

GLIOMY

Kniha byla vydána za laskavé podpory společností:



MUDr. Radek Lakomý, Ph.D., MUDr. Tomáš Kazda, Ph.D.,
Prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.,
a kolektiv

GLIOMY

SOUČASNÁ DIAGNOSTIKA A LÉČBA

2. vydání

maxdorf jessenius

Radek Lakomý, Tomáš Kazda, Pavel Šlampa a kol.,
GLIOMY – SOUČASNÁ DIAGNOSTIKA A LÉČBA, 2. vydání

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ

Autoři i nakladatel vynaložili velkou péči a úsilí, aby všechny informace v knize obsažené týkající se dávkování léků a forem jejich aplikace odpovídaly stavu vědy v okamžiku vydání. Nakladatel však za údaje o použití léků, zejména o jejich indikacích, kontraindikacích, dávkování a aplikačních formách, nenese žádnou odpovědnost, a vylučuje proto jakékoli přímé či nepřímé nároky na úhradu eventuálních škod, které by v souvislosti s aplikací uvedených léků vznikly. Každý uživatel je povinen důsledně se řídit informacemi výrobců léčiv, zejména informací přiloženou ke každému balení léku, který chce aplikovat.

Ochranné obchodní známky (chráněné názvy) léků ani dalších výrobků nejsou v knize zvlášť zdůrazňovány. Z absence označení ochranné známky proto nelze vyvozovat, že v konkrétním případě jde o název nechráněný.

Toto dílo, včetně všech svých částí, je zákonem chráněno. Každé jeho užití mimo úzké hranice zákona je nepřipustné a je trestné. To se týká zejména reprodukování či rozšiřování jakýmkoli způsobem (včetně mechanického, fotografického či elektronického), ale také ukládání v elektronické formě pro účely rešeršní i jiné. K jakémukoli využití díla je proto nutný písemný souhlas nakladatele, který také stanoví přesné podmínky využití díla. Písemný souhlas je nutný i pro případy, ve kterých může být udělen bezplatně.

© Pavel Šlampa, 2013, 2018

© Maxdorf, 2013, 2018

Illustrations © Maxdorf, 2013, 2018

Cover layout © Maxdorf, 2013, 2018

Cover photo © Dr_Microbe / iStockphoto.com

Vydal Maxdorf s. r. o., nakladatelství odborné literatury, Na Šejdru 247/6a, 142 00 Praha 4

e-mail: info@maxdorf.cz, internet: www.maxdorf.cz

Jessenius® je chráněná značka [No. 267113] označující publikace určené odborné zdravotnické veřejnosti

Odpovědný redaktor: Ing. Veronika Pátková, Martina Špičková, Mgr. Irena Kratochvílová

Ilustrace: Ing. Jaroslav Nachtigall, Ph.D.

Sazba: Denisa Honzalová

Obálka: Jan Hugo

Tisk: Books Print s.r.o.

Printed in the Czech Republic

ISBN 978-80-7345-561-3

HLAVNÍ AUTOŘI A EDITOŘI

- **MUDr. Radek Lakomý, Ph.D.**, Klinika komplexní onkologické péče LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
- **MUDr. Tomáš Kazda, Ph.D.**, Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno; CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno
- **Prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.**, Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno; RECAMO MOÚ

HLAVNÍ AUTOŘI

- **Mgr. Radka Alexandrová**, Úsek klinické psychologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
- **MUDr. Renata Belanová**, Odd. radiologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
- **MUDr. Martin Bulík, Ph.D.**, Klinika zobrazovacích metod LF MU a FN u sv. Anny v Brně, Brno
- **MUDr. Irena Doležalová, Ph.D.**, Centrum pro epilepsie Brno, I. neurologická klinika LF MU a FN u svatě Anny v Brně, Brno
- **Prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.**, I. patologicko-anatomický ústav LF MU a FN u svatě Anny v Brně, Brno
- **Prof. MUDr. Marina Hodolič, Ph.D.**, Klinika nukleární medicíny, LF UP, Olomouc; IASON, Nuclear Medicine Research Department, Graz, Austria
- **MUDr. Ludmila Hynková, Ph.D.**, Klinika radiační onkologie LF MU, Masarykův onkologický ústav, Brno
- **Doc. MUDr. Radim Jančálek, Ph.D.**, Neurochirurgická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně, Brno
- **Doc. MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D., MBA**, Neurochirurgická klinika LF UP a FN Olomouc
- **Doc. MUDr. Evžen Křepela, CSc.**, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha
- **RNDr. Jan Mužík, Ph.D.**, Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha
- **MUDr. Ing. Tomáš Svoboda**, Neurochirurgická klinika LF MU, FN Brno
- **Mgr. Jiří Šána, Ph.D.**, Středoevropský technologický institut (CEITEC), MU, Brno; Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, LF MU, Brno
- **MUDr. Andrea Šprláková-Puková, Ph.D.**, Klinika radiologie a nukleární medicíny LF MU, FN Brno
- **Prof. MUDr. Josef Vymazal, DSc.**, Radiodiagnostické oddělení, Nemocnice Na Homolce, Praha

SPOLUAUTOŘI

- **Prof. MUDr. Milan Brázdil Ph.D.**, Centrum pro epilepsie Brno, I. neurologická klinika LF MU a FN u svatě Anny v Brně, Brno
- **Doc. MUDr. Eva Brichtová, Ph.D.**, Neurochirurgická klinika LF MU a FN u svatě Anny v Brně, Brno
- **MUDr. Petr Bušek, Ph.D.**, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha
- **MUDr. Petr Burkoň, Ph.D.**, Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
- **Doc. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D.**, Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha
- **MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D.**, Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno
- **Mgr. Tomáš Chodúr**, Úsek klinické psychologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
- **Doc. MUDr. Radim Lipina, Ph.D.**, Neurochirurgická klinika, FN Ostrava

-
- **RNDr. Ondřej Májek**, Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha
 - **MUDr. Ing. Eduard Neuman, Ph.D.**, Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno
 - **MUDr. Alexandr Poprach, Ph.D.**, Klinika komplexní onkologické péče LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
 - **MUDr. Petr Pospíšil, Ph.D.**, Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
 - **MUDr. Zdeněk Řehák, Ph.D.**, Oddělení nukleární medicíny, PET centrum Masarykova onkologického ústavu, Brno, RECAMO MOÚ
 - **Doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.**, Středoevropský technologický institut (CEITEC), MU, Brno; Klinika komplexní onkologické péče, LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
 - **Mgr. Ivana Svobodová**, Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha
 - **Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.**, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha
 - **Mgr. Kamila Šiffelová**, Úsek klinické psychologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
 - **Mgr. Marek Večeřa**, Středoevropský technologický institut (CEITEC), MU, Brno

RECENZENT 1. VYDÁNÍ

- **Prof. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.**, Onkologické a radioterapeutické oddělení LF UK a FN Plzeň, Plzeň

PŘEDMLUVY K 2. VYDÁNÍ

Zhoubné nádory mozku, gliomy, jsou stále ve větší míře centrem pozornosti výzkumu a studií. Nové poznatky přispěly k úvaze vypracování druhého vydání publikace Gliomy v relativně krátké době od prvního vydání v r. 2013. V posledním roce byly navíc publikovány poměrně zásadní novinky, které významně mění denní praxi v diagnostice a léčbě pacientů s gliomy. Mezi nejdůležitějšími je nutné zmínit vydání nové klasifikace gliomů Světové zdravotnické organizace (WHO) integrující histopatologické a molekulárně biologické charakteristiky nádorů. Tato nová WHO 2016 klasifikace je již zohledněna v nových doporučeních Evropské neuroonkologické asociace – EANO guidelines, která byla publikována po třech letech v červnu 2017, včetně guidelines pro paliativní a podpůrnou léčbu pacientů s gliomy (Weller M, et al. Lancet Oncol. 2017; Pace A, et al. Lancet Oncol. 2017). V neposlední řadě je nutné z novinek zmínit léčbu pomocí přístroje Optune, která je založena na principu tzv. tumor-treating fields, využívající účinky střídavého elektrického proudu prostřednictvím elektrod nalepených na kůži hlavy. Studie EF-14, kombinující tento typ léčby se současnou standardní chemoradioterapií a adjuvantní chemoterapií, je po dlouhé době pozitivní studie popisující prodloužení celkového přežití u pacientů s nově diagnostikovaným glioblastomem. Výsledky byly zatím prezentovány na odborných konferencích, na jejich publikaci se čeká.

Kolektiv autorů druhého vydání je vybrán z aktivních účastníků pravidelných multidisciplinárních setkání „Glio meeting“. V r. 2017 se uskutečnilo už 10. setkání odborníků zabývajících se výzkumem, diagnostikou a léčbou gliomů. Jestli se při prvním ročníku meetingu účastnilo asi 35 odborníků, pak v r. 2017 přijelo už více než 100 účastníků. Poslední dva ročníky „Glio meetingu“ jsou součástí Brněnských onkologických dnů. Meeting je pravidelně pod garancí Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti (NOS ČOS) a Společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky (SROBF).

V novém vydání jsou texty zabývajících se tradičními diagnostickými a léčebnými postupy. Jsou přidány kapitoly věnující se více molekulární biologii, patologii, nové WHO klasifikaci mozkových nádorů, psychologii, výzkumu a epilepsii. Jsem velice rád, že oslovení autoři ve velmi krátkém termínu zpracovali své problematiky do textové formy. Při práci na tomto vydání mi v editorství významně pomohli dva mladí kolegové z Masarykova onkologického ústavu, MUDr. Radek Lakomý, Ph.D., a MUDr. Tomáš Kazda, Ph.D. Oba na téma léčby

gliomů publikovali několik originálních a souhrnných prací v českých i zahraničních odborných periodikách. Vážím si i podpory sponzorů, kteří se podíleli na vydání publikace.

Kniha je určena pro širokou odbornou veřejnost zabývající se výzkumem, diagnostikou a léčbou zhoubných mozkových nádorů. Přináší nové poznatky v této problematice, které budou určitě i základem pro tvorbu léčebných standardů v neurochirurgii, radioterapii a klinické onkologii.

Duben 2018

*Prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.
přednosta Kliniky radiační onkologie LF MU,
Masarykův onkologický ústav, Brno*

Druhé přepracované vydání knihy Gliomy vycházející čtyři roky po vydání prvním nese, krom vlastních odborných sdělení, ještě několik dalších – a s potěšením musím konstatovat, že dobrých – poselství o biomedicínské komunitě z oblasti neuroonkologie v naší republice. Ale popořádku.

Pečlivá editorská práce profesora Šlampa umožnila v knize Gliomy II předložit témata pokrývající celé spektrum aktuální neuroonkologie klenoucí se od biomedicínských kořenů až po své zásadní naplnění v klinické péči o pacienta. Kniha nám tedy předkládá kapitoly věnované moderním zobrazovacím metodám, nové molekulárně-biologické klasifikaci glioblastomů, celé šíři aktuálně používaných terapeutických konceptů až po epidemiologii a témata studia biologických zákonitostí a principů uplatňujících se v gliomogenezi na úrovni nádorového mikroprostředí.

A v čem spatřuji ono výše zmíněné dobré poselství o naší neuroonkologické komunitě? Ono poselství je personifikováno rozsáhlým multioborovým autorským týmem reprezentujícím naše pracoviště napříč republikou, na nějž se mohl editor obrátit s žádostí o jednotlivé kapitoly. Předzvěstí konsolidace a živé komunikace této komunity napříč republikou byly zpočátku dominantně klinicky orientované „Glio meetingy“, jejichž tradici spolu se svými brněnskými kolegy založil právě profesor Šlampa. Ty umožnily (a navíc i velmi příjemnily) všestrannou spolupráci především neurochirurgů, onkologů a radioterapeutů a iniciovaly přípravu doporučených postupů v neuroonkologii. Nutnost spolupráce i v oblasti výzkumné, zahrnující základní, translační i aplikovaný výzkum, vedla pak v roce 2012 k založení a postupné strukturalizaci NOS ČOS. Ta nejen napomohla k dalšímu propojení týmů jednotlivých center, ale přivedla do našich řad i nelékařské odborníky z teoretických pracovišť fakult a Akademie věd České republiky (AV ČR), jejichž participace a synergie je nezbytná pro další pokrok a inspiraci vědecké práce na poli neuroonkologie.

Věřím, že kniha bude shledána jak naší komunitou, tak i dalšími svými adresáty jako užitečná a přínosná.

Květen 2018

*Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
děkan 1. lékařské fakulty UK Praha
předseda Neuroonkologické sekce ČOS*

OBSAH

Předmluvy k 2. vydání	7
1 Epidemiologie gliomů podle dat Národního onkologického registru	14
1.1 Zdroje epidemiologických dat	14
1.2 Identifikace typů zhoubných novotvarů mozku v datech NOR	15
1.3 Epidemiologie zhoubných novotvarů mozku	15
1.4 Predikce vývoje epidemiologie zhoubných novotvarů mozku	20
1.5 Hodnocení výsledků léčby na populační úrovni – přežití pacientů	21
2 Nádorové mikroprostředí glioblastomu	24
2.1 Interakce buněk v mikroprostředí glioblastomu a jejich patogenetický význam	26
2.2 Sekretomy a extracelulární vezikuly v mikroprostředí glioblastomu	27
2.3 Acidifikace a hypoxie v mikroprostředí glioblastomu	28
2.4 Heterogenita mikroprostředí glioblastomu	30
2.5 Možný význam nádorového mikroprostředí pro diagnostiku a léčbu glioblastomu	31
2.6 Shrnutí pro praxi	32
3 Klasifikace gliomů a jejich integrovaná diagnostika	34
3.1 Principy současné klasifikace difuzních gliomů	34
3.2 Molekulárně genetické vyšetření gliomů	37
3.3 Histologický grading gliomů	40
3.4 Základní charakteristiky nozologických jednotek difuzních gliomů	41
3.5 Další směr vývoje diagnostiky a klasifikace gliomů	48
4 Nekódující ribonukleové kyseliny a jejich využití v diagnostice gliomů	50
4.1 Krátké nekódující ribonukleové kyseliny	51
4.2 Dlouhé nekódující ribonukleové kyseliny	60
4.3 Shrnutí pro praxi	65
5 Zobrazovací metody v diagnostice primárních mozkových maligních tumorů	68
5.1 Výpočetní tomografie	69
5.2 Magnetická rezonance	72
5.3 Shrnutí pro praxi	79
6 Pokročilé techniky magnetické rezonance při zobrazení tumorů mozku	81
6.1 Difuzní zobrazení magnetickou rezonancí – princip a praktické využití traktografie	81
6.2 Perfuzní zobrazení mozku	84
6.3 Funkční magnetická rezonance	86
6.4 Shrnutí pro praxi	88
7 Magnetická rezonanční spektroskopie v zobrazování gliomů	91
7.1 Metabolické změny gliomů	93
7.2 Klinické indikace spektroskopie v neuroonkologii	95
7.3 Shrnutí pro praxi	98

8	Moderní vyšetřovací metody v oblasti nukleární medicíny	101
8.1	Radiofarmaka používaná u gliomů	102
8.2	Shrnutí pro praxi.	110
9	Aktuální neurochirurgické postupy u low-grade gliomů	112
9.1	Problematika klinických studií a reálná praxe.	112
9.2	Chirurgické přístupy v neuroonkologii.	114
9.3	Shrnutí pro praxi.	120
10	Úloha neurochirurgie v léčbě high-grade gliomů	121
10.1	Operační výkony u high-grade gliomů	122
10.2	Intraoperační metody umožňující bezpečnou maximální resekci	125
10.3	Awake kraniotomie	131
10.4	Lokální terapie high-grade gliomů aplikovaná v průběhu operačního výkonu	132
10.5	Operační léčba recidiv high-grade gliomů	133
10.6	Komplikace operačních výkonů	134
10.7	Shrnutí pro praxi.	136
11	Přínos chemoradioterapie v léčbě high-grade gliomů	138
11.1	Východiska aktuální léčby high-grade gliomů	139
11.2	Konkomitantní chemoradioterapie	141
11.3	Radioterapie	142
11.4	Adjuvantní léčba u starších pacientů	146
11.5	Shrnutí pro praxi.	147
12	Kontroverze při současné radioterapii high-grade gliomů	150
12.1	Kontroverze v předpisu dávky záření	151
12.2	Kontroverze ve stanovení cílových objemů	152
12.3	Další kontroverze v radioterapii glioblastomu	156
12.4	Shrnutí pro praxi.	157
13	Stereotaktická radioterapie a radiochirurgie v léčbě recidivujících high-grade gliomů	160
13.1	Stereotaktická radioterapie a radiochirurgie – základní charakteristika	161
13.2	Reiradiace rekurentních high-grade gliomů	164
13.3	Shrnutí pro praxi.	168
14	Optune – nová cesta v léčbě glioblastomu	170
14.1	Medicínské využití střídavého elektrického proudu	170
14.2	Mechanismus účinku a Optune systém	171
14.3	Aplikace Optune u pacientů s glioblastoma multiforme	172
14.4	Kontraindikace léčby Optune.	175
14.5	Léčba Optune v ostatních indikacích	175
14.6	Léčba Optune a úhradové mechanismy.	175
15	Postavení chemoterapie v léčbě gliomů	177
15.1	High-grade gliomy	177
15.2	Low-grade gliomy	182
15.3	Shrnutí pro praxi.	186

16	Kontroverze v adjuvantní léčbě low-grade gliomů	190
16.1	Optimální čas zahájení pooperační léčby — radioterapie a chemoterapie	190
16.2	Chemoterapie a její kontroverze v léčbě „high-risk“ low-grade gliomů	191
16.3	Nejllepší chemoterapeutický režim — PCV nebo temozolomid	193
16.4	Molekulární prognostické a prediktivní markery u low-grade gliomů	193
16.5	Studie s LGG a problematické srovnání jejich výsledků	195
16.6	Shrnutí pro praxi	197
17	Klinický výzkum a moderní léčba u gliomů	199
17.1	Cílená léčba	199
17.2	Imunoterapie	201
17.3	Optune (NovoTTF-100A)	204
17.4	Shrnutí pro praxi	205
18	Kortikoterapie u nádorů centrálního nervového systému	208
18.1	Patofyziologie účinku kortikosteroidů v mozkové tkáni	209
18.2	Indikace kortikoterapie u nádorů mozku	210
18.3	Vedlejší účinky kortikoterapie a kortikosteroidní toxicita	211
18.4	Prediktory toxicity léčby	212
18.5	Kortikoterapie v neuroonkologii	213
18.6	Shrnutí pro praxi	215
19	Diagnostika a léčba epilepsie u nádorů mozku	218
19.1	První epileptický záchvat	218
19.2	Akutní symptomatické záchvaty	218
19.3	Epilepsie	221
19.4	Klasifikace epileptických záchvatů	221
19.5	Klasifikace epilepsií	224
19.6	Epileptický status	224
19.7	Diagnostika epilepsie	225
19.8	Léčba epilepsie	226
19.9	Epilepsie a gliomy	235
19.10	Shrnutí pro praxi	236
20	Psychologické aspekty nádorového onemocnění mozku	238
20.1	Klinicko-psychologický obraz nádorových onemocnění mozku	238
20.2	Možnosti psychodiagnostiky při nádorových onemocněních mozku	241
20.3	Možnosti a limity psychologických intervencí a rehabilitace u pacientů s nádorovým onemocněním mozku	242
20.4	Kvalita života s nádorovým onemocněním mozku	244
20.5	Shrnutí pro praxi	246
	Přehled použitých zkratk	248
	Seznam obrázků	254
	Medailonky hlavních autorů	257
	Rejstřík	259

2 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ GLIOBLASTOMU

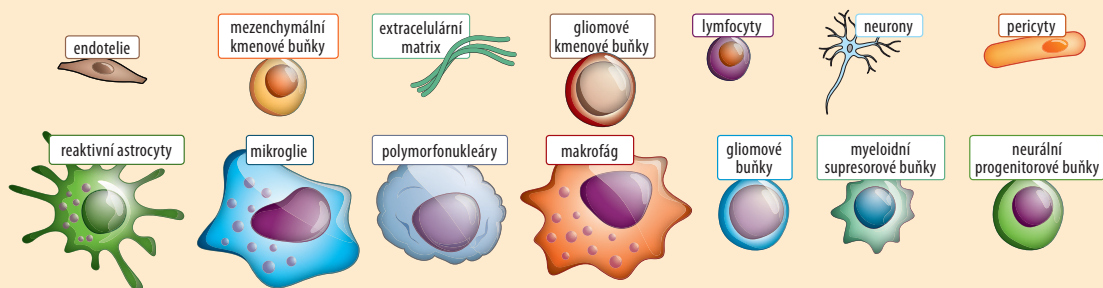
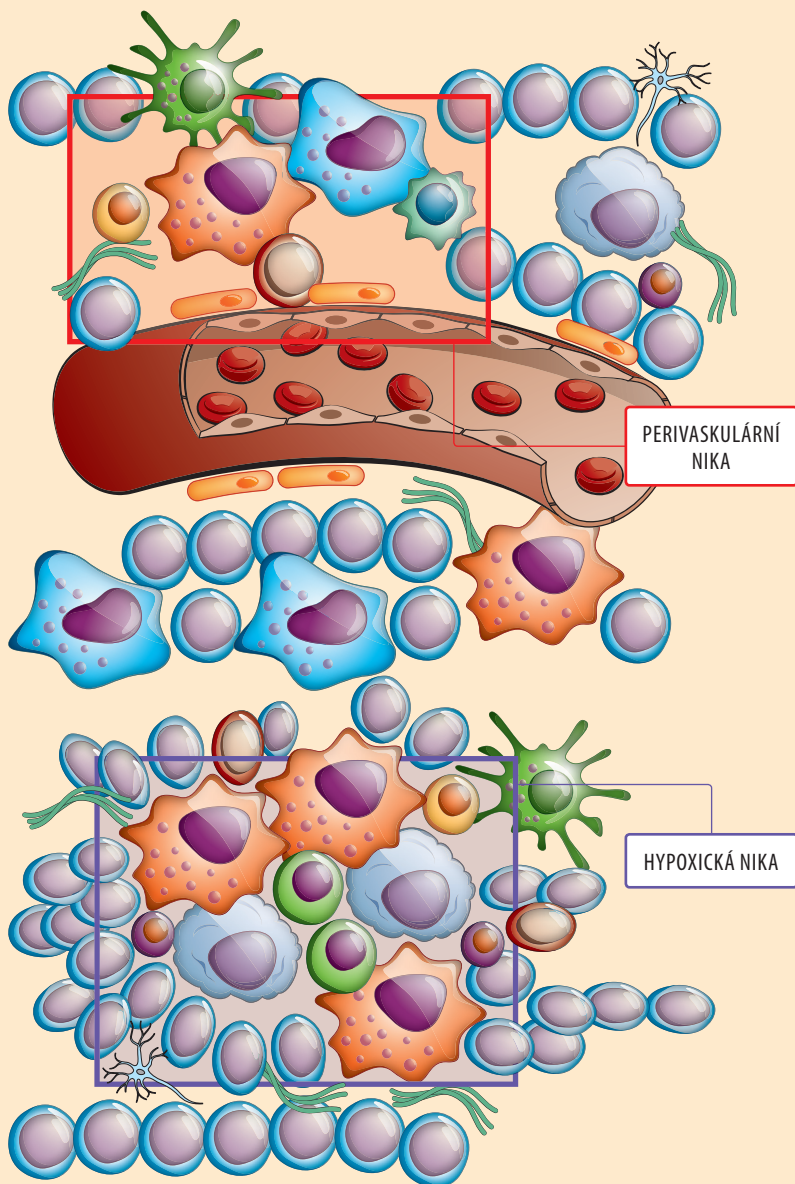
Evžen Křepela, Petr Bušek, Aleksi Šedo

Úvod

Glioblastom (GBM – glioblastoma multiforme; astrocytom G IV dle WHO) je nejčastější primární mozkový nádor s extrémně agresivním klinickým fenotypem. Vzniká pravděpodobně neoplastickou transformací gliálních buněk a vyznačuje se značnou proliferací a invazivitou, vysokou hustotou mikrovaskularizace a častým výskytem nekróz. V důsledku uvolňování nadměrných množství glutamátu nádorovými buňkami se v okolí GBM často vyskytuje excitotoxická neurodegenerace a destrukce neuronů. V tkáni GBM se společně s transformovanými gliomovými buňkami nacházejí i různé nenádorové buňky, jako např. mikroglie, makrofágy, astrocyty, oligodendrocyty, endotelie, pericyty, mezenchymální kmenové buňky a různé typy imunitních buněk (obr. 2.1). Tyto nenádorové buňky spolu s intratumorální extracelulární matrix (ECM) tvoří tzv. nádorové stroma. Buněčné a nebuněčné komponenty nádorového stromatu spolu s intratumorální extracelulární tekutinou a tekutinou mikrocirkulace představují komplexní a dynamické nádorové mikroprostředí, které velmi významným způsobem ovlivňuje růst a progresi GBM.

Pro tumorigenezi a invazivní růst GBM je důležitá nejen autokrinní signalizace a sekrece gliomových buněk, ale i kontaktem zprostředkovaná (juxtakrinní) a parakrinní signalizace a sekrece buněk, které se vyskytují v nádorovém stromatu. Autonomní protumorigenní aktivita buněk GBM zahrnuje např.:

1. vznik autokrinního signálního komplexu VEGF-VEGFR2 (vasculární endotelální růstový faktor/receptor pro VEGF)-neuropilin-1 v plasmatické membráně, jehož signalizace urychluje vstup gliomových buněk buněčným cyklem, a tím růst GBM, a také zvyšuje životaschopnost gliomových buněk a jejich radiorezistenci,
2. reciproční parakrinní signalizaci mezi gliomovými buňkami exprimujícími mutantní receptor epidermálního růstového faktoru VIII (EGFRvIII) a gliomovými buňkami s expresí nemutovaného EGFR,
3. sekreci různých proteáz a autokrinního motilitního faktoru (enzymu glykolýzy fosfoglucoizomerázy) a uvolnění solubilního urokinázového receptoru, což spolupodporuje migraci a invazi gliomových buněk,



Obr. 2.1 Složky nádorového mikroprostředí glioblastomu a jejich přítomnost ve funkčně a histologicky heterogenních nikách (niches). Gliomové buňky s vlastnostmi kmenových buněk se nacházejí ve zvýšené míře v okolí cév a hypoxických oblastí. V okolí hypoxického okrsku s centrální nekrózou dochází ke změně morfologie gliomových buněk se vznikem typických pseudopalisád

4. sekreci sfingosin-1-fosfátu, který autokrinní signalizací přes receptory spřažené s G-proteiny zvyšuje proliferaci a invazivitu gliomových buněk i proliferaci a životaschopnost gliomových kmenových buněk (GSC, glioma stem cells) a udržuje jejich kmenové vlastnosti,
5. vzájemné propojení gliomových buněk pomocí více než 500 μm dlouhých buněčných výběžků (tumor microtubes), které podporují šíření do okolní mozkové tkáně a vedou ke vzniku funkčního syncytia, které zvyšuje odolnost do něj zapojených buněk k radioterapii (RT).

Vedle výše uvedených příkladů a řady dalších protumorigenních autonomních aktivit gliomových buněk jsou do růstu a progresu GBM a jejich odpovědi na léčbu zapojeny i mnohočetné komunikace a interakce mezi subpopulacemi nádorových gliomových buněk a nenádorovými buňkami sídlícími v mikroprostředí GBM nebo v mozkové tkáni infiltrované gliomovými buňkami.

2.1 INTERAKCE BUNĚK V MIKROPROSTŘEDÍ GLIOBLASTOMU A JEJICH PATOGENETICKÝ VÝZNAM

Významnou součástí mikroprostředí GBM představují různé typy imunitních buněk patřící do systému vrozené nebo získané imunity. Jejich četnost je nejvyšší u mezenchymálního molekulárního subtypu GBM a v případě tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) je asociována s mutacemi v genech NF1 a RB1. Imunitní buňky komunikují s gliomovými buňkami i navzájem mezi sebou prostřednictvím přímých kontaktů, solubilních faktorů anebo extracelulárních vezikul, přičemž důsledkem těchto interakcí je modulace růstu nádoru. Až 30 % masy GBM představují s nádorem sdružené makrofágy (TAM), k nimž se řadí makrofágy pocházející z kostní dřeně a rezidentní buňky mikroglie pocházející původně z buněk žloutkového váčku. TAM jsou zapojeny do reciproční komunikace s gliomovými buňkami. Gliomové buňky secernují různé cytokiny a chemoatraktanty, kterými jsou TAM atrahovány do mikroprostředí GBM a dochází k jejich alternativní aktivaci a polarizaci na převážně protumorigenně působící M2 fenotyp. V důsledku toho TAM uvolňují faktory podporující proliferaci a přežití gliomových buněk a proteázy degradující ECM. Buňky mikroglie mají dále schopnost stimulovat proliferaci a invazi gliomových buněk např. cestou sekrece TGF- β . Lymfoidní rameno imunitního systému je primárně složeno z T buněk, B buněk a přirozených zabíječů (NK buňky). Lokální mikroprostředí může tlumit funkci efektorových T buněk během protinádorové imunitní odpovědi, přičemž T buňkami zprostředkované zánětlivé odpovědi jsou v mozku i za fyziologických podmínek minimální. V tomto kontextu je zajímavé, že získaná imunorezistence GBM aktivací kontrolního bodu imunitní odpovědi (tvorbou signálního komplexu PD-1/PD-L1) je způsobena interakcí TIL s imunosupresivními tumor infiltrujícími myeloidními buňkami (TIM), které jsou zdrojem většiny PD-L1 exprimovaného v GBM.

Astrocyty vytvářejí s gliomovými buňkami funkční kanálkové (mezero-vé) spoje, které slouží k intercelulárnímu přenosu malých signálních molekul (např. cGMP). Analogicky k efektu astrocytů na nádorové buňky v mozkových metastázách by astrocyty mohly podporovat přežití gliomových buněk tím, že budou aktivovat jejich signální cesty využívající transkripční faktory STAT1 a NF- κ B, a dále tím, že prostřednictvím mikroRNA (miRNA) budou potlačovat v gliomových buňkách expresi tumorsupresoru homologu fosfatázy a tenzinu (PTEN) (více o roli miRNA v diagnostice a léčbě gliomů v kapitole 4). Sekrecí různých cytokinů a chemokinů navíc astrocyty zvyšují i invazivitu GSC.

V mikroprostředí GBM se vyskytují i s nádorem sdružené mezenchymální kmenové buňky (TAMSC). Tyto buňky mají schopnost autokrinní indukce syntézy kyseliny hyaluronové (HA), a to signální cestou C5a (aktivovaná složka komplementu)-C5aR1-pERK1/2-HA syntáza-2, přičemž secernovaná HA působí jako parakrinní signální ligand receptoru pro hyaluronanem zprostředkovanou motilitu (RHAMM), který je exprimován na gliomových buňkách a podporuje jejich invazi.

Silně vyvinutá mikrovaskularizace je charakteristickým rysem GBM. Vyznačuje se aberantní strukturou a nedostatečnou integritou. Novotvořené mikrocévy v GBM mají deregulovanou perfuzi a permselektivitu. V důsledku toho je v GBM přítomen edém a vysoký tlak intersticiální tekutiny a dále extenzivní hypoxie a nekrózy. Bezprostřední okolí cév (perivaskulární nika) v GBM slouží jako rezervoár GSC (viz obr. 2.1). V této nise endotelové buňky secernují faktory (např. oxid dusnatý), které zde udržují hotovost GSC. Rovněž tak juxtakrinní signalizace z endotelových buněk prostřednictvím DLL-4 a JAGGED1 jdoucí cestou Notch receptoru v GSC podporuje udržování jejich kmenového fenotypu. GSC mají schopnost se transdiferencovat v pericyty a patrně i v endotelové buňky, a tím mohou přispívat k intratumorální neovaskularizaci GBM.

2.2 SEKRETOMY A EXTRACELULÁRNÍ VEZIKULY V MIKROPROSTŘEDÍ GLIOBLASTOMU

Komunikace a interakce mezi subpopulacemi gliomových buněk a mezi gliomovými buňkami a nenádorovými buňkami v mikroprostředí GBM probíhají v řadě případů cestou sekrece solubilních proteinových a jiných signálních molekul a cestou uvolňování extracelulárních vezikul. Gliomové buňky, jakož i různé nenádorové buňky v mikroprostředí GBM, mají své specifické sekreční proteomy (sekretomy). Významnou úlohu v těchto souborech secernovaných proteinů mají proteolytické enzymy, cytokiny a chemokiny, neboť tyto molekuly zpravidla podporují proliferaci, migraci a invazi gliomových buněk i jejich únik z imunitního dohledu. V gliomových buňkách vede signalizace cestou nadměrné exprese EGFR nebo cestou konstitutivní exprese aktivní mutované varianty EGFRvIII ke zvýšené sekreci proteinů podporujících jejich invazi. Komponenty sekretomu

gliomových buněk mají schopnost indukovat přechodnou transformaci normálních neurálních prekursorových buněk, která se projevuje jejich zvýšenou proliferací, vzestupem exprese kmenových markerů (např. CD133 a ALDH) a receptorů růstových faktorů (např. VEGFR1, VEGFR2, EGFR a PDGFR α) a zvýšením sekrece růstových faktorů (např. EGF, VEGF a PDGF-AA) a dalších proteinů. Srovnávací kvantitativní proteomické studie GSC a normálních neurálních kmenových buněk zjistily, že tyto buňky diferenciálně exprimovaly 447 intracelulárních proteinů a 138 sekrečních proteinů. Komponenty sekretomu mozkových endotelových buněk podporují, s využitím signální cesty proteinkinázy (mTOR), proliferaci a životaschopnost GSC. Podobně cytokiny a chemokiny jako komponenty sekretomu netransformovaných astrocytů zvyšují invazivitu GSC.

Dalším signálním efektem mezi populacemi buněk v mikroprostředí GBM jsou extracelulární vezikuly (EV), a to zejména exozomy a mikrovezikuly (ektozomy). Bylo zjištěno, že jedna gliomová buňka uvolní za 48 hodin asi 10^4 EV. Extracelulární vezikuly uvolněné z gliomových buněk obsahují nukleové kyseliny (DNA, mRNA, miRNA) a transmembránové i solubilní proteiny. EV slouží jako intercelulární přenašeče receptorů a dalších signálních molekul, enzymů, adhezních proteinů, onkogenů, nukleových kyselin a lipidů. Zrcadlí se v nich molekulární profil a vlastnosti donorových gliomových buněk, včetně jejich molekulárního transkripčního subtypu. V mikroprostředí GBM mohou být EV po uvolnění z gliomových buněk přijaty různými okolními buňkami: např. nádorovými gliomovými buňkami, neurony, endotelovými buňkami, mikroglíi, makrofágy či imunitními buňkami. Po přijetí recipientní buňkou mohou EV změnit její fenotyp, např. indukovat proliferaci a migraci buněk, neoangiogenezi, změny permeability nebo imunotoleranci. EV vznikají a účinkují nejen lokálně v mikroprostředí GBM, ale mohou i unikat do mozkomíšního moku a periferní krve, kde je lze detekovat a kde mohou působit na recipientní buňky. Nedávno bylo zjištěno, že exozomy získané z GSC mohou vyvolat systémovou imunosupresi T lymfocytů cestou maturace monocytárních myeloidních supresorových buněk (MDSC). Analýza proteomu EV z gliomových buněčných linií dále ukázala, že hladiny 14 proteinů EV signifikantně korelovaly s tvorbou invadopodií u studovaných buněk. Invadopodia, což jsou výběžky plasmatické membrány bohaté na aktin a proteolytické enzymy, jsou místa uvolňování EV z nádorových buněk a jejich produkce je sdružena s vysoce agresivními nádory.

2.3 ACIDIFIKACE A HYPOXIE V MIKROPROSTŘEDÍ GLIOBLASTOMU

Kyselá extracelulární pH a tkáňová hypoxie představují důležité faktory spoluvytvářející nádorové mikroprostředí GBM. GBM jsou silně glykolytické nádory využívající aerobní glykolýzu (Warburgův efekt) pro infiltrační růst. Z důvodu nadměrné vícezdroje intracelulární produkce kationtů H^+ (např.

v deregulované glykolytické dráze, v dehydrogenačních reakcích, v reakcích vyžadujících hydrolýzu adenosintrifosfátu (ATP) a při disociaci kyseliny uhličitě vznikající v karboanhydrázami katalyzovaných reakcích) mobilizují gliomové buňky různé efluxní mechanismy, které exportují nadprodukované H^+ ionty z cytosolu do extracelulárního prostředí, a tím udržují v cytosolu slabě alkalické pH 7,2–7,8, které je optimální pro metabolismus gliomových buněk. Export H^+ iontů z gliomových buněk je uskutečňován Na^+/H^+ -antiportéry, monokarboxylátovými transportéry, proton-translokujícími adenosintrifosfatázami vakuolárního typu a H^+/K^+ -ATPázovými protonovými pumpami. Důsledkem zvýšeného efluxu H^+ iontů z gliomových buněk, jakož i nedostatečné kapilární perfuze GBM, je akumulace H^+ iontů v mikroprostředí GBM. Tato extracelulární acidifikace v GBM dosahuje hodnot extracelulárního pH 6,8–5,9. Kyselé extracelulární pH je v GBM udržováno i přísunem H^+ iontů pocházejících z pericelulární disociace kyseliny uhličitě, která zde excesivně vzniká katalytickým účinkem karboanhydráz IX a XII. Tyto enzymy jsou nadměrně exprimovány v plasmatické membráně gliomových buněk vystavených extracelulárnímu acidnímu stresu a hypoxii.

Extracelulární acidní stres v GBM má mnohočetný funkční dopad: podporuje proliferaci a invazi nádorových buněk, indukuje genovou expresi a spouští reprogramování genové exprese nádorových buněk a vytvoření fenotypu kmenových buněk, podporuje neoangiogenezi, vede k mnohočetné lékové rezistenci nádorových buněk a k úniku nádorových buněk z apoptózy spouštěné cytotoxickými lymfocyty a NK buňkami. Na biologických účincích extracelulárního acidního stresu se podílí i protonerní receptory spřažené s G-proteiny (PRGP). Tyto receptory jsou integrálními proteiny plasmatické membrány, které fungují jako senzory koncentrace H^+ iontů v extracelulárním mikroprostředí. Nadměrná exprese PRGP se projevuje transformační a onkogenní aktivitou a byla prokázána v různých typech nádorových buněk včetně buněk gliomových.

Okrsky hypoxie (snížené hladiny O_2) v mikroprostředí GBM vznikají v důsledku hypoperfuze strukturně vadně utvářeného intratumorálního mikrovaskulárního řečiště. Při nedostatku O_2 je v GBM inhibována aktivita enzymů s prolylhydroxylázovou doménou, a proto se v nich hromadí hypoxií indukibilní faktor (HIF)-1 α a HIF-2 α . Oba tyto proteiny jsou translokovány do buněčného jádra, kde tvoří heterodimery s konstitutivně exprimovaným HIF- β (ARNT) proteinem. Komplexy HIF-1 α /HIF- β a HIF-2 α /HIF- β jsou transkripčními faktory HIF-1 a HIF-2, které se vážou na „hypoxie responzivní“ elementy stovek cílových genů a spouštějí jejich transkripci. Proteiny, jejichž produkce je indukována v gliomových buňkách hypoxickou odpovědí, jsou buď zapojeny do různých biologických funkcí v samotných gliomových buňkách, nebo jsou secernovány a působí jako parakrinní signální molekuly na různé buňky ve stromatu GBM. Biologické funkce indukované hypoxickou odpovědí gliomových buněk ve svém souhrnu podporují růst a progresi GBM a jejich rezistenci na protinádorovou léčbu. Při hypoxické odpovědi gliomových buněk i různých nenádorových buněk sídlících v mikroprostředí GBM jsou transkripčně aktivovány a exprimovány geny, jejichž proteinové produkty jsou funkčně důležité pro sebeobnovu, udržování fenotypu

a tumorigenicitu GSC (např. NANOG, OCT-3/4, Notch a TGF- β 1), pro exekuci motility a invazivity gliomových buněk (např. MMP-9 a PAI-I), pro udržování pericelulární acidity (např. CAIX a CAXII), pro tvorbu mikrocév (např. VEGF, YKL-40 a IL-8) a pro imunosupresi efektorových T lymfocytů cestou juxtakrin-ní signalizace z TIM, TAM nebo dendritických buněk (PD-L1) anebo účinkem adenosinu, který se vlivem ektonukleotidáz CD39 a CD7 zvýšeně tvoří v hypoxických zónách mikroprostředí GBM.

2.4 HETEROGENITA MIKROPROSTŘEDÍ GLIOBLASTOMU

Heterogenita GBM je do značné míry produktem mikroevoluce subklonů mutovaných nádorových buněk kontinuálně vznikajících v mikroprostředí GBM. Tato mikroevoluce probíhá na základě Darwinova principu přirozeného výběru různými intracelulárními a extracelulárními selekčními tlaky. Jejich působením se zachovávají k proliferační klonální expanzi jen ty mutované klony gliomových buněk, které nejlépe uspějí v kompetici o přežití a přizpůsobení se lokálnímu kontextu v mikroprostředí GBM. K darwinovské klonální mikroevoluci gliomových buněk, a tím k rozvoji heterogenity GBM přispívají nejen genetické faktory (onkogenní somatické mutace), ale i řada faktorů negenetických. K nim patří epigenetická regulace genové exprese („reprogramování genomu“), stochasticita genové exprese, hierarchie buněčné diferenciace a kontext nádorového mikroprostředí. Přitom různé buňky nádorového stromatu přispívají různou měrou a v různých regionech GBM k variabilitě hlavních charakteristik gliomových buněk, a to zejména ke kontinuální proliferační signalizaci, k úniku z působení růstových supresorů, k rezistenci k buněčné smrti, k replikační imortalitě, k indukci neoangiogeneze, k invazivitě, k reprogramování metabolismu a k úniku z imunitního dohledu. Kombinace genetických a negenetických faktorů, které spoluurčují spuštění a průběh procesu mikroevoluce v GBM, vede k významné variabilitě komplexních a vysoce dynamických populací gliomových buněk, které mají schopnost a kapacitu udržet růst GBM a způsobit jeho relaps i přes veškeré klinicky využívané léčebné přístupy. Různá míra působení výše uvedených genetických, epigenetických a biochemických faktorů, které se podílejí na mikroevoluci populací gliomových buněk, je tedy primární příčinou intratumorální (regionální) a intertumorální heterogenity GBM. Je zřejmé, že heterogenita GBM se promítá i do jeho mikroprostředí a zasahuje do intercelulární signalizace a do profilu sekrečních proteomů a složení extracelulárních vezikul, které jsou produkovány různými subpopulacemi gliomových buněk i nenádorovými buňkami stromatu v mikroprostředí GBM. Heterogenní vývoj mikrovaskularizace v GBM může být vyvolán např. účinkem angiogenního faktoru YKL-40 (CHI3L1) na GSC. Působením YKL-40 v přítomnosti endotelových buněk GSC transdiferencují na pericyty, které ve spolupráci s endoteliemi podporují angiogenezi. Při absenci endotelových buněk však GSC vytvářejí vaskulogenní mimikry s mikromorfologií kanálků perfundovaných krví.

2.5 MOŽNÝ VÝZNAM NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ PRO DIAGNOSTIKU A LÉČBU GLIOBLASTOMU

Důležitým směrem molekulárního výzkumu s potenciálními výstupy pro neinvazivní klinickou diagnostiku GBM i prediktivní a prognostické aplikace při léčbě GBM je studium diferenciální sekrece biomolekul a diferenciální molekulární kompozice extracelulárních vezikul uvolňovaných z nádorových a nenádorových buněk. Srovnávací sekretomika již zjistila řadu kandidátních proteinových molekul GBM pro vstup do translačních studií, jejichž cílem bude analyzovat a validovat jejich vhodnost pro diagnostické, prediktivní a prognostické aplikace v klinické praxi. Gliomové buňky uvolňují mnoho EV, které přecházejí do krve i mozkomíšního moku, slouží jako přenašeče různých biomolekul a jejich molekulární kompozice odráží molekulární profil a vlastnosti donorových gliomových buněk. Vzhledem k těmto a dalším vlastnostem jsou EV velkým příslibem pro molekulární diagnostiku i predikci a sledování léčby GBM, jakož i analýzu somatických mutací v primárních nádorech a detekci rezistence k protinádorové léčbě. V současnosti vychází naprostá většina informací o biologickém chování nádoru u konkrétního pacienta z jednoho biotického vzorku získaného při chirurgickém odstranění nádoru, o následných změnách v průběhu léčby máme jen minimum informací. Molekulární analýza EV uvolňovaných z nádorového mikroprostředí do biologických tekutin, některými autory obecně nazývaná „kapalnou biopsií“ (liquid biopsy), by mohla do budoucna tento nedostatek odstranit. Soubor molekulárních biomarkerů GBM dosud analyzovaných EV technikou mikrofluidních čipů zahrnuje např. mikroRNA miR2 a miR-10b a zejména pak skupinu mediátorových RNA kódujících EGFR, EGFRvIII, PDGFR α , podoplatinin, EphA2, IDH1R132H, MGMT a APNG.

Přes multimodální léčbu pacientů s GBM, sestávající z chirurgické resekce, radioterapie (RT) a chemoterapie (CHT) s alkylačním agens temozolomidem (TMZ) (standardní Stuppův protokol), nádorové onemocnění rychle progreduje. Relaps nádorové nemoci obvykle nastává během 8–9 měsíců po primární léčbě a medián přežití pacientů činí pouhých 12–15 měsíců. Existuje shoda, že jednou z příčin selhávání léčby u GBM je jejich vysoká intratumorální heterogenita, jejímž podkladem je mikroevoluce populací gliomových buněk na subklony, které mají schopnost čelit jakékoli formě buněčného stresu, včetně terapeutické intervence. Důležitým poznatkem vyplývajícím z výzkumu genomových a transkriptomových profilů u pacientů s GBM v průběhu cílené léčby je to, že v GBM probíhá jak lineární, tak větvená divergentní subklonální mikroevoluce. To ukazuje na to, že cílené monoterapie založené na nálezech somatických mutací v genomu GBM pouze v době diagnózy budou velmi pravděpodobně odsouzeny k nezdaru.

Ke koncepcím léčby GBM byl zařazen i přístup spočívající v terapeutickém zásahu do mikroprostředí GBM. Tato léčba je většinou patogenetická, neboť je cílena na zablokování patogenetických mechanismů progresu GBM. K protinádorové terapii cílené na mikroprostředí GBM v dnešní době patří zejména antiangiogenní léčba a antiimunosupresivní imunoterapie. Pro antiangiogenní léčbu

u GBM nádorů je především při rekurenci onemocnění k dispozici monoklonální anti-VEGF protilátka bevacizumab. Její léčebné použití však v řadě klinických zkoušek nepřineslo prodloužení celkového přežití u pacientů s GBM. Nově studovaným přístupem protinádorové léčby nádorů je cílené zvýšení aktivace efektorových T lymfocytů s použitím inhibitorů imunitních kontrolních bodů (tj. receptorů a ligandů PD-1, CTLA-4 a PD-L1 aj.). Tato antiimunosupresivní imunoterapie s použitím inhibičních monoklonálních protilátek (např. nivolumab, pembrolizumab, durvalumab, tremelimumab) přinesla zásadní zlepšení prognózy pacientů s maligním melanomem a nemalobuněčným karcinomem plic a u GBM je v současné době ve stadiu pokročilého klinického zkoušení. Další vyvíjenou terapeutickou intervencí do mikroprostředí GBM je blokování imunosupresivní signální osy HIF-1 – CD39/ CD73 – adenosin – A2AR – cAMP s použitím antagonistů adenosinového receptoru A2A a podpůrné oxygenoterapie. Vzhledem k silným protumorigenním a imunosupresivním účinkům, které má extracelulární acidifikace mikroprostředí GBM, se také nabízí možnost antiacidifikační léčby s použitím antagonistů blokujících export H^+ iontů z gliomových buněk a inhibitorů ektokarboanhydras IX a XII. Tento zatím experimentální terapeutický přístup, který spočívá v přeměrování acidního stresu v GBM nádorech s výslednou alkalizací extracelulárního mikroprostředí v GBM a acidifikací intracelulárního prostředí v gliomových buňkách, může mít mnohočetné a synergické protinádorové účinky.

2.6 SHRnutí PRO PRAXI

Mikroprostředí GBM je patogenetickým prostředím mikroevoluce subklonů gliomových buněk. Ve svém kontextu podporuje tumorigenezi, heterogenitu a progresi GBM. Jeho složky vstupují do nesčetného množství recipročních interakcí s gliomovými buňkami a svou dynamikou, variabilitou a redundancí podporují životaschopnost a odolnost subpopulací, klonů a subklonů gliomových buněk vůči mnoha stresům včetně léčby. Výzkum sekrečních proteomů (sekretomů) a transkriptomů a proteomů extracelulárních vezikul (vezikulomů) gliomových buněk s nekmenovým i kmenovým fenotypem má značný význam pro identifikaci a validaci biomarkerů a molekulárních signatur důležitých pro výběr cílené léčby, sledování její účinnosti a eventuální přenastavení při identifikaci subklonálních populací gliomových buněk refrakterních na léčbu, aby se předešlo relapsu GBM. Lze nicméně očekávat, že i terapeutické přístupy cílené na potlačení imunosuprese efektorových T lymfocytů u GBM léčebně zasáhnou subpopulace gliomových buněk větším či menším selektivním tlakem a povedou ve svém důsledku ke vzniku nových rezistentních subklonů gliomových buněk. Terapeutická účinnost uvedených přístupů se však může zvýšit při jejich kombinaci nebo v kombinaci s protinádorovými léčivými zásahujícími intracelulární cíle v gliomových buňkách. Kombinací terapie založená na těchto principech by mohla vést k režimům s lepšími výsledky ve srovnání se standardním Stuppovým protokolem.

Podpořeno UNCE 204013, Progres Q28/ILFUK a z programového projektu MZ ČR s reg. č. 15-31379A.

LITERATURA

1. Andre-Gregoire G, Gavard J. Spitting out the demons: extracellular vesicles in glioblastoma. *Cell Adh Migr.* 2017;11:164–72.
2. Antonios JP, Soto H, Everson RG, Moughon D, Orpilla JR, Shin NP, et al. Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2017; doi: 10.1093/neuonc/now287.
3. Caiado F, Silva-Santos B, Norell H. Intra-tumour heterogeneity - going beyond genetics. *FEBS J.* 2016;283:2245–58.
4. Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizdahkhani S, Gilbert MR, Park DM. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol.* 2017; doi: 10.1093/neuonc/now258.
5. D'Asti E, Chennakrishnaiah S, Lee TH, Rak J. Extracellular vesicles in brain tumor progression. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36:383–407.
6. Dello RC, Lisi L, Tentori L, Navarra P, Graziani G, Combs CK. Exploiting microglial functions for the treatment of glioblastoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;17:267–81.
7. Denicolai E, Tabouret E, Colin C, Metellus P, Nanni I, Boucard C, et al. Molecular heterogeneity of glioblastomas: does location matter? *Oncotarget.* 2016;7:902–13.
8. Gatenby RA, Brown J. Mutations, evolution and the central role of a self-defined fitness function in the initiation and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2017; in press, doi: 10.1016/j.bbcan.2017.03.005.
9. Giusti I, Di Francesco M, Dolo V. Extracellular vesicles in glioblastoma: role in biological processes and in therapeutic applications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;17:221–35.
10. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21:309–22.
11. Hatfield SM, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1 α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;29:90–6.
12. Honasoge A, Sontheimer H. Involvement of tumor acidification in brain cancer pathophysiology. *Front Physiol.* 2013;4:316.
13. Huber V, Camisaschi C, Berzi A, Ferro S, Lugini L, Triulzi T, et al. Cancer acidity: an ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol.* 2017; doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.001.
14. Okawa S, Gargra S, Blin C, Ender C, Pollard SM, Krijgsveld J. Proteome and secretome characterization of glioblastoma-derived neural stem cells. *Stem Cells.* 2017;35:967–80.
15. Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, Zhu Y, Cheng ZJ, Vafaee F, Chen J, Wheeler HR, Howell VM. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep.* 2016;6:22477.
16. Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol.* 2017; doi: 10.1093/annonc/mdx169.
17. Quail DF, Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell.* 2017; 31:326–41.
18. Robert SM, Sontheimer H. Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:1839–54.
19. Šedo A, Mentlein R, editors. *Glioma Cell Biology.* Wien: Springer-Verlag; 2014.
20. Tan AC, Heimberger AB, Khasraw M. Immune checkpoint inhibitors in gliomas. *Curr Oncol Rep.* 2017;19:23.