

## ZNAČENJE ANGIOGENEZE I EKSPRESIJE CD44 U GLIOBLASTOMU

JOSIP MIHIĆ, KREŠIMIR ROTIM, MAJDA VUČIĆ<sup>1</sup>, GABY NOVAK-BILIĆ<sup>2</sup>  
i LIBORIJA LUGOVIĆ-MIHIĆ<sup>2</sup>

*Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Klinika za neurokirurgiju, <sup>1</sup>Ljudevit Jurak Zavod za patologiju i <sup>2</sup>Klinika za kožne i spolne bolesti, Ambulanta za alergologiju i kliničku imunologiju, Zagreb, Hrvatska*

Cilj ove studije bio je pokazati ulogu angiogeneze i CD44 u glioblastomu (*glioblastoma multiforme*, GBM). Kao što su recentne studije pokazale da izraženost CD44 u nekim tumorima ima prognostičku vrijednost, postoje pojedini dokazi da je povećana izraženost CD44 povezana s lošijom prognozom bolesnika s glioblastomom. Poznato je da je CD44 široko izražen transmembranski stanični protein uključen u mnoge fiziološke i patološke procese (adhezija matriksa, navođenje i aktivacija limfocita, cijeljenje rana, stanični rast, preživljavanje i migracija stanica, rast i metastaziranje tumora I dr.). Postoji veći broj potencijalnih mehanizama kojima CD44 može promicati malignost, npr. CD44 modulira čimbenike koji mogu dopustiti pokretanje tumora i metastatsku kaskadu (prianjanje, pokretljivost, degradacija matriksa, proliferacija i stanično preživljavanje). Specifično gledano, CD44 veže nekoliko izvanstaničnih tvari (hijaluronska kiselina, kolagen, fibronektin, osteopontin) što može olakšati vezanje i naknadni rast tumorskih stanica na drugim mjestima i izraženost CD44. S druge strane, pronađeno je da manja izraženost CD44 može biti povezana s većom vjerojatnošću recidiva i posljedično lošijim ishodom, što je potkrijepljeno praćenjem bolesnika s recidivom glioblastoma koji imaju bolje preživljavanje kod veće izraženosti CD44. Prema tome, veća izraženost CD44 vidljiva je u težim oblicima tumora, dok niže razine CD44 mogu ukazivati da su maligne stanice rezistentnije na kemoterapijske tvari.

**Ključne riječi:** angiogeneza, CD44, glioblastom, bevacizumab

**Adresa za dopisivanje:** Dr. sc. Josip Mihić, prim., dr. med.  
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice  
Klinika za neurokirurgiju  
Vinogradska cesta 29  
10 000 Zagreb, Hrvatska

### UVOD

Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*, GBM) je najmaligniji oblik astrocitoma koji obično ne reagira na terapiju, a nosi visoku stopu smrtnosti zbog svog agresivnog i invazivnog rasta (1-3). Glioblastom se stvara u području moždanih hemisfera, najčešće u subkortikalnoj bijeloj tvari moždanih hemisfera, unutar kortikotemporalne regije mozga, uz moguće leptirasto širenje preko kaloznog korpusa u drugu hemisferu. Mikroskopski je za glioblastom karakteristična astrogljalna diferencijacija, atipija jezgara, stanični polimorfizam, mitotska aktivnost, mikrovaskularna proliferacija s krvožilnim trombozama i nekrozama (4-6). Patohistološki, za glioblastom su karakteristične nekroze koje su razmještene pseudopalisadno, kalcifikacije i nerijetko cističke promjene (7).

U radu s bolesnicima s glioblastomom trenutno ne postoje standardi za određivanje stupnja prošireno-

sti (*staging*) glioma (8,9). Smatra se da su najvažniji prognostički parametri kod tih bolesnika histologija tumora, njegova lokalizacija i biologija. S druge strane, kod glioma se primjena klasifikacije koja uključuje morfološko histološka obilježja prema ključnim stavovima (*American Joint Committee on Cancer*, AJCC) nije pokazala dobrim prediktorom ishoda (8). Stoga je nova WHO klasifikacija glioma iz 2016. godine uz fenotipska obilježja uključila i genotipizaciju u definiranju entiteta glioblastoma uvodeći tzv. IDH-*wildtype* i IDH-*mutant* glioblastom (9).

### ANGIOGENEZA I CD44 KOD GLIOBLASTOMA

Za glioblastom je karakteristično da je to najbolje vaskularizirani tumor mozga, a proces angiogeneze je sve važniji u dijagnostici i terapiji (10,11). Angiogenezu kod tog tumora mikroskopski obilježava mikrovasku-

larna proliferacija kao morfološki biljeg koji, po odrednicama klasifikacije tumora WHO, razlikuje glioblastom od bolje diferenciranih astrogljalnih tumora. Mikrovaskularna proliferacija se očituje pojavom krvožilnih tjelešaca sličnih bubrežnim glomerulima (glomeruloidnih tjelešaca) građenih od hiperplastičnih i proliferacijski aktivnih endotelnih stanica, okruženih bazalnom membranom, pericitima i glatkim mišićnim stanicama. Neovaskularizacija glijalnih tumora mozga korelira s njihovom biološkom agresivnošću, stupnjem zloćudnosti i prognozom. Kod glioblastoma je karakteristično da njegova neovaskularizacija, zbog nepostojanja krvnomoždane prepreke oko novostvorenih krvnih žila, omogućuje i migraciju tumorskih stanica, razaranje okolnog tkiva edemom i nakupljanje radiološkog kontrasta.

Ključni korak u progresiji zloćudnih tumora, pa tako i glioblastoma, je angiogeneza (budući da omogućuje rast tumora) i prilagodba tumora na hipoksiju. Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih, tijekom čega dolazi do promjene ravnoteže proangiogenih i protuangiogenih čimbenika izlučenih iz tumorskih stanica, endotelnih stanica i makrofaga. Pritom je zadovoljavajuća angiogeneza preduvjet tumorskog rasta i progresije glioblastoma. Zbog svoje potencijalne prognostičke i terapijske vrijednosti, angiogeneza se dosta istražuje kod glioblastoma, s obzirom na to da je on zbog svoje iznimno bogate vaskularizacije pogodan za protuangiogeno liječenje (12,13). Pritom je važno da je proces tumorske angiogeneze reguliran proangiogenetskim i antiangiogenetskim čimbenicima proizvedenim od strane tumorskih stanica te okolnih i infiltrirajućih stanica domaćina (12-14).

U tom procesu je važno stvaranje angiogenih čimbenika iz tumorske mase što potiče stvaranje krvnih žila koje hrane stanice karcinoma kisikom i hranjivim tvarima. Ove krvne žile se vjerojatno koriste kao put za širenje metastaza (15). Opisano je nekoliko angiogenih čimbenika, uključujući vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*), čimbenik rasta fibroblasta (FGF, engl. *Fibroblast growth factor*), transformirajući čimbenik rasta (TGF- $\alpha$ , engl. *Transforming growth factor- $\alpha$* ), transformirajući čimbenik rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), čimbenik rasta hepatocita (HGF, engl. *Hepatocyte growth factor*), tumor nekrotizirajući čimbenik (TNF, engl. *Tumor necrosis factor*), angiogenin, interleukin-8 i angiopoetini (15,16). Osobito je pritom važna uloga koju ima VEGF, pro-angiogeni i imunomoduladni citokin, koji ima sustavno značenje i značenje u tumorskom mikrookolišu. Tako se ističe njegovo terapijsko značenje, s obzirom na moguću primjenu VEGF inhibitora, tj. protutijela usmjerenih protiv VEGF (bevacizumab) (12). Uz to, interakcije i funkcionalni kontakti između tumorskih stanica i njihovog mikrookoliša odvija-

ju se putem staničnih površinskih receptora, koji su odgovorni za interstanične adhezije i adhezije između stanica i izvanstaničnog matriksa (17). Pritom tkivo CNS-a sadrži dosta glikozaminoglikana hijaluronske, dok gliomske stanice izražavaju glavni stanični površinski hijaluronanski receptor, CD44, što ukazuje na njegovo značenje (17).

Među čimbenicima s važnom ulogom u navedenom procesu tumorske angiogeneze su i angiopoetini (Ang). Angiopoetini su ligandi Tie-2 tirozin-kinaznog receptora (RTK), koji je izražen primarno na endotelnim stanicama (14,18,19). U ljudi su do sada dokazana tri angiopoetina (Ang-1, Ang-2 i Ang-4), a osobito je značajan Ang-4 koji pomaže progresiju glioblastoma, na način da potiče zadržavanje/održivost tumorskih stanica i angiogenezu (14). Utvrđeno je da je Ang-4 povišen u ljudskom tkivu i stanicama glioblastoma pri čemu njegove stanice pokazuju ekspresiju Tie-2 RTK kao i endotelne stanice. Utvrđeno je (studijama *in vivo*) da Ang-4 potiče rast ljudskog glioblastoma tako da pomaže tumorsku angiogenezu i izravnu aktivaciju izvanstaničnog signala reguliranog kinazom Erk1/2 u stanicama glioblastoma. Ispitivanje učinka Ang-4 na tumorsku angiogenezu i progresiju glioblastoma pokazalo je da Ang-4 potiče rast glioblastoma, pri čemu postoji pro-glioblastomski učinak Ang-4 putem poticanja tumorske angiogeneze i aktivacije Erk1/2 u stanicama glioblastoma. Te spoznaje upućuju da je funkcionalna os Ang-4 – Tie-2 atraktivna meta za ciljanu terapiju glioblastoma (14).

Do sada su provedena pojedina istraživanja o molekulama značajnim za vaskularizaciju glioblastoma među kojima se ističe CD44. Tako se navodi da je povećana izraženost CD44 u endotelnim stanicama povezana s aktivnošću VEGFR-2 i HGF koji su neophodni za razvoj tumorske vaskularizacije (3,15). Već od ranije postoje dokazi da CD44 ima ulogu u nastanku novotvorina i metastaziranju (20). Ovaj antigen CD44 je transmembranski glikoprotein, čije su različite izoforme kodirane temeljem alternativnog RNA izrezivanja, a najbrojnija izoformna inačica je standardni CD44.

CD44 je multistrukturalna i multifunkcionalna stanična adhezijska molekula koja je uključena u procese stanične proliferacije, diferencijacije, angiogeneze, stanične migracije i staničnog preživljenja, te tumorskom rastu i metastaziranju (21). CD44 sudjeluje i u patološkim procesima rasta tumora, proliferacije tumora i rasapa tumorskih stanica. CD44 također posreduje u interakciji izvanstaničnog matriksa i unutarstaničnog citoskeleta, međudjelovanju s čimbenicima rasta i metaloproteazama matriksa, aktivirajući tako signalne puteve koji mogu potaknuti tumorski rast i suprimirati apoptozu (21).

Uloga CD44 u tumorskom rastu i širenju uključuje mogućnost da CD44 proteini sudjeluju na više načina (21,22). Smatra se da CD44 može poticati proliferaciju, pokretljivost i/ili invazivnost tumorskih stanica jer može regrutirati i potom aktivirati metaloproteinaze matriksa pridružene staničnoj površini. Kao drugo, inačice CD44 bi mogle imati ulogu u poticanju tumorskog rasta kao ko-receptori u aktivaciji tumorskih RTK receptora. Uz to bi specifične CD44 inačice mogle funkcionirati kao ligandi površine tumorskih stanica koje međudjeluju s endotelnim selektinima, posredujući u početnom zaustavljanju i hvatanju cirkulirajućih tumorskih stanica u sekundarnom organu (22). Također CD44 može regulacijom endotelnih stanica i/ili regrutacijom/aktivacijom upalnih stanica, promicati tumorsku angiogenezu. Pritom treba imati u vidu važnost angiogeneze tumora, budući da je poznato da su maligni gliomi izrazito vaskularizirani, a angiogeneza ima značajnu ulogu u progresiji ovog tumora (12,15).

Postoje literaturni dokazi da je u mnogim tumorima CD44 jako izražen i promotor nastanka tumora putem interakcija s tumorskim mikrookolišem te je ključan u malignim procesima, uključujući pokretljivost stanica, stanični rast i angiogenezu (20-23).

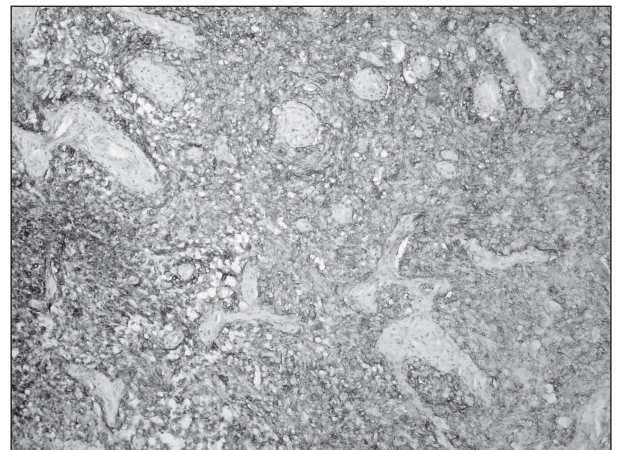
Već su ranije uočene promjene izraženosti CD44 molekula kod različitih tipova tumora, npr. tumora dojke, sarkoma mekih tkiva te neuroblastoma (21). Tako je u više tumora dokazana povećana imunohistokemijska izraženost CD44 (tumori dojke, prostate i gastrointestinalnog trakta), što se povezuje sa slabije diferenciranim karcinomima histološki višeg stupnja i s nepovoljnijim preživljenjem bolesnika. Rezultati većine dosadašnjih istraživanja pokazali su povezanost povećane izraženosti CD44 s metastatskim potencijalom tumorskih stanica. Također treba uzeti u obzir da je utvrđena povezanost glioblastoma s postojanjem/prisutnošću karcinomskih matičnih stanica ("cancer stem cells", CSCs) unutar tumora (1,18,20). To treba uzeti u obzir s obzirom da se CD44 smatra biljekom subpopulacije matičnih tumorskih stanica iz kojih samoobnavljanjem može proliferirati glavnina tumorske mase (18,20).

S druge strane, neki radovi su ipak kontradiktorno kod nekih malignoma (karcinoma bubrežnih stanica i non-Hodgkinovog limfoma) pokazali kod povećane izraženosti CD44 u tumorskim stanicama povoljnije preživljenje. U dosadašnjim istraživanjima dobiveni su različiti i dijelom oprečni podaci o imunohistokemijskoj izraženosti CD44 u tumorskim stanicama zbog čega je dijelom i nejasna njegova uloga u tumorskoj neovaskularizaciji. Tako neka istraživanja uzoraka raspodjele CD44 u različitim tumorima pokazuju da određene stanice ne koriste CD44 ni u tumorogenezi

ni u stvaranju metastaza. Međutim, dostupni podaci izrazito su proturječni i potrebne su daljnje studije za utvrđivanje prognostičkog značenja CD44 i njegovih izoformnih inačica. Stoga se precizna uloga CD44 u procesu metastaziranja i značenje njegove uloge u nastanku ljudskih zloćudnih novotvorina tek treba u potpunosti utvrditi (20).

## DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA I ISKUSTVA S CD44 U GLIOBLASTOMU

Utvrđivanje čimbenika odgovornih za razvoj, metastatsko širenje i recidiviranje tumora mozga korisno je u prepoznavanju dijagnostičkih biljega i ciljeva terapijskih mogućnosti zbog čega se analizirala prognostička vrijednost CD44 u glioblastomu (sl. 1).



Sl. 1. Imunohistokemijska ekspresija CD44 u glioblastomu, difuzno pozitivna reakcija u stanicama tumora, dok je neovaskularizacija negativna (CD44, x200, vlastito bojenje).

Unatoč tomu, rezultati koji se odnose na ulogu CD44 u nastanku novotvorina su dosta kontradiktorni. Raniji rezultati su pokazali da je izraženost CD44 povećana u kolorektalnom karcinomu, dok kod karcinoma prostate postoji korelacija između njegove niže izraženosti i metastatske progresije. Prema nekim studijama jaka izraženost CD44 povezana je s boljom prognozom (suprimira metastatsku progresiju i invazivnost tumora), dok je prema drugima smanjena izraženost CD44 povezana s boljom prognozom (doprinosi smanjenju migracije i invazije) (24). Stoga, iako CD44 vjerojatno ima važnu ulogu u nastanku novotvorina i njihovom metastaziranju, narav uloge CD44 očito varira ovisno o tkivu i/ili patologiji (21).

Provedena su istraživanja koja su analizirala ekspresiju i ulogu CD44 u moždanom tkivu (17). Dok normalno tkivo mozga pokazuje nikakvu ili slabu CD44 eks-



presiju, reaktivni astrociti i stanice astrocitoma imaju različitu ekspresiju CD44 (17). Imunohistokemijskom analizom je u astrocitomima visokog stupnja utvrđen veći postotak i intenzitet CD44-pozitivnih tumorskih stanica u usporedbi s astrocitomima niskog stupnja.

Ujedno se pokazalo da su stanice glioblastoma koje izražavaju CD44 smještene/lokalizirane u perivaskularnim i perinekrotičnim lezijama. Uočeno je da su u ljudi stanice glioma (stanične linije A172 i KG-1-C) izražavale CD44 mRNA i protein. Pokazalo se da je davanje monoklonskog anti-humanog CD44 protutijela inhibiralo migraciju A172 stanica (koje su glioblastomskog podrijetla), ali nije utjecalo na stanični rast. Uočena je korelacija između vrijednosti CD44 i histopatološkog stupnja glioma. Uz to su monoklonska anti-CD44 protutijela inhibirala migraciju stanica glioblastoma (17). Ova zapažanja upućuju da je CD44 potencijalni terapijski cilj kod glioblastoma.

U nedavnoj su studiji, analizom CD44 kod glioblastoma, Monney i sur. utvrdili da CD44 promiče agresivnost glioblastoma povećavanjem invazije tumorskih stanica, proliferacijom i rezistencijom na standardnu kemoradijacijsku terapiju (23). Takav učinak CD44 u glioblastomu također ukazuje da bi takva inhibicija CD44 mogla biti značajna u terapiji (23).

Provedeno je i nekoliko drugih novijih istraživanja pa su tako Guadagno i sur. u glioblastomu određivali imunohistokemijsku izražnost biljega matičnih stanica CD44 i nestina radi procjene moguće prognostičke vrijednosti i povezanosti s ukupnim vremenom preživljenja (25,26). Prema rezultatima istraživanja izražnost CD44 bila je statistički značajna u tih bolesnika, što je i potvrđeno dvostrukom tehnikom bojanja. Prema istoj studiji, povećana izražnost CD44 bila je povezana s lošijom stopom preživljenja, iako to nije bilo statistički značajno. S druge strane, nalaz nestina na cjelokupnoj membrani lošiji je prognostički čimbenik. Tako i ovi rezultati upućuju da dokaz CD44 u glioblastomu može biti od vrijednosti i kao prediktivni biljeg (25,26).

Uloga CD44 kao prognostičkog pokazatelja diseminacije bolesti može se shvatiti i objasniti na nekoliko načina. Tako se pretpostavlja da bi CD44 mogao promovirati zloćudnost preko brojnih potencijalnih mehanizama (21). Smatra se da zloćudne stanice svoju pokretljivost ostvaruju interakcijom s komponentama izvanstaničnog matriksa (preko specifičnih receptora uključujući citoskelet) putem stanične signalizacije. Tako CD44 usklađuje i podešava staničnu adhezivnost, pokretljivost, razgradnju matriksa, proliferaciju i stanično preživljenje, tj. djeluje na te čimbenike koji bi mogli dovesti do inicijacije metastatske kaskade (27). S obzirom da se CD44 može vezati za različite

komponente izvanstaničnog matriksa (uključujući hijaluronsku kiselinu, kolagen, fibronektin, osteopontin), vjerojatno to omogućuje zaustavljanje i kasnije rast tumorskih stanica uz izražnost CD44 na sekundarnim lokacijama (21,28). Također je moguće da je CD44 uključen i u druge mehanizme kao što je široko prihvaćeno postojanje matičnih stanica karcinoma unutar različitih novotvorina, pa su i matične stanice tumora mozga uključene u tumorsku progresiju (21,25,29).

Značenje biljega tumora mozga su ispitali i Wei i sur. koji su praćenjem CD44 i drugih potencijalnih tumorskih biljega glioblastoma (CD63, FN1, GADD45A, SPP1) dokazali njihovu povećanu izražnost (uključujući CD44) i ulogu u važnim staničnim procesima koje bi mogle pridonositi tumorogenezi (21).

Postoje i druga istraživanja izražnosti ovog biljega u glioblastomu. Tako su kod glioblastoma Koev i sur. uočili da velika izražnost CD44, TNF-alfa, YKL-40 i IL-6 ukazuju da se tumor može označiti/klasificirati kao mezenhimni podtip glioblastoma, čime se objašnjava brzi klinički tijek i smrtni ishod (30).

Objavljene su i studije koje pokazuju povezanost CD44 s potencijalnim tumorskim supresorskim genom nazvanim *epithelial membrane protein 3* (EMP3)(31). Prema nedavnom istraživanju, Jun i sur. su zapazili da je EMP3 osobito izražen u glioblastomima s jakom ekspresijom CD44 (31). To upućuje da bi EMP3 mogao biti potencijalni cilj kod glioblastoma koji jako izražavaju CD44, pri čemu se ističe ključna uloga EMP3 u TGF- $\beta$ /Smad2/3 signalnoj aktivaciji i tumorskoj progresiji (31).

Takvi dokazi o povezanosti CD44 s malignim gliomima ukazuju na moguću upotrebu izražnosti CD44 kao dijagnostičkog alata ili prognostičkog pokazatelja, ali ujedno i na njegovo terapijsko značenje (32,33).

#### MOGUĆI TERAPIJSKI PRISTUPI UTEMELJENI NA ANGIOGENEZI I CD44

U terapijskom pristupu se zadnjih godina ističe mogućnost terapijskog djelovanja na angiogenezu (32). Uz to, takvi terapijski pristupi temeljeni na angiogenezi pokazali su kliničku učinkovitost kod bolesnika s glioblastomom (14). Stoga je istraživanje angiogeneze i CD44 značajno i kod osmišljavanja terapijskih mogućnosti budući da CD44 može biti ciljna meta antiangiogenetske terapije, što odgovara njegovim ulogama u regulaciji raznih staničnih procesa (stanične proliferacije, diferencijacije, preživljenja i pokretljivosti)(17).

Značajan pristup protutumorskom liječenju je mogućnost inhibicije signalizacije angiogenetskim čimbenicima VEGF i HGF preko ciljanja inačice CD44v6 (14,15,33). Uz to treba uzeti u obzir značenje angiopotina, osobito Ang-4, koji pomaže progresiju glioblastoma na način da potiče održivost tumorskih stanica i angiogenezu. Stoga je funkcionalna os Ang-4 – Tie-2 također atraktivna meta za ciljanu terapiju glioblastoma (14).

U takvom terapijskom pogledu se osobito ističe djelovanje na angiogene čimbenike, a najvažniji angiogeni čimbenik je VEGF-A, član VEGF obitelji čimbenika rasta. Pritom se VEGF-ovi vežu na 3 povezana člana obitelji VEGFR, VEGFR-1, VEGFR-2, i VEGFR-3 (15). Već postoji nekoliko anti-VEGF terapijskih postupaka koji se mogu kombinirati s kemoterapijom ili radioterapijom. U ovim postupcima najvažnija je primjena VEGF inhibitora, odnosno protutijela usmjerena prema VEGF (bevacizumab), nekoliko malih molekula koje inhibiraju VEGFR-2 signaliziranje te solubilnih VEGF receptora koji se natječu s endogenim receptorom za vezanje na VEGF (12,15). Ipak, svi ovi terapijski postupci imaju umjerenu korist za većinu bolesnika s malignomima, pa stoga postoji još mnogo prostora za poboljšanje.

Antiangiogeno terapija postala je važna komponenta liječenja mnogih solidnih tumora što potvrđuje važnost odgovarajuće opskrbe krvlju za tumorski rast i metastaze (10,16). Thomas i sur. u nedavnoj studiji potvrđuju važnost VEGF i njegovo značenje kod novodijagnosticiranih glioblastoma uz poznate imunomodulatorne učinke radijacije i temozolomida (16). Analiza pratećih imunoloških promjena je pokazala da liječenje primjenom radijacije, temozolomida i bevacizumaba smanjuje broj perifernih regulacijskih limfocita T (ali ne postotak) i povećava koncentraciju cirkulirajućeg VEGF (12,16). Ovaj prijelaz profila perifernih imunskih stanica može izmijeniti/modulirati tumorski okoliš i utjecati na kombiniranje imunoterapije s antiangiogenom terapijom (16).

Takva primjena terapijskih agensa koji ciljaju na VEGF i njegov receptor (VEGFR) pokazala je kliničku dobit za bolesnike s malignim gliomima (12,13). Ipak, trajanje odgovora varira od bolesnika do bolesnika, a pokazalo se da bar 50 % bolesnika ne odgovora na antiangiogenetsko liječenje (12,13). Uz to se uočava pojava rezistencije na anti-VEGF/VEGFR agense, što ukazuje da maligni gliomi imaju sposobnost prijelaska od zavisnosti o signalnom putu VEGF/VEGFR na zavisnost o alternativnom proangiogenetskom signalnom putu.

Usprkos obećavajućim pretkliničkim podacima i kliničkim pokusima u bolesnika s glioblastomom, antiangiogeni agensi ne pokazuju značajan učinak na preživljenje u randomiziranim kontroliranim studijama.

Tako agensi koji ciljaju na VEGF čini se da produžuju razdoblje bez bolesti, poboljšavaju kvalitetu života i smanjenje primjene steroida, ali ne utječu na produženje ukupnog preživljenja (10). Da bi se popravilo trajanje odgovora i poboljšalo preživljenje potrebno je još istraživanja koja ispituju alternativne proangiogene putove, mehanizme rezistencije, strateške kombinacije i biomarkere u predviđanju terapijskog odgovora (10).

S obzirom da je kod glioblastoma ciljanje tumorske angiogeneze potencijalni terapijski pristup, važno je istaknuti moguću korist koju pokazuje tivozanib, oralni pan-VEGF inhibitor RTK (receptori s tirozin-kinaznom aktivnosti), koji cilja na centralni put angiogeneze glioblastoma (32). Ipak, tivozanib ima ograničenu anti-tumorsku aktivnost usprkos funkcionalnim promjenama tumorske vaskularizacije, što naglašava ograničenja anti-VEGF monoterapije. Buduća istraživanja potencijalnih terapijskih mogućnosti kod glioblastoma trebala bi otkriti način pojačane antivaskularne aktivnosti agenasa koji ciljaju VEGF, s ciljem povećanja aktivnosti drugih terapija.

Također se naglašava primjena male interferirajuće RNA (siRNA) za specifičnu gensku inhibiciju kao obećavajući pristup u liječenju genskom terapijom (34). Tako je učinkovita celularna predaja terapijske siRNA ključni korak u aplikaciji male interferirajuće RNA (RNAi). Pritom bi trebalo razviti visokoučinkovite siRNA nosače za specifično stanično preuzimanje, stvaranje stabilnih RNA-kompleksa i oslobađanje intracelularne RNA. Radi istraživanja ovih karakteristika, Egorova i sur. nedavno su ispitali nosače koji nose CXCR4 ciljni ligand i njihovu sposobnost da kondenziraju siRNA, ubrzavaju endosomalni bijeg i gensko stišavanje VEGFA u endotelnim stanicama i stanicama glioblastoma s izraženim CXCR4. Pokazalo se da peptidni nosači kondenziraju i štite siRNA od RNA-zne degradacije. Ti rezultati pokazali su značenje peptidnih nosača promijenjenih preko CXCR4 liganda, važnih za razvoj ciljanog siRNA dostavnog sustava u karcinomskim i endotelnim stanicama s izraženim CXCR4 (34).

Ipak, usprkos pozitivnim pretkliničkom/kliničkim pokušajima primjene bevacizumaba kod glioblastoma (kao antiangiogene terapije), velika prepreka u njegovoj kliničkoj aplikaciji je razvoj rezistencije i progresije koji slijedi prolazno razdoblje odgovora (12, 35).

Nažalost, kod bolesnika s glioblastomom nerijetko se razvija rezistencija na terapiju što upućuje da stanice glioblastoma imaju sposobnost zamjene ovisnosti o jednom proangiogenetskom putu drugim alternativnim putem. Iz tog je razloga nužno utvrditi uloge angiogenetskih čimbenika u tumorskoj angiogenezi i progresiji glioblastoma (14).

Istraživanjima su kod tumora koji su razvili rezistenciju na takvu terapiju (anti-VEGF/VEGFR agense) dokazane povećane koncentracije angiopoetina. To upućuje da je tako moguća njihova posredujuća uloga u razvoju rezistencije na anti-VEGF/VEGRF agense.

Postoje spoznaje dobivene na životinjskim modelima (kod miševa je primijenjen multigeneracijski glioblastomski ksenograft model, sa supkutanom implantacijom U87 stanica uz liječenje bevacizumabom) koje ukazuju da je u novih generacija miševa povećana ekspresija nekih biljega, uključujući povećanu izraženost CD44 kao navodnog biljega matičnih stanica CD44 i ključnih epitelnih mezenhimnih prijelaznih transkripcijskih čimbenika SNAI2 i ZEB2 (35). To upućuju da je tumorska progresija pod bevacizumabom povezana s prijelazom genske ekspresije prema mezenhimnom subtipu, za koji je karakteristična povećana invazivnost, rezistencija i loš ishod (35). U nedavnoj su studiji Jahangiri i sur. u bolesnika s glioblastomom rezistentnih na bevacizumab (analizom primjenom *microarray* modela) uočili poveznost razvoja rezistencije s prijelazom genske ekspresije prema mezenhimnom subtipu i s aktivacijom alternativnih proangiogenih puteva. To upućuje na mehanizme rezistencije na antiangiogenu terapiju kod glioblastoma (35).

Ukupno se može istaknuti da je primjena terapijskih mogućnosti s antiangiogenetskim djelovanjem (poput anti-VEGF/VEGFR terapijskih agensa) pokazala kliničku korist za bolesnike s glioblastomom. Ipak, kako kod vrlo velikog broja bolesnika dolazi do razvoja rezistencije na anti-VEGF/VEGFR terapiju, potrebno je bolje upoznati druge angiogenetske čimbenike i njihove signalne puteve koji imaju značajnu i/ili preklapajuću ulogu s VEGF/VEGFR-om u regulaciji tumorske angiogeneze tijekom progresije glioblastoma (12,14). Nadamo se da će buduća istraživanja doprinijeti boljem upoznavanju angiogeneze i uloge CD44 u biologiji tumora, kojima bi se konačno utvrdila učinkovitost i sigurnost ciljane anti-CD44 terapije (17).

## ZAKLJUČAK

Angiogeneza i CD44 su značajni kod glioblastoma pa postoji niz dokaza o njihovoj povezanosti s prognozom i terapijskom primjenom. Identifikacija tumorskih biljega kao što je CD44 od prognostičkog je značenja, te ujedno može pomoći u traženju novih terapijskih modaliteta, s ciljem produljenja preživljenja bolesnika s glioblastomom. Također se dosta očekuje od rada na poboljšanju ovih mogućnosti i od budućih istraživanja na polju antiangiogene terapije tumora.

## L I T E R A T U R A

1. Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Tintiang T. Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Front Surg* 2016; 15: 3-21.
2. Kostron H, Bauer R. Management of recurrent malignant glioma – neurosurgical strategies. *Wien Med Wochenschr* 2011;161(1-2): 20-1.
3. Komotar RJ, Starke RM, Connolly ES, Sisti MB. Methods of resistance to epidermal growth factor receptor inhibition in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2012; 70(2): 13-4.
4. Ayuso JM, Monge R, Martínez-González A i sur. Glioblastoma on a microfluidic chip: generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events. *Neuro Oncol* 2017; 6. pii: now230.
5. Schwartzbaum J, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 494-503.
6. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM i sur. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 1(21): 2683-710.
7. Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* 2002; 51(1): 2-12.
8. Donahue B: Adult gliomas. U: Brady L, Lu J, Heilman HP et al. (eds). *Radiation Oncology: An evidence-based review*. Berlin: Springer-Verlag; 2008, 484-99.
9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G i sur. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803-20.
10. Wang N, Jain RK, Batchelor TT. New directions in anti-angiogenic therapy for glioblastoma. *Neurotherapeutics* 2017; 14: 321-32.
11. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* 2011; 59: 169-80.
12. Norden AD, Young GS, Setayesh K i sur. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 2008; 70(10): 779-87.
13. Norden AD, Drapatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol* 2009; 5: 610-20.
14. Brunckhorst MK, Wang H, Lu R, Yu Q. Angiopoietin-4 promotes glioblastoma progression by enhancing tumor cell viability and angiogenesis. *Cancer Res* 2010; 70(18): 7283-93.
15. Tremmel M, Matzke A, Albrecht I i sur. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood* 2009; 114(25): 5236-44.
16. Thomas AA, Fisher JL, Hampton TH i sur. Immune modulation associated with vascular endothelial growth factor (VEGF) blockade in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66(3): 379-89.
17. Yoshida T, Matsuda Y, Naito Z, Ishiwata T. CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration. *Pathol Int* 2012; 62(7): 463-70.



18. Holopainen T, Huang H, Chen C i sur. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4656-64.
19. Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2009; 11(2): 111-6.
20. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51: 191-200.
21. Wei KC, Huang CY, Chen PY i sur. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* 2010; 30(1): 253-9.
22. Napier SL. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem* 2007; 282(6): 3433-41.
23. Mooney KL, Choy W, Sidhu S i sur. The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 2016; 34: 1-5.
24. Iczkowski KA. The predominant CD44 splice variant in prostate cancer binds fibronectin, and calcitonin stimulates its expression. *Anticancer Res* 2006; 26(4B): 2863-7.
25. Guadagno E, Borrelli G, Califano M i sur. Immunohistochemical expression of stem cell markers CD44 and nestin in glioblastomas: Evaluation of their prognostic significance. *Pathol Res Pract* 2016; 212(9): 825-32.
26. Park D, Xiang AP, Mao FF i sur. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(12): 2162-71.
27. Peiper M. CD44s expression is associated with improved survival in soft tissue sarcoma. *Anticancer Res* 2004; 24(2C): 1053-6.
28. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(6): 449-58.
29. Schulenburg A. Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology. *Cancer* 2006; 107(10): 2512-20.
30. Koev IG, Feodorova YN, Kazakova MH, Staykov DG, Kitov BD, Sarafian VS. Glioblastoma multiforme classified as mesenchymal subtype. *Folia Med* 2014; 56(3): 215-9.
31. Jun F, Hong J, Liu Q i sur. Epithelial membrane protein 3 regulates TGF- $\beta$  signaling activation in CD44-high glioblastoma. *Oncotarget* 2017; 8(9): 14343-58.
32. Kalpathy-Cramer J, Chandra V, Da X i sur. Phase II study of tivozanib, an oral VEGFR inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2017; 131(3): 603-10.
33. Mihić J, Vučić M, Rotim K, Lugović-Mihić L. The role of CD44 immunohistochemical expression in glioblastoma. 24<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology. May 31<sup>st</sup> and June 1<sup>st</sup>, 2013, Abstract Book.
34. Egorova A, Subina A, Sokolov D, Selkov S, Baranov V, Kiselev A. CXCR4-targeted modular peptide carriers for efficient anti-VEGF siRNA delivery. *Int J Pharm* 2016; 515(1-2): 431-40.
35. Jahangiri A, Chen W, Yagnik G i sur. Obtaining the genetic fingerprint of resistance to 333 glioblastoma through a novel multigenerational xenograft model. *Neurosurgery* 2016; 63 Suppl 1: 197.

## SUMMARY

### THE ROLE OF ANGIOGENESIS AND EXPRESSION OF CD44 IN GLIOBLASTOMA

J. MIHIĆ, K. ROTIM, M. VUČIĆ<sup>1</sup>, G. NOVAK-BILIĆ<sup>2</sup> and L. LUGOVIĆ MIHIĆ<sup>2</sup>

*Sestre milosrdnice University Hospital Center, Clinical Department of Neurosurgery; <sup>1</sup>Ljudevit Jurak Clinical Department of Pathology and <sup>2</sup>Clinical Department of Dermatovenereology, Allergology and Immunology Clinical Unit, Zagreb, Croatia*

The aim of this study was to show the role of angiogenesis and CD44 in glioblastoma multiforme (glioblastoma). Some recent studies have demonstrated that CD44 expression in some tumors has a prognostic value, and there is some evidence that increased CD44 expression is linked to the less favorable prognosis in glioblastoma patients. It is known that CD44 is a widely distributed transmembrane cell-surface adhesion protein involved in many physiological and pathological processes (matrix adhesion, lymphocyte homing and activation, wound healing, growth promotion, cell survival and migration, tumor growth and metastasis, etc.). There are a number of potential mechanisms by which CD44 might promote malignancy [e.g., CD44 modulates factors that could allow a tumor to initiate a metastatic cascade (adhesiveness, motility, matrix degradation, proliferation, and cell survival)]. Specifically, CD44 binds to several extracellular matrix components (hyaluronic acid, collagen, fibronectin, osteopontin) that could facilitate adhesion and subsequent growth of CD44-expressing tumor cells at secondary sites. On the other hand, it was also found that lower CD44 expression might correlate with a greater likelihood of recurrence and consequently worse overall outcome, which is supported by the observation that patients with recurrent glioblastoma have better survival outcomes if their CD44 expression levels are higher. Thus, although higher levels of CD44 expression are seen in more severe tumors, lower CD44 levels could indicate that the malignant cells are more resistant to chemotherapeutic agents.

**Key words:** angiogenesis, CD44, glioblastoma, prognosis