

PAWEŁ WAŃKOWICZ, PRZEMYSŁAW NOWACKI

## GLEJAK WIELOPOSTACIOWY – POSTĘP WIEDZY NA TEMAT PATOGENEZY NOWOTWORU

### GLIOBLASTOMA MULTIFORME – THE PROGRESS OF KNOWLEDGE ON THE PATHOGENESIS OF CANCER

Katedra i Klinika Neurologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie  
ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Przemysław Nowacki*

#### Summary

Glioblastoma multiforme is a particularly malignant form of primary brain tumor. This cancer represents 12–15% of all brain tumors. Despite advances in neurosurgery, radiation and chemotherapy, the average survival rate is only from 12.1 to 14.6 months. Glioblastoma multiforme is characterized by its diverse histological and cellular features. Like other malignant tumours, it is formed in a multi-stage process of somatic cell transformations, accumulating several genetic disorders. The last decade was a period of particular interest in stem cells. These cells have so far been identified in a variety of primary tumours in the brain. They are probably responsible for the recurrence and progression of cancer. Given the current state of knowledge, it is likely that modifications to the previously used morphological classification of tumours of the CNS will be made by the WHO, as well as the extension of its molecular criteria. In particular, such strategies are awaited for Glioblastoma multiforme – the most malignant primary tumor of the central nervous system, with so far very poor prognosis.

**Key words:** glioblastoma multiforme – the pathogenesis of cancer – genetic disorders – cancer stem cells.

#### Streszczenie

Glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme* – GBM) to szczególnie złośliwa postać pierwotnego guza mózgu. Nowotwór ten stanowi 12–15% wszystkich guzów

mózgu. Pomimo postępów w neurochirurgii, radio- i chemioterapii wskaźnik średniego przeżycia wynosi zaledwie 12,1–14,6 miesięcy. Glejaka wielopostaciowego cechuje zróżnicowany układ histologiczny i komórkowy. Podobnie jak inne nowotwory złośliwe, powstaje w procesie wielostopniowej transformacji komórek somatycznych, w których dochodzi do akumulacji wielu zaburzeń genetycznych. Ostatnia dekada to okres szczególnego zainteresowania komórkami macierzystymi. Komórki te, do tej pory zidentyfikowane w różnych guzach pierwotnych, w tym w mózgu, są prawdopodobnie odpowiedzialne za wznowę i progresję nowotworu. Biorąc pod uwagę stan obecnej wiedzy, prawdopodobnym wydaje się dokonanie modyfikacji dotychczas stosowanej morfologicznej klasyfikacji guzów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wg Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) i poszerzenie jej o kryteria molekularne. Szczególnie oczekiwane są takie strategie wobec GBM – najbardziej złośliwego pierwotnego nowotworu OUN o, jak dotąd, pesymistycznym prognozowaniu.

**H a s ł a:** glejak wielopostaciowy – patogeneza nowotworu – zaburzenia genetyczne – nowotworowe komórki macierzyste.

\*

Rozpoznanie guza mózgu wciąż budzi ogromny lęk. Nowotwór rozwija się często niepostrzeżenie, a ubytkowe objawy neurologiczne w początkowym stadium choroby trudno stwierdzić. Częstość występowania pierwotnych guzów mózgu waha się między 3,55 a 5,7 przypadków na 100 000 osób – 70% wszystkich pierwotnych guzów

mózgu stanowią glejaki [1]. Charakteryzują się dwoma szczytami zachorowalności, pierwszy przypada w dzieciństwie, a drugi między 55. a 65. r.ż. [2, 3]. Przeciętna zapadalność na glejaki jest wyższa u kobiet niż u mężczyzn (6 : 1) [4]. Na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować tendencję wzrostową zachorowalności na pierwotne złośliwe guzy ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Jest to szczególnie zauważalne u pacjentów w starszym wieku [1].

Ryzyko rozwoju glejaka jest znacznie zwiększone w kilku zespołach uwarunkowanych genetycznie: w zespole Li–Fraumeni, nerwiakowłóknikowości typu 1 i 2, zespole von Hippel–Lindau, stwardnieniu guzowatym, zespole Burkitta oraz dziedzicznym zespole niepolipowatego guza odbytnicy i jelita grubego.

Według obecnie obowiązującej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) wyróżnia się cztery stopnie złośliwości glejaków (G1–4). Najbardziej złośliwym przedstawicielem w tej grupie pierwotnych nowotworów OUN jest glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme* – GBM). Nowotwór ten stanowi 12–15% wszystkich guzów mózgu. W USA każdego roku na GBM zapada 3,19 osób na 100 000 osób [5]. Pomimo postępów w neurochirurgii, radio- i chemioterapii wskaźnik średniego przeżycia wynosi zaledwie 12,1 miesiący przy stosowaniu radioterapii lub 14,6 miesiący z dodatkowym leczeniem temozolomidem [6].

Glejaka wielopostaciowego cechuje zróżnicowany układ histologiczny i komórkowy. Nowotwór czasami może przypominać guz o mniejszym użłośliwieniu, jednak rozpoznanie atypii jąder komórkowych, wysokiej aktywności proliferacyjnej, unaczynienia o strukturze kłębuszkowatej czy obszarów martwicy przesądza o rozpoznaniu. Nowotwór tworząc tzw. struktury wtórne, skupia się wokół komórek nerwowych, naczyń lub przedostaje się do pęczków nerwowych. Charakterystyczną cechą GBM jest pleomorfizm komórek nowotworowych. Nowotwór mogą budować różne niskozróżnicowane formy komórkowe, komórki olbrzymie wielojądrowe, a z drugiej strony bardziej dojrzałe gemistocyty czy astrocyty włóknkowe. W guzie mogą występować elementy poligonalne, ciała tłuszczowe zawieszane w cytoplazmie o zróżnicowanej strukturze piankowej, szklistej lub ziarnistej. Biorąc pod uwagę analizę immunohistochemiczną, w komórkach GBM stwierdza się ekspresję markera glejowego – kwaśnego białka włóknkowego (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP) uzależnioną od stopnia dojrzałości komórek guza. W związku z tym małe komórki glejaka mogą nie wykazywać reaktywności z przeciwciałami wykrywającymi ten antygen, a dojrzałe cechuje wysoka ekspresja GFAP. Można stwierdzić też obecność aktywny, alfa-antytrypsyny, alfa-1-antychymotrypsyny, a także ekspresję S-100 i alfa-beta-krystaliny i cytokeratyn [7, 8, 9].

Glejaka wielopostaciowy podobnie jak inne nowotwory złośliwe powstaje w procesie wielostopniowej transformacji komórek somatycznych, w których dochodzi do akumulacji wielu zaburzeń genetycznych. Wyróżnia się dwie postaci GBM: pierwotną, która powstaje *de novo*, oraz

wtórna – rozwijającą się na podłożu glejaka o mniejszej złośliwości, zwłaszcza gwiaździaaka anaplastycznego, ale może także powstać w wyniku transformacji gwiaździaaków rozlanych (tucznomórkowego, rzadziej włóknistego). Pierwotny GBM występuje najczęściej u osób po 62. r.ż., a czas rozwoju objawów klinicznych jest krótki. Postać wtórna GBM dotyczy młodszej populacji (średnia wieku 45 lat) i jest związana z dłuższym czasem przeżycia [10].

Pod względem histopatologicznym postać pierwotna i wtórna GBM są nie do odróżnienia [11], natomiast pod względem molekularnym stanowią dwie odrębne jednostki. W pierwotnych GBM stwierdza się zmiany molekularne, takie jak: amplifikacja receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) – 36%, delecja genu supresorowego p16 (31%), kontrolującego wzrost komórek przez inhibicję kinaz CDK4 i CDK6 oraz mutacja genu supresorowego *PTEN* na chromosomie 10 (25%). Wtórny GBM cechują: mutacja genu białka p53 (60%) oraz nadmierna nadekspresja receptora czynnika płytkowego (*platelet-derived growth factor receptor* – PDGFR) [12, 13].

Przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu badania pozwoliły na zmianę wiedzy na temat patogenyzy i rozwoju GBM. Obecnie zidentyfikowanych jest wiele czynników powodujących transformację nowotworową komórki prekursorowej. Wśród nich znajdują się geny *GLI* (*glioma-associated oncogenes*), które uczestniczą w transferowaniu sygnału Hedgehog-Gli (HH-GLI), m.in. u człowieka [14]. Badania nad GBM wykazały, że działanie GLI powoduje zakłócenie ekspresji 30 genów, z których 11 ulega wysokiej ekspresji. Są to geny mające wpływ na apoptozę, cykl komórkowy oraz transdukcję sygnału [15].

Rozwój badań z użyciem mikromacierzy przyczynił się do rozpoznania nowych genów, które uczestniczą w mechanizmie rozwoju glejaków (*ADD3*, *CAMK2G*, *CENPF*, *COL4A2*, *FOXMI*, *IGFBP2*, *MGP*, *TOP2A*, *VEGFA*) [16]. W 2001 r. naukowcy z Cornell University w swoim badaniu z zastosowaniem mikromacierzy udokumentowali liczne molekularne zaburzenia w GBM obejmujące blisko 170 genów, które wcześniej nie były nawet wiązane z tym typem nowotworu [17]. Są to grupy genów zaangażowane m.in. w naprawę DNA (np. *NULL*, *POLD2*, *RFC4*, *ODC1*, *H4FG*), regulację cyklu komórkowego (*CKS2*, *CDC20*, *CDK4*, *CDKN3*), regulację transkrypcji (*FOXG1B*, *TLS/CHOP*, *FOXMI*, *MYBL2*), inaktywację apoptozy (*API4*, *TXN*), degradację białek (*UBCH10*, *E2-EPF*).

Ostatnia dekada to okres wyjątkowego zainteresowania komórkami macierzystymi ze szczególną fascynacją nowotworowymi komórkami macierzystymi. Komórki te do tej pory zostały zidentyfikowane w różnych guzach pierwotnych, np. jelita grubego [18], płuc [19], prostaty [20], trzustki [21], mózgu [22]. Są one prawdopodobnie odpowiedzialne za wznowę i progresję nowotworu [23]. Jeszcze do niedawna sądzono, że w mózgu dorosłego człowieka nie ma komórek macierzystych. Przez wiele dekad utrzymywał się dogmat R. Cajala, według którego po zakończonym

rozwoju układu nerwowego dalszy wzrost i regeneracja aksonów nie jest już możliwa. Pierwsze racjonalne argumenty przemawiające za neurogenezą w mózgu człowieka pojawiły się w latach 90. ubiegłego stulecia. Amerykańscy naukowcy zlokalizowali obszary neuralnych komórek macierzystych w mózgu dorosłego człowieka: strefę okołokomorową komór bocznych (*subventricular zone* – SVZ) oraz strefę podziarnistą obszaru zakrętu zębatego hipokampa (*subgranular zone* – SGZ) [24, 25]. Przełomowego odkrycia na polu poszukiwań nowotworowych komórek macierzystych (*cancer stem cells* – CSC) dokonano w 1977 r. Wyniki badań wykazały, że niewielka wobec oczekiwań grupa komórek wyizolowanych z litych guzów posiada zdolność do proliferowania. Dowiedziano, że zdolność do tworzenia kolonii miało jedynie 1/1000–1/5000 wyizolowanych komórek [26]. Na podstawie tych wyników wysunięto wnioski, że istnieją komórki odpowiedzialne za rozwój i proliferację nowotworów.

Pierwsza identyfikacja nowotworowych komórek macierzystych OUN przypada na 2004 r. [23]. Przeprowadzone analizy hodowli pierwotnych guzów mózgu w standardowych warunkach neuronalnych komórek macierzystych potwierdziły wytwarzanie neurosfer, które były fenotypowo podobne do neuronalnych komórek macierzystych pod względem samoodnawiania się oraz różnicowania w neurony, astrocyty i oligodendrocyty. Tak powstałe populacje były wszczepiane do organizmu o innym pochodzeniu niż dawca komórek (w tym przypadku były to myszy z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną). Wszczepione populacje komórek prowadziły do rozwoju guza, który fenotypowo podobny był do nowotworu macierzystego [23, 27, 28].

Komórki macierzyste guza mózgu mogą być wyodrębnione spośród innych komórek pierwotnego guza mózgu za pomocą powierzchniowego markera nerwowych komórek macierzystych – CD133+ (Prominin-1) [29]. Pomimo wielu przeprowadzonych badań i poszukiwań skutecznych markerów dla nowotworowych komórek macierzystych, obecnie tylko CD133+ uważany jest za najbardziej niezawodny marker nowotworowych komórek macierzystych guzów mózgu. Sugeruje się, że markery embrionalnych komórek macierzystych, tj. Nanog, Oct4 i Sox2, mogą służyć jako biomarkery nowotworowych komórek macierzystych i być pomocne w identyfikacji tych komórek w masie guza [30, 31]. Komórki CD 133 stanowią 3,5–46% wszystkich komórek w guzie, przy czym w guzach o wyższym stopniu złośliwości ten odsetek jest wyższy [23]. W rzeczywistości nowotworowe komórki macierzyste CD133+ w GBM są związane ze zwiększoną opornością na radioterapię, w porównaniu z nienowotworowymi komórkami macierzystymi CD133– obejmującymi masę guza. Ponadto, komórki CD133+ o wiele szybciej niż CD133– usuwają uszkodzenia DNA [32]. Nowotworowe komórki macierzyste posiadają zdolność inicjacji nowotworu u innych kręgowców. Na podstawie wyników kolejnych badań udowodniono, że transplantowane komórki CD133+ wywołały guzy, natomiast CD133– nie wykazywały takiej zdolności [23]. Nowotworowe komórki macierzyste

GBM mają wiele fenotypowych podobieństw do neuralnych komórek macierzystych, jak chociażby ekspresja markerów (Nestyna, Sox2, CD133) i zdolność do samoodnowy lub różnicowania w procesie powstawania neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Regulacja samoodnowy i różnicowania nowotworowych komórek macierzystych GBM i neuralnych komórek macierzystych przebiega na tych samych ścieżkach sygnałowych, w tym BMP (*bone morphogenetic protein*), Hedgehog and Notch.

Biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy, prawdopodobnym wydaje się dokonanie modyfikacji dotychczas stosowanej morfologicznej klasyfikacji guzów OUN wg WHO i poszerzenie jej o kryteria molekularne. Badania komórkowych ścieżek sygnałowych lub ekspresji genów być może umożliwią wyróżnienie wielu odmian poznanych już nowotworów, a nawet doprowadzą do przeklasyfikowania obwiązujących podziałów z myślą o efektywnej odpowiedzi na celowaną terapię genetyczno-molekularną. Szczególnie oczekiwane są takie strategie wobec GBM – najzłośliwszego pierwotnego nowotworu OUN o, jak dotąd, pesymistycznym prognozowaniu.

## Piśmiennictwo

1. Ohgaki H., Kleihues P.: Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005, 109 (1), 93–108.
2. Cokgor I., Friedman A.H., Friedman H.S.: Pediatric Update: Gliomas. *Eur J Cancer.* 1998, 34, 1910–1918.
3. Louis D.N., Pomeroy S.L., Cairncross I.G.: Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell.* 2002, 1 (2), 125–128.
4. Kleihues P., Cavenee W.K.: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon 2000.
5. Rodriguez F.J., Orr B.A., Ligon K.L., Eberhart C.G.: Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget.* 2012, 3, 98–106.
6. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J. et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005, 352 (10), 987–996.
7. Scherer H.J.: Structural development in gliomas. *Am J Cancer.* 1938, 34, 333–351.
8. Zagzag D., Esencay M., Mendez O., Yee H., Smirnova I., Huang Y. et al.: Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol.* 2008, 173, 545–560.
9. Burger P.C., Scheithauer B.W., Vogel F.S.: Surgical pathology of the nervous system and its coverings. Churchill Livingstone, New York 2002.
10. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvett A. et al.: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007, 114 (2), 97–109.
11. Wen P.Y., Kesari S.: Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008, 359 (5), 492–507.
12. Ohgaki H., Kleihues P.: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007, 170 (5), 1445–1453.
13. Smith J.S., Perry A., Borell T.J., Lee H.K., O'Fallon J., Hosek S.M. et al.: Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol.* 2000, 18, 636–645.
14. Matisse M.P., Joyner A.L.: Gli genes in development and cancer. *Oncogene.* 1999, 18, 7852–7859.

15. Yoon J.W., Kita Y., Frank D.J., Majewski R.R., Konicek B.A., Nobrega M.A. et al.: Gene expression profiling leads to identification of *Gli1*-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in *Gli1*-induced cell transformation. *J Biol Chem.* 2002, 277 (7), 5548–5555.
16. van den Boom J., Wolter M., Kuick R., Misk D.E., Youkilis A.S., Wechsler D.S. et al.: Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 2003, 163 (3), 1033–1043.
17. Rickman D.S., Bobek M.P., Misk D.E., Kuick R., Blaivas M., Kurnit D.M. et al.: Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 2001, 61 (18), 6885–6891.
18. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C. et al.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007, 445, 111–115.
19. Eramo A., Lotti F., Sette G., Pilozzi E., Biffoni M., Di Virgilio A. et al.: Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differ.* 2008, 15, 504–514.
20. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., Stower M.J., Maitland N.J.: Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005, 65, 10946–10951.
21. Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V. et al.: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007, 67 (3), 1030–1037.
22. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J. et al.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003, 63 (18), 5821–5828.
23. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T. et al.: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004, 432 (7015), 396–401.
24. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D. A. et al.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998, 4 (11), 1313–1317.
25. Doetsch F., Caille L., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999, 97, 703–716.
26. Hamburger A.W., Salmon S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977, 197 (4302), 461–463.
27. Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S. et al.: Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004, 64, 7011–7021.
28. Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A.: Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia.* 2002, 39 (3), 193–206.
29. Uchida N., Buck D.W., He D., Reitsma M.J., Masek M., Phan T.V. et al.: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, 14720–14725.
30. Clement V., Marino D., Cudalbu C., Hamou M.F., Mlynarik V., de Tribolet N. et al.: Marker-independent identification of glioma-initiating cells. *Nat Methods.* 2010, 7 (3), 224–228.
31. Sampetean O., Saya H.: Characteristics of glioma stem cells. *Brain Tumor Pathol.* 2013, 30 (4), 209–214.
32. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B. et al.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006, 444, 756–760.