., Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Zlutý kopec 7, 656 53 Brno, Czech Republic. Phone: +420 54 31 32 203; Fax: +420 54 31 32 455; E-mail: lakomy@mou.cz

Disclosure: No potential conflicts of interest were disclosed.

**Background.** The current standard of care of glioblastoma, the most common primary brain tumor in adults, has remained unchanged for over a decade. Nevertheless, some improvements in patient outcomes have occurred as a consequence of modern surgery, improved radiotherapy and up-to-date management of toxicity. Patients from control arms (receiving standard concurrent chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide) of recent clinical trials achieve better outcomes compared to the median survival of 14.6 months reported in Stupp's landmark clinical trial in 2005. The approach to radiotherapy that emerged from Stupp's trial, which continues to be a basis for the current standard of care, is no longer applicable and there is a need to develop updated guidelines for radiotherapy within the daily clinical practice that address or at least acknowledge existing controversies in the planning of radiotherapy.

The goal of this review is to provoke critical thinking about potentially controversial aspects in the radiotherapy of glioblastoma, including among others the issue of target definitions, simultaneously integrated boost technique, and hippocampal sparing.

**Conclusions.** In conjunction with new treatment approaches such as tumor-treating fields (TTF) and immunotherapy, the role of adjuvant radiotherapy will be further defined. The personalized approach in daily radiotherapy practice is enabled with modern radiotherapy systems.

Key words: glioblastoma; radiation therapy; controversy; target volumes; radiotherapy dosage

## Introduction

Despite many advances in the understanding of glioblastoma (GBM) biology in recent decades,

only a few findings were translated into updates in the treatment guidelines for this most aggressive and frequent primary brain tumor of adults. These updates have notably occurred in the manage-

ment of elderly patients, where methylation of the *O6-methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT) gene promoter indicates higher chemosensitivity and higher benefit from administration of alkylating agents such as temozolomide (TMZ).<sup>1-5</sup> Unlike for the majority of other cancer types in which there have been treatment gains with the advent of targeted therapies, there have not been similar advances in GBM treatment to date. Owing to rich tumor neovascularization, much hope was put especially into anti-angiogenic therapy<sup>6</sup>; however, negative results have been reported in GBM clinical trials that used bevacizumab to target vascular endothelial growth factor.<sup>7,8</sup> In contrast with negative results from recent GBM trials focused on new pharmacotherapeutics, co-administration of RT with TMZ has nearly tripled the 2-year survival of GBM patients in the last decade from a dismal 10% with RT alone to 27% with the addition of TMZ and quintupled to 47% in patients with MGMT promoter methylation<sup>9</sup>, representing an exciting advance after little progress in previous decades.<sup>10</sup> However, standard post-surgery treatment of newly diagnosed GBM patients has remained unchanged since implementation of the recommendations of the EORTC 26981–22981/NCIC CE3 trial (Stupp regimen) that finished enrolling patients in 2002 and was published in 2005.<sup>9,11</sup> In this protocol, TMZ (75 mg/m<sup>2</sup>) is administered on days 1 through 42 with concomitant RT (60 Gy), followed by administration of TMZ alone (150 to 200 mg/m<sup>2</sup>) on days 1–5 in six consecutive 4-week cycles. Co-administration of TMZ improved survival from 12.1 months (with RT alone) to 14.6 months (with the addition of TMZ).<sup>11,12</sup>

This educational review considers potentially controversial aspects in the RT of GBM assuming strict application of the current standard of care EORTC 26981–22981/NCIC CE3 protocol for RT planning.

### Current updates in glioblastoma treatment

Despite the advance described above, patients in ordinary clinical practice (outside of clinical trials) have now been treated with the same general protocol for more than 10 years. During that time, though, RT itself has experienced rapid evolution due to advances in computing technology, better access to imaging methods, and more sophisticated RT instrumentation.<sup>13</sup> Today, preparation and application of RT is much more complicated than 10 years ago, but does this complexity bring

any benefits in regards to overall survival of patients with GBM? Even though patients receive a numerically identical dose of 60 Gy, the dosing technique matters as it affects toxicity. There is an obvious difference between conventional 2-dimensional external beam RT (as whole brain irradiation, WBRT) and the 3-dimensional conformal RT or other modern methods of photon RT (*e.g.*, intensity-modulated arc therapy, IMRT). Recently, tumor-treating fields (TTFs) have become recognized as a novel cancer treatment modality with antimitotic effects against rapidly dividing tumor cells.<sup>14</sup> This is caused by alternating electric fields of low-intensity and intermediate-frequency through transducer arrays applied to the shaved head, which are being increasingly thought of as an upcoming new standard of care in GBM, already approved by the U.S. Food and Drug Administration for both newly diagnosed as well as recurrent GBM.<sup>15</sup> A randomized clinical phase 3 trial EF-14 evaluated the effect of TTF plus maintenance TMZ *vs.* maintenance TMZ alone on survival parameters in patients with newly diagnosed GMB.<sup>16,17</sup> This trial represents the first major advance in the treatment of newly diagnosed GBM in roughly a decade, with a hazard ratio for overall survival of 0.63 being numerically comparable with that seen in the Stupp trial in 2005. Ultimately, aside from health-care payers' points of view, the willingness of patients to undergo the burden of carrying a TTF device non-stop will determine if TTF becomes a new standard of care.<sup>18</sup> Based on the interim analysis, there is no preliminary evidence that health-related quality of life, cognitive, or functional status is adversely affected by continuous usage of TTF.<sup>19</sup>

Notably, patients in control (standard therapy) arm of this trial achieved relatively long median survival, as well as in another recent trial (ACT IV trial), where the role of epidermal growth factor receptor EGFRvIII targeted vaccine-based immunotherapy rindopepimut was investigated.<sup>20</sup> Compared to a median overall survival (OS) of 14.6 months in the original Stupp trial<sup>11</sup>, there was reported to be significant increase in median OS (from diagnosis to death) to 19.8 months in the EF-14 trial<sup>17</sup>, and to 20.2 months (median 17.4 months from randomization to death + a reported median of 2.8 months from diagnosis to randomization) in the control arm of the rindopepimut ACT IV trial.<sup>20</sup> Since the underlying treatment (RT to 60 Gy + concomitant and maintenance TMZ) is the same, it is unclear whether this difference in median OS is the evidence of improved treatment outcomes as

a consequence of modern surgery, improved RT, and up-to-date management of toxicity. Patients in both of these studies were randomized after the completion of concomitant chemoradiotherapy. Thus, more favorable patients were selected compared to the first landmark Stupp trial. For this reason, a selection bias may be responsible for the described difference in OS. 82 out of 1019 (8%) eligible patients for EF-14 trial experienced progressive disease after completion of radiotherapy phase and were excluded.<sup>17</sup> Whether 8% patients with the worst prognosis would have been excluded in EORTC 26981–22981/NCIC CE3 trial, the median overall survival would be roughly 16.5 months from randomization (17.7 months from diagnosis). So without eventual selection bias, it is possible to compare these 17.7 months in the Stupp trial to the 19.8 months in EF-14 and 20.2 months in rindopepimut trials, all with the same treatment RT + TMZ. The difference in more than 2 months is clear improvement in outcomes as a consequence of modern surgery, RT and toxicity management. Or should we utilize approaches in daily RT practice which were employed in the Stupp trial decade ago since this is a “registration” trial for the current standard of care?

### The correct total dose

Despite advances in RT over the last 10 to 15 years, certain postulates remain unchanged. One such principle is: “*the correct dose to the correct place.*” Dosage for adjuvant RT of GBM has been same over the last few decades, and it is not typically considered controversial in patients younger than 60–65 years.<sup>21</sup> The effect of high doses in adjuvant RT of GBM was shown in 1979 by a retrospective analysis performed by the German “Brain Tumor Study Group”.<sup>23</sup> The best result (median overall survival of 42 weeks) was achieved by WBRT with 60 Gy compared to 55 (36 weeks) or 50 Gy (28 weeks)<sup>23</sup> and with significant difference between those receiving 60 versus 50 Gy. Doses above 60 Gy did not lead to any benefit regardless of RT technique used. With WBRT, increasing to 70 Gy was not associated with further survival improvement.<sup>24</sup> The later attempts to improve outcomes by an increase of RT dose included combination of 60 Gy WBRT and increased targeted dosage by IMRT<sup>25</sup>, brachytherapy<sup>26</sup>, or stereotactic radiosurgery (RTOG 9305).<sup>27</sup> Increasing focused radiation dose by hyperfractionation was tested as well.<sup>28</sup> Doses above 60 Gy have not proven to be beneficial even in the TMZ era.<sup>29</sup>

One might conclude that the question of the correct total dose in adjuvant RT is a closed chapter and further studies in this field are not judged. On the other hand, it is possible that the studies mentioned above missed application of increased RT dose to the most malignant tumor cells (a high-density portion of tumor). Such areas are generally considered to be areas with contrast enhancement on CT or MRI. MRI-guided serial biopsy study has proven that tumor cells are present inside but also outside the area of this enhancement, infiltrating at least borders of T2 hyperintensity on MRI.<sup>30</sup> Positron emission tomography (PET) has an increasingly important role in the diagnosis, grading, response assessment, and/or guidance of surgery and RT.<sup>31–33</sup> For example, <sup>18</sup>F-DOPA (3,4-dihydroxy-6-[<sup>18</sup>F] fluoro-1-phenylalanine) is an amino acid tracer that identifies areas of high-grade portions of disease as proven by histopathology evaluation of <sup>18</sup>F-DOPA and MRI-guided biopsies with statistically significant difference in tumor-to-normal brain uptake ratio between grade II, III and IV gliomas.<sup>34</sup> Dose escalation to not only areas with post-contrast MRI enhancement but also to high-risk areas identified by PET or diffusion/perfusion MRI may improve clinical outcomes of glioma treatment.<sup>35</sup> An ongoing phase II clinical trial for high-grade gliomas is evaluating increases in the dose up to 76 Gy with target volume defined by MRI and <sup>18</sup>F-DOPA PET (NCT01991977). Dose-escalated proton beam RT is being evaluated in an ongoing prospective trial as well (NCT02179086). Hence, even if the current RT dosage is well established at 60 Gy in common standard of care, the correct dose of radiation may become controversial shortly with wider availability of advanced MR and PET imaging or proton beam facilities.<sup>36,37</sup> Furthermore, as we gain additional experience with TTF therapy, effects of concurrent administration of TTF and RT will be questioned, and dose escalation or de-escalation trials may be of substantial interest in the field, further clouding the issue of correct RT dose.

### The correct RT target definition

Determination of the ideal target volume for RT represents a trade-off between minimizing treatment-related toxicity and achieving tumor control. With standard structural MRI, there are several comparable methods of contouring clinical target volume (CTV: location of expected or suspected malignant cells). Two basic approaches in target definition are “the American approach” by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG con-

TABLE 1. Recommendations for target definition according to EORTC, RTOG and ESTRO-ACROP

| Contouring approach | Dose prescription | GTV   | CTV   |
|---------------------|-------------------|---|---|
| EORTC single phase  | 30 x 2.0 Gy       | Resection cavity + residual T1 enhancement  | GTV + 2 cm  |
| RTOG two phases     | 23 x 2.0 Gy       | GTV1:<br>Resection cavity + residual T1 enhancement + FLAIR abnormality (oedema)                    | CTV1 = GTV1 + 2 cm (the margin is 2.5 cm in cases where no oedema is presented) |
|                     | + 7 x 2.0 Gy      | GTV2:<br>Resection cavity + residual T1 enhancement   | GTV2 + 2 cm   |
| ESTRO-ACROP         | 30 x 2.0 Gy       | Resection cavity + residual T1 enhancement + FLAIR abnormality (oedema) for secondary glioblastomas | GTV + 2 cm  |

Abbreviations: EORTC = European Organisation for Research and Treatment of Cancer; ESTRO-ACROP = European Society for Radiotherapy & Oncology - Advisory Committee on Radiation Oncology Practice; CTV = clinical target volume; FLAIR = Fluid-attenuated Inversion Recovery. GTV = gross tumor volume; RTOG = Radiation Therapy Oncology Group

touring approach) that defines two CTVs accommodating hyperintensity at T2/FLAIR MRI (FLAIR – Fluid-attenuated Inversion Recovery) in addition to T1 contrast-enhanced MRI<sup>38</sup> and “the European approach” by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (*EORTC single phase contouring approach*) that defines one CTV utilizing mainly T1 post-contrast MRI. The ESTRO-ACROP (European Society for Radiotherapy & Oncology - Advisory Committee on Radiation Oncology Practice) approach resembles EORTC practice, although CTV is defined in certain instances also by T2/FLAIR MRI, especially in the case of secondary, *isocitrate dehydrogenase (IDH)*-mutated GBM<sup>39</sup> (Table 1). There has been no randomized comparison of these different consensus practices. Nevertheless, the single phase approach is generally associated with reduced irradiated volume without a significant increase in marginal or distant recurrences.<sup>40</sup> Reducing target volumes leads to lower irradiation of radiographically normal brain and, thus, possibly to less toxicity, although this remains to be validated prospectively.

In daily clinical practice, the chosen method for contouring depends in part on the planned radiation technique (3-dimensional conformal therapy *vs.* inverse planning of IMRT with steeper dose gradients and higher demand on precision) or on the extent of edema, respective of the tumor itself. Molecular characteristics of gliomas, currently established in the integral diagnosis within the new WHO classification update from 2016, may also influence target definition in the personalized contouring of target volumes.<sup>41</sup> Mutation of the *IDH* gene, the early stable driving mutation in diffuse glioma, is associated with WHO grade II/

III gliomas and a better prognosis, while GBMs are typically *IDH* wild-type. Nonetheless, about 10% of GBMs, formerly named secondary GBMs, are *IDH*-mutated, which probably indicates their dedifferentiation from low-grade gliomas. Because this dedifferentiation may occur anywhere within initial low-grade glioma, a single phase approach with high dose irradiation covering all T2/FLAIR hyperintensity may be deemed suitable. Nevertheless, it is too soon to speak about a predictive marker for RT because no clinical trial or RT planning study so far addressed this issue.

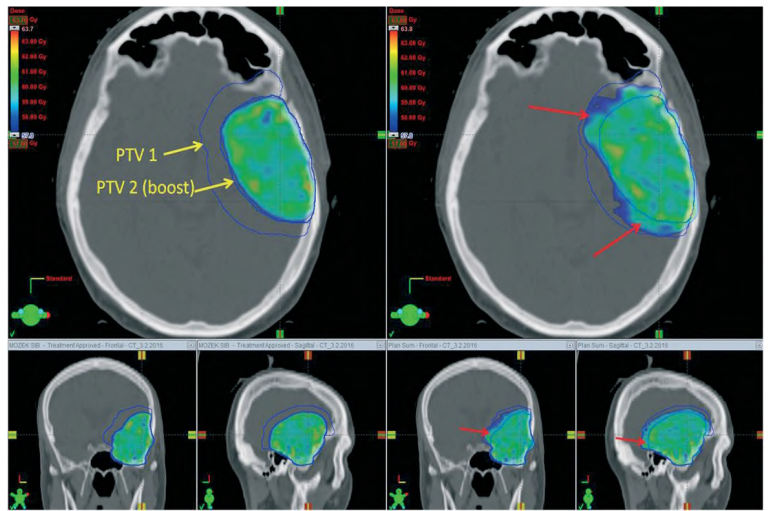
If a two-phase RTOG strategy is applied for a particular patient, the dose for “the larger volume” and the dose for “the smaller volume – the high-risk region” must be determined. This cone-down strategy, also called sequential boost, combines most often 46 + 14 Gy, or possibly 50 + 10 Gy, depending on target volume size. IMRT allows preparation of irradiation for two target volumes simultaneously. This technique, called simultaneous integrated boost (SIB), is sometimes used in clinical practice. However, its usage may be controversial. A common prescription is 30 x 1.7 Gy (51 Gy) for planning target volume #1 and 30 x 2.0 Gy (60 Gy) for planning target volume #2. This is not truly an SIB, because the dose in high-risk subvolume does not exceed standard daily 2.0 Gy; instead, the dose in low-risk subvolume is decreased to daily 1.7 Gy. The advantage is in dose control within individual subvolumes. In the case of the standard sequential 46 + 14 Gy regimen, the low-risk subvolume receives more than the prescribed 46 Gy (Figure 1) because irradiation during the second phase passes through the low-risk subvolume (resulting in a non-homogeneous dose of about 50–57 Gy, of which

first 46 Gy is delivered in 2.0 Gy daily fractions). As long as all dose-volume constraints are met, such an RT plan can be clinically applied. SIB seems to be more beneficial for cases with a large volume of hyperintensity on T2/FLAIR-weighted MRI, because the total dose for low-risk subvolume exactly matches the prescribed dose. Assuming relative radioresistance of glioma cells, the disadvantage is in the low daily dose of 1.7 Gy. There are no clinical studies that prove or disprove superiority of this type of SIB, and therefore its use remains controversial. However, there are also no robust clinical studies demonstrating benefits of IMRT in general.<sup>42</sup> Some reports exist in the evaluation of classical SIB, where the RT schedule is hypofractionated. For example, Paner-Raymond reported no survival improvement or patterns of failure change in their retrospective analysis of patients treated in 20 fraction of 2.0 Gy delivered to the larger volume while simultaneously boosting gross tumor volume by 3.0 Gy.<sup>43</sup> The same RT protocol was used in recently published phase II clinical trial evaluating the role of neoadjuvant TMZ.<sup>44</sup> Hypofractionated (60 Gy in 20 daily fractions) RT was administered concurrently with TMZ after 2 weeks of prior neoadjuvant TMZ (75 mg/m<sup>2</sup> per day) and was followed by adjuvant TMZ.<sup>44</sup> Encouraging median overall survival of 22.3 months warrants further testing of this approach in phase III design. Until then, hypofractionated SIB cannot be considered a standard for daily clinical practice. Generally, there is potential for a planning study and then even maybe a trial (comparison of RTOG *vs.* EORTC contouring approaches, normofractionated or hypofractionated SIB techniques *vs.* cone-down strategy, etc), however only one topic at the time must be addressed.

IMRT is commonly used due to its apparent dosimetric advantages, mainly for tumors localized close to critical organs. The question often asked about expensive particle therapy is also pertinent for IMRT: What evidence do we need for the establishment of a new standard of care in RT techniques? Dosimetric advantages have the potential to translate into the better neurocognitive function as is currently evaluated in the NCT01854554 clinical trial, where IMRT is compared with intensity-modulated proton RT for newly diagnosed GBM.

### Lessons from the past: RT approach from Stupp's protocol

The RT planning steps in the original Stupp's protocol were substantially less complicated than those used nowadays. Gross tumor volume (GTV)



**FIGURE 1.** An example of an RT treatment plan (color wash display of isodoses with a minimal dose of 57 Gy, that is 95% of the prescribed dose of 60 Gy) in three planes. A RT plan for the same patient was prepared using a simultaneous integrated boost (left) and sequential boost (right). Target volumes are shown in blue contour (yellow labeled arrows). Dose assignment to the "PTV2-boost" target volume is the same in boost cases, 30 x 2.0 Gy. With sequential boost, overtreatment (red arrows) is observed in the area where a lower dose was prescribed.

representing tumor mass, was defined as the area within the primary tumor as measured by post-contrast enhancement on either CT or MRI. In general terms, planning target volume (PTV: margin needed to compensate for inaccuracies) is the GTV enlarged by approximately 2–3 cm.<sup>11</sup> Determination of a safety margin for PTV is complicated in daily clinical practice with a slight difference in each patient as several variables must be taken into consideration. The most important are planned technique (classical conformal RT *vs.* IMRT; coplanar *vs.* non-coplanar), quality of immobilization, availability of on-board imaging system, inaccuracy in images registration, compliance, and overall patient's state.

Based on the evaluation of randomly selected individual patients from all participating centers in the EORTC 26981–22981/NCIC CE3 trial, 34% of centers planned RT based solely on pre-operative CT and 62% of centers planned RT on classic 2-dimensional simulator measurements.<sup>45</sup> Most of the centers (94%) delineated PTV alone or with CTV or GTV.<sup>45</sup> Would that be considered as a *lege artis* or as a controversial, whether we plan RT for our patient on 2 dimensional RTG simulator without dedicated planning CT (and MRI) scan, since it was employed in a registry study of the current standard of care?

### Other controversies in the decision-making of daily RT practice

A few other controversies associated with RT of HGG are mentioned briefly. The issue of reduction of CTV around natural barriers to tumor growth is not standardized. One of the options is to reduce the CTV to as low as zero at the border with fixed barriers such as bone or falx and to as low as few millimeters around non-rigid barriers such as ventricles or brain stem. Another controversial topic is hippocampal sparing with the goal of minimizing the negative effects of RT on cognitive functions.<sup>46,47</sup> RT in 2 Gy fractions to 40% of the bilateral hippocampi greater than an equivalent dose of 7.3 Gy was associated with long-term memory impairment in patients with low-grade or benign brain tumors.<sup>47</sup> There is controversy as to whether it might or might not be beneficial to spare the ipsilateral neural stem cell regions as in the hippocampus, owing to accumulating evidence of higher risk of tumor recurrence in the proximity to these regions, which are thought to provide favorable conditions for putative glioma stem cells whose survival is believed to be responsible for tumor recurrence.<sup>48-50</sup> Indeed, subventricular zones have been proposed as new key targets for GBM treatment.<sup>51,52</sup> Whether to spare the contralateral hippocampus remains controversial. Nevertheless, especially when employing inverse RT planning to allow dose control in different parts of the brain, contralateral hippocampal sparing should be at least considered in patients with right-sided low-grade glioma to spare the dominant left hemisphere which may be more related to verbal memory declines after RT.<sup>53,54</sup>

### Conclusion and future perceptivities

To provide state-of-the-art RT for GBM patients in daily clinical practice, it is necessary to acknowledge the capabilities and limitations of current RT techniques in the light of the potential controversies described in this review. With current technical and supportive care advances, it is possible to prolong further the survival of patients with GBM as presented in the control arms of the recent EF-14 and rindopepimut ACT IV trials. In trials enrolling patients who have completed chemoradiotherapy, significant differences in completed upfront treatment may affect results; further confounding influences can be at least partially mitigated if the above-mentioned uncertainties and controversies in daily RT are used as stratifications factors. For

example, for the EF-14 trial, trial protocol amendment V2.0 included an update in the dose of RT (from 60 Gy to 45-70 Gy) to address common variations in the standard of care treatment between individual patients/centers.<sup>16</sup> Although the proportion of patients who received less than 57 Gy was balanced between the TTF and control arms, one must ask what kind of RT should be used in daily clinical practice if the TTF treatment were to become the new standard of care. With the current standard approach of concomitant and adjuvant TMZ, it might not matter which RT procedure is chosen. With new treatment approaches such as TTF or immunotherapy<sup>55-57</sup>, the role of adjuvant radiotherapy will be further defined.

### Acknowledgments and funding

This work was supported in part by the Ministry of Health, Czech Republic – Conceptual Development of Research Organization (MMCI 00209805) and project MEYS-NPS I-LO1413. The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with the financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds.

### Statement

The paper has not been published or submitted for publication elsewhere. This is the first submission of this paper. All listed authors concur in the submission and are responsible for its content. They agree with publication and have given the corresponding author the authority to act on their behalf in all matters pertaining to publication.

### References

1. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1583-8. doi: 10.1200/JCO.2004.06.082
2. Malmström A, Grönberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 916-26. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6
3. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 707-15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X
4. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N Engl J Med* 2017; **376**: 1027-37. doi: 10.1056/NEJMoa1611977

5. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 997-1003.
6. Wick W, Platten M, Wick A, Hertenstein A, Radbruch A, Bendzus M, et al. Current status and future directions of anti-angiogenic therapy for gliomas. *Neuro Oncol* 2016; **18**: 315-28. doi: 10.1093/neuonc/nov180
7. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; **370**: 709-22. doi: 10.1056/NEJMoa1308345
8. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A Randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; **370**: 699-708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573
9. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 459-66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
10. Uhm JH, Porter AB. Treatment of Glioma in the 21st Century: An exciting decade of postsurgical treatment advances in the molecular era. *Mayo Clin Proc* 2017; **92**: 995-1004. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.01.010
11. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330
12. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult glioblastoma. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 2402-09. doi: 10.1200/JCO.2017.73.0119
13. Halasz BLM, Soltys SG, Breneman JC, Chan MD, Laack NN, Minniti G, et al. Treatment of gliomas: a changing landscape. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017; **98**: 255-8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.02.223
14. Hottinger AF, Pacheco P, Stupp R. Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro Oncol* 2016; **18**: 1338-49. doi: 10.1093/neuonc/nov182
15. Mehta M, Wen P, Nishikawa R, Reardon D, Peters K. Critical Reviews in Oncology / Hematology Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; **111**: 60-5. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.005
16. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma. *JAMA* 2015; **314**: 2535-43. doi: 10.1001/jama.2015.16669
17. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: A randomized clinical trial. *JAMA* 2017; **318**: 2306-16. doi: 10.1001/jama.2017.18718
18. Wick W. TTFields: Where does all the skepticism come from? *Neuro Oncol* 2016; **18**: 303-5. doi: 10.1093/neuonc/nov012
19. Zhu JJ, Demireva P, Kanner AA, Pannullo S, Mehdorn M, Avgeropoulos N, et al. Health-related quality of life, cognitive screening, and functional status in a randomized phase III trial (EF-14) of tumor treating fields with temozolomide compared to temozolomide alone in newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol* 2017 Aug 28. doi: 10.1007/s11060-017-2601-y. [Epub ahead of print]
20. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; **18**: 1373-85. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X
21. Corso CD, Bindra RS, Mehta MP. The role of radiation in treating glioblastoma: here to stay. *J Neurooncol* 2017 Mar 7. doi: 10.1007/s11060-016-2348-x. [Epub ahead of print]
22. Roth P, Gramatzki D, Weller M. Management of elderly patients with glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017; **17**: 35. doi: 10.1007/s11910-017-0740-3
23. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; **5**: 1725-31. doi: 10.1016/0360-3016(79)90553-4
24. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazar O, Perez-Tamayo R, Kramer S, et al. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* 1983; **52**: 997-1007.
25. Chan JL, Lee SW, Fraass BA, Normolle DP, Greenberg HS, Junck LR, et al. Survival and failure patterns of high-grade gliomas after three-dimensional conformal radiotherapy. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1635-42.
26. Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, et al. The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery* 2002; **51**: 343-57.
27. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: Report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **60**: 853-60. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.04.011
28. Werner-Wasik M, Scott CB, Nelson DF, Gaspar LE, Murray KJ, Fischbach JA, et al. Final report of a phase I/II trial of hyperfractionated and accelerated hyperfractionated radiation therapy with carmustine for adults with supratentorial malignant gliomas. Radiation Therapy Oncology Group Study 83-02. *Cancer* 1996; **77**: 1535-43.
29. Badiyan SN, Markovina S, Simpson JR, Robinson CG, DeWees T, Tran DD, et al. Radiation therapy dose escalation for glioblastoma multiforme in the era of temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; **90**: 877-85. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.07.014
30. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kall BA KD. Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. *Mayo Clin Proc* 1987; **62**: 450-9.
31. Dunet V, Ponomi A, Hottinger A, Nicod-Lalonde M, Prior JO. Performance of 18F-FET versus 18F-FDG-PET for the diagnosis and grading of brain tumors: systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol* 2016; **18**: 426-34. doi: 10.1093/neuonc/nov148
32. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galdiks N, Soffietti R, Kim MM, et al. Response assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol* 2016; **18**: 1199-208. doi: 10.1093/neuonc/nov058
33. Whitfield GA, Kennedy SR, Djoukharad IK, Jackson A. Imaging and target volume delineation in glioma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2014; **26**: 364-76. doi: 10.1016/j.clon.2014.04.026
34. Pafundi DH, Laack NN, Youland RS, Parney IF, Lowe VJ, Giannini C, et al. Biopsy validation of 18 F-DOPA PET and planning and radiotherapy target delineation: results of a prospective pilot study. *Neuro Oncol* 2013; **15**: 1058-67. doi: 10.1093/neuonc/not002
35. Mills SJ, Du Plessis D, Pal P, Thompson G, Buonaccorsi G, Soh C, et al. Mitotic activity in glioblastoma correlates with estimated extravascular extracellular space derived from dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Am J Neuroradiol* 2016; **37**: 811-7. doi: 10.3174/ajnr.A4623
36. Brindle KM, Izquierdo-Garcia JL, Lewis DY, Mair RJ, Wright AJ. Brain tumor imaging. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 2432-8. doi: 10.1200/JCO.2017.72.7636
37. Niyazi M, Geisler J, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Garny S, et al. FET-PET for malignant glioma treatment planning. *Radiother Oncol* 2011; **99**: 44-8. doi: 10.1016/j.radonc.2011.03.001
38. Sulman EP, Ismaila N, Armstrong TS, Tsien C, Batchelor TT, Cloughesy T, et al. Radiation therapy for glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 361-9. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7562
39. Niyazi M, Brada M, Chalmers AJ, Combs SE, Erridge SC, Fiorentino A, et al. ESTRO-ACROP guideline "target delineation of glioblastomas." *Radiother Oncol* 2016; **118**: 35-42. doi: 10.1016/j.radonc.2015.12.003
40. Minniti G, Amelio D, Amichetti M, Salvati M, Muni R, Bozzao A, et al. Patterns of failure and comparison of different target volume delineations in patients with glioblastoma treated with conformal radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *Radiother Oncol* 2010; **97**: 377-81. doi: 10.1016/j.radonc.2010.08.020



41. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella D, Webster B, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; **131**: 803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
42. Chan MF, Schupak K, Burman C, Chui C-S, Ling CC. Comparison of intensity-modulated radiotherapy with three-dimensional conformal radiation therapy planning for glioblastoma multiforme. *Med Dosim* 2003; **28**: 261-5. doi: 10.1016/j.meddos.2003.08.004
43. Panet-Raymond V, Souhami L, Roberge D, Kavan P, Shakibnia L, Muanza T, et al. Accelerated hypofractionated intensity-modulated radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide for patients with glioblastoma multiforme: a safety and efficacy analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; **73**: 473-8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.04.030
44. Shenouda G, Souhami L, Petrecca K, Owen S, Panet-Raymond V, Guiot M-C, et al. A phase 2 trial of neoadjuvant temozolomide followed by hypofractionated accelerated radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide for patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017; **97**: 487-94. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.11.006
45. Ataman F, Poortmans P, Stupp R, Fisher B, Mirimanoff RO. Quality assurance of the EORTC 26981/22981; NCIC CE3 intergroup trial on radiotherapy with or without temozolomide for newly-diagnosed glioblastoma multiforme: the individual case review. *Eur J Cancer* 2004; **40**: 1724-30. doi: 10.1016/j.ejca.2004.03.026
46. Kazda T, Jancalck R, Pospisil P, Sevela O, Prochazka T, Vrzal M, et al. Why and how to spare the hippocampus during brain radiotherapy: the developing role of hippocampal avoidance in cranial radiotherapy. *Radiat Oncol* 2014; **9**: 139. doi: 10.1186/1748-717X-9-139
47. Gondi V, Hermann BP, Mehta MP, Tomé WA. Hippocampal dosimetry predicts neurocognitive function impairment after fractionated stereotactic radiotherapy for benign or low-grade adult brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; **85**: 348-54. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.11.031
48. Gzell C, Back M, Wheeler H, Bailey D, Foote M. Radiotherapy in glioblastoma: the past, the present and the future. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2017; **29**: 15-25. doi: 10.1016/j.clon.2016.09.015
49. Smith AW, Mehta MP, Wernicke AG. Neural stem cells, the subventricular zone and radiotherapy: implications for treating glioblastoma. *J Neurooncol* 2016; **128**: 1-10. doi: 10.1007/s11060-016-2123-z
50. Chen L, Chaichana KL, Kleinberg L, Ye X, Quinones-Hinojosa A, Redmond K. Glioblastoma recurrence patterns near neural stem cell regions. *Radiother Oncol* 2015; **116**: 294-300. doi: 10.1016/j.radonc.2015.07.032
51. Khalifa J, Tensaouti F, Lusque A, Plas B, Lotterie J-A, Benouaich-Amiel A, et al. Subventricular zones: new key targets for glioblastoma treatment. *Radiat Oncol* 2017; **12**: 67. doi: 10.1186/s13014-017-0791-2
52. Nourallah B, Diggall R, Jena R, Watts C. Irradiating the subventricular zone in glioblastoma patients: is there a case for a clinical trial? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2017; **29**: 26-33. doi: 10.1016/j.clon.2016.09.005
53. Pospisil P, Kazda T, Hynkova L, Bulik M, Dobiaskova M, Burkon P, et al. Post-WBRT cognitive impairment and hippocampal neuronal depletion measured by in vivo metabolic MR spectroscopy: results of prospective investigational study. *Radiother Oncol* 2017; **122**: 373-9. doi: 10.1016/j.radonc.2016.12.013
54. Flechl B, Sax C, Ackerl M, Crevenna R, Woehrer A, Hainfellner J, et al. The course of quality of life and neurocognition in newly diagnosed patients with glioblastoma. *Radiother Oncol* 2017; **125**: 228-33. doi: 10.1016/j.radonc.2017.07.027
55. Weller M, Roth P, Preusser M, Wick W, Reardon DA, Platten M, et al. Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat Rev Neurol* 2017; **13**: 363-74. doi: 10.1038/nrneurol.2017.64
56. Sampson JH, Maus MV, June CH. Immunotherapy for brain tumors. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 2450-6. doi: 10.1200/JCO.2017.72.8089
57. Reznik E, Smith AW, Taube S, Mann J, Yondorf MZ, Parashar B, et al. Radiation and immunotherapy in high-grade gliomas. *Am J Clin Oncol* 2017 Sep 12. doi: 10.1097/COC.000000000000406. [Epub ahead of print]



# Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade

Radek Lakomy<sup>1,2</sup>, Tomas Kazda<sup>3,4,5\*</sup>, Iveta Selingerova<sup>5</sup>, Alexandr Poprach<sup>1,2</sup>, Petr Pospisil<sup>3,4</sup>, Renata Belanova<sup>6,7</sup>, Pavel Fadrus<sup>8</sup>, Vaclav Vybihal<sup>8</sup>, Martin Smrcka<sup>8</sup>, Radim Jancalek<sup>9</sup>, Ludmila Hynkova<sup>3,4</sup>, Katarina Muckova<sup>10</sup>, Michal Hendrych<sup>11</sup>, Jiri Sana<sup>1,2,10</sup>, Ondrej Slaby<sup>1,2,10</sup> and Pavel Slampa<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czechia, <sup>2</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>3</sup> Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czechia, <sup>4</sup> Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>5</sup> Research Center for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czechia, <sup>6</sup> Department of Radiology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czechia, <sup>7</sup> Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>8</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>9</sup> Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>10</sup> Department of Pathology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia, <sup>11</sup> First Department of Pathology, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czechia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sandro M. Krieg,  
Technical University of  
Munich, Germany

### Reviewed by:

Andrea Salmaggi,  
ASST Lecco, Italy  
Carmelo Anile,  
Catholic University of the Sacred  
Heart, Italy

### \*Correspondence:

Tomas Kazda  
tomas.kazda@mou.cz

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuro-Oncology and Neurosurgical  
Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 24 March 2020

**Accepted:** 28 April 2020

**Published:** 03 July 2020

### Citation:

Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, Fadrus P, Vybihal V, Smrcka M, Jancalek R, Hynkova L, Muckova K, Hendrych M, Sana J, Slaby O and Slampa P (2020) Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front. Oncol.* 10:840. doi: 10.3389/fonc.2020.00840

The aim of this retrospective study is to provide real-world evidence in glioblastoma treatment and to compare overall survival after Stupp's regimen treatment today and a decade ago. A current consecutive cohort of histologically confirmed glioblastoma irradiated from 1/2014 to 12/2017 in our cancer center was compared with an already published historical control of patients treated in 1/2003–12/2009. A total of new 155 patients was analyzed, median age 60.9 years, 61% men, 58 patients (37%) underwent gross total tumor resection. Stupp's regimen was indicated in 90 patients (58%), 65 patients (42%) underwent radiotherapy alone. Median progression-free survival in Stupp's regimen cohort was 6.7 months, median OS 16.0 months, and 2-year OS 30.7%. OS was longer if patients were able to finish at least three cycles of adjuvant chemotherapy (median 23.3 months and 43.9% of patients lived at 2 years after surgery). Rapid early progression prior to radiotherapy was a negative prognostic factor with HR 1.87 ( $p = 0.007$ ). The interval between surgery and the start of radiotherapy (median 6.7 weeks) was not prognostically significant ( $p = 0.825$ ). The median OS in the current cohort was about 2 months longer than in the historical control group treated 10 years ago (16 vs. 13.8 months) using the same Stupp's regimen. Taking into account differences in patient's characteristics between current and historical cohorts, age, extent of resection, and ECOG patient performance status adjusted HR (Stupp's regimen vs. RT alone) for OS was determined as 0.45 ( $p = 0.002$ ).

**Keywords:** glioblastoma, chemotherapy, radiotherapy, rapid early progression, overall survival, real-world evidence

## INTRODUCTION

Despite intensive multimodal treatment of glioblastoma consisting of maximal safe resection followed by combined chemoradiotherapy (well-known Stupp's regimen), ultimately all patients develop tumor recurrence and subsequently die for further glioblastoma progression (1, 2). The greatest benefit from multimodal treatment has been demonstrated in patients after macroscopic gross total resection (GTR), those under 50 years of age, with ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status of 0–1 and the presence of promoter methylation of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene (3–5). Currently, more approaches are considered standard of care in older people who are less tolerant to the standard Stupp's regimen and are treated by Perry's modification (3 weeks chemoradiotherapy) or by chemotherapy alone, for example (6–8).

Real-world evidence data are an increasingly important supplement to clinical and translational research. These analyses of current real-world patients treated outside controlled clinical trials may identify hidden needs as well as provide survival data for proper powering in future clinical trials. This is especially relevant in glioblastoma where no positive practice changing trial, focused on the treatment of the best prognostic glioblastoma subcohort, was published during the last 15 years despite huge advances in the understanding of glioblastoma in general (9, 10).

This single institutional retrospective study unbiased by inter-center variability aims to analyze the outcomes of consecutive glioblastoma patients irradiated in our cancer center from 1/2014 to 12/2017 and to compare their outcomes with a historical control of patients treated in 1/2003–12/2009. This control cohort with a median survival of 13 months (2-year overall survival 26%) was published in 2011 and was treated by the same Stupp's regimen as most patients from the present cohort (11, 12). Comparison of survival data in respective control arms in recently published global clinical trials (Stupp's regimen used as the standard of care in control arm) with those published in original trial by Stupp et al. (patients enrollment from 8/2000 to 3/2002) reveals remarkable improvement in survival around 5 months after the same treatment regimen (1, 10, 13, 14). We aim to describe this possible improvement also in patients treated in real-world care outside of clinical trials in single institutional report unbiased by variability associated with the inclusion of patients in many countries and institutions.

## MATERIALS AND METHODS

Consecutive patients over 18 years of age with histologically proven newly diagnosed glioblastoma irradiated from 1/2014 to 12/2017 in our cancer center were eligible for this analysis approved by our institutional review board. All patients signed informed consent with the usage of their data for research purposes. All patients after glioma surgery were discussed in the multidisciplinary neurooncology tumor board and those eligible for postsurgery oncology treatment were referred to radiotherapy consultation. A subgroup of patients indicated to concurrent

chemoradiation with subsequent adjuvant chemotherapy was further analyzed in detail.

Radiotherapy (RT) was performed in all patients within study cohorts. A planning CT scan for 3-dimensional RT dose calculation was utilized in all patients. Some of them underwent also planning MRI (including postcontrast T1 weighted scan with submillimeter slices) which was rigidly registered to CT scan for proper RT target definition. Individual prescription of RT dose and scheduling was guided mainly by patient's performance status and by volume, size, shape, and location of the target volume. Both standards of care approaches in target volume definitions were employed in patients eligible for treatment by Stupp's regimen—the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG contouring approach) that defines two clinical target volumes accommodating hyperintensity at T2/FLAIR MRI in addition to T1 contrast-enhanced MRI (15) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC single-phase contouring approach) that defines one target utilizing mainly T1 postcontrast MRI (16). The total dose of normofractionated 60 Gy was prescribed irrespective of the used target volumes definition approach. RT was prepared employing planning system Eclipse<sup>TM</sup> (Varian medical systems, Palo Alto, CA, USA) and performed on linear accelerator Varian Clinac iX or TrueBeam (Varian medical systems, Palo Alto, CA, USA).

Concurrent chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy were prescribed according to the original Stupp et al. (1) protocol. Temozolomide (75 mg/m<sup>2</sup>) was administered on days 1 through 42 with concomitant RT (60 Gy). After 4 weeks, treatment follows by the administration of temozolomide alone (150–200 mg/m<sup>2</sup>) on days 1–5 in six consecutive 4-week cycles or to progression. The prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia was at the discretion of the treating physician.

Response to treatment was evaluated based on regular follow up MRI scanning. Progression presented already on planning MRI was considered only in patients who had available early postsurgery (within 72 h) control MRI enabling a clear definition of eventual postsurgery residuum. The first post (chemo)radiotherapy MRI was usually ordered 4–6 weeks after the last RT session, followed by regular MRI every 3 months unless clinically indicated for earlier examination. No routine RANO criteria (17) usage in daily clinical practice was employed and MRI were visually evaluated by servicing radiologist. Unclear findings were reviewed by a multidisciplinary neurooncology tumor board, mostly with a recommendation for an earlier control exam. Treatment at progression was highly individualized with options for resurgery, reirradiation, temozolomide rechallenge, palliative chemotherapy (mostly lomustine), or symptomatic treatment.

The primary objective is to evaluate the impact of clinical and laboratory factors (gender, age, extent of resection, ECOG patient status, tumor location, early tumor progression on planning MRI, MGMT methylation) and used treatment on survival parameters such as progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). PFS was defined as the time from the date of initiation of RT to the date of relapse. Considering retrospective nature of this analysis, no strong measures according to differential diagnosis

**TABLE 1** | Basic patients' characteristics of current cohort (GBM 2014–2017) and historical group (GBM 2003–2009).

| Study cohort  | GBM 2014–2017<br>(n = 155) |                    | GBM 2003–2009<br>(n = 145) |                    | Current vs.<br>historical group |
|---|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------|
|   | Stupp's regimen<br>n = 90  | RT alone<br>n = 65 | Stupp's regimen<br>n = 86  | RT alone<br>n = 59 | Stupp's regimen<br>p-value*     |
| <b>Age (years)</b>  |                            |                    |                            |                    |                                 |
| Median (IQR)  | 56 (30-76)                 | 66 (20-86)         | 56 (24-69)                 | 67 (41–82)         | <b>0.034</b>                    |
| ≤50   | 22 (24%)                   | 10 (15%)           | 30 (35%)                   | 5 (8%)             | 0.140                           |
| <b>Mens</b>   | 61 (68%)                   | 34 (52%)           | 51 (59%)                   | 33 (56%)           | 0.274                           |
| <b>Performance status (ECOG)<br/>and Karnofsky index (KI)</b> |                            |                    |                            |                    | 0.450                           |
| ECOG 0<br>(KI 90–100%)  | 45 (50%)                   | 11 (17%)           | 38 (44%)                   | 6 (10%)            |                                 |
| ECOG 1<br>(KI 70–80%)   | 44 (49%)                   | 38 (58%)           | 48 (56%)                   | 35 (59%)           |                                 |
| ECOG 2<br>(KI 50–60%)   | 1 (1%)                     | 16 (25%)           | 0 (0%)                     | 18 (31%)           |                                 |
| <b>Tumor location</b>   |                            |                    |                            |                    |                                 |
| Deep brain location   | 23 (26%)                   | 26 (40%)           | NA                         | NA                 |                                 |
| <b>Extent of resection</b>                                    |                            |                    |                            |                    | <b>&lt;0.001</b>                |
| GTR   | 44 (49%)                   | 14 (22%)           | 17 (20%)                   | 8 (13%)            |                                 |
| STR   | 36 (40%)                   | 24 (37%)           | 56 (65%)                   | 21 (36%)           |                                 |
| Partial resection<br>or biopsy                                | 10 (11%)                   | 27 (41%)           | 13 (15%)                   | 30 (51%)           |                                 |
| <b>IDH status</b>   |                            |                    |                            |                    |                                 |
| Mutated/evaluated   | 5/57 (9%)                  | 1/22 (5%)          | NA                         | NA                 |                                 |
| <b>MGMT status</b>  |                            |                    |                            |                    |                                 |
| Methylated/evaluated  | 11/48 (23%)                | 8/25 (32%)         | 12/38 (32%)                | NA                 |                                 |

GBM, glioblastoma; CHT/RT, chemoradiotherapy; CHT, chemotherapy; RT, radiotherapy; NA, Not Available; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; GTR, gross total resection; STR, subtotal resection; IDH, Isocitrate dehydrogenase; MGMT, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. \*p-values <0.05 are marked in bold.

of pseudoprogression were possible to be utilized. In the cases, where progression was described by the radiologist and there was subsequent change in the treatment, we recorded date of that MRI as a date of progression. On the other hand, in the cases where there was no change in the treatment after radiologist call of possible progression and subsequent MRI did not confirm progression, we did not record the previous MRI as that with progression and the subsequent MRI were evaluated in PFS analysis. OS was defined as the time from the date of diagnosis to the date of death (from tumor cause). The last control date was considered when relapse/death was not presented. The secondary goal is to compare the current treatment results using the Stupp's regimen with the results of patients treated 10 years ago adjusted for age, extent of resection, and ECOG patient status.

Patients' characteristics of both current and historical cohorts were described using standard summary statistics i.e., median and interquartile range (IQR) for continuous variables and frequency distributions for categorical variables. The following comparison of both groups was examined with Fisher's exact test, chi-squared test, or Mann–Whitney test, as appropriate. Survival probabilities were estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was performed to compare OS and PFS between the groups. Characteristics associated with the time-to-event outcomes were evaluated using Cox models where hazard ratios

(HR) and their 95% confidence interval (CI) were calculated. The proportional hazard assumption was verified based on scaled Schoenfeld residuals. The multivariable model was fitted using stepwise backward selection. All statistical analyses were performed employing R version 3.6.2 (18) and the significance level of 0.05 was considered.

## RESULTS

A total of 155 patients was indicated to postsurgery RT. The median age was 61 years, 21% were younger 50 years, slightly higher number of men (61%). Gross total resection was achieved in 58 (37%) patients and more than 80% were in good general condition (ECOG 0–1). The other basic patients and tumor characteristics are summarized in **Table 1** including corresponding data from the historical cohort (11, 12). Patients treated with the Stupp's regimen in 2014–2017 were older than the historical cohort ( $p = 0.034$ ) but underwent more often radical resection ( $p < 0.001$ ). Postsurgery MRI exam was performed in 97 (63%) patients and was more common in patients after GTR or subtotal resection (STR).

The median time to first RT session was 6.7 weeks (range 2.1–11.7 weeks). The majority of patients (91%) were irradiated by intensity-modulated radiotherapy technique (including arc

TABLE 2 | Patients' treatment.

| Study cohort                       | GBM 2014–2017<br>(n = 155) |                    | GBM 2003–2009<br>(n = 145) |                    | Current vs.<br>historical group<br>Stupp's regimen<br><i>p</i> -value* |
|------------------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|--|
|                                    | Stupp's regimen<br>n = 90  | RT alone<br>n = 65 | Stupp's regimen<br>n = 86  | RT alone<br>n = 59 |  |
| <b>Time to RT initiation</b>       |                            |                    |                            |                    |  |
| Median (weeks)                     | 6.7                        | 6.9                | 5.1                        | 5.3                | <b>&lt;0.001</b>   |
| >6 weeks                           | 57 (63%)                   | 43 (66%)           | 27 (31%)                   | 22 (39%)           | <b>&lt;0.001</b>   |
| <b>Radiotherapy</b>                |                            |                    |                            |                    |  |
| Median dose                        | 60                         | 40                 | 60                         | 50                 | 0.430  |
| Abbreviated RT 15 × 2.67 Gy        | 0                          | 11/65<br>(17%)     | 0                          | 0                  |  |
| Abbreviated RT 20 × 2.5 Gy         | 0                          | 17/65<br>(26%)     | 0                          | 9/59 (15%)         |  |
| Contouring approach EORTC          | 32 (36%)                   | 53 (82%)           | NA                         | NA                 |  |
| Contouring approach RTOG           | 58 (64%)                   | 5 (8%)             | NA                         | NA                 |  |
| <b>Chemoradiotherapy</b>           |                            |                    |                            |                    |  |
| Duration (days; IQR)               | 42 (37–44)                 | 0                  | 42                         | 0                  |  |
| Corticosteroids use                | 53/86 (62%)                | 57/62<br>(92%)     | NA                         | NA                 |  |
| <b>Adjuvant chemotherapy</b>       |                            |                    |                            |                    |  |
| No. of patients                    | 65/90 (72%)                | 0                  | 34/86 (40%)                | 0                  | <b>&lt;0.001</b>   |
| No. of cycles: median (range)      | 4 (1–15)                   | 0                  | 4 (1–12)                   | 0                  |  |
| No. of cycles: ≥3                  | 47/90 (52%)                |                    | 26/86 (30%)                | 0                  |  |
| No. of cycles: ≥6                  | 31/90 (34%)                | 0                  | 11/86 (13%)                | 0                  |  |
| <b>Treatment after progression</b> |                            |                    |                            |                    |  |
| No. of patients                    | 47/79 (59%)                | 9/32 (28%)         | 46/67 (69%)                | NA                 |  |
| Surgery                            | 20/47 (43%)                | 1/9 (11%)          | 21/46 (46%)                | NA                 |  |
| Chemotherapy                       | 33/47 (70%)                | 8/9 (89%)          | 39/46 (85%)                | NA                 |  |
| Reirradiation                      | 20/47 (43%)                | 1/9 (11%)          | 8/46 (17%)                 | NA                 |  |

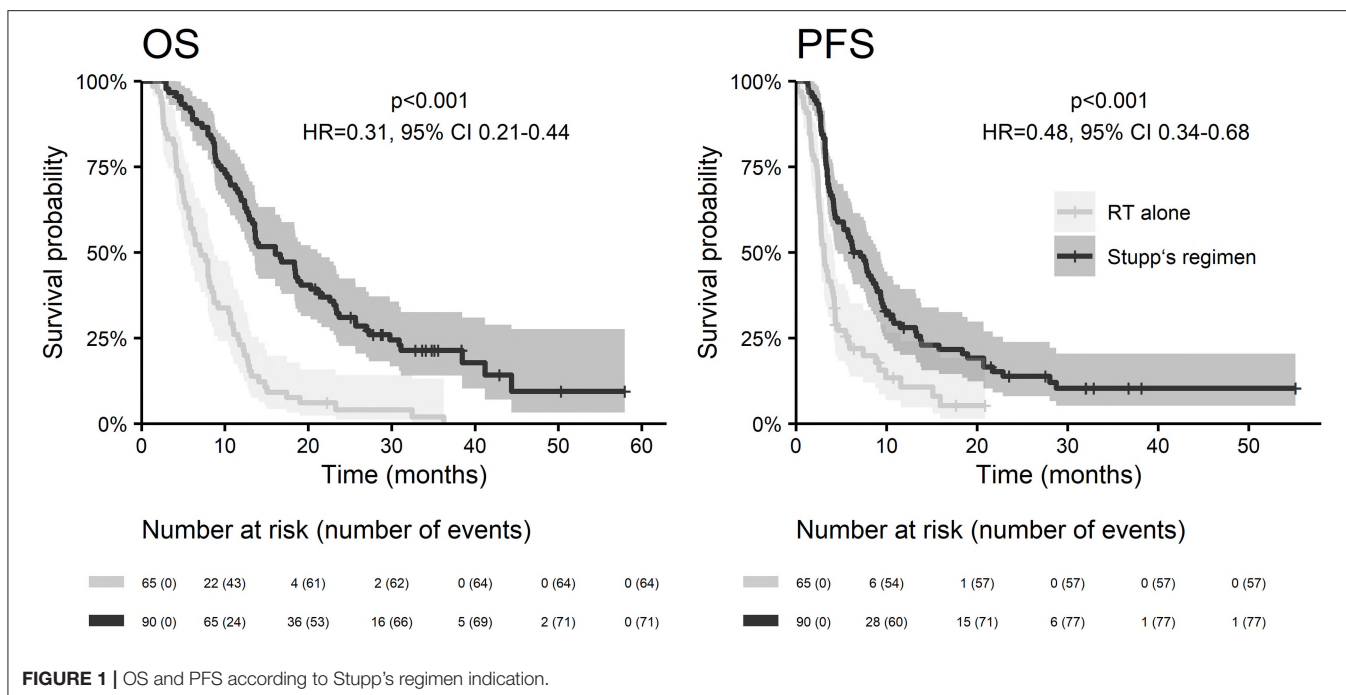
GBM, glioblastoma; CHT/RT, chemoradiotherapy; CHT, chemotherapy; RT, radiotherapy; NA, Not Available. \**p*-values < 0.05 are marked in bold.

therapy—volumetric modulated RT). Among patients who were not indicated to Stupp's regimen, the most common abbreviated schedule was 15 × 2.67 Gy (11/65; 17%) and 20 × 2.5 Gy (17/65; 26%). Stupp's regimen was indicated in 90/155 patients (58%). Only 31/90 (34%) patients finished the whole Stupp's protocol with all six cycles of adjuvant chemotherapy, 47/90 (52%) finished at least three cycles. More details about patients' treatment are summarized in **Table 2**.

With a median follow up of 34.8 months, the median PFS for the whole study cohort was 4.2 months and 2-year PFS 10%. Corresponding values for OS were 11.6 months and 19.8%. Treatment with Stupp's regimen was a strong positive prognostic factor with HR 0.31 ( $p < 0.001$ , median 16.0 vs. 7.1 months) and HR 0.48 ( $p < 0.001$ , median 6.7 vs. 3.1 months) for OS and PFS, respectively (**Figure 1**). Univariable analysis of prognostic factors for OS and PFS in the whole study cohort, Stupp's regimen cohort, and radiotherapy alone cohort is summarized in **Figure 2** and **Table 3**. In the whole cohort, the median OS of patients over 50 years was significantly shorter than that of younger patients (10.7 vs. 20.2 months; HR 2.31;  $p < 0.001$ ). Better OS was observed in patients after GTR (median 15.4 vs. 11.8 months; HR 0.54;  $p = 0.003$ ), those with better ECOG

score (median 13.6 vs. 10.3 vs. 5.8 months for ECOG 0, 1, 2 respectively;  $p < 0.001$ ), patients with contouring based on RTOG approach (median 14.0 vs. 10.7 months; HR 0.60;  $p = 0.005$ ) and patients without corticosteroids, as well as without deep brain tumor location (related to possibility to achieve GTR). No difference in OS and PFS was observed in our considered cohorts with respect to MGMT methylation status. The interval between surgery and the start of radiotherapy (median 6.7 weeks) was not prognostically significant ( $p = 0.825$  and 0.603 for OS and PFS, respectively). On the other hand, the presence of rapid early progression on planning MRI (in 46 patients out of 90 evaluable patients who had postsurgery MRI) was associated with significantly worse survival (median 10.7 vs. 18.7 months; HR 1.87;  $p = 0.007$ , 2-year OS 15.6 vs. 37.7%), **Figure 3**.

The best outcomes had patients, who were able to continue in adjuvant chemotherapy after chemoradiotherapy (median OS 23.3 months and 2-year survival of 43.9% in those who finished at least three cycles of adjuvant chemotherapy), **Figure 4**. Survival outcome was associated with adjuvant chemotherapy also after adjusting for age, extent of resection, and ECOG patient status (**Figure 5**).



In the subgroup of patients treated by Stupp's protocol, the age, deep brain tumor location, contouring approach, corticosteroids, and adjuvant chemotherapy were independently associated with OS and age, deep brain tumor location, and adjuvant chemotherapy were independently associated with PFS (Figure 6).

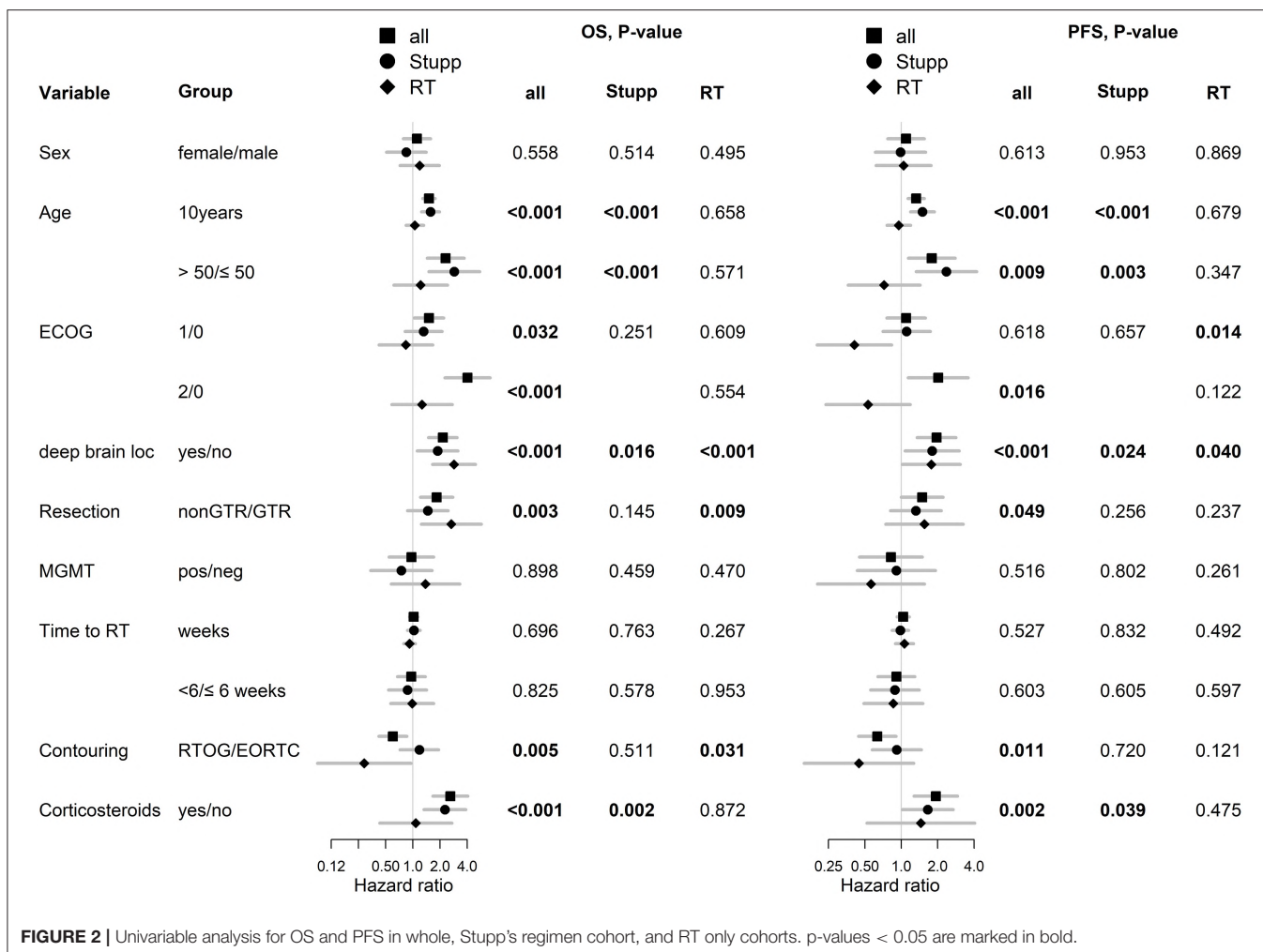
In comparison with 86 patients from historical control treated by "the same" Stupp's regimen, the positive trend in the increase of overall survival was observed (median OS 13.8 vs. 16.0 months), Table 4 (11). The hazard ratios (Stupp's regimen vs. RT alone) were adjusted for age, extent of resection, and ECOG patient status due to comparability with historical results (historical cohort and original Stupp's trial) (1, 11). Adjusted HRs in current cohort were 0.45 (95% CI: 0.27–0.75,  $p = 0.002$ ) and 0.55 (95% CI: 0.32–0.93,  $p = 0.025$ ) for OS and PFS, respectively.

## DISCUSSION

Remarkable improvement in overall survival after Stupp's regimen treatment was observed in recent years in comparison to the historical cohort treated a decade ago in our cancer center. Using the same treatment protocol in daily real-world practice, we observed improvement in median OS more than 2 months, with similar median PFS. Absence in PFS improvement may probably be due to the frequent unavailability of postoperative MRI examination 10 years ago. In the cohort of subsequently treated patients according to Stupp's regimen, postoperative MRI was performed in only 20% (17/86) of patients. The evaluation of the finding on the first MRI examination after completed radiotherapy was then very problematic. Progression was often closed according to the second MRI examination. Similar improvement in OS through decade was also observed

in reports from recent prospective randomized clinical trials where treatment in control study arm usually consisted of Stupp's regimen. However, care must be taken in comparison of survival data with respect to time of randomization (some of the recent clinical trials randomized patients after the end of chemoradiotherapy phase) (10, 13, 14). In the ACT IV study with rindopepimut, the median OS with Stupp's regimen alone (control arm) was 20.2 months (median 2.8 months from diagnosis to randomization + median 17.4 months from randomization to death) and in EF-14 with Optune median OS 19.8 months as discussed below (13, 14). Randomization in the EF-14 study (Stupp's regimen + Optune vs. Stupp's regimen alone) occurred after chemoradiotherapy was finished and only patients without progression of the disease were enrolled (92%), the remaining 8% of patients were excluded. Hypothetically, if the same proportion of patients with the worst prognosis (8%) were excluded from the Stupp's study EORTC 26981–22981/NCIC CE3, then the median OS of patients treated with Stupp's regimen would increase to around 16.5 months from randomization and to around 17.7 months from diagnosis. The difference in overall survival of 2–3 months is probably due to advances in diagnostic and treatment methods (20.2 months in ACT IV and 19.8 months in EF-14 vs. hypothetical 17.7 months in the Stupp's study) (10, 13, 14). The same improvement was also observed in our real-world cohort of patients treated outside of clinical trials.

The original Stupp's regimen (EORTC 26981–22981/NCIC CE3) was published already in 2005 and represents one of the most influencing prospective clinical trial in general (1). Indeed, the referred paper is unequivocally the most cited one (Publication Year 2005) in premium *the New England Journal of Medicine* journal. Only a few subsequent reports indicate so far possible improvements, mainly based on



trials focused on alternative temozolomide scheduling, as is prolonged administration to 12 or even more months (19). However, based on a meta-analysis of 4 randomized clinical trials comparing outcomes after six vs. more cycles adjuvant chemotherapy, no difference in OS was observed next to only slight improvement in PFS (19). Moreover, not every patient is actually able to finish in daily clinical practice the predefined 6 months of adjuvant treatment due to worsening clinical status or already progressing tumor. In our recent cohort, 52% (47/90) of patients were able to finish three and more cycles, and only 34% (31/90) completed six cycles of temozolomide (in original Stupp's cohort 47% of patients finished six cycles).

Neither other modern targeted therapies (bevacizumab, anti-EGFR inhibitors and antibodies, integrin inhibitors, anti-EGFR antibody conjugate, and deparuxizumab mafodotin cytostatics) have been able to improve the Stupp regimen (20–26). Similarly, immunotherapy with rindopepimut or the anti-PD-1 antibody nivolumab, which has been currently successful in a number of poorly treatable diagnoses, has not been successful (13).

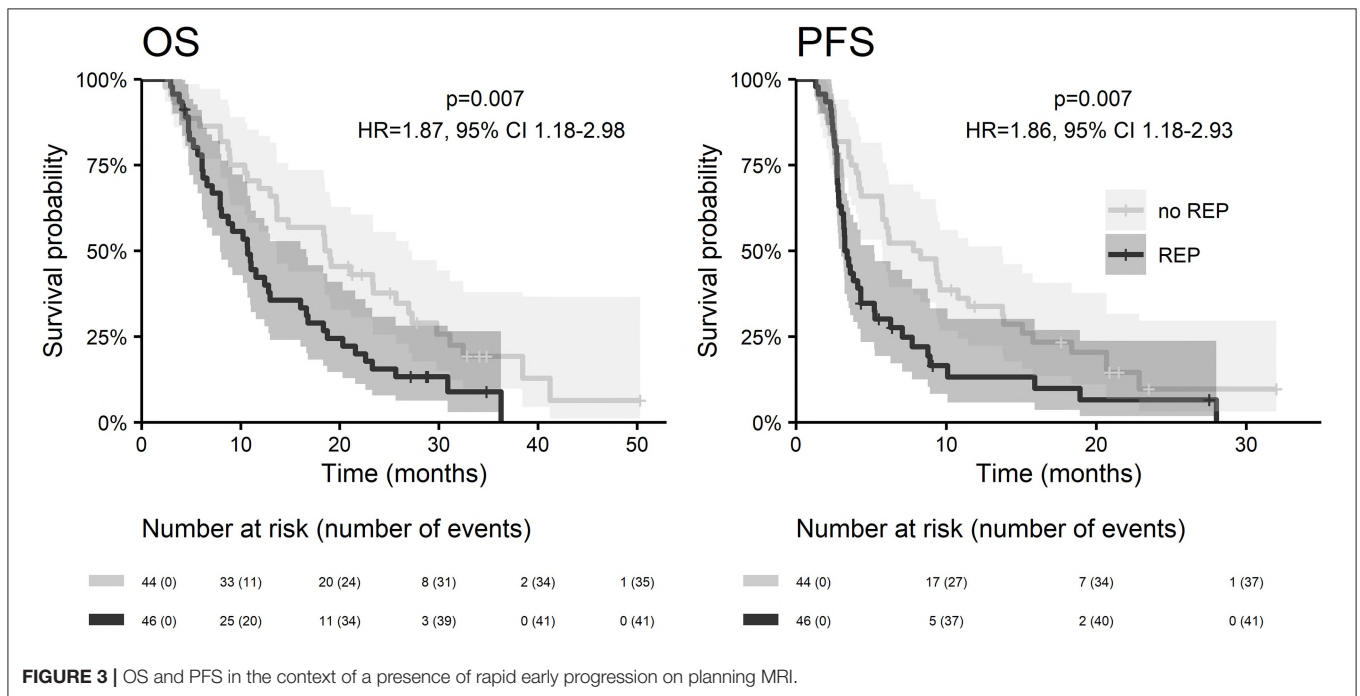
The only positive phase 3 clinical trial since 2005 that partially changed the glimpse of the treatment standard of newly diagnosed glioblastomas is the EF-14 study with Optune. The principle of treatment is based on the application of alternating current via Tumor Treating Fields to the tumor by means of electrodes adhered to the scalp, which prevent tumor cell mitosis (14, 27). Since treatment with TTF is not appropriate/accepted by and also available to every patient with glioblastoma, the Stupp's regimen should still be considered the gold standard (28). Similarly, intensification of chemotherapy in patients with MGMT methylation (lomustine + temozolomide combination) will probably not be a major breakthrough. The scheme is accepted with embarrassment, mainly because of concerns about a potential increase in toxicity (29).

The essential prerequisite for further optimization of treatment in daily clinical practice is the auto evaluation of own cohorts with comparison to published guidelines defining clinical trials. We performed the first major analysis of glioblastoma patients treated by the Stupp's regimen in 2011. At that time, patients treated in our cancer center achieved a similar median overall survival (13.8 vs. 14.6 months), the same 2-year survival

**TABLE 3 |** Univariable analysis for OS and PFS in whole, Stupp's regimen, and RT only cohorts.

| Variable        | Group       | OS               |                  |                  |                  |                  |                  |
|-----------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                 |             | All              |                  | Stupp's regimen  |                  | RT alone         |                  |
|                 |             | HR (95% CI)      | P-value*         | HR (95% CI)      | P-value*         | HR (95% CI)      | P-value*         |
| Sex             | Female/male | 1.11 (0.78–1.57) | 0.558            | 0.85 (0.51–1.40) | 0.514            | 1.19 (0.72–1.97) | 0.495            |
| Age             | 10 years    | 1.51 (1.28–1.76) | <b>&lt;0.001</b> | 1.57 (1.25–1.97) | <b>&lt;0.001</b> | 1.05 (0.84–1.31) | 0.658            |
|                 | >50/≤50     | 2.31 (1.44–3.69) | <b>&lt;0.001</b> | 2.87 (1.50–5.48) | <b>&lt;0.001</b> | 1.22 (0.61–2.42) | 0.571            |
| ECOG            | 1/0         | 1.51 (1.04–2.19) | <b>0.032</b>     | 1.32 (0.82–2.11) | 0.251            | 0.84 (0.42–1.66) | 0.609            |
|                 | 2/0         | 4.02 (2.27–7.14) | <b>&lt;0.001</b> | NA               | NA               | 1.26 (0.58–2.73) | 0.554            |
| Deep brain loc  | Yes/no      | 2.15 (1.49–3.08) | <b>&lt;0.001</b> | 1.88 (1.12–3.15) | <b>0.016</b>     | 2.85 (1.65–4.92) | <b>&lt;0.001</b> |
| Resection       | Non-GTR/GTR | 1.84 (1.22–2.77) | <b>0.003</b>     | 1.46 (0.87–2.45) | 0.145            | 2.66 (1.24–5.72) | <b>0.009</b>     |
| MGMT            | Pos/neg     | 0.96 (0.55–1.70) | 0.898            | 0.74 (0.34–1.63) | 0.459            | 1.38 (0.58–3.30) | 0.470            |
| Time to RT      | Weeks       | 1.02 (0.92–1.14) | 0.696            | 1.02 (0.87–1.20) | 0.763            | 0.92 (0.79–1.07) | 0.267            |
|                 | <6/≤6 weeks | 0.96 (0.67–1.37) | 0.825            | 0.87 (0.54–1.41) | 0.578            | 0.98 (0.57–1.70) | 0.953            |
| Contouring      | RTOG/EORTC  | 0.60 (0.42–0.86) | <b>0.005</b>     | 1.18 (0.72–1.93) | 0.511            | 0.29 (0.09–0.95) | <b>0.031</b>     |
| Corticosteroids | Yes/no      | 2.60 (1.67–4.05) | <b>&lt;0.001</b> | 2.26 (1.33–3.85) | <b>0.002</b>     | 1.08 (0.43–2.71) | 0.872            |
| <b>PFS</b>      |             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Sex             | Female/male | 1.09 (0.77–1.55) | 0.613            | 0.99 (0.61–1.59) | 0.953            | 1.04 (0.62–1.76) | 0.869            |
| Age             | 10 years    | 1.33 (1.14–1.55) | <b>&lt;0.001</b> | 1.50 (1.19–1.88) | <b>&lt;0.001</b> | 0.95 (0.76–1.19) | 0.679            |
|                 | >50/≤50     | 1.79 (1.15–2.79) | <b>0.009</b>     | 2.36 (1.33–4.20) | <b>0.003</b>     | 0.72 (0.36–1.43) | 0.347            |
| ECOG            | 1/0         | 1.10 (0.76–1.58) | 0.618            | 1.11 (0.71–1.74) | 0.657            | 0.41 (0.20–0.83) | <b>0.014</b>     |
|                 | 2/0         | 2.02 (1.14–3.57) | <b>0.016</b>     | NA               | NA               | 0.53 (0.24–1.18) | 0.122            |
| Deep brain loc  | Yes/no      | 1.96 (1.35–2.83) | <b>&lt;0.001</b> | 1.80 (1.07–3.01) | <b>0.024</b>     | 1.77 (1.02–3.08) | <b>0.040</b>     |
| Resection       | Non-GTR/GTR | 1.49 (1.00–2.22) | <b>0.049</b>     | 1.32 (0.82–2.14) | 0.256            | 1.56 (0.74–3.25) | 0.237            |
| MGMT            | Pos/neg     | 0.82 (0.45–1.49) | 0.516            | 0.91 (0.43–1.91) | 0.802            | 0.56 (0.20–1.55) | 0.261            |
| Time to RT      | Weeks       | 1.04 (0.92–1.17) | 0.527            | 0.98 (0.84–1.15) | 0.832            | 1.06 (0.89–1.26) | 0.492            |
|                 | <6/≤6 weeks | 0.91 (0.64–1.30) | 0.603            | 0.88 (0.56–1.41) | 0.605            | 0.86 (0.49–1.51) | 0.597            |
| Contouring      | RTOG/EORTC  | 0.63 (0.44–0.90) | <b>0.011</b>     | 0.92 (0.57–1.47) | 0.720            | 0.45 (0.16–1.27) | 0.121            |
| Corticosteroids | Yes/no      | 1.93 (1.28–2.92) | <b>0.002</b>     | 1.66 (1.02–2.68) | <b>0.039</b>     | 1.45 (0.52–4.05) | 0.475            |

OS, overall survival; PFS, progression free survival; RT, radiotherapy; NA, Not applicable; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; GTR, gross total resection; MGMT, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. \*p-values < 0.05 are marked in bold.



**FIGURE 3 |** OS and PFS in the context of a presence of rapid early progression on planning MRI.



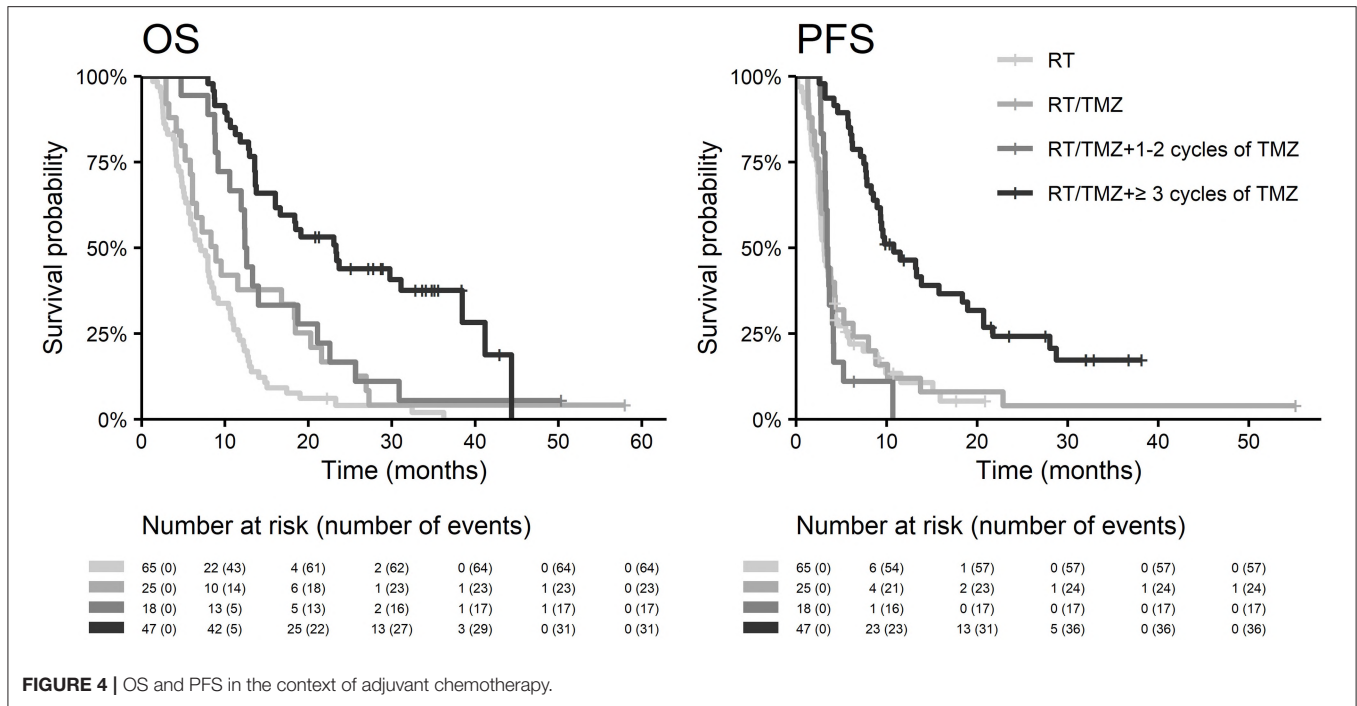


FIGURE 4 | OS and PFS in the context of adjuvant chemotherapy.

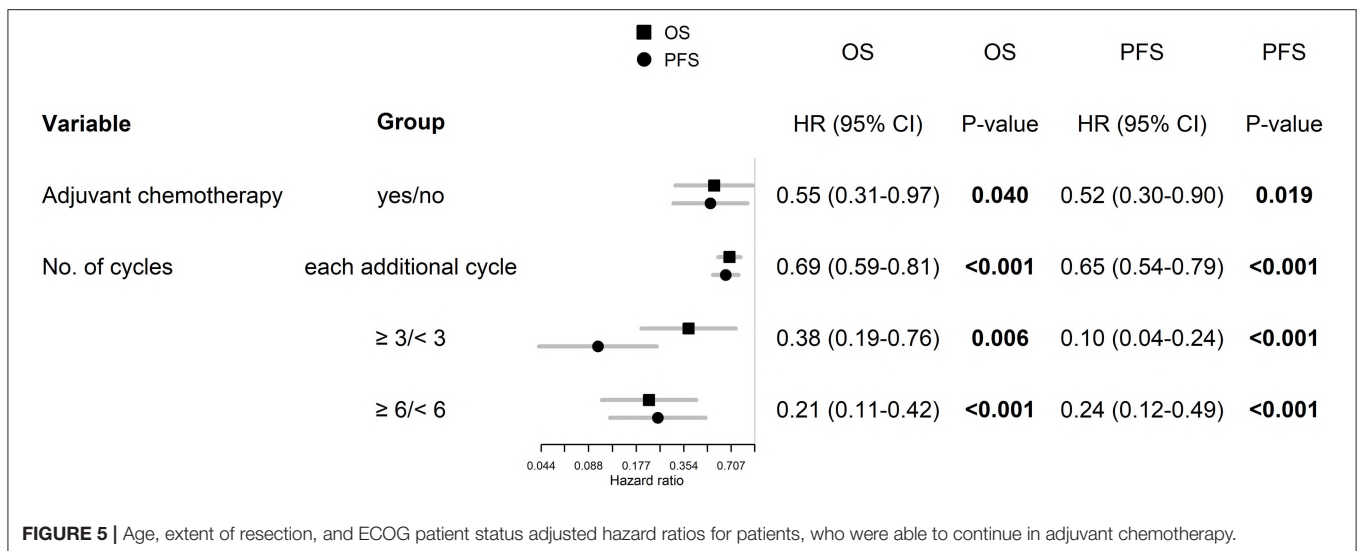
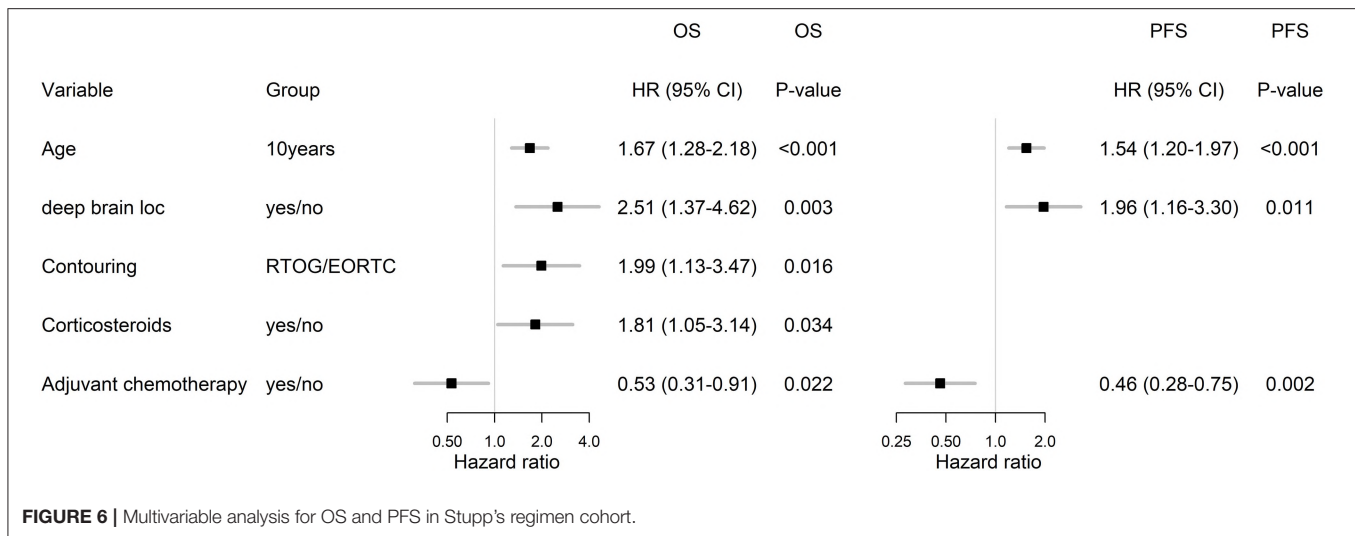


FIGURE 5 | Age, extent of resection, and ECOG patient status adjusted hazard ratios for patients, who were able to continue in adjuvant chemotherapy.

after surgery (28 vs. 27%), but lower 5-year survival (2 vs. 10%) compared to outcomes from original Stupp et al. trial (Table 4) (1, 11). In the recent evaluation of patients treated in 2014–2017, we confirmed the importance of known prognostic factors (except for MGMT methylation) and compared the overall survival to patients treated previously in 2003–2009 (86 patients). Similar to improvements observed in mentioned clinical trials, we also described increased survival in our cohort of patients treated outside of clinical trials (median overall survival increased from 13.8 to 16.0 months, the 2-year survival rate increased from 28 to 31% and 4-year survival increased from 2 to 10%), Table 4. This improvement in OS is also reflected by better

adjusted HR for treatment by Stupp regimen HR 0.45 (95% CI: 0.27–0.75,  $p = 0.002$ ) in comparison to that reported in original Stupp paper [HR 0.63 (95% CI: 0.52–0.75)  $p < 0.001$ ]. However, it should be acknowledged that the proportion of patients treated with adjuvant temozolomide increased significantly, mainly thanks to better toxicity management and improvements in general comprehensive cancer care. In the historical cohort, adjuvant chemotherapy after chemoradiotherapy was indicated in only 40% of patients, whereas in the current cohort it was already 72% (65/90), which is close to that in the Stupp and colleagues trial (78%) (1, 11). In addition, a subanalysis of 47 patients who underwent three or more cycles of adjuvant



**FIGURE 6 |** Multivariable analysis for OS and PFS in Stupp's regimen cohort.

**TABLE 4 |** Survival outcomes (months) in comparison with previous cohorts.

|                                  | CHT/RT<br>(MMCI 2014–2017)<br>n = 90 | CHT/RT<br>(MMCI 2003–2009)<br>n = 86 | CHT/RT<br>[Stupp trial (1)]<br>n = 287 |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Median follow up (months)        | 34.8                                 | NA                                   | 28                                     |
| <b>Overall survival</b>          |                                      |                                      |  |
| Median                           | 16.0                                 | 13.8                                 | 14.6                                   |
| 1-year                           | 65%                                  | 58%                                  | 61%                                    |
| 2-year                           | 31%                                  | 28%                                  | 27%                                    |
| 3-year                           | 21%                                  | 7%                                   | 16%                                    |
| 4-year                           | 10%                                  | 2%                                   | 12%                                    |
| 5-year                           | NA                                   | 2%                                   | 10%                                    |
| <b>Progression free survival</b> |                                      |                                      |  |
| Median                           | 6.7                                  | 7.8                                  | 6.9                                    |
| 1-year                           | 28%                                  | 32%                                  | 27%                                    |
| 2-year                           | 14%                                  | 9%                                   | 11%                                    |

OS, overall survival; PFS, progression free survival; CHT/RT, chemoradiotherapy; MMCI, Masaryk Memorial Cancer Institute; NA, Not Available.

temozolomide revealed a significant increase in overall survival to 23.3 months and nearly 44% of patients achieved 2-year OS. From these results, it is evident that the continuation of adjuvant temozolomide is crucial. Premature discontinuation of chemotherapy should be avoided due to unclear findings at the first MRI follow-up after chemoradiotherapy (30–34). Attention should be paid to the differential diagnosis of pseudoprogression, with cooperation of radiation oncologist and neuroradiologist (35) as well as with employment of advanced imaging methods. Definitely, some patients (including those in original Stupp and colleagues trial) developed pseudoprogression, and wrong discontinuation of chemotherapy affected their survival. We can only assume the same bias rate in both historical and current cohort and thus relatively low influence on the overall survival analysis.

In the current analysis, we also addressed the issue of rapid early recurrence at planning MRI and its effect on overall survival (evaluated strictly only in patients who underwent postoperative MRI). The incidence of rapid early progression was 51% high, what incidence is in accordance with recent publications (36–39). We confirmed its significant negative prognostic effect on overall survival and progression-free survival (Figure 3). More aggressive treatment of this especially risky group of patients warrants further interest in future clinical trials.

The inherent limitation of this study is its retrospective nature. On the other hand, the methodology to obtain data describing the truly real clinical experience must be retrospective in nature. Thus, this represents both the strength as well as the limitation of this single institution study unbiased by inter-center variability. Definitely, there are enormous unmeasurable biases in the way the patients were treated during a decade (extent of surgery, demographic features, etc.) and these are likely different in the two time cohorts. Even more biases would be in the case we would aim to compare results with original trial by Stupp et al. (1) (patients enrollment between 2000 and 2002; patients enrolled in many institutions in many countries; ability to recover after brain surgery and ability to achieve better performance status also thanks to safer neurosurgery). For these reasons, we focused mainly on a comparison of our own two cohorts, and mentioned differences were acknowledged in statistical methodology. Some results (for example effect of RT target volumes contouring strategy on OS and observation of association between OS and number of temozolomide cycles in the adjuvant phase) warrant further detailed evaluation.

## CONCLUSIONS

Age, performance status, extent of resection, the presence of rapid early recurrence before radiotherapy, MGMT gene promoter methylation, ability to finish concomitant chemoradiotherapy, and adjuvant chemotherapy significantly influence the prognosis of glioblastoma patients. According to an analysis of a recent group of patients treated outside of clinical trials with the Stupp's

regimen, we have shown a clear trend in extending overall survival over the last decade, despite the absence of a new treatment method. An important factor is the completion of the full Stupp's regimen. The most important is multidisciplinary cooperation and medical progress in both the area of diagnostics and individual treatment methods.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethical Committee, Masaryk Memorial Cancer Institute. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## REFERENCES

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. European organisation for research and treatment of cancer brain tumor and radiotherapy groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* (2005) 352:987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* (2009) 10:459–66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* (2005) 352:997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyl-transferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* (2008) 26:4189–99. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5964
- Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* (2008) 9:29–38. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70384-4
- Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N Engl J Med.* (2017) 376:1027–37. doi: 10.1056/NEJMoa1611977
- Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2012) 13:707–15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X
- Malmström A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2012) 13:916–26. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6
- Uhm JH, Porter AB. Treatment of glioma in the 21st century: an exciting decade of postsurgical treatment advances in the molecular era. *Mayo Clin Proc.* (2017) 92:995–1004. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.01.010
- Kazda T, Dziacky A, Burkon P, Pospisil P, Slavik M, Rehak Z, et al. Radiotherapy of glioblastoma 15 years after the landmark Stupp's trial: more controversies than standards? *Radiol Oncol.* (2018) 52:121–8. doi: 10.2478/raon-2018-0023

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: TK, MS, RJ, JS, OS, and PS. Data curation: IS, PP, PF, VV, and OS. Formal analysis: RL, TK, AP, JS, and LH. Funding acquisition: RL, TK, and MH. Investigation: RL, TK, RB, PF, RJ, KM, MH, JS, and OS. Methodology: RL, TK, IS, RB, and JS. Project administration: LH. Supervision: PS. Validation: IS, AP, and PP. Writing—original draft: RL, TK, and IS. Writing—review and editing: TK, MS, OS, and PS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported in part by the Ministry of Health, Czech Republic—Conceptual Development of Research Organization (MMCI 00209805). Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant AZV NU20-03-00148.

- Lakomy R, Fadrus P, Slampa P, Svoboda T, Kren L, Lzicarová E, et al. [Multimodal treatment of glioblastoma multiforme: results of 86 consecutive patients diagnosed in period 2003-2009]. *Klin Onkol.* (2011) 24:112–20. doi: 10.14735/amko2011112
- Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* (2011) 102:2186–90. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02092.x
- Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopemimut and temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2017) 18:1373–85. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X
- Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA.* (2017) 318:2306–16. doi: 10.1001/jama.2017.18718
- Sulman EP, Ismaila N, Armstrong TS, Sien C, Batchelor TT, Cloughesy T, et al. Radiation therapy for glioblastoma: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the American society for radiation oncology guideline. *J Clin Oncol.* (2017) 35:361–9. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7562
- Niyazi M, Brada M, Chalmers AJ, Combs SE, Erridge SC, Fiorentino A, et al. ESTRO-ACROP guideline “target delineation of glioblastomas.” *Radiother Oncol.* (2016) 118:35–42. doi: 10.1016/j.radonc.2015.12.003
- Chukwueke UN, Wen PY. Use of the response assessment in neuro-oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice. *CNS Oncol.* (2019) 8:CNS28. doi: 10.2217/cns-2018-0007
- R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: <https://www.R-project.org/>
- Blumenthal DT, Gorlia T, Gilbert MR, Kim MM, Burt Nabors L, Mason WP, et al. Is more better? The impact of extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of EORTC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro Oncol.* (2017) 19:1119–26. doi: 10.1093/neuonc/nox025
- Gilbert MR, Dignán JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* (2014) 370:699–708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573
- Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* (2014) 370:709–22. doi: 10.1056/NEJMoa1308345



22. Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, Stevens GH, et al. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* (2010) 98:93–9. doi: 10.1007/s11060-009-0067-2
23. Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, et al. A randomized, open label phase 3 trial of nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer.* (2015) 51:522–32. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.019
24. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2014) 15:1100–8. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1
25. Reardon DA, Lassman AB, van den Bent M, Kumthekar P, Merrell R, Scott AM, et al. Efficacy and safety results of ABT-414 in combination with radiation and temozolomide in newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* (2017) 19:965–75. doi: 10.1093/neuonc/now257
26. NIH U.S. National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov. *A Study of ABT-414 in Subjects with Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM) with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplification (Intellance1)*. Available online at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02573324> (Accessed December 1, 2019).
27. Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MDP, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvalli V, et al. Treatment of glioblastoma (GBM) with the addition of tumor-treating fields (TTF): a review. *Cancers (Basel).* (2019) 11:174. doi: 10.3390/cancers11020174
28. Wick W. TTFIELDS: where does all the skepticism come from? *Neuro Oncol.* (2016) 18:303–5. doi: 10.1093/neuonc/now012
29. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, et al. Phase III trial of CCNU/temozolomide (TMZ) combination therapy vs. standard TMZ therapy for newly diagnosed MGMT-methylated glioblastoma patients: the randomized, open-label CeTeG/NOA-09 trial. *Lancet.* (2019) 393:678–88. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31791-4
30. Kazda T, Bulik M, Pospisil P, Lakomy R, Smrcka M, Slampa P, et al. Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging. *Neuroimage Clin.* (2016) 11:316–21. doi: 10.1016/j.nicl.2016.02.016
31. Brandes AA, Tosoni A, Spagnoli F, Frezza G, Leonardi M, Calucci F, et al. Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: pitfalls in neurooncology. *Neuro Oncol.* (2008) 10:361–7. doi: 10.1215/15228517-2008-008
32. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol.* (2008) 26:2192–7. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8163
33. Topkan E, Topuk S, Oymak E, Parlak C, Pehlivan B. Pseudoprogression in patients with glioblastoma multiforme after concurrent radiotherapy and temozolomide. *Am J Clin Oncol.* (2012) 35:284–9. doi: 10.1097/COC.0b013e318210f54a
34. Parvez K, Parvez A, Zadeh G. The diagnosis and treatment of pseudoprogression, radiation necrosis and brain tumor recurrence. *Int J Mol Sci.* (2014) 15:11832–46. doi: 10.3390/ijms150711832
35. Belanova R, Sprlakova-Pukova A, Standara M, Janu E, Koukalova R, Kristek J, et al. *In silico* study of pseudoprogression in glioblastoma: collaboration of radiologists and radiation oncologists in the estimation of extent of high dose RT region. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* (2019). doi: 10.5507/bp.2019.039. [Epub ahead of print].
36. Wee CW, Kim E, Kim TM, Park CK, Kim JW, Choi SH, et al. Impact of interim progression during the surgery-to-radiotherapy interval and its predictors in glioblastoma treated with temozolomide-based radiochemotherapy. *J Neurooncol.* (2017) 134:169–75. doi: 10.1007/s11060-017-2505-x
37. Merkel A, Soeldner D, Wendl C, Urkan D, Kuramatsu JB, Seliger C, et al. Early postoperative tumor progression predicts clinical outcome in glioblastoma-implication for clinical trials. *J Neurooncol.* (2017) 132:249–54. doi: 10.1007/s11060-016-2362-z
38. Villanueva-Meyer JE, Han SJ, Cha S, Butowski NA. Early tumor growth between initial resection and radiotherapy of glioblastoma: incidence and impact on clinical outcomes. *J Neurooncol.* (2017) 134:213–9. doi: 10.1007/s11060-017-2511-z
39. Palmer JD, Bhamidipati D, Shukla G, Sharma D, Glass J, Kim L, et al. Rapid early tumor progression is prognostic in glioblastoma patients. *Am J Clin Oncol.* (2019) 42:481–6. doi: 10.1097/COC.0000000000000537

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Lakomy, Kazda, Selingerova, Poprach, Pospisil, Belanova, Fadrus, Vybihal, Smrcka, Jancalek, Hynkova, Muckova, Hendrych, Sana, Slaby and Slampa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

# Pre-Radiotherapy Progression after Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma: Corroboration of New Prognostic Variable

Radek Lakomy <sup>1,2</sup>, Tomas Kazda <sup>3,4,5,\*</sup>, Iveta Selingerova <sup>6</sup>, Alexandr Poprach <sup>1,2</sup>, Petr Pospisil <sup>3,4</sup>, Renata Belanova <sup>7,8</sup>, Pavel Fadrus <sup>9</sup>, Martin Smrcka <sup>9</sup>, Vaclav Vybihal <sup>9</sup>, Radim Jancalek <sup>10,11</sup>, Igor Kiss <sup>1,2</sup>, Katarina Muckova <sup>12</sup>, Michal Hendrych <sup>13</sup>, Andrea Knight <sup>14</sup>, Jiri Sana <sup>1,2,12</sup>, Pavel Slampa <sup>3,4</sup> and Ondrej Slaby <sup>5,15</sup>

- <sup>1</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; lakomy@mou.cz (R.L.); poprach@mou.cz (A.P.); kiss@mou.cz (I.K.); jiri.sana@mou.cz (J.S.)
  - <sup>2</sup> Department of Comprehensive Cancer Care, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
  - <sup>3</sup> Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; ppospisil@mou.cz (P.P.); slampa@mou.cz (P.S.)
  - <sup>4</sup> Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
  - <sup>5</sup> Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic; ondrej.slaby@ceitec.muni.cz
  - <sup>6</sup> Research Center for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; iveta.selingerova@mou.cz
  - <sup>7</sup> Department of Radiology, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic; belanova@mou.cz
  - <sup>8</sup> Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
  - <sup>9</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital Brno, and Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; fadrus.pavel@fnbrno.cz (P.F.); smrcka.martin@fnbrno.cz (M.S.); vybihal.vaclav@fnbrno.cz (V.V.)
  - <sup>10</sup> Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, 656 91 Brno, Czech Republic; radim.jancalek@fnusa.cz
  - <sup>11</sup> Department of Neurosurgery, St. Anne's University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
  - <sup>12</sup> Department of Pathology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; muckova.katarina@fnbrno.cz
  - <sup>13</sup> First Department of Pathology, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, 656 91 Brno, Czech Republic; michal.hendrych@fnusa.cz
  - <sup>14</sup> Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Gamma Delta T Cell Laboratory, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; knight@med.muni.cz
  - <sup>15</sup> Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
- \* Correspondence: tomas.kazda@mou.cz

Received: 31 July 2020; Accepted: 3 September 2020; Published: 5 September 2020



**Abstract:** Background: The aim of this retrospective study is to assess the incidence, localization, and potential predictors of rapid early progression (REP) prior to initiation of radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients and to compare survival outcomes in cohorts with or without REP in relation to the treatment. Methods: We assessed a consecutive cohort of 155 patients with histologically confirmed irradiated glioblastoma from 1/2014 to 12/2017. A total of 90 patients with preoperative, postoperative, and planning MRI were analyzed. Results: Median age 59 years, 59% men, and 39 patients (43%) underwent gross total tumor resection. The Stupp regimen was indicated to 64 patients (71%); 26 patients (29%) underwent radiotherapy alone. REP on planning MRI performed shortly prior to radiotherapy was found in 46 (51%) patients, most often within the

surgical cavity wall, and the main predictor for REP was non-radical surgery ( $p < 0.001$ ). The presence of REP was confirmed as a strong negative prognostic factor; median overall survival (OS) in patients with REP was 10.7 vs. 18.7 months and 2-year survival was 15.6% vs. 37.7% (hazard ratio HR 0.53 for those without REP;  $p = 0.007$ ). Interestingly, the REP occurrence effect on survival outcome was significantly different in younger patients ( $\leq 50$  years) and older patients ( $> 50$  years) for OS ( $p = 0.047$ ) and non-significantly for PFS ( $p = 0.341$ ). In younger patients, REP was a stronger negative prognostic factor, probably due to more aggressive behavior. Patients with REP who were indicated for the Stupp regimen had longer OS compared to radiotherapy alone (median OS 16.0 vs 7.5; HR = 0.5,  $p = 0.022$ ; 2-year survival 22.3% vs. 5.6%). The interval between surgery and the initiation of radiotherapy were not prognostic in either the entire cohort or in patients with REP. Conclusion: Especially in the subgroup of patients without radical resection, one may recommend as early initiation of radiotherapy as possible. The phenomenon of REP should be recognized as an integral part of stratification factors in future prospective clinical trials enrolling patients before initiation of radiotherapy.

**Keywords:** glioblastoma; chemotherapy; radiotherapy; rapid early progression; overall survival

---

## 1. Introduction

The Stupp regimen is still the standard of care for patients with newly diagnosed glioblastoma, with only a few reports indicating possible improvement in the past decade [1,2]. Apart from the possible role of tumor treating fields [3], the update in treatment guidelines was mainly related to modifications of already known procedures (abbreviated chemoradiotherapy, or combination of temozolomide and lomustine) [4,5]. Prognostic and predictive biomarkers guide the indication for optimal treatment. Besides classical clinical prognosticators, biomarkers such as promoter methylation of the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene or isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 and 2 mutations moved into daily practice and became an integral part of diagnosis [6–9]. With the long-lasting lack of new effective therapeutics, further biomarkers for a suitable indication of the currently used modifications of temozolomide-based chemoradiotherapy are one way to improve the care of these patients.

The phenomenon of postoperative rapid early progression (REP) has only recently been explored with increasingly available magnetic resonance imaging (MRI) for both postsurgery and pre-radiotherapy (pre-RT) indication and is currently of high interest. REP diagnosis is based on a comparison of early postoperative MRI findings (up to 72 h postoperatively) and planning pre-RT MRI. Only a few studies retrospectively evaluated REP and indicated almost up to 50% risk of development of REP, regardless of the waiting time until the start of radiotherapy (RT) [10–12]. Clearly, these patients biased previous clinical trials, where no routine pre-RT MRI examination was performed. Currently, the treatment of these patients is not different from patients without REP, and if so, it is a purely individual approach.

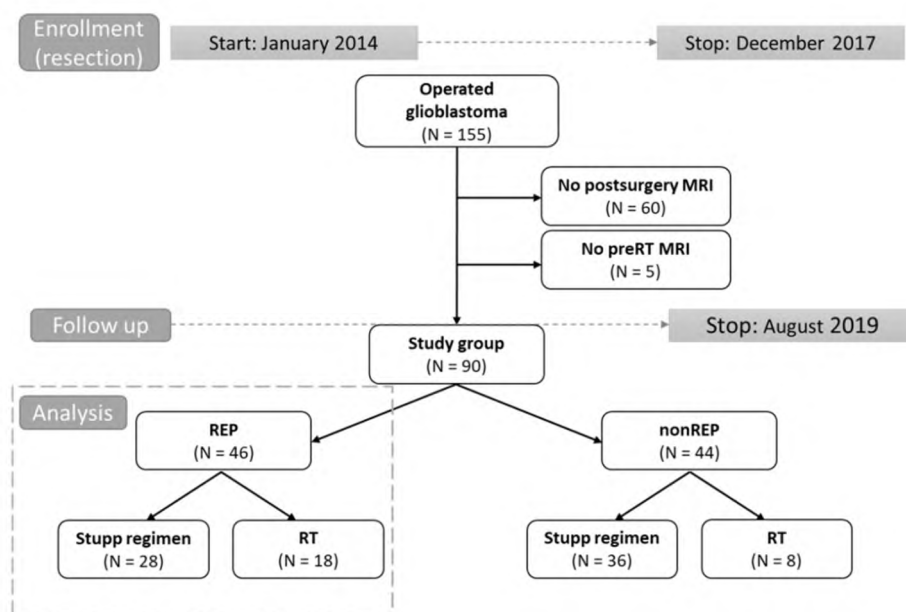
The aim of this retrospective study is to evaluate the incidence and localization of REP in a consecutive cohort of patients treated, out of the frame of clinical trials (real-world evidence data). The aim is also to describe clinical factors associated with REP in glioblastoma and to describe the effect of REP and treatment on survival.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients and Treatment

A consecutive cohort of 155 histologically confirmed glioblastoma patients, who were indicated via a multidisciplinary neuro-oncology board to adjuvant or palliative radiotherapy between 01/2014 and 12/2017, were screened for eligibility to this retrospective study (Figure 1). All patients were

treated outside of clinical trials. Those with available early postoperative MRI (up to 72 h) evaluating the extent of surgery and those who had also performed pre-RT MRI were eligible for assessment of REP. The subgroup of patients who were indicated for the treatment according to the Stupp regimen was further analyzed in more detail. All patients signed standard informed consent to treatment and consent to processing their data for scientific purposes in a pseudonymized form. The study was approved by Institutional Review Board No. 2020/1206/MOU, JID: 315 453, approved on day month year.



**Figure 1.** Design of study (flow chart). Grey dot line: time to study enrolment and follow up, respectively. Black line arrows: division into parts. Grey dot line box: cohort analyzed in more details.

Clinical and imaging data were retrieved from electronic medical records for further statistical analysis. Radiotherapy was performed in all patients. Planning pre-RT MRI (including postcontrast T1 weighted scan with submillimeter slices) was rigidly registered to planning CT scan for proper RT target and organs-at-risk definition. Individual prescription of RT dose and scheduling was guided mainly by the patient's performance status and by volume, size, shape, and location of the target volume. Both standard of care approaches in target volume definitions were employed in patients eligible for treatment by the Stupp regimen (60 Gy in 30 fractions), the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG contouring approach) that defines two clinical target volumes accommodating hyperintensity at T2/FLAIR MRI in addition to T1 contrast-enhanced MRI [13], and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC single-phase contouring approach) that defines one target utilizing mainly T1 post-contrast MRI [14]. In patients with REP, the single target EORTC approach was preferably performed. The RT plan was prepared employing the treatment planning system Eclipse™ (Varian medical systems, Palo Alto, CA, USA) and delivered on linear accelerators Varian Clinac iX or TrueBeam (Varian medical systems, Palo Alto, CA, USA). Abbreviated RT courses (for example, 15 × 2.7 or 10 × 3.4 Gy) were indicated according to the treating physician, reflecting the individual patient's performance status and disease.

Concurrent chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy were prescribed according to the original Stupp protocol [1]. Temozolomide (75 mg/m<sup>2</sup>) was administered on days 1 through 42 with concurrent RT (60 Gy). After 4 weeks, treatment was followed by the administration of temozolomide alone (150 to 200 mg/m<sup>2</sup>) on days 1–5 in six consecutive 4-week cycles or to progression. The prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia was at the discretion of the treating physician. In patients with an abbreviated course of RT, concurrent chemotherapy was usually not indicated and was initiated

after the end of RT based on the patient's actual performance status. Treatment at progression was very individualized, with options for resurgery, reirradiation, temozolomide rechallenge, palliative chemotherapy (mostly lomustine), or symptomatic treatment.

## 2.2. Imaging Evaluation

All diagnostic MRIs were evaluated by two independent radiologists as part of the standard of care in our institution. In the case of discordance, patients were referred to the discussion on the neuro-oncology tumor board as well. Response to treatment was evaluated based on regular follow up MRI scanning. The first post (chemo) radiotherapy MRI was usually performed 4–6 weeks after the last RT session, followed by regular MRI every 3 months unless clinically indicated for earlier examination. No routine RANO criteria [15] were employed and MRI was visually evaluated by the servicing radiologist. Unclear findings (as was suspected pseudoprogression) were reviewed by a multidisciplinary neuro-oncology board, mostly with recommendations for earlier control exams with or without the change of treatment or with suggestions for advanced MRI methods [16].

The pre-RT MRI was retrospectively evaluated by an experienced radiation oncologist (TK) and doublechecked by a neuroradiologist (RB). Progression already presented on planning MRI was considered only in patients who had available early postsurgery (within 72 h) control MRI enabling a clear definition of eventual postsurgery residual disease. Criteria for REP were as follows: (1) increase in postsurgery residual disease (T1 weighted post contrast MRI) for  $\geq 25\%$  in any dimension; (2) occurrence of a new enhancing lesion; (3) unambiguous progression of enhancing lesion (in multifocal glioblastomas where only some nodules were amenable to surgery). The localization of REP was categorized as follows: (1) progression of postsurgery residuum; (2) new enhancing satellite; (3) new enhancement in the wall of resection cavity; or (4) progression of tumor which was not operated on in patients with multicentric tumors.

## 2.3. Statistical Analysis

Patient and treatment characteristics were described using standard summary statistics, i.e., median and interquartile range (IQR) for continuous variables and frequency distributions for categorical variables. The comparison of these characteristics in patients with and without the occurrence of REP was performed using Fisher's exact test, a chi-squared test, or a Mann–Whitney test, as appropriate. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were considered as survival outcome. OS was defined as the time from the date of neurosurgery resection to the date of death from tumor cause. PFS was defined as the time from the date of initiation of RT until progression or death from tumor cause. Survival probabilities were calculated by the Kaplan–Meier method. Survival curves were compared using the log-rank test. The Cox proportional hazard model was used to perform the univariable and multivariable analysis. The proportional hazard assumption was verified based on scaled Schoenfeld residuals. Stepwise backward selection was performed to obtain characteristics independently associated with OS and PFS. Stratified models were used for the assessment of the effect of treatment or age in patients with and without the occurrence of REP. All statistical analyses were performed employing R version 4.0.0 [17], and the significance level of 0.05 was considered.

## 3. Results

### 3.1. Patients Characteristics

A total of 155 patients who were indicated for postoperative oncology treatment were screened for eligibility, and 90/155 (58%) met the inclusion criteria and had undergone both postsurgery as well as pre-RT MRI (Figure 1). The median age was 59 years, with 23% of patients being younger than 50 years. Gross total resection (GTR) was achieved in 39/90 (43%) patients, and 34/90 (38%) were in excellent overall performance status with Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status 0. MGMT methylation was present in 26% and IDH mutation in 8% of patients (total of 53 evaluated



patients). The subgroup of 64 patients (64/90; 71%) was indicated for concurrent chemoradiotherapy and was further analyzed in detail. The other patients' diagnostic and treatment characteristics are summarized in Table 1; Table 2.

**Table 1.** Basic patients' characteristics of cohort with REP and non-REP.

| Study Cohort<br>( <i>n</i> = 90)                         | All                  | REP                  | Non-REP              | <i>p</i> -Value  |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| No. of patients  | 90 (100%)            | 46 (51%)             | 44 (49%)             |                  |
| <b>Age (years)</b>                                       |                      |                      |                      |                  |
| median (IQR)   | 59.3<br>(51.1, 65.2) | 60.0<br>(52.2, 67.8) | 57.1<br>(50.6, 63.5) | <i>p</i> = 0.180 |
| ≤50  | 21 (23%)             | 10 (22%)             | 11 (25%)             | <i>p</i> = 0.805 |
| <b>Men</b>   | 53 (59%)             | 27 (59%)             | 26 (59%)             | <i>p</i> > 0.999 |
| <b>Performance status (ECOG)<br/>and Karnofsky index</b> |                      |                      |                      |                  |
| ECOG 0 (KI 90–100%)                                      | 34 (38%)             | 17 (37%)             | 17 (39%)             | <i>p</i> = 0.868 |
| ECOG 1 (KI 70–80%)                                       | 49 (54%)             | 26 (57%)             | 23 (52%)             |                  |
| ECOG 2 (KI 50–60%)                                       | 7 (8%)               | 3 (7%)               | 4 (9%)               |                  |
| <b>Tumor location</b>                                    |                      |                      |                      |                  |
| deep brain location                                      | 21 (23%)             | 14 (30%)             | 7 (16%)              | <i>p</i> = 0.136 |
| <b>Extent of resection</b>                               |                      |                      |                      |                  |
| GTR  | 39 (43%)             | 10 (22%)             | 29 (66%)             | <i>p</i> < 0.001 |
| STR  | 44 (49%)             | 31 (67%)             | 13 (30%)             |                  |
| Partial resection or biopsy                              | 7 (8%)               | 5 (11%)              | 2 (5%)               |                  |
| <b>Extent of resection</b>                               |                      |                      |                      |                  |
| GTR  | 39 (43%)             | 10 (22%)             | 29 (66%)             | <i>p</i> < 0.001 |
| Non-GTR  | 51 (57%)             | 36 (78%)             | 15 (34%)             |                  |
| <b>IDH status</b>  |                      |                      |                      |                  |
| Mutated/evaluated  | 4/53 (8%)            | 1/24 (4%)            | 3/29 (10%)           |                  |
| <b>MGMT status</b>                                       |                      |                      |                      |                  |
| Methylated/evaluated                                     | 14/53 (26%)          | 6/23 (26%)           | 8/30 (27%)           | <i>p</i> > 0.999 |
| <b>Localization of REP</b>                               |                      |                      |                      |                  |
| Postsurgery residuum                                     |                      | 31/46 (67%)          |                      |                  |
| New enhancing satellite                                  |                      | 6/46 (13%)           |                      |                  |
| New enhancement in the wall<br>of resection cavity       |                      | 22/46 (48%)          |                      |                  |
| Not operated tumor in<br>multicentric tumors             |                      | 10/46 (22%)          |                      |                  |

Abbreviations: REP—rapid early progression; ECOG—Eastern Cooperative Oncology Group; GTR—gross total resection; non-GTR—non gross total resection; STR—subtotal resection; MGMT—O6-methylguanine-DNA-methyltransferase; IDH—Isocitrate dehydrogenase; IQR—interquartile ratio.

Table 2. Patients' treatment.

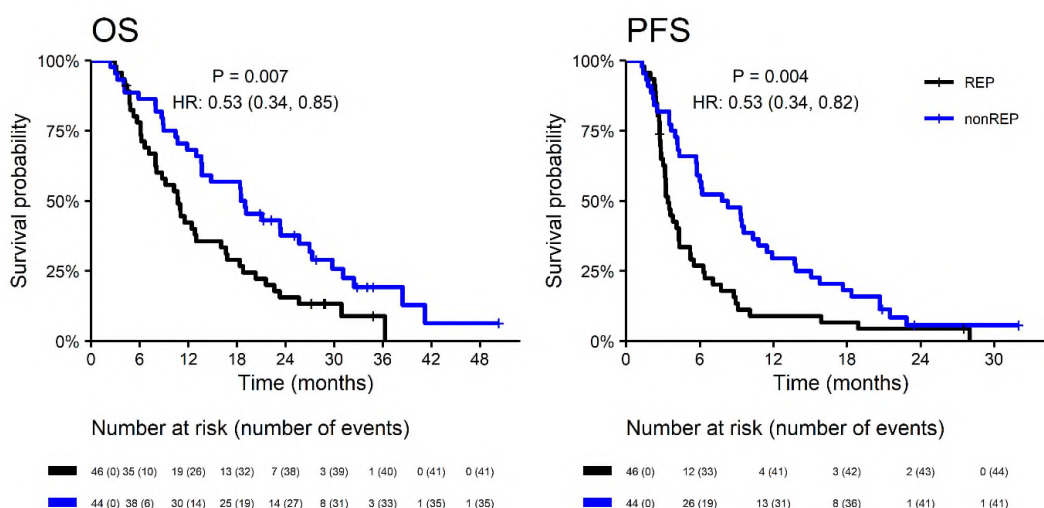
| Study Cohort<br>(n = 90)                     | All<br>(n = 90) | REP<br>(n = 46) | Non-REP<br>(n = 44) | p-Value   |
|--|-----------------|-----------------|---------------------|-----------|
| <b>Time to RT initiation</b>                 |                 |                 |                     |           |
| Median (weeks; IQR)                          | 6.7 (5.9, 7.3)  | 6.6 (5.9, 7.1)  | 6.8 (5.8, 7.5)      | p = 0.981 |
| >6 weeks                                     | 56 (62%)        | 28 (61%)        | 28 (64%)            | p = 0.830 |
| <b>Radiotherapy</b>                          |                 |                 |                     |           |
| RT technique IMRT                            | 89 (99%)        | 46 (100%)       | 43 (98%)            |           |
| RT technique other                           | 1 (1%)          | 0 (0)           | 1 (2%)              |           |
| median dose (Gy; IQR)                        | 60 (50, 60)     | 60 (43, 60)     | 60 (60, 60)         | p = 0.024 |
| pts. receiving ≥ 90% of<br>prescribed dose   | 82 (91%)        | 43 (93%)        | 39 (89%)            | p = 0.480 |
| contouring approach EORTC                    | 46 (51%)        | 30 (65%)        | 16 (36%)            | p = 0.011 |
| contouring approach RTOG                     | 43 (48%)        | 16 (35%)        | 27 (62%)            |           |
| contouring unknown                           | 1/90 (1%)       | 0/46 (0)        | 1/44 (2%)           |           |
| <b>Chemoradiotherapy (Stupp<br/>regimen)</b> |                 |                 |                     |           |
| No. of patients                              | 64 (71%)        | 28 (61%)        | 36 (82%)            | p = 0.037 |
| median (days; IQR)                           | 42 (30, 45)     | 41.5 (23, 43)   | 43 (39, 46)         | p = 0.095 |
| corticosteroids use                          | 62 (69%)        | 35 (76%)        | 27 (61%)            | p = 0.151 |
| <b>Adjuvant chemotherapy</b>                 |                 |                 |                     |           |
| No. of patients                              | 43 (48%)        | 16 (35%)        | 27 (61%)            | p = 0.020 |
| No. of cycles: median (IQR)                  | 4.5 (2, 6)      | 3.5 (1, 6)      | 5 (3, 6)            | p = 0.242 |
| No. of cycles: ≥ 3                           | 32/43 (74%)     | 8/16 (50%)      | 24/27 (89%)         | p = 0.016 |
| No. of cycles: ≥ 6                           | 21/43 (49%)     | 7/16 (44%)      | 14/27 (52%)         | p = 0.761 |
| <b>Treatment after progression</b>           |                 |                 |                     |           |
| No. of patients                              | 42              | 22              | 20                  | p > 0.999 |
| surgery                                      | 7 (17%)         | 4 (18%)         | 3 (15%)             |           |
| surgery + chemoradiotherapy                  | 1 (2%)          | 0 (0)           | 1 (5%)              |           |
| surgery + chemotherapy                       | 8 (19%)         | 2 (9%)          | 6 (30%)             |           |
| chemotherapy                                 | 18 (43%)        | 13 (59%)        | 5 (25%)             |           |
| reirradiation                                | 6 (14%)         | 2 (9%)          | 4 (20%)             |           |
| reirradiation + chemotherapy                 | 2 (5%)          | 1 (5%)          | 1 (5%)              |           |

Abbreviations: IQR—interquartile ratio; IMRT—intensity modulated radiotherapy; EORTC—European Organization for Research and Treatment of Cancer; RTOG—Radiation Therapy Oncology Group; GBM—glioblastoma; CHT/RT—chemoradiotherapy; CHT—chemotherapy; RT—radiotherapy.

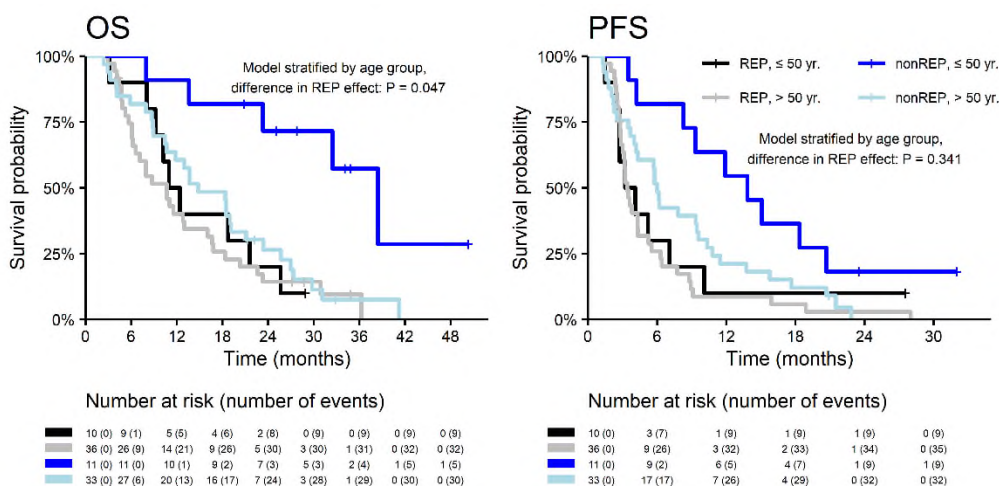
### 3.2. Rapid Early Progression

REP was presented in 46 out of 90 evaluated patients (51%). In the majority of patients, REP was presented as a progression of postsurgery residuum (31/46; 67%) or as a new enhancement in the wall of the resection cavity (22/46; 48%). Only 6/46 (13%) REP presented by a new enhancing lesion and 10/46 (22%) by the progression of the tumor, which was not operated on in patients with multicentric tumors. The occurrence of REP was significantly associated with the extent of resection (78% of patients with REP vs. 34% of patients without REP, after non-radical resection;  $p < 0.001$ ). The other evaluated pre-RT diagnostic variables (age, sex, performance status, etc.) were not significantly associated with the development of REP (Table 1).

With a median follow up (measured from neurosurgery resection) of 34.1 months, the median OS was significantly longer in patients without REP (18.7 vs. 10.7 months; HR 0.53;  $p = 0.007$ ) with corresponding 2-year survival 37.7% vs. 15.6%. A similar effect was observed for PFS (Figure 2). Interestingly, the REP occurrence effect on survival outcome is significantly different in younger patients ( $\leq 50$  years) and older patients ( $> 50$  years) for OS ( $p = 0.047$ ) and non-significantly for PFS ( $p = 0.341$ ). In younger patients ( $\leq 50$  years), REP occurrence is a negative prognostic factor, probably in relation to more aggressive glioblastoma behavior at a younger age (Figure 3).



**Figure 2.** Overall survival and progression-free survival in patients with REP vs. non-REP. OS—overall survival; PFS—progression free survival; HR—hazard ration; REP—rapid early progression.



**Figure 3.** Overall survival and progression-free survival in patients with REP and non-REP in relation to age.

Indication to concurrent chemoradiotherapy (the Stupp regimen) was more common in the subgroup without REP (82% vs. 61%;  $p = 0.037$ ), as was summarized in Table 2. OS and PFS were significantly better in patients indicated for the Stupp regimen in both subgroups with and without REP (Figure 4). The median OS of patients with REP who were indicated for the Stupp regimen was 16.0 (2-year OS 22.3%). The median OS of patients treated by RT alone was 7.5 months (2-year OS 5.6%) (Table 3). The model stratified by REP showed a 50% lower risk of death, and a 37% lower risk of progression in patients indicated concurrent chemoradiotherapy (OS: HR = 0.5,  $p = 0.007$ ; PFS: HR = 0.63,  $p = 0.060$ ).

The median time to initiation of radiotherapy was 6.7 weeks and was similar in both groups of patients (6.6 vs. 6.8 weeks in patients with and without REP, respectively). In the REP subgroup, both OS and PFS were similar in patients undergoing RT within six weeks after resection as in patients with a longer initiation time (Figure 5). Target definition for radiotherapy planning according to EORTC (the one same target for the whole course of RT) was more commonly employed in the subgroup of patients with REP (65%) vs. in patients without REP (36%;  $p = 0.011$ ). Nevertheless, the OS of patients with REP did not differ with respect to contouring strategy (HR 0.9 for RTOG vs. EORTC;  $p = 0.824$ ).

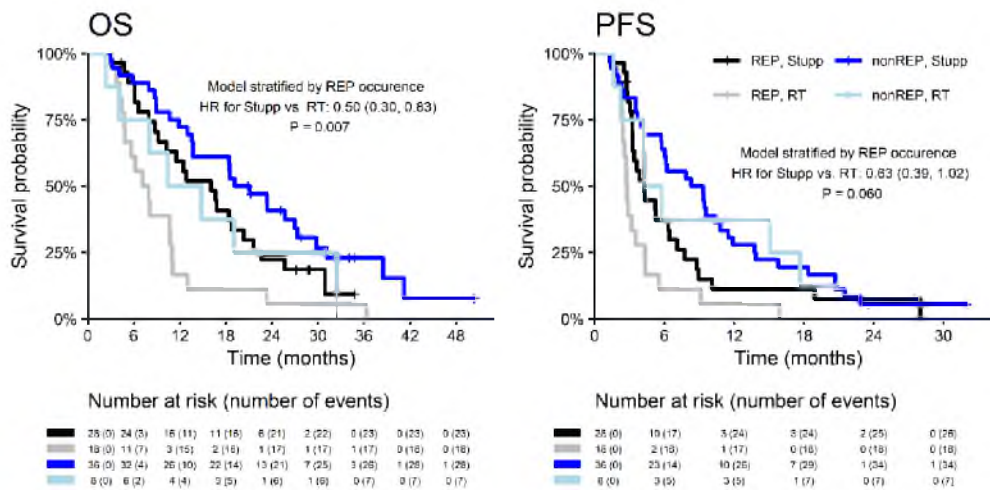


Figure 4. Survival outcomes of patients with REP and non-REP in relation to the treatment.

Table 3. Survival outcomes in patients with REP and non-REP in relation to the treatment.

|                                  | REP<br>(n = 46)                  |                  | Non-REP<br>(n = 44)              |                    |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|--------------------|
|                                  | Stupp regimen<br>(n = 28)        | RT<br>(n = 18)   | Stupp regimen<br>(n = 36)        | RT<br>(n = 8)      |
|                                  | Median follow up 31.9 (28.7, NA) |                  | Median follow up 34.1 (32.9, NA) |                    |
| <b>Overall survival</b>          |                                  |                  |                                  |                    |
| Median (months)                  | 16.0 (10.2, 21.6)                | 7.5 (4.8, 11.0)  | 20.1 (13.6, 29.8)                | 12.6 (8.0, NA)     |
| 1-year                           | 59.3 (43.4, 81.1)                | 16.7 (5.9, 46.8) | 72.2 (59.0, 88.4)                | 50.0 (25.0, 100.0) |
| 2-year                           | 22.3 (11.0, 45.1)                | 5.6 (0.8, 37.3)  | 40.8 (27.3, 60.9)                | 25.0 (7.5, 83.0)   |
| 3-year                           | 9.3 (1.9, 45.7)                  | 5.6 (0.8, 37.3)  | 22.9 (11.9, 44.1)                | 0.0 (NA, NA)       |
| <b>Progression-free survival</b> |                                  |                  |                                  |                    |
| Median (months)                  | 4.1 (3.2, 7.1)                   | 2.8 (2.4, 4.3)   | 8.8 (5.8, 11.5)                  | 5.0 (4.2, NA)      |
| 1-year                           | 11.2 (3.8, 32.4)                 | 5.6 (0.8, 37.3)  | 27.8 (16.4, 47.0)                | 37.5 (15.3, 91.7)  |
| 2-year                           | 7.4 (2.0, 28.2)                  | 0.0 (NA, NA)     | 5.6 (1.4, 21.4)                  | 12.5 (2.0, 78.2)   |

Abbreviations: REP—rapid early progression; Stupp regimen—concomitant chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide; RT—radiotherapy; NA—Not Available.

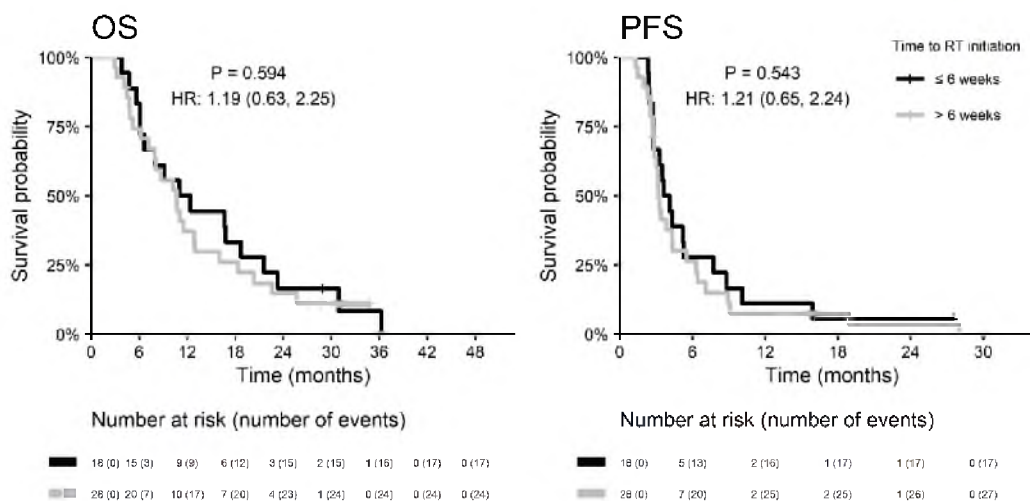


Figure 5. Survival outcomes of patients with REP in relation to the start of radiotherapy.

Based on univariable analysis of 46 patients with REP, the lower overall performance status (the median OS 16.8 vs. 11.0 vs. 5.8 months in patients with ECOG 0 vs. 1 vs. 2;  $p = 0.011$ ), and indication to concurrent chemoradiotherapy (HR 0.50;  $p = 0.022$  for OS) was positively associated with OS and PFS (Figure 6). REP presented as a progression of postsurgery residuum was a negative prognostic factor of OS with the borderline level of statistical significance (HR 1.9;  $p = 0.068$ ). Deep brain tumor location was a significant negative prognostic factor for PFS (HR 2.4;  $p = 0.014$ ), but not for OS (HR 1.0;  $p = 0.948$ ). The other prognostic variables (age, sex, the extent of resection, MGMT status, the location of REP) were not significant in the univariable analysis (Figure 6). IDH mutation was not evaluated in a univariable analysis due to low numbers of positive patients. According to the multivariable analysis of patients with REP (Table 4), the extent of resection and Stupp regimen are independently associated with OS, and performance status and deep brain tumor location are independently associated with PFS.

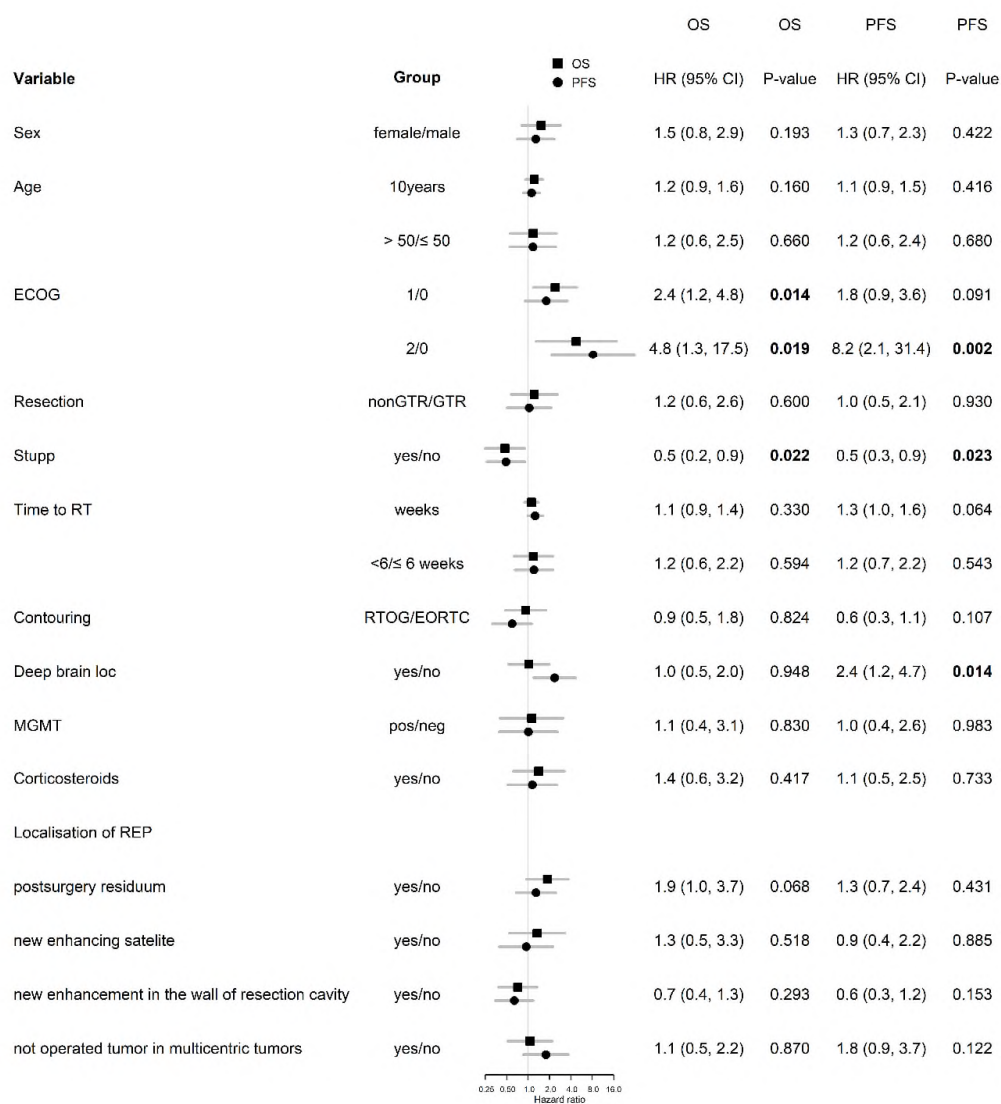


Figure 6. Univariable analysis in patients with REP. Number in bold are < 0.05.

**Table 4.** Multivariable analysis in patients with REP.

|                           |             | OS            |                 | PFS           |                 |
|---------------------------|-------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                           |             | HR (95% CI)   | <i>p</i> -Value | HR (95% CI)   | <i>p</i> -Value |
| Performance status (ECOG) | 1/0         |               |                 | 2.3 (1.1,4.5) | 0.033           |
|                           | 2/0         |               |                 | 16.6 (3.9,70) | < 0.001         |
| Extent of resection       | non-GTR/GTR | 2.2 (0.9,5.2) | 0.088           |               |                 |
| Stupp regimen             | yes/no      | 0.3 (0.1,0.7) | 0.003           |               |                 |
| deep brain location       | yes/no      |               |                 | 3.1 (1.5,6.7) | 0.003           |

Abbreviations: OS—overall survival; HR—hazard ratio; CI—confidence interval; PFS—progression free survival; ECOG—Eastern Cooperative Oncology Group; GTR—Gross total resection.

#### 4. Discussion

A high proportion of glioblastoma patients indicated for adjuvant oncology treatment developed rapid early progression in this retrospective analysis of an unselected cohort of consecutive patients treated outside of clinical trials. About half of the patients (46/90; 51%) progressed between surgery and initiation of adjuvant RT, regardless of waiting time to RT initiation. High incidence of REP and reports of overall survival are in accordance with other retrospective published studies [10–12]. The only one clinical negative predictive factor for the development of REP in our cohort was non-radical surgery, confirming the overall prognostic value of surgical radicality in glioblastoma [1]. Further studies evaluating potential biomarkers of REP are highly warranted.

The question of optimal timing of RT initiation, the first logical argument for the risk of REP in a specific patient, is still unanswered. Published studies that evaluated this issue are inconclusive with different waiting times, ranging from 37 to 56 days after surgery [18–23]. Some reported no effect of waiting time on the OS. In the broad analysis of 2855 patients enrolled in 16 RTOG trials, Blumenthal et al. described even better outcomes in patients with the mild postponement of RT (4–6 weeks) comparing to early initiation of RT within 2 weeks after surgery [24]. One may assume the need for recovery from secondary edema and hypoxia to be a prerequisite for RT effect on radioresistant glioblastoma. However, considering glioblastoma aggressivity with doubling time reported about 24 days, it is recommended to avoid unnecessary delay in RT initiation [25–28].

Development of REP represents an important, and not yet described in detail, negative prognostic factor (median OS 10.7 vs. 18.7 months in our cohort). We confirmed other well-known prognostic factors, such as performance status and the ability to undergo the Stupp regimen. The question of eventual administration of chemotherapy for over 6 months remains to be answered. As expected, worse OS was in the subgroup of patients with REP who were treated by RT alone (OS 7.5 months).

The majority of patients with REP develop central progression within the initial lesion of the cavity. Modification of RT targeting and techniques including employment of planning PET may be another way how to improve the outcomes of this unfavorable group of patients [29,30]. Precise knowledge of tumor biology may also add to the guidance of optimal treatment (prediction for more invasive forms of glioblastoma and risk of distant satellites). MGMT promoter methylation is both a prognostic and predictive marker in an REP group of patients, as described by Palmer et al.: patients with both REP and MGMT methylation reached significantly longer survival compared to those with REP and MGMT intact (16.5 vs. 10.2 months,  $p = 0.033$ ) [12]. In our cohort, we did not observe any role of MGMT ( $p = 0.830$ ). However, only 23/46 (50%) patients with REP were examined, which could significantly affect our analysis. Palmer's study evaluated MGMT promoter methylation, however, there may be many different genetic mutations and molecular characteristics specific to a subset of patients that predispose to REP and poor treatment response. It can be assumed that other important molecular markers such as IDH and pTERT (Telomerase reverse transcriptase gene promoter) also influence the prognosis and rapid progression in patients with glioblastomas [31–33].

In our clinical practice, MGMT is more likely to be investigated in elderly patients and in patients unable to undergo intensive postoperative treatment. For all others, we indicate the Stupp regimen

regardless of MGMT methylation. It may be hypothesized that tumors with REP represent more aggressive disease, which may be associated with higher tumor mutation burden and neoantigens, relevant biomarkers for immunotherapy. On the other hand, unlike in other tumors, immunotherapy in glioblastoma did not prove clear effectivity so far, including immune checkpoint inhibitors or dendritic cell vaccines [34–36]. Analysis of REP patients may provide new insights into the biology of this aggressive tumor and potentially reveal new targets for cancer therapy.

An inherent limitation of our study is its retrospective nature, related also to limited possibility for molecular analyses. Ongoing work may provide more information, especially with the analysis of molecular biomarkers of REP. In future prospective studies, advanced MRI techniques such as MRI spectroscopy or diffusion-weighted MRI may play a role in the differential diagnosis of REP and postoperative changes, as does ischemia, for example.

## 5. Conclusions

The extent of surgery remains one of the most important prognostic factors in glioblastoma, affecting not only general OS but also the risk of REP development. Especially in the subgroup of patients without radical resection, one may recommend as early initiation of radiotherapy as possible. The phenomenon of REP should be recognized as an integral part of stratification factors in future prospective clinical trials enrolling patients before the initiation of RT.

**Author Contributions:** Conceptualization, T.K., M.S., R.J., J.S., O.S., P.S.; Data curation, I.S., P.P., P.F., O.S.; Formal analysis, R.L., T.K., A.P., J.S., V.V.; Funding acquisition, R.L., T.K., A.K.; Investigation, R.L., T.K., R.B., P.F., R.J., K.M., M.H., V.V., A.K., J.S., O.S.; Methodology, R.L., T.K., I.S., I.K., R.B., J.S.; Project administration, I.K.; Supervision: P.S.; Validation, I.S.; A.P., I.K., P.P.; Writing—original draft, R.L., T.K., I.S.; Writing—review and editing, T.K., M.S., O.S., A.K., P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by the Ministry of Health, Czech Republic—Conceptual Development of Research Organization (MMCI, 00209805 and FNBr, 65269705) and supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant AZV NU20-03-00148 and NV19-05-00410. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [[CrossRef](#)]
2. Kazda, T.; Dziacky, A.; Burkon, P.; Pospisil, P.; Slavik, M.; Rehak, Z.; Jancalek, R.; Slampa, P.; Slaby, O.; Lakomy, R. Radiotherapy of Glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp’s Trial: More Controversies than Standards? *Radiol. Oncol.* **2018**, *52*, 121–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; et al. Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: A randomized clinical trial. *JAMA* **2017**, *318*, 2306–2316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Perry, J.R.; Laperriere, N.; O’Callaghan, C.J.; Brandes, A.A.; Menten, J.; Phillips, C.; Fay, M.; Nishikawa, R.; Cairncross, J.G.; Roa, W.; et al. Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1027–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Herrlinger, U.; Tzaridis, T.; Mack, F.; Steinbach, J.; Schlegel, U.; Sabel, M.; Hau, P.; Kortman, R.D.; Krex, D.; Grauer, O.; et al. Phase III trial of CCNU/temozolomide (TMZ) combination therapy vs. standard TMZ therapy for newly diagnosed MGMT-methylated glioblastoma patients: The randomized, open-label CeTeG/NOA-09 trial. *Lancet* **2019**, *393*, 678–688. [[CrossRef](#)]
6. Hegi, M.E.; Liu, L.; Herman, J.G.; Stupp, R.; Wick, W.; Weller, M.; Mehta, M.P.; Gilbert, M.R. Correlation of O6-methylguanine methyl-transferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4189–4199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Sanson, M.; Marie, Y.; Paris, S.; Idbaih, A.; Laffaire, J.; Ducray, F.; El Hallani, S.; Boisselier, B.; Mokhtari, K.; Hoang-Xuan, K.; et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4150–4154. [[CrossRef](#)]
8. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
9. Wen, P.Y.; Weller, M.; Lee, E.Q.; Alexander, B.A.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Barthel, F.P.; Batchelor, T.T.; Bindra, R.S.; Chang, S.M.; Chiocca, E.A.; et al. Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions. *Neuro. Oncol.* **2020**, *8*, 1073–1113. [[CrossRef](#)]
10. Merkel, A.; Soeldner, D.; Wendl, C.; Urkan, D.; Kuramatsu, J.B.; Seliger, C.; Proescholdt, M.; Eyupoglu, I.Y.; Hau, P.; Uhl, M. Early postoperative tumor progression predicts clinical outcome in glioblastoma-implication for clinical trials. *J. Neurooncol.* **2017**, *132*, 249–254. [[CrossRef](#)]
11. Villanueva-Meyer, J.E.; Han, S.J.; Cha, S.; Butowski, N.A. Early tumor growth between initial resection and radiotherapy of glioblastoma: Incidence and impact on clinical outcomes. *J. Neurooncol.* **2017**, *134*, 213–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Palmer, J.D.; Bhamidipati, D.; Shukla, G.; Sharma, D.; Glass, J.; Kim, L.; Evans, J.J.; Judy, K.; Farrell, C.; Andrews, D.W. Rapid Early Tumor Progression is Prognostic in Glioblastoma Patients. *Am. J. Clin. Oncol.* **2019**, *42*, 481–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sulman, E.P.; Ismaila, N.; Armstrong, T.S.; Tsien, C.; Batchelor, T.T.; Cloughesy, T.; Galanis, E.; Gilbert, M.; Gondi, V.; Lovely, M. Radiation Therapy for Glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 361–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Niyazi, M.; Brada, M.; Chalmers, A.J.; Combs, S.E.; Erridge, S.C.; Fiorentino, A.; Grosu, A.L.; Lagerwaard, F.J.; Minniti, G.; Mirimanoff, R.O.; et al. ESTRO-ACROP guideline “target delineation of glioblastomas”. *Radiother. Oncol.* **2016**, *118*, 35–42. [[CrossRef](#)]
15. Chukwueke, U.N.; Wen, P.Y. Use of the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice. *CNS Oncol.* **2019**, *8*, CNS28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kazda, T.; Bulik, M.; Pospisil, P.; Lakomy, R.; Smrcka, M.; Slampa, P.; Jancalok, R. Advanced MRI increases the diagnostic accuracy of recurrent glioblastoma: Single institution thresholds and validation of MR spectroscopy and diffusion weighted MR imaging. *Neuroimage Clin.* **2016**, *11*, 316–321. [[CrossRef](#)]
17. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 6 April 2020).
18. Irwin, C.; Hunn, M.; Purdie, G.; Hamilton, D. Delay in radiotherapy shortens survival in patients with high grade glioma. *J. Neurooncol.* **2007**, *85*, 339–343. [[CrossRef](#)]
19. Gliński, B.; Urbański, J.; Hetnał, M.; Małecki, K.; Jarosz, M.; Mucha-Małecka, A.; Chrostowska, A.; Jakubowicz, E.; Frączek-Błachut, B.; Dymek, P. Prognostic value of the interval from surgery to initiation of radiation therapy in correlation with some histo-clinical parameters in patients with malignant supratentorial gliomas. *Contemp Oncol.* **2012**, *16*, 34–37. [[CrossRef](#)]
20. Noel, G.; Huchet, A.; Feuvret, L.; Maire, J.P.; Verrelle, P.; Le Rhun, E.; Aumont, M.; Thillays, F.; Sunyach, M.P.; Henzen, C.; et al. Waiting times before initiation of radiotherapy might not affect outcomes for patients with glioblastoma: A French retrospective analysis of patients treated in the era of concomitant temozolomide and radiotherapy. *J. Neurooncol.* **2012**, *109*, 167–175. [[CrossRef](#)]
21. Lutterbach, J.; Weigel, P.; Guttenberger, R.; Hinkelbein, W. Accelerated hyper-fractionated radiotherapy in 149 patients with glioblastoma multiforme. *Radiother. Oncol.* **1999**, *53*, 49–52. [[CrossRef](#)]
22. Hulshof, M.C.; Koot, R.W.; Schimmel, E.C.; Dekker, F.; Bosch, D.A.; González González, D. Prognostic factors in glioblastoma multiforme. 10 years experience of a single institution. *Strahlenther. Onkol.* **2001**, *177*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lai, R.; Hershman, D.L.; Doan, T.; Neugut, A.I. The timing of cranial radiation in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro. Oncol.* **2010**, *12*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



24. Blumenthal, D.T.; Won, M.; Mehta, M.P.; Curran, W.J.; Souhami, L.; Michalski, J.M.; Rogers, C.L.; Corn, B.W. Short delay in initiation of radiotherapy may not affect outcome of patients with glioblastoma: A secondary analysis from the radiation therapy oncology group database. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 733–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Burnet, N.G.; Jena, R.; Jefferies, S.J.; Stenning, S.P.; Kirkby, N.F. Mathematical modelling of survival of glioblastoma patients suggests a role for radiotherapy dose escalation and predicts poorer outcome after delay to start treatment. *Clin. Oncol.* **2006**, *18*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Grewal, A.S.; Schonewolf, C.; Min, E.J.; Chao, H.H.; Both, S.; Lam, S.; Mazzoni, S.; Bekelman, J.; Christodouleas, J.; Vapiwala, N. The effect of delay in treatment on local control by radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *34*, 243–250. [[CrossRef](#)]
27. Han, S.J.; Englot, D.J.; Birk, H.; Molinaro, A.M.; Chang, S.M.; Clarke, J.L.; Prados, M.D.; Taylor, J.W.; Berger, M.S.; Butowski, N.A. Impact of Timing of Concurrent Chemoradiation for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Critical Review of Current Evidence. *Neurosurgery* **2015**, *62*, 160–165. [[CrossRef](#)]
28. Marra, J.S.; Mendes, G.P.; Yoshinari, G.H., Jr.; da Silva Guimarães, F.; Mazin, S.C.; de Oliveira, H.F. Survival after radiation therapy for high-grade glioma. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2019**, *24*, 35–40. [[CrossRef](#)]
29. Albert, N.L.; Weller, M.; Suchorska, B.; Galldiks, N.; Soffietti, R.; Kim, M.M.; la Fougère, C.; Pope, W.; Law, I.; Arbizu, J.; et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro. Oncol.* **2016**, *18*, 1199–1208. [[CrossRef](#)]
30. Grosu, A.L.; Weber, W.A.; Riedel, E.; Jeremic, B.; Nieder, C.; Franz, M.; Gumprecht, H.; Jaeger, R.; Schwaiger, M.; Molls, M. L-(methyl-11C) methionine positron emission tomography for target delineation in resected high-grade gliomas before radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *63*, 64–74. [[CrossRef](#)]
31. Killela, P.J.; Pirozzi, C.J.; Healy, P.; Reitman, Z.J.; Lipp, E.; Ahmed Rasheed, B.; Yang, R.; Diplas, B.H.; Wang, Z.; Greer, P.K.; et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1515–1525. [[CrossRef](#)]
32. Arita, H.; Yamasaki, K.; Matsushita, Y.; Nakamura, T.; Shimokawa, A.; Takami, H.; Tanaka, S.; Mukasa, A.; Shirahata, M.; Shimizu, S.; et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol. Commun.* **2016**, *4*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Houdova Megova, M.; Drábek, J.; Dwight, Z.; Trojanec, R.; Koudeláková, V.; Vrbková, J.; Kalita, O.; Mlcochova, S.; Rabcanova, M.; Hajdúch, M. Isocitrate Dehydrogenase Mutations Are Better Prognostic Marker Than O6-methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Glioblastomas—A Retrospective, Single-centre Molecular Genetics Study of Gliomas. *Klin. Onkol.* **2017**, *30*, 361–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Weller, M.; Butowski, N.; Tran, D.D.; Recht, L.D.; Lim, M.; Hirte, H.; Ashby, L.; Mechtler, L.; Goldlust, S.A.; Iwamoto, F.; et al. Rindopepimut and temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): A randomised, double blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1373–1385. [[CrossRef](#)]
35. Filley, A.C.; Henriquez, M.; Dey, M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: The game is not over yet. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91779–91794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Weller, M.; Le Rhun, E.; Preusser, M.; Tonn, J.C.; Roth, P. How we treat glioblastoma. *ESMO Open* **2019**, *4*, e000520. [[CrossRef](#)]

