



**rijksuniversiteit
groningen**

Faculteit: Wiskunde en Natuurwetenschappen

Studie: Life, Science and Technology

Glioblastoma's

Huidige en potentiële
behandelmethoden



Francien Talens (s1857592)

Bachelorscriptie major Biomedische Wetenschappen

Juli 2012

Begeleider: dr. P. de Vos

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1. Inleiding	4
1.1 Symptomen en diagnose	4
1.2 Typen hersentumoren	5
1.3 Epidemiologie	6
1.4 Risico en prognosefactoren	8
2. Glioblastoma's	9
2.1 Primaire en secundaire glioblastoma's	10
2.2 Genetische pathways primaire en secundaire glioblastoma's	10
2.2.1 EGFR/PTEN/Akt/mTOR Pathway	11
2.2.2 TP53/MDM2/p14 Pathway	12
3. Huidige behandelmethoden	13
3.1 Chirurgie	13
3.2 Radiotherapie	13
3.3 Chemotherapie	14
4. Nieuwe mogelijke behandelmethoden	15
4.1 Glutamaat en necrose	15
4.1.1 Mogelijke therapieën	18
4.2 Angiogenese	21
4.2.1 Anti-Angiogene therapie	23
5. Discussie	29
6. Conclusie	31
7. Referenties	32

Samenvatting

Glioblastoma (GBM) is een veel voorkomende en erg kwaadaardige vorm van primaire hersentumoren in volwassenen. Ze zijn invasief en infiltreren vaak in belangrijke neuronale gebieden in de hersenen. De prognose voor patiënten met GBM is het slechtste van alle hersentumoren. Het percentage van patiënten met GBM dat na 5 jaar nog leeft is slechts 3.4%. Ondanks vorderingen op het gebied van behandeling zoals chirurgie, radiotherapie en chemotherapie, is de gemiddelde overlevingskans na diagnose van GBM de laatste paar decennia onveranderd gebleven. Daarom vraagt deze ernstige hersentumor om nieuwe behandelmethoden. De problemen bij het behandelen van niet alleen GBM, maar ook van andere hersentumoren, zijn de genetische en moleculaire veranderingen die per tumor en individu verschillen. Deze karakteristieken zijn niet alleen van belang voor het opstellen van een prognose en overlevingskans, maar bepaalt ook of de tumor zal responderen op specifieke behandelmethoden. Nu deze karakteristieken steeds meer in kaart worden gebracht, kan er ook onderzoek gedaan worden naar doelgerichtere behandelmethoden voor GBM. Twee belangrijke eigenschappen van GBM zijn overmatige glutamaatlevels en angiogenese. In dit review zullen onder andere de epidemiologie, genetische eigenschappen en huidige behandelmethoden voor GBM besproken worden. Daarnaast zal worden ingegaan op de glutamaat en angiogenese mechanismen en hoe in de toekomst deze pathways een belangrijke rol kunnen spelen bij mogelijk nieuwe behandelmethoden van GBM.

1. Inleiding

Een tumor is een gezwel dat het gevolg is van ongeremde celdeling. Dit gezwel kan goedaardig of kwaadaardig zijn. Bij een kwaadaardige tumor is sprake van kanker. In 2006 werden in Europa 3.191.600 gevallen van kanker gediagnosticeerd en 1,7 miljoen mensen zijn tevens in 2006 overleden aan kanker (Ferlay *et al.*, 2007). Hersentumoren zijn zeldzaam (2% van alle kankers in Amerika (Chandana *et al.*, 2008) maar vaak wel agressief met slechte prognose voor de patiënten. Bij hersentumoren is er, in vergelijking met andere kankertypen, sprake van het meeste aantal jaren levensverlies (gemiddeld 20,1 jaar) (Burnet *et al.*, 2005). De behandeling van hersentumoren, vooral van glioma's die in het hersenweefsel infiltreren, blijft nog steeds een van de grootste uitdagingen binnen de oncologie. Glioma's operatief verwijderen is vrijwel onmogelijk en het klinische traject is afhankelijk van het biologische gedrag van tumorcellen. Dit biologische gedrag is echter moeilijk te voorspellen, want dat verschilt per individu (Shiraishi & Tabuchi, 2003).

1.1 Symptomen en diagnose

Symptomen van hersentumoren zijn erg divers en worden bepaald door de locatie van de tumor in de hersenen, de grootte van de tumor en de soort tumor. Zodra een tumor begint te groeien en het steeds meer ruimte begint in te nemen, wordt de druk binnen de schedel (intracraniale druk) verhoogd en kan dit leiden tot hoofdpijn. Overigens veroorzaken lang niet alle hersentumoren een intracraniale drukverhoging en hoofdpijn wordt zelden door een hersentumor veroorzaakt. Als gezond hersenweefsel door de tumor in verdrinking komt of beschadigd raakt, kan dit resulteren in uitvallende hersenfuncties, neurocognitieve symptomen en persoonlijkheidsveranderingen afhankelijk van de plaats van de tumor (Chandana *et al.*, 2008, Chang *et al.*, 2005). Tevens kunnen epileptische aanvallen het gevolg zijn van een hersentumor en vermoeidheid is een van de meest gehoorde klachten vanaf het moment van diagnose en gedurende het gehele ziekte traject (Lovely, 2004). In twee grote studies met patiënten met glioma's (meest voorkomende en kwaadaardige hersentumor), kwam hoofdpijn als duidelijkst aanwezige symptoom naar voren. Bij 50% van de patiënten kan de hoofdpijn langer dan 6 maanden aanhouden (Chandana *et al.*, 2008). Symptomen van cognitieve disfunctie kunnen bestaan uit veranderingen in geheugen, aandacht, oriëntatie, taal, persoonlijkheid en dagelijkse activiteiten zoals slapen en eten. Deze symptomen kunnen veroorzaakt worden door de tumor zelf, door tumor gerelateerde epilepsie of door behandeling zoals chirurgie, chemotherapie, radiotherapie en anti-epileptica.

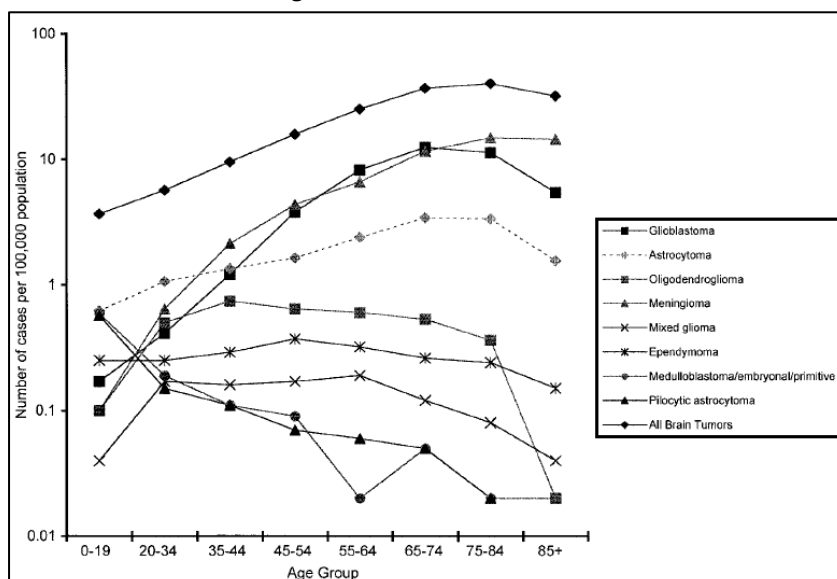
De diagnose van hersentumoren wordt gesteld op basis van verschillende onderzoeken. De klachten en symptomen van de patiënt worden geïnventariseerd en op basis hiervan kan een hersenscan worden gemaakt. Met de recente ontwikkelingen op het gebied van brain imaging technieken is het mogelijk om tumor locatie, grootte en biologische activiteit vast te stellen. Tevens worden deze technieken gebruikt om na te gaan of de behandelingen effect hebben (Chandana *et al.*, 2008). Voorbeelden van de gebruikte technieken zijn CT, MRI, fMRI en PET scans.

Hersentumoren zijn te verdelen in primaire en secundaire hersentumoren. Primaire hersentumoren zijn tumoren die ontstaan in het hersenweefsel zelf. Primaire hersentumoren zijn de op nummer twee meest voorkomende type kanker bij kinderen jonger dan 15 jaar (leukemie is de eerste) en de derde leidende oorzaak van kanker gerelateerde dood in volwassenen jonger dan 34 jaar. Toch verschijnt de meerderheid van de primaire hersentumoren na het 50^e levensjaar (Castro *et al.*, 2003).

Bij secundaire hersentumoren ligt de oorsprong van de tumor in een ander orgaan en worden het ook wel metastasen genoemd. Dit zijn uitzaaiingen naar de hersenen van een tumor elders in het lichaam. Hersenmetastasen komen 10 keer zo vaak voor als primaire hersentumoren en vaak is de metastase afkomstig van een tumor in de longen (40-50%) en van borstkanker (20-30%) (Rahmathulla *et al.*, 2012). De meest voorkomende goedaardige primaire hersentumor in volwassenen is meningioma en de meest voorkomende kwaadaardige primaire tumor is de glioblastoma (astrocytoma graad VI). Dit is tevens de meest fatale waarbij de meeste patiënten binnen één jaar na diagnose te komen overlijden (Ohgaki & Kleihues, 2007). De glioblastoma's zullen in paragraaf 1.5 besproken worden.

1.2 Typen hersentumoren

Hersentumoren kunnen worden verdeeld in klassen, typen en subtypen. De classificatie van tumoren wordt eens in de zoveel jaar uitgegeven door de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) zodat het wereldwijd geaccepteerd en gebruikt kan worden (Kleihues *et al.*, 2002, Louis *et al.*, 2007). De tumoren worden geclassificeerd op basis van celtype en histologische verschijnselen. Vaak wordt de tumor vernoemd naar het weefsel waar het is ontstaan. De hersencellen die het zenuwweefsel steunen, beschermen en op hun plek houden worden glia-cellen genoemd. Een tumor van het glia-weefsel heet een glioom. De meeste gliomen zijn kwaadaardig. Er zijn meerdere glia-cellen te onderscheiden waaruit een glioom kan ontstaan waaronder astrocyten (astrocytoom), oligodendrocyten (oligodendrogliomen), ependymcellen (ependymomen), schwanncellen en microglia. De meeste gliomen ontstaan uit de astrocyten en vaak worden de termen glioom en astrocytoom door elkaar gebruikt. Tevens bestaan combinatietumoren die uit meerdere celtypen zijn gevormd (bijvoorbeeld oligo-astrocytomen) (Castro *et al.*, 2003). Ongeveer 50% van de primaire hersentumoren zijn glioma's en 50% van deze glioma's zijn de meest kwaadaardige variant, de glioblastoma (GBM). De hersenvliezen heten meningen en tumoren die ontstaan uit de hersenvliezen heten meningioom. Een meningioom is meestal een goedaardige tumor (90%). Als een tumor goedaardig is dan zal de tumor beperkt blijven tot één plek in de hersenen en niet uitzaaien. Met kwaadaardigheid van een hersentumor wordt bedoeld dat het diffuus in het omliggende hersenweefsel groeit en daarmee een grote kans heeft om terug te komen. Gliomen zaaien vrijwel nooit uit naar andere organen in het lichaam.



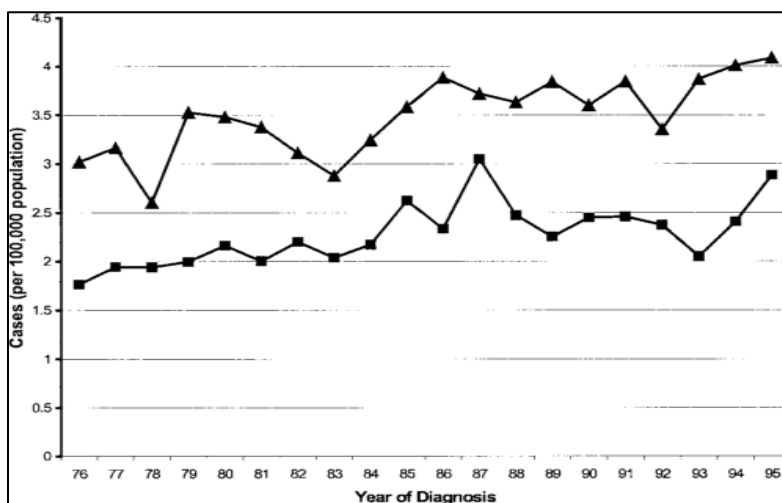
Figuur 1. Incidentie van primaire hersentumoren in verschillende leeftijdsgroepen (1992-1997).

{{25 Wrensch,M. 2002}}

Hoe kwaadaardig de tumor is, wordt onder andere bepaald door de hoeveelheid cellen die zich delen, hoeveel bloedvaten er in de tumor aanwezig zijn en welke soort gliacellen overheerst. Op basis van deze kenmerken kunnen gliomen worden ingedeeld in lage graad tumoren (graad 1 en 2) en hoge graad tumoren (graad 3 en 4). Dit is een indeling die wordt gehanteerd volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) (Kleihues *et al.*, 2002).

1.3 Epidemiologie

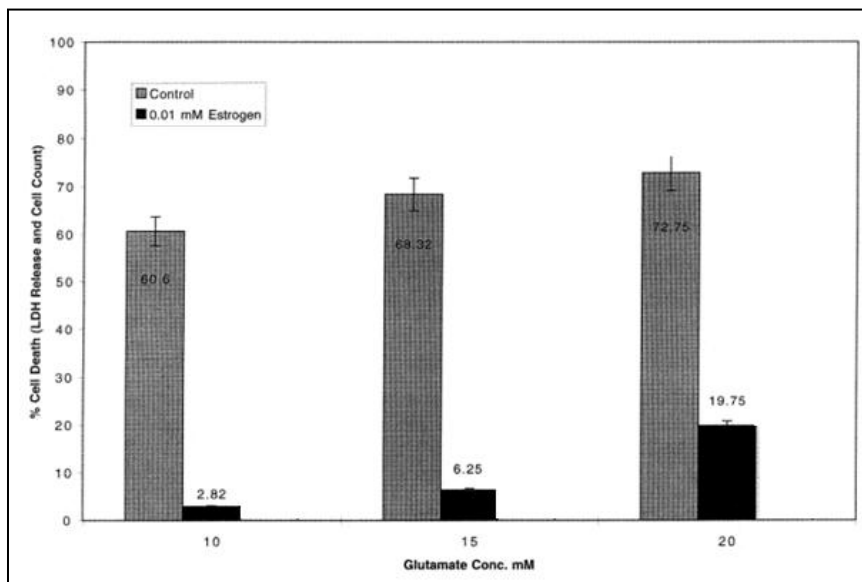
Primaire hersentumoren behoren tot de top 10 oorzaken van kanker gerelateerde dood in Amerika (Wrensch *et al.*, 2002). Voor alle primaire hersentumoren ligt de gemiddelde leeftijd van de patiënten op 54 jaar. Meningioma's worden bij 80% meer vrouwen dan mannen geconstateerd. Dit is de enige hersentumor variant die meer bij vrouwen dan bij mannen voorkomt. Voor de rest komen alle varianten meer bij mannen voor, bijvoorbeeld de glioblastoma's die 40% meer bij mannen dan bij vrouwen voorkomt (Figuur 2) (Surawicz *et al.*, 1999). De incidentie van hersentumoren bij mannen en vrouwen is 7.6 versus 5.3 per 100.000 personen per jaar (Chandana *et al.*, 2008). Glioblastoma's komen in blanke populaties dubbel zo vaak voor als in zwarte populaties, maar de incidentie van meningioma's is vrijwel gelijk tussen deze twee groepen (Wrensch *et al.*, 2002). Deze veranderingen kunnen niet worden toegeschreven aan verschillen in diagnostisering en toegang tot gezondheidszorg, aangezien primaire kwaadaardige hersentumoren vaker voorkomen in landen met meer toegang tot goed ontwikkelde medische zorg (Surawicz *et al.*, 1999).



Figuur 2. Incidentie van glioblastoma's vergeleken met het jaar van diagnose (1976-1995). Driehoek: Mannen; Vierkant: Vrouwen. (McKinley *et al.*, 2000)

Een studie van (McKinley *et al.*, 2000) heeft aangetoond dat het verschil in incidentie tussen geslacht (grotere incidentie bij mannen) bij glioblastoma's duidelijk naar voren komt zodra de menarche van vrouwen begint (eerste menstruatie), het grootste is rond de menopauze en daarna weer afneemt. Dit suggereert dat vrouwelijke hormonen (oestrogeen, progesteron of metabolieten ervan) een beschermend effect kunnen hebben bij de pathogenese van glioblastoma's en andere hersentumoren. In een studie uit 1992 werd al een relatie aangetoond tussen de menopauzestatus van vrouwen en het risico op GBM. Deze studie observeerden dat postmenopauze vrouwen een verhoogd risico hadden op het krijgen van GBM in vergelijking met pre-menopauze vrouwen (Schlehofer *et al.*, 1992). Een andere verklaring kan zijn dat het mogelijk beschermende effect van vrouwelijke hormonen eigenlijk het resultaat is van de schadelijke effecten bij blootstelling aan

mannelijke geslachtshormonen. In dit scenario hebben vrouwen een lagere blootstelling aan mannelijke hormonen en dus een lager risico voor het ontwikkelen van GBM in vergelijking met mannen. Een alternatieve verklaring zou kunnen zijn dat er genetische verschillen tussen mannen en vrouwen door tumorgene stimuli op het X of Y chromosoom aanwezig zijn. Hier is echter nog weinig over bekend. Enkele studies hebben aangetoond dat het gebruik van vrouwelijke hormonen het risico op meningioma's verhoogt en dit is tevens het enige type hersentumor dat bij vrouwen meer voorkomt dan bij mannen (Wigertz *et al.*, 2006). Studies naar de effecten van vrouwelijke hormonen op het risico van hersentumoren laten over het algemeen geen eenduidige resultaten zien. Wel wordt de hypothese dat vrouwelijke geslachtshormonen beschermend werken tegen glioma's en het risico op meningioma's juist bevorderen, door de meeste studies beaamd (Cowpli-Bony *et al.*, 2011). Uit een review van 20 studies naar de effecten van hormonen op hersentumoren, kwamen de volgende meest consistente resultaten naar voren: behandeling van vrouwen met HRT (hormoon replacement therapie) en OC (orale contraceptie) verlaagde het risico op glioma's; het risico op glioma's nam toe in vrouwen waarbij de puberteit op een latere leeftijd begon; toename van het risico op meningioma's met HRT behandeling en menopauze. Mogelijk is het BRCA1 gen (geassocieerd met borstkanker) ook betrokken bij de ontwikkeling naar meningioma's, aangezien een verhoogde incidentie van meningioma's werd geobserveerd in vrouwen die eerder borstkanker hebben gehad (Bethke *et al.*, 2008). Verder wordt de hypothese dat vrouwelijke hormonen het risico op meningioma's verhogen ondersteund door de bevinding dat het aantal zwangerschappen bij jonge vrouwen het risico op meningioma's verhoogt. Daarnaast was een toenemend aantal zwangerschappen omgekeerd gerelateerd aan het risico op glioma's (Wigertz *et al.*, 2008). Cellulaire en dierlijke studies hebben aangetoond dat oestradiol gliomacellen direct kan beïnvloeden en gliomagroei inhibeert via verschillende mechanismen (inhibitie van celcyclus, lagere glutamaat toxiciteit in gliacellen (Figuur 3) (Shy *et al.*, 2000), down-regulatie van TGF- β 1 en neuroprotectie via aromatase door melatonine) (Chamaon *et al.*, 2005).



Figuur 3. Vergelijking van het percentage celdood onder gliacellen na 7 dagen voorbehandeling met oestradiol en 24 uur blootstelling aan verschillende glutamaat concentraties in vitro. (Shy *et al.*, 2000)

Voor alle leeftijden en alle typen hersentumoren in Amerika is het overlevingspercentage na 5 jaar 20%. Patiënten met glioblastoma's hebben de kleinste overlevingskans binnen alle leeftijdsgroepen en oudere patiënten hebben op hun beurt weer de kleinste overlevingskans binnen alle typen hersentumoren ten opzichte van jongere patiënten.

1.4 Risico en prognosefactoren

Er zijn tot nu toe slechts twee risicofactoren voor glioma's geconstateerd: ioniserende straling en zeldzame mutaties in genen geassocieerd met bepaalde ziekten en syndromen (Wrensch *et al.*, 2005). Er is overtuigend bewijs dat bepaalde genen die worden geërfd invloed hebben op het risico voor het ontwikkelen van primaire hersentumoren. Een persoon die een dergelijk gen erft dat de kans op het krijgen van een tumor vergroot, heeft een genetische predispositie. Bepaalde erfelijke syndromen zijn neurofibromatosis type 1 en 2 en het basaalcelnaevussyndroom (nevroid basal cell carcinoma syndrome). Deze syndromen gaan gepaard met een genetische predispositie voor primaire hersentumoren (Chandana *et al.*, 2008, Wrensch *et al.*, 2005). Uit verschillende studies in begin jaren '90 is gebleken dat maar 1 of 2% van de patiënten met een primaire hersentumor een dergelijk syndroom met genetische predispositie had. Dit moet echter niet onderschat worden aangezien sommige erfelijke syndromen misschien nog niet gediagnosticeerd waren bij de patiënten en niet alle patiënten met een hersentumor automatisch worden doorgestuurd naar een geneticus. Naast deze zeldzame erfelijke syndromen is er ook een correlatie gevonden in TP53 mutaties en erfelijkheid. Bij patiënten waarvan hun tumor een TP53 mutatie bevatte, had 58% van de patiënten een eerstegraads verwant die ook kanker had. Deze relatie is vooral gevonden in patiënten met primaire kwaadaardige tumoren (Bondy *et al.*, 1994).

Hoewel erg veel omgevingsfactoren worden geassocieerd met hersentumoren, is blootstelling aan een hoge dosis ioniserende straling de enige bewezen risicofactor. Studies naar andere omgevingsfactoren laten tegenstrijdige resultaten zien (Wrensch *et al.*, 2002). Een goed voorbeeld is onderzoek naar radiofrequentie elektromagnetische velden (EMFs) via mobiele telefoons. Dit kreeg een aantal jaar geleden veel aandacht, omdat het gezien werd als een potentiële risicofactor voor hersentumoren. Echter laten verschillende studies inconsistente en onduidelijke resultaten zien door verschil in experimentele opzet en de manier hoe blootstelling en gebruik van mobiele telefoons gemeten wordt (Ostrom & Barnholtz-Sloan, 2011).

In de oncologie is en wordt veel onderzoek gedaan naar factoren die de prognose van tumorpatiënten kunnen voorspellen. De tot nu toe beste en sterkste indicators voor prognose en overlevingskans zijn tumor histologie (volgens de WHO classificatie) en leeftijd van de patiënt (Wrensch *et al.*, 2002). Een leeftijd van onder de 60 en een score van 70 of meer op de Karnofsky schaal zijn geassocieerd met een verlengde levensduur in patiënten met glioma's (Krex *et al.*, 2007, Laws *et al.*, 2003). In een studie met 689 patiënten gediagnosticeerd met glioblastoma van Scott *et al.* werd aangetoond dat jongere patiënten en patiënten met een hoge Karnofsky score langer overleefden. De Karnofsky score wordt gebruikt om aan te geven hoe een patiënt met kanker omgaat en wat de functionele toestand van de patiënt is. Een hoge score betekent dat de patiënt nauwelijks beperkingen heeft en in staat is tot normale activiteit. Tevens is de prognose voor vrouwen over het algemeen wat beter dan voor mannen in Europa met een kwaadaardige hersentumor (20% overleving na 5 jaar tegenover 17%) (Sant *et al.*, 1998). Daarnaast zijn ook de locatie en de omvang van de hersentumor en de behandeling voorspellende factoren voor

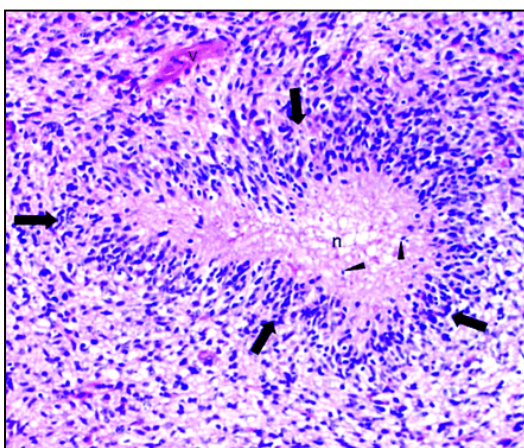
overleving (Lopez-Gonzalez & Sotelo, 2000). Er wordt tevens veel onderzoek gedaan op het gebied van genetische en moleculaire markers die invloed hebben op de prognose. Bij patiënten jonger dan de gemiddelde leeftijd voor glioblastoma's, resulteerde EGFR overexpressie in een slechtere prognose terwijl bij patiënten ouder dan de gemiddelde leeftijd EGFR overexpressie een betere prognose liet zien (Simmons *et al.*, 2001).

2. Glioblastoma's

Glioblastoma's (GBM), de meest voorkomende vorm van glioma's in volwassenen, zijn erg agressief, invasief en infiltreren vaak in belangrijke neuronale gebieden in de hersenen (Castro *et al.*, 2003, Chandana *et al.*, 2008). De overlevingskans van patiënten met GBM ligt erg laag; de gemiddelde overlevingskans is 3,5 maanden voor patiënten ouder dan 65 jaar en 10 maanden voor patiënten jonger dan 65 jaar (Wrench *et al.*, 2005). Het percentage van patiënten met een glioblastoma dat na 5 jaar nog leeft is slechts 3.4% (Noch & Khalili, 2009). Ondanks vorderingen op het gebied van behandeling zoals chirurgie, radiotherapie en chemotherapie, is de gemiddelde overlevingskans na diagnose van GBM de laatste paar decennia onveranderd gebleven (Castro *et al.*, 2003, Ohgaki *et al.*, 2004).

Onderscheid Glioblastoma's en andere tumoren

Glioblastoma's hebben vele kenmerken die je ook terug ziet bij andere typen kankers. Bijvoorbeeld toegenomen activatie van de epidermale groei factor receptor die tumorgroei bevordert in de afwezigheid van exogene groeifactoren, vaak gemuteerde tumorsuppressor genen zoals p16 en p53 en de inductie van nieuwe bloedvaten. Ondanks deze overeenkomsten met andere tumoren, onderscheiden glioblastoma's zich door biologische aanpassingen (Sontheimer, 2008). Een van deze aanpassingen is dat de meeste tumoren groeien in zacht weefsel en daardoor niet gehinderd worden bij het groeien. Primaire hersentumoren kunnen niet ongelimiteerd groeien, omdat ze worden tegengehouden door de schedel. Daarom vernietigen glioma's omliggend normaal hersenweefsel om uit te breiden. Dit mechanisme wordt in paragraaf 4.1 besproken. Glioblastoma's worden daarom ook gekenmerkt door de aanwezigheid van necrose van normaal hersenweefsel rondom de tumor (Rong *et al.*, 2006, Sontheimer, 2008). Een ander kenmerk is microvasculaire hyperplasia. Dit is een vorm van angiogenese (proliferatie van endotheelcellen). Deze mechanismen worden gelinkt aan de snelle groeicapaciteiten wat kenmerkend is voor de transitie van graad 3 naar graad 4 tumor (zie paragraaf 2.1) (Rong *et al.*, 2006).



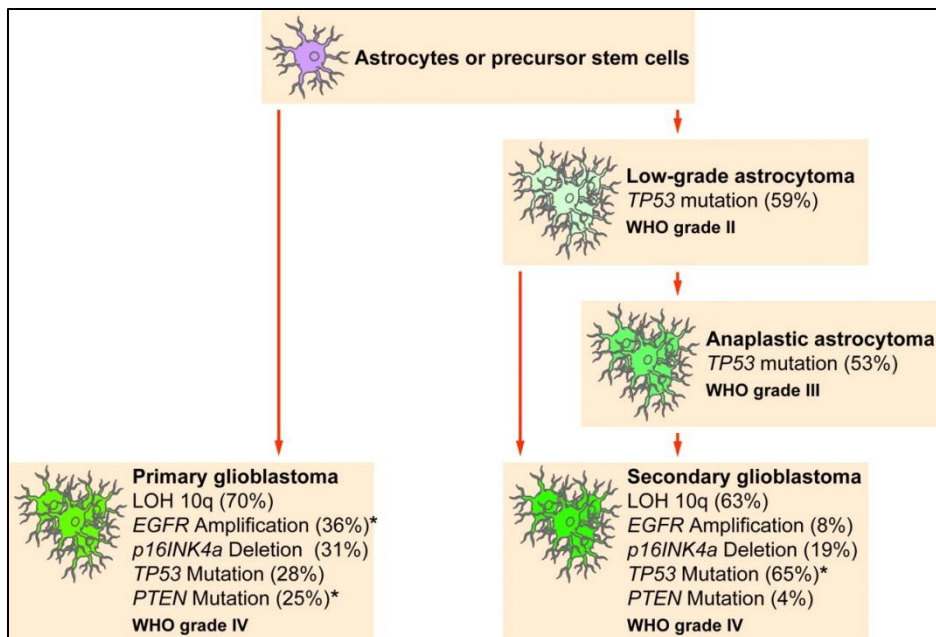
Figuur 4. Pseudopaliserende necrose in glioblastoma's. De pijl wijst naar de pallisade vormende gliomacellen rondom het tumor necrose gebied (n). Zie paragraaf 4.2.

2.1 Primaire en secundaire glioblastoma's

GBMs kunnen onderverdeeld worden in primaire en secundaire glioblastoma's. Het grootste gedeelte van de glioblastoma's ontwikkelen zich erg snel als primaire glioblastoma (90%) (Ohgaki & Kleihues, 2009). Primair betekent dat er niet al een bestaande, minder kwaadaardige tumor aanwezig was. Secundaire glioblastoma's zijn minder frequent en ontwikkelen zich langzaam vanuit een lagere graad diffuus astrocytoma (WHO graad 2) of een anaplastisch astrocytoma (WHO graad 3) (Ohgaki & Kleihues, 2009). De gemiddelde progressie tijd van een lage graad glioom tot glioblastoma is 5.3 jaar en van een anaplastisch astrocytoma tot glioblastoma 1.4 jaar (Okamoto *et al.*, 2004). Er is een groot verschil in leeftijd van patiënten met primaire en secundaire glioblastoma's. De gemiddelde leeftijd van patiënten met primaire GBM is 62 jaar, terwijl secundaire GBM optreedt in jongere patiënten van gemiddeld 45 jaar. Primaire GBMs ontwikkelen zich meer frequent in mannen, terwijl secundaire GBMs meer frequent in vrouwen worden gevonden (Ohgaki *et al.*, 2004). De gemiddelde overlevingskans van secundaire GBM patiënten was significant langer dan dat van primaire GBM patiënten (7.8 maanden: 4.7 maanden). Dit verschil kan echter worden verklaard door het feit dat patiënten met secundaire GBM gemiddeld jonger zijn dan primaire GBM patiënten en een jongere leeftijd een belangrijke voorspellende factor is voor een betere overlevingskans in glioblastoma patiënten (Ohgaki *et al.*, 2004, Ohgaki & Kleihues, 2007).

2.2 Genetische routes primaire en secundaire glioblastoma's

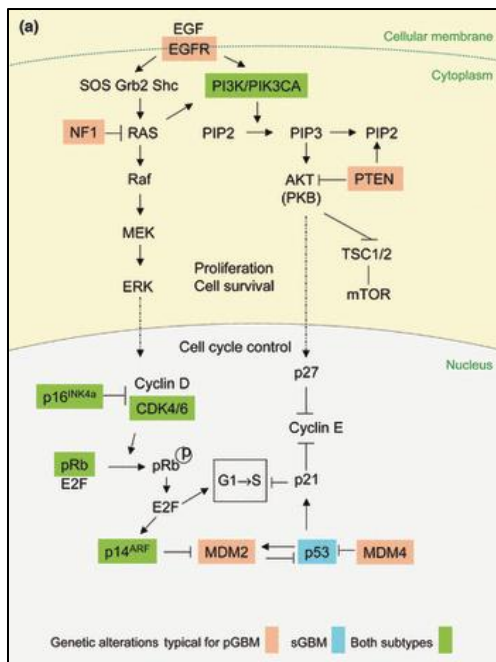
Kanker is ook een genetische ziekte aangezien alle typen tumoren gepaard gaan met genetische veranderingen, ook wel somatische genetische veranderingen genoemd. Deze genetische veranderingen in de tumor worden geassocieerd met respons op behandeling, terugkeer van de ziekte en overleving (Ostrom & Barnholtz-Sloan, 2011). Het is daarom van groot belang dat de verschillende typen hersentumoren volledig in kaart kunnen worden gebracht op het gebied van moleculaire en genetische eigenschappen. Het identificeren van het genotype van de tumor is belangrijk om het biologische gedrag van de tumor te kunnen voorspellen en ook om een prognose en therapeutische strategieën te vormen (Shiraishi & Tabuchi, 2003). Glioblastoma's hebben een complexe moleculaire structuur die nog niet goed kan worden gekarakteriseerd, ook al wordt er veel onderzoek naar gedaan. Het bepalen van specifieke genen of het begrijpen van inter-connecties tussen bepaalde routes van de tumor zou de mogelijkheid bieden om het klinisch verloop van de ziekte te kunnen achterhalen, waaronder agressiviteit van de tumor, respons op behandeling, overlevingskans en de tijd tot terugkeer van de tumor (Ostrom & Barnholtz-Sloan, 2011). Er wordt gedacht dat primaire hersentumoren ontstaan door accumulatie van genetische veranderingen die het cellen mogelijk maakt om aan de normale regulaire mechanismen en het immuunsysteem te ontsnappen. Het gaat hierbij vooral om genetische aanpassingen van cruciale genen die de celcyclus controleren zoals TP53. Dit zijn potentiële neurocarcinogenen (kankerverwekkend). Belangrijke modificaties voor glioblastoma's zijn onder andere mutaties in EGFR, CDK4, MDM2, TP53 of PTEN (Castro *et al.*, 2003, Ohgaki & Kleihues, 2009, Wrensch *et al.*, 2005). Enkele van deze mutaties zullen kort besproken worden. Hoewel primaire en secundaire glioblastoma's histologisch gezien nauwelijks te onderscheiden zijn, ontwikkelen ze zich via verschillende genetische routes (Figuur 5).



Figuur 5. Genetische pathways betrokken bij primaire en secundaire glioblastoma's. LOH10q is frequent in zowel primaire als secundaire glioblastoma's. TP53 mutaties zijn vroege en frequente genetische veranderingen in de ontwikkeling naar secundaire glioblastoma's. (Ohgaki & Kleihues, 2007)

2.2.1 EGFR/PTEN/Akt/mTOR Pathway

De epidermale groeifactor receptor (EGFR) is een oncogen dat wordt geactiveerd door binding van groeifactoren waaronder de epidermale groeifactor. Dit resulteert in rekrutering van Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) naar het celmembraan. PI3K fosforyleert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) naar (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃), dat vervolgens een downstream route van effector moleculen activeert zoals AKT (proteïne kinase B) en mTOR. Dit resulteert in cel proliferatie en toename in celoverleving door remming van apoptose. Fosfatase en tensine homolog (PTEN), een tumorsuppressor eiwit, remt het PIP₃ signaal en heeft daardoor een inhiberende werking op celproliferatie (Figuur 6). EGFR overexpressie treedt op in 40% van de primaire GBMs en is erg zeldzaam in secundaire GBMs (Ohgaki & Kleihues, 2007, Ohgaki & Kleihues, 2009). Versterking van EGFR wordt vaak geassocieerd door mutaties in het DNA. EGFR variant III (EGFRvIII) met deletie van exonen 2-7 is de meest voorkomende mutatie. Deze mutatie wordt geassocieerd met een verhoogde receptor activatie en een onvermogen om het signaal te verzwakken met behulp van downregulatie. Het actieve EGFRvIII leidt tot celproliferatie door downregulatie van p27 en de activatie van de PI3K/Akt pathway (Narita *et al.*, 2002). Tevens komt in 15-40% van de primaire GBMs mutatie in het PTEN gen voor. In tweederde van de primaire GBMs (63%) en in een derde van de secundaire GBMs, wordt ten minste een verandering gevonden in het EGFR, PTEN of PIK3CA (actief eiwit van het PI3K complex) gen (Ohgaki & Kleihues, 2009). Hoewel in vitro en in vivo studies hebben gedemonstreerd dat EGFRvIII leidt tot toename in proliferatie en invasie van glioma cellen, heeft (Montano *et al.*, 2011) aangetoond dat EGFRvIII is geassocieerd met een verlenging van de levensduur van patiënten met GBM die behandeld zijn met operatie en radio/chemotherapie. Mede doordat EGFRvIII positieve GBM cellen minder resistent zijn tegen TMZ (chemotherapie).



Figuur 6. Voornaamste signaal routes betrokken bij de pathogenese van glioblastoma's. pGBM, primaire glioblastoma; sGBM, secundaire glioblastoma. (Ohgaki & Kleihues, 2009)

2.2.2 TP53/MDM2/p14 Pathway

TP53 mutaties zijn frequente genetische veranderingen die belangrijk zijn in de ontwikkeling naar secundaire glioblastoma's (Ohgaki & Kleihues, 2007, Ohgaki & Kleihues, 2009). TP53 mutaties zijn de eerst detecteerbare genetische veranderingen bij 2/3^e van de lage graad astrocytoma's, anaplastische astrocytoma's en de secundaire glioblastoma's. TP53 mutaties komen ook voor bij primaire glioblastoma's, maar bij een lager percentage (<30%) (Ohgaki *et al.*, 2004, Ohgaki & Kleihues, 2009). Het TP53 gen is een tumorsuppressor gen dat codeert voor een eiwit (p53) dat een belangrijke rol speelt in vele cellulaire processen, waaronder de celcyclus, respons op DNA schade, celdood en celdifferentiatie. Bij DNA schade, wordt TP53 geactiveerd en induceert het de transcriptie van genen zoals p21. MDM2 is een eiwit dat aan TP53 kan binden, waardoor transcriptie van TP53 geïnhibeerd wordt. Transcriptie van MDM2 wordt geïnduceerd door wild type TP53. In normale cellen reguleert deze autoregulatorische feedback loop de activiteit van TP53 en de expressie van MDM2 (Bogler *et al.*, 1995, Ohgaki & Kleihues, 2007). P14 kan ten slotte binden aan MDM2 en remt daardoor de inhiberende werking van MDM2 op TP53 degradatie. P14 wordt negatief gereguleerd door TP53. Veranderende functie van TP53 kan dus resulteren vanuit veranderingen in TP53, MDM2 of p14.

Samenvattend : EGFR en PTEN mutaties zijn genetische veranderingen die typerend zijn voor primaire glioblastoma's. TP53 mutaties zijn al vroeg aanwezige en frequente genetische veranderingen die belangrijk zijn in de pathway die leidt tot secundaire glioblastoma's.

3. Huidige behandelmethoden

Voor de behandeling van primaire hersentumoren, met name glioblastoma's, zijn nog weinig effectieve therapieën. De huidige therapieën voor glioblastoma's zijn erop gericht om de tumor voor een zo lang mogelijk termijn onder controle te houden. De gemiddelde overleving voor glioblastoma's is 16 maanden en patiënten waarbij chirurgische resectie wordt toegepast in combinatie met radiotherapie en chemotherapie, overleefden het langst in een studie in Mexico (Lopez-Gonzalez & Sotelo, 2000). Zelfs wanneer de meest agressieve therapie wordt toegepast die chirurgie, chemotherapie en radiotherapie combineert, treedt vaak binnen 6 tot 12 maanden een herhaling op waarbij zich opnieuw een tumor begint te groeien (Castro *et al.*, 2003).

3.1 Chirurgie

Operatie speelt een belangrijke rol in de behandeling van glioma's. Bij diagnose zijn de tumoren vaak <5cm in diameter. Er wordt nog steeds gedacht dat de behandeling van glioblastoma's met chirurgie het leven van de patiënt kan verlengen met 6 maanden. Het is echter erg moeilijk om glioblastoma's chirurgisch te verwijderen, omdat er vaak een duidelijke scheiding mist tussen de glioblastoma en normaal hersenweefsel. Tumorweefsel kan zich namelijk uitbreiden tussen normaal hersenweefsel zodat het niet meer opvalt of dat het lijkt op normaal en gezond hersenweefsel. Daarnaast kan de tumor zich dicht in de buurt van kritische gebieden in de hersenen bevinden. Tumoren kunnen compleet of gedeeltelijk verwijderd worden. Zelfs het weghalen van een klein gedeelte van de tumor blijkt voordelig te zijn voor de patiënt aangezien dit onder andere de bloed hersenbarrière verbreekt waardoor de tumor beter kan worden blootgesteld aan chemotherapie (Castro *et al.*, 2003). Het geeft de tumor tevens ruimte om te gaan groeien waardoor de tumor in een groeiende celcyclus komt. Hiermee kan een betere respons op radio- en chemotherapie bereikt worden, aangezien deze therapieën voornamelijk aangrijpen op delende tumorcellen. Chirurgie kan tevens gepaard gaan met het plaatsen van shunts. Deze shunts kunnen overmatige vloeistof uit de ventrikels afvoeren naar andere lichaamsholtes via een katheter. Als complete of gedeeltelijke resectie van de tumor niet mogelijk is of als diagnose erg moeilijk is, kunnen biopsies van het tumorweefsel genomen worden om meer informatie te verkrijgen over eventuele toepassing van andere therapieën (Castro *et al.*, 2003).

3.2 Radiotherapie

Na chirurgie, of als chirurgie niet mogelijk is, kan radiotherapie worden toegepast om resterende tumorcellen te doden en om symptomen te verminderen. Normaal hersenweefsel kan 60 Gy (eenheid van hoeveelheid geabsorbeerde ioniserende straling) per dosis tolereren. Dit is echter te laag om glioblastoma cellen te doden. De straling richt zich op de tumormassa en op het omliggende weefsel (2cm rondom de tumor). Om de schade aan gezond hersenweefsel, veroorzaakt door een te hoge dosis, te beperken en om de tumorcellen in zoveel mogelijk fasen van de celgroei te pakken, kan hyper gefractioneerde bestraling worden toegepast. Bij deze methode worden dezelfde doseringen gebruikt als bij normale bestraling, maar hierbij worden meer frequent kleinere doseringen toegediend op kleinere gebieden in de hersenen (Butowski *et al.*, 2006). De bijeffecten van bestraling zijn vaak opzwellen van de hersenen en accumulatie van dode tumorcellen. Dit maakt het moeilijk om met behulp van hersenscans de reductie van de tumor in te schatten (Castro *et al.*, 2003). Om meer gericht en hogere doseringen van bestraling toe te passen, is

stereotactische radiochirurgie ontwikkeld. Het voordeel hiervan is dat er hogere doseringen kunnen worden toegepast op tumormassa met een diameter van minder dan 1.5 inches. Hierdoor wordt ook de blootstelling van normaal hersenweefsel rondom de tumor geminimaliseerd. Als de tumor erg goed is gedefinieerd en gelokaliseerd, chirurgisch toegankelijk is en niet meer dan 5cm in diameter is, kan interstitiële radiotherapie (brachytherapie) worden gebruikt (Butowski *et al.*, 2006). Hierbij wordt een radioactieve pellet geïmplanteerd in de tumormassa die de omliggende tumorcellen vernietigt. Hierbij blijft ook de blootstelling van normaal hersenweefsel aan de straling beperkt. Er zijn diverse methoden ontwikkeld om het effect van de radiotherapie te verbeteren of om de bijeffecten te verminderen. Zo wordt hyperthermia gebruikt om de respons van de tumor op de bestraling te verhogen. Radiosensitizers zijn medicijnen die de tumor meer gevoelig maken voor radiotherapie. Daarnaast zijn er radioprotectors die gebruikt worden om normaal hersenweefsel te beschermen tegen effecten van de straling.

3.3 Chemotherapie

Het gebruik van chemotherapie is bijna niet meer weg te denken bij de behandeling van kanker. Over het algemeen verlengt chemotherapie de levensduur, maar met name glioblastoma's neigen er naar om resistent te worden tegen chemotherapie. Zoals bij vele tumoren het geval is, is chemotherapie bij hersentumoren niet curatief, maar wordt het enkel toegepast om de groei van de tumor te controleren en om zo lang mogelijk kwaliteit van leven van de patiënten te behouden (Castro *et al.*, 2003, Macdonald *et al.*, 2005). Chemotherapie kan als primaire therapie of als additionele therapie in combinatie met chirurgie of bestraling gebruikt worden. De meest voorkomende bestanddelen zijn temozolomide, procarbazine, nitrosourem en op platinum gebaseerde medicijnen (cisplatin, cisplatinum, carboplatin) (Macdonald *et al.*, 2005). De nadelen van chemotherapie zijn dat niet alle tumoren reageren op chemotherapeutische middelen en dat chemotherapie het beenmerg van de patiënt kan beschadigen. Actief delende cellen zijn het gevoeligste voor chemotherapie. Er zijn al enkele methoden ontwikkeld om chemotherapie meer effectief te maken. Zo zijn er implanteerbare catheters die chemotherapeutische middelen direct en gericht in de tumor kunnen afleveren. Daarnaast zijn er ook middelen met een hogere dosering of juist middelen met een lager toxisch effect om de bijeffecten te beperken. Ook zijn er middelen die de permeabiliteit van de bloed hersenbarrière (BBB) verhogen zodat de medicijnen de hersenen beter in kunnen (Receptor mediated permeabilizers, RMP-7) (Grant *et al.*, 2002).

De voornaamste nadelen van chemotherapie zijn dat er zich chemoresistente tumorcellen kunnen vormen en een inadequate drug delivery (Castro *et al.*, 2003). Soms kan chemoresistentie voorkomen worden door de tumor bloot te stellen aan vele verschillende chemotherapeutische middelen. Desondanks kunnen cellen binnen de tumor anders reageren op de medicijnen zodat er toch resistente klonen geproduceerd kunnen worden. Een ander groot nadeel van chemotherapie om hersentumoren te behandelen is de aanwezigheid van de bloed hersenbarrière (BBB). De BBB scheidt de hersenen van het bloed om hersenfuncties en metabolisme te reguleren. Het bestaat uit verschillende lagen cellen waaronder endotheelcellen, astroglia, pericyten en microglia in een basale lamina. De fysieke barrière hangt grotendeels af van de endotheelcellen die met elkaar verbonden zijn via tight junctions. De BBB vormt hierdoor een barrière voor de meeste hydrofiele substanties en voor grotere lipofiele moleculen. En door de aanwezigheid van efflux pompen kunnen ook niet alle kleine lipofiele moleculen de BBB passeren.

In de meeste gevallen bestaat de basis therapie van glioblastoma's uit chemotherapie met temozolomide (TMZ) en radiotherapie. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is een repareer eiwit dat promotogene G:C → A:T mutaties tijdens DNA replicatie voorkomt. Verlies of vermindering van MGMT activiteit komt frequent voor in glioblastoma's (40-57%) door methylatie van de promotor. MGMT methylatie wordt echter geassocieerd met een betere respons op chemotherapie en langere overleving van glioblastoma patiënten die behandeld worden met TMZ (Ohgaki & Kleihues, 2009). De respons op chemotherapie is afhankelijk van het tumortype, de omvang van eventuele chirurgische resectie en de leeftijd van de patiënt. Over het algemeen reageren patiënten met glioblastoma's het slechtste op chemotherapie. Ondanks nieuwe chemotherapeutische medicijnen, nieuwe combinaties en betere delivery methoden, blijft het therapeutisch effect bij het behandelen van glioblastoma's beperkt. Voor glioblastoma's in het bijzonder, is er een grote vraag naar het ontwikkelen van nieuwe therapieën of het verbeteren van de tumorspecifieke cytotoxische effecten van de huidige therapieën. Bij 80% van de patiënten groeit de tumor namelijk terug. Vaak binnen een gebied van 2 tot 3 cm vanaf de rand van oorspronkelijke lesie.

4. Nieuwe mogelijke behandelmethoden

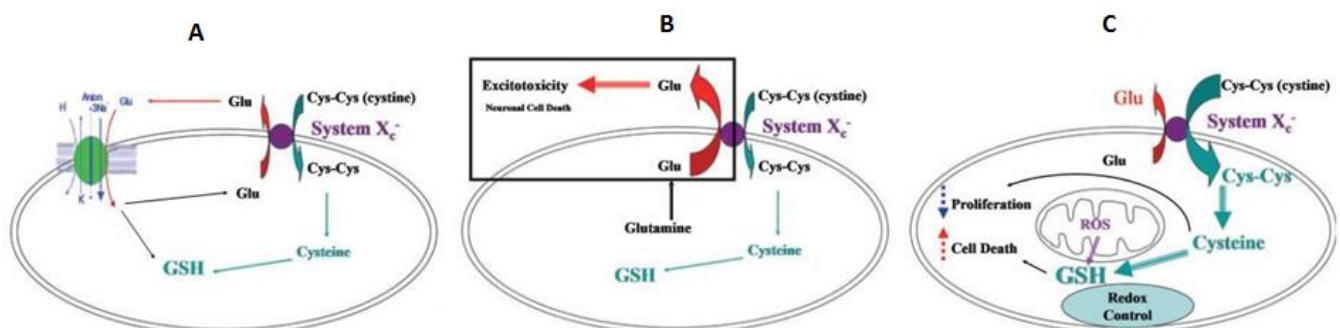
Aangezien verbeteringen op het gebied van radiotherapie, chirurgie en chemotherapie nog weinig positieve effecten hebben gehad op de behandeling van GBM, zijn er geheel nieuwe behandelmethoden nodig. Er wordt naar gestreefd om deze behandelmethoden te richten op specifieke moleculaire en biologische eigenschappen van de tumor zodat de tumor doelgericht kan worden aangepakt. Twee van deze belangrijke eigenschappen zijn overmatige glutamaat release en angiogenese. Op deze eigenschappen zal in de toekomst kunnen worden aangegrepen met nieuwe of gecombineerde behandelmethoden. De mechanismen van deze eigenschappen met mogelijk nieuwe therapieën zullen hieronder worden besproken.

4.1 Glutamaat en necrose

Glioblastoma's laten glutamaat vrij in de extracellulaire ruimte via systeem Xc. Systeem Xc is een cellulaire aminozuur transporter in het membraan die nog weinig in detail is gebracht. Het is een heterodimeer eiwit complex dat bestaat uit een katalytische lichte keten (xCT) die zorgt voor specificiteit en een regulatoire zware keten die de locatie van de transporter in het membraan bepaalt. Het is een antiporter die cystine importeert in ruil voor de release van glutamaat (Lyons, S.A. 2007). Cystine dient vervolgens als een precursor voor de synthese van glutathion (GSH), een intracellulaire antioxidant (Figuur 7C). De release van glutamaat door tumorcellen heeft ten eerste een beschermend effect voor de tumorcellen aangezien het apoptose tegengaat en ten tweede bevordert het de tumorgroei en invasie (de Groot & Sontheimer, 2011). Deze glutamaat release maakt de glioblastoma's onder andere zo invasief en vormt mogelijk een van de beperkingen bij het effectief bestrijden van deze type tumor (de Groot & Sontheimer, 2011).

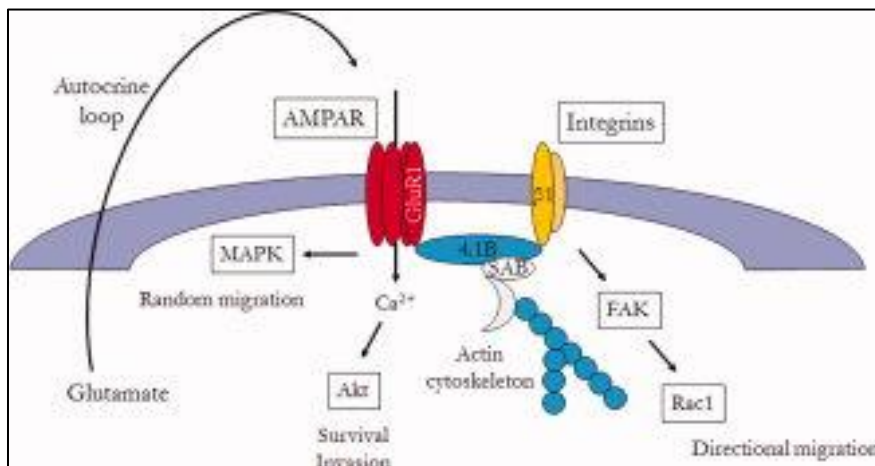
Glutamaat is een van de belangrijkste neurotransmitters in de hersenen en is essentieel voor neuronale functies en neurotransmissie. Accumulatie van glutamaat in de extracellulaire ruimte kan echter leiden tot glutamaat toxiciteit. De extracellulaire concentratie van glutamaat moet daarom goed gereguleerd worden om neurotoxische effecten te voorkomen. Het mechanisme voor de handhaving van lage extracellulaire glutamaat levels is via Na⁺ afhankelijke glutamaat transporters

in het celmembran van astrocyten en neuronen (excitatory amino acid transporters, EAAT). EAAT2 is de predominante isovorm in astrocyten en downregulatie van EAAT2 leidt tot extracellulaire glutamaat toxiciteit (Noch & Khalili, 2009). Verschillende studies hebben aangetoond dat er nauwelijks glutamaat opname van gliomacellen is in vergelijking met normale astrocyten door afwezigheid van Na⁺ afhankelijke glutamaat transporters en dat de extracellulaire concentratie van glutamaat rondom de gliomacellen verhoogd is (Roslin *et al.*, 2003, Ye & Sontheimer, 1999). Dit suggereert dat gliomacellen zich het tegenovergestelde gedragen als astrocyten door glutamaat uit te scheiden in plaats van het op te nemen (de Groot & Sontheimer, 2011). Normaalgesproken kunnen gliacellen op verschillende manieren glutamaat vrijmaken. Er is echter bewijs dat gliomacellen glutamaat via een specifiek systeem vrijmaken, namelijk via de Xc cystine glutamaat exchanger (systeem Xc) (Lyons *et al.*, 2007, Sontheimer, 2008, Ye & Sontheimer, 1999). Dit is een Na⁺ onafhankelijk systeem dat cystine in ruil voor glutamaat de cel in transporteert. Om te functioneren is er extracellulaire cystine en intracellulaire glutamaat nodig. De Xc expressie is verhoogd op gliomacellen (Chung *et al.*, 2005). De hoofdfunctie van Xc is de opname van cystine om een cellulaire antioxidant genaamd glutathion te produceren. Het opgenomen cystine wordt afgebroken tot cysteine en vormt samen met glutamaat en glycine de antioxidant tripeptide Glu-cysteine-glycine, glutathion (GSH) (Chung *et al.*, 2005). Cystine opname is de belangrijkste stap in de synthese van GSH, wat de voornaamste intracellulaire antioxidant is die cellen beschermt tegen oxidatieve stress en reactieve zuurstofradicalen (ROS). Metabool actieve cellen, en met name tumorcellen, synthetiseren vaak verhoogde GSH producties om hen beter te beschermen tegen endogene geproduceerde radicalen (Estrela *et al.*, 2006). De meeste cellen hebben maar weinig cystine opname nodig voor de productie van GSH. Dit is echter anders in tumorcellen die, vanwege hun sterke groei en metabolisme, significant meer ROS genereren en daardoor meer GSH produceren (Chung *et al.*, 2005). Dit suggereert dat de verhoogde glutamaat release van glioma's een bijproduct is van cellulaire cystine opname voor de generatie van GSH (Figuur 7). De GSH productie is verhoogd in glioma's en dat maakt hen resistent tegen oxidatieve stress en bepaalde chemotherapeutische medicijnen (Sontheimer, 2008). Het extracellulaire glutamaat blijkt tevens een belangrijke rol te spelen bij de invasie en groei van de tumor. Deze veronderstelling werd ondersteund door een experiment waarbij een glioma cellijn die geen glutamaat kon vrijmaken, nauwelijks groeide in vergelijking met de glioma cellijn die wel in staat was om glutamaat uit te scheiden (Takano *et al.*, 2001). Tevens kan de verhoogde extracellulaire glutamaat concentratie bij patiënten met kwaadaardige glioma's de aanwezigheid van vele epileptische aanvallen verklaren.



Figuur 7. **A**, In normale gliacellen wordt glutamaat vrijgelaten door Systeem Xc en weer opgenomen door de Na⁺ afhankelijke transporter (EAAT), **B**, In gliomacellen zorgt de afwezigheid van deze glutamaat transporters voor extracellulaire ophoping van glutamaat (excitotoxisch). **C**, Het doel van systeem Xc is opname van Cystine voor de productie van de antioxidant GSH.

Te hoge extracellulaire glutamaat concentraties kunnen leiden tot excitotoxiciteit. In patiënten met glioma's is glutamaat excitotoxiciteit aangetoond (Takano *et al.*, 2001). In tegenstelling tot andere kankertypen, die vaak in zacht weefsel groeien en daardoor ongelimiteerde groei capaciteit hebben, wordt de groei van hersentumoren tegengehouden door de schedel. Daarvoor moeten hersentumoren omliggende neuronen en andere ondersteunende cellen vernietigen om uit te kunnen breiden (de Groot & Sontheimer, 2011, Noch & Khalili, 2009). Een mogelijk mechanisme is dat glutamaat excitotoxiciteit door glioblastoma's leidt tot necrose van de omliggende neuronen zodat er meer ruimte vrijkomt voor tumorgroei (Noch, E. 2009; 83 Sontheimer, H. 2008). Eenmaal uitgescheiden in de extracellulaire ruimte rondom de tumor, zorgt glutamaat voor een excitotoxische neuronale celdood rondom de tumor (Ye & Sontheimer, 1999). Velen stellen zich voor dat deze excitotoxische neuronale celdood de tumor de mogelijkheid biedt om uit te breiden (Sontheimer, 2008, Takano *et al.*, 2001). Necrose is een belangrijk kenmerk van glioblastoma en is bij 85% van de glioblastoma's aanwezig. De aanwezigheid en omvang van necrose is gecorreleerd met een slechte prognose (Noch & Khalili, 2009, Shiraishi & Tabuchi, 2003). Dit kan te verklaren zijn doordat necrose rondom de tumor aangeeft dat de tumor ruimte aan het maken is om te groeien. Tevens zijn er aanwijzingen dat extracellulair glutamaat dient als een groeifactor door binding aan de NMDA en AMPA receptor op gliomacellen dat de groei en invasie van de tumor stimuleert. De NMDA en AMPA receptoren worden in glioblastoma's verhoogd tot expressie gebracht (de Groot & Sontheimer, 2011). Er is aangetoond dat gliomacellen in respons op glutamaat gestimuleerd worden om te migreren. In tegenstelling tot neuronen, acteert glutamaat op een Ca²⁺ permeabele AMPA receptor in plaats van een NMDA receptor (Lyons *et al.*, 2007). De calcium influx geïnitieerd door glutamaat leidt uiteindelijk tot motiliteit en invasie van de cel (Sontheimer, 2008). Uiteindelijk leidt het glutamaat dat wordt vrijgelaten door dezelfde of omliggende gliomacellen via Xc tot een autocrien of paracrien signaal en op die manier gliomacellen aanzet tot groei en migratie (Figuur 8) (Lyons *et al.*, 2007, Sontheimer, 2008).



Figuur 8. Autocriene of paracriene activatie van AMPA-R. Activatie van AMPA-R leidt tot celproliferatie en overleving via calcium gemedieerde activatie van PI3K/AKT en MAPK. Receptor stimulatie leidt tevens tot cel motiliteit en invasie via integrine interactie en activatie van FAK (Piao *et al.*, 2009). Figuur uit (de Groot & Sontheimer, 2011)

4.1.1 Mogelijke therapieën glutamaat pathway

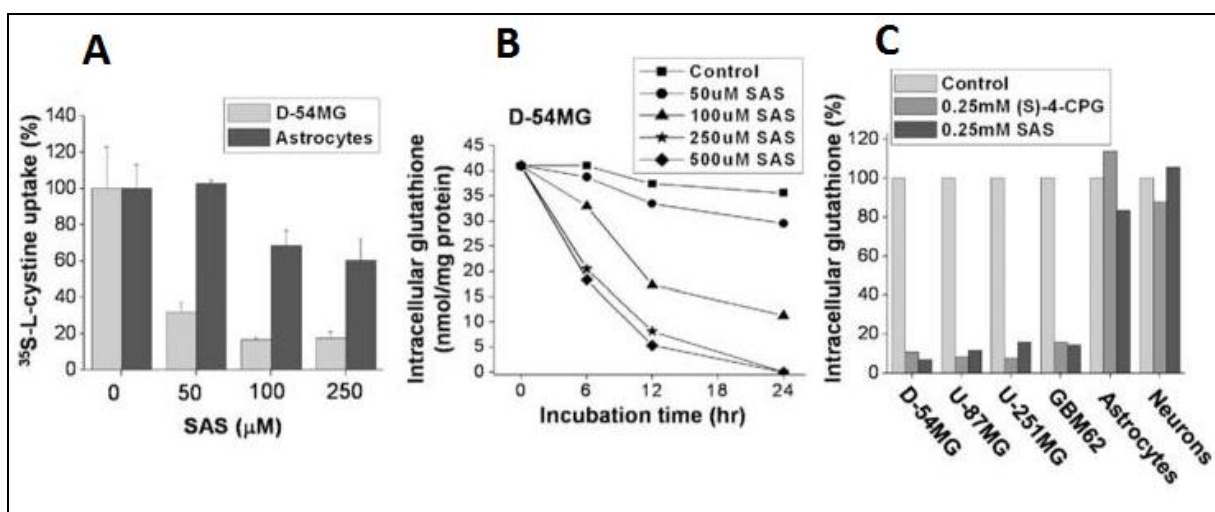
Nu er sterke aanwijzingen zijn dat glutamaat een belangrijke transmitter en groeifactor is in de extracellulaire omgeving die tumorgroei en invasie bevordert, vereist dat aandacht als een potentieel therapeutische target. Er zijn al klinische trials bezig die zich richten op de remming van de effecten van glutamaat. Glioblastoma's zijn vergelijkbaar met andere kankertypen waarbij het kwaadaardige gedrag van de tumor gedreven wordt door een afwijkende celsignalering door activatie van tyrosine kinases en het verlies van tumorsuppressor genen. Echter, klinische studies die aan wilden grijpen op groeifactoren zoals de epidermale groeifactor receptor (EGFR), mTOR, PKC en andere signaalfactoren bij GBMs toonden negatieve resultaten. Dit impliceert dat glioma's unieke tumoren zijn met karakteristieken die net zo belangrijk of zelfs belangrijker zijn dan de andere groeifactoren. De neurotransmitter glutamaat lijkt deze rol te vervullen en zou daarom een goede kandidaat zijn voor therapieën tegen GBM {{84 de Groot,J. 2011}}.

Er is een consensus dat glutamaat vanuit glioma's bindt aan glutamaat receptoren op omliggende neuronen en glioblastoma tumorcellen. Antagonisten van deze glutamaat receptoren lijken daarom een logische target te zijn. Echter, de meeste glutamaat receptor remmers lieten ernstige bijwerkingen zien, omdat glutamaat receptoren ook erg belangrijk zijn in de normale signalering van de hersenen en activatie van NMDA receptoren onmisbaar is bij leren en geheugen (Lipton, 2004). Een recent ontwikkelde AMPA receptor antagonist, genaamd Talampanel, liet veelbelovende resultaten zien in preklinische studies en kon de hersenen goed binnendringen. Twee onafhankelijke klinische trials hebben Talampanel onderzocht in patiënten met kwaadaardige glioma's. Talampanel veroorzaakte geen ongunstige bijwerkingen en in een grotere fase II studie (72 patiënten met glioblastoma's) werd Talampanel toegediend in combinatie met radiotherapie en chemotherapie (temozolomide). De data lieten bemoedigende resultaten zien op de overleving van de patiënten zonder toxische effecten van Talampanel (Grossman *et al.*, 2009). Dit suggereert een algemeen gebruik van Talampanel in deze combinatietherapie. Er is echter een gerandomiseerde placebo-gecontroleerde studie nodig om te achterhalen of Talampanel daadwerkelijk effectiever werkt in deze combinatietherapie dan bestraling en chemotherapie alleen. In een studie van (Sontheimer, 2008) bleek dat Jolo-Tx, een andere specifieke inhibitor van Calcium permeabele AMPA receptoren, de migratie van tumorcellen geïnitieerd door glutamaat kon verminderen. De verhoogde glutamaat levels rondom gliomacellen zijn het gevolg van glutamaat release door de Systeem Xc transporter. Aangrijpen op deze transporter en daarmee de glutamaat secretie remmen zou een mogelijk therapeutische target kunnen zijn.

Systeem Xc Transporter inhibitie

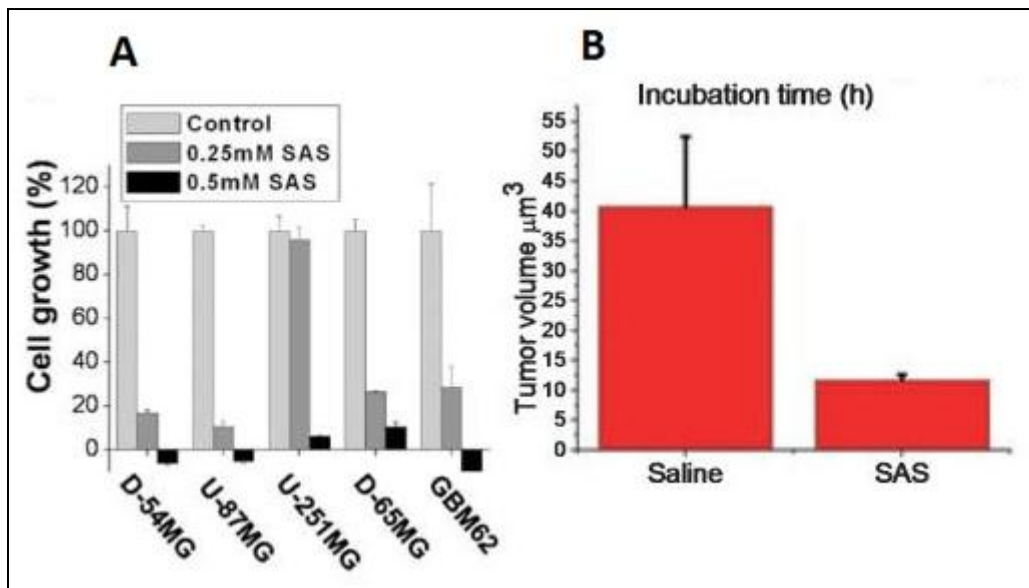
De Systeem Xc transporter is verantwoordelijk voor de voornaamste glutamaat release en kan geremd worden door Sulfasalazine (SAS). Sulfasalazine wordt tegenwoordig al gebruikt als reumaremmers, omdat het een ontstekingsremmer is. Ondanks dat SAS goedgekeurd is door de Food and Drug Administration (FDA), heeft SAS een erg slechte biologische beschikbaarheid, omdat het zodra het circuleert snel gemetaboliseerd wordt en daardoor een lage halfwaardetijd heeft (de Groot & Sontheimer, 2011). Er is aangetoond dat systeem Xc de enige pathway is die verantwoordelijk is voor de cystine opname in gliomacellen en niet in andere hersencellen (Chung *et al.*, 2005). Systeem Xc is dus belangrijk om de intracellulaire antioxidant glutathion concentraties in tumorcellen te behouden die nodig zijn voor overleving van de cellen. Farmacologische inhibitie van

dit systeem zou dus niet alleen de glutamaat release van gliomacellen remmen en daarmee excitotoxiciteit verminderen, maar ook de vorming van glutathion wat vervolgens leidt tot apoptotische celdood aangezien de cellen zich niet meer kunnen verdedigen tegen reactieve zuurstofradicalen (Chung *et al.*, 2005). Belangrijk is dat andere normale hersencellen (bijvoorbeeld neuronen en astrocyten) ongevoelig zijn voor systeem Xc inhibitie wat suggereert dat glutathion synthese in gliomacellen selectief kan worden geïnhibeerd met behulp van sulfasalazine. De groei van astrocyten en neuronen werd niet tegengehouden door inhibitie van systeem Xc. Deze cellen bleven in staat om glutathion te produceren, terwijl bepaalde gliomacellen 48 uur na inhibitie van systeem Xc geen glutathion meer produceerden (Figuur 9) (Chung *et al.*, 2005). Daarnaast is vastgesteld dat glutamaat release door gliomacellen geremd wordt door toediening van SAS (dosisafhankelijk). Dit bevestigt dat de glutamaat release plaatsvindt via de Systeem Xc transporter (Lyons *et al.*, 2007).



Figuur 9. Inhibitie van Systeem Xc met Sulfasalazine. **A**, SAS verlaagt de cystine opname in D-54 MG cellen meer dan in astrocyten. **B**, Sulfasalazine veroorzaakt een tijd- en dosisafhankelijke afname in intracellulaire glutathion productie in D54-MG gliomacellen. **C**, Behandeling met sulfasalazine remt intracellulaire glutathion in glioma cellen, maar niet in astrocyten en neuronen. (Chung *et al.*, 2005)

In vitro testen met geïsoleerde tumorcellijnen uit (Chung *et al.*, 2005) hebben aangetoond dat inhibitie van systeem Xc selectief de cystine opname en daarmee de glutathion vorming in gliomacellen remt (Figuur 9 C) (Sontheimer, 2008). Tevens wordt de glioma celgroei door blokkering van de cystine opname geremd (Figuur 10A) en leidt cystine opname inhibitie tot apoptotische celdood. Deze in vitro resultaten worden bevestigd met in vivo testen in muizen met menselijke glioma's waarbij toediening van sulfasalazine de tumorgroei vertraagde, minder tumorinvasie optrad en de tumoren kleiner waren dan in de met saline behandelde muizen (Chung *et al.*, 2005, Lyons *et al.*, 2007). Het tumorvolume werd verminderd met 60-80% in muizen behandeld met SAS ten opzichte van de met Saline behandelde muizen (Figuur 10B) (Sontheimer, 2008). Al deze resultaten suggereren dat tumorinvasie door het autocriene/paracriene signaal van glutamaat geremd wordt door inhibitie van Systeem Xc. Tevens was er minder necrose zichtbaar in de behandelde dieren. Dit is interessant aangezien necrose gecorreleerd is met een betere prognose en overleving van de patiënt (Raza *et al.*, 2002).



Figuur 10. Effect van System Xc inhibitie door SAS op celgroei en tumor volume. A, Behandeling van gliomacellen met SAS toont dosis-afhankelijke groei inhibitie. **B,** Intraperitoneale injectie (2x per dag 8 mg/kg sulfasalazine) leidt tot 75% reductie in tumor volume in vivo.

Een significant gedeelte van de cellulaire schade die met chemotherapie en bestraling wordt bereikt wordt toegeschreven aan de productie van ROS. De hoge GSH levels in gliomacellen zijn mede de oorzaak dat glioma's resistent worden voor zulke behandelingen. Er zijn al studies geweest die de tumorgroei probeerden te controleren door gebruik te maken van chemische remmers van glutathion synthese. Echter waren deze medicijnen niet specifiek genoeg en daardoor werd ook de productie van GSH in de lever en ander organen geremd (Fojo & Bates, 2003). Nu is aangetoond dat gliomacellen GSH produceren via cystine opname door Systeem Xc en inhibitie van dit systeem leidt tot verlaagde GSH productie en vertraagde tumorgroei, biedt SAS erg goede toekomstperspectieven voor een eventuele nieuwe behandeltherapie van glioblastoma's. Het gebruik van SAS zou de tumoren meer gevoelig maken voor chemotherapie en bestraling.

Glutamaat heeft in glioma's een tweevoudige capaciteit. Het maakt ruimte voor tumorgroei en het activeert AMPA receptoren op dezelfde of andere omliggende gliomacellen zodat Calcium signalen in de cel worden geïnitieerd die cel motiliteit en invasie promoten (Lyons *et al.*, 2007, Sontheimer, 2008). Inhibitie van glutamaat release via Systeem Xc door gebruik te maken van SAS remt de calcium respons en vermindert migratie (Sontheimer, 2008). De migratie van de tumorcellen werd weer hersteld door toediening van glutamaat. Het remmen van de glutamaat release heeft tevens een gunstige werking op de vermindering van epileptische aanvallen bij patiënten met GBM. De hoge glutamaat levels zijn namelijk verantwoordelijk voor de inductie van epileptische aanvallen in patiënten (Buckingham *et al.*, 2011).

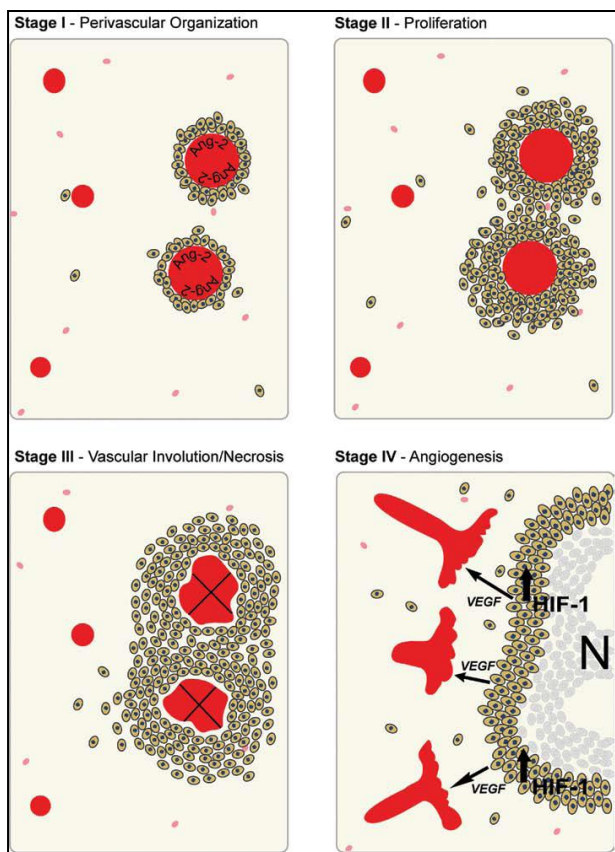
Opregulatie van glutamaat heropname

De toegenomen glutamaat rondom glioblastoma's is het gevolg van verhoogde glutamaat release van glioma's via systeem Xc gecombineerd met de afwezigheid van glutamaat heropname door EAAT transporters. Het verbeteren van de EAAT gemedieerde glutamaat heropname biedt een andere mogelijkheid om op de verhoogde extracellulaire glutamaat levels aan te grijpen. EAAT2 transporter expressie kan in muizen verdubbeld of zelfs verdrievoudigd worden door toediening van het beta-lactam antibioticum ceftriaxone (Rothstein *et al.*, 2005). Het is mogelijk dat toediening van zulke antibiotica aan patiënten de opname van glutamaat via EAAT2 transporters door gliacellen verhoogt, waardoor accumulatie van glutamaat rondom de tumor kan worden tegengegaan. Hier moet echter meer onderzoek naar gedaan worden.

4.2 Angiogenese

Angiogenese speelt een belangrijke rol in de natuurlijke progressie van tumoren. Van alle tumoren vertonen hersentumoren, met name GBM, de meeste vasculaire proliferatie. GBM is een tumor die daarom gekenmerkt wordt door een hele hoge vasculaire densiteit (Fischer *et al.*, 2005, Rong *et al.*, 2006). De WHO onderscheidt lage graad tumoren van hoge graad tumoren door de aanwezigheid van microvasculaire proliferatie als diagnostisch criterium en prognose parameter (Kleihues *et al.*, 2002). Tijdens embryogenese worden bloedvaten gevormd uit endothele precursors en hematopoetische stamcellen. Een proces dat vasculogenese wordt genoemd. Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten uit al bestaande bloedvaten door een veranderde balans in pro-angiogene en anti-angiogene factoren (Fischer *et al.*, 2005). Cellen hebben toegang nodig tot het vasculaire systeem om voedingsstoffen en zuurstof te kunnen bemachtigen als wel om afvalproducten te elimineren. De vorming van nieuwe bloedvaten is daardoor noodzakelijk voor tumorgroei zodat alle tumorcellen genoeg voedingsstoffen krijgen. Een recente studie heeft laten zien dat glutamaat op endotheelcellen een down-regulatie van occludines en als gevolg daarop een verminderde barrièrefunctie van de onderliggende endotheelcellen veroorzaakt (Andras *et al.*, 2007). Het is mogelijk dat gliomacellen die migreren langs bloedvaten en glutamaat vrijmaken op deze manier toegang krijgen tot voedingsstoffen en aminozuren uit het plasma door vermindering van de endothele tight junctions (Lyons *et al.*, 2007).

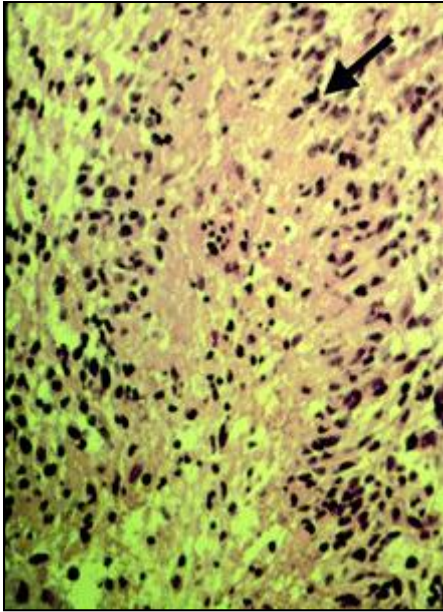
Vergelijkbaar met andere tumoren kunnen hersentumoren vier mechanismen gebruiken om nieuwe bloedvaten te werven: co-option, angiogenese, vasculogenese en intussusceptie. De groei van glioblastoma's gaat voornamelijk gepaard met co-option, de formatie van nieuwe bloedvaten vanuit andere al bestaande bloedvaten. Dit proces wordt strak gereguleerd en gaat gepaard met een complexe aaneenschakeling van pro- en anti-angiogene factoren (Chi *et al.*, 2009, Rong *et al.*, 2006). Bij tumorgroei migreren tumorcellen zich langs bloedvaten om ze te destabiliseren wat uiteindelijk leidt tot bloedvatregressie en verminderde perfusie van de tumorcellen. Dit veroorzaakt hypoxia en tumor celdood (necrose). De hypoxia en mutaties in tumorcellen induceren de secretie van groeifactoren die via angiogenese nieuwe bloedvaten rekruteren (Jain *et al.*, 2007). Pseudopalisades bestaan uit tumorcellen die het necrotisch tumorgebied omringen en spelen een belangrijke rol bij deze vorm van angiogenese in GBM (Rong *et al.*, 2006). Dit proces wordt hieronder verder uitgelegd.



Figuur 11. Schematische weergave van glioma groei en angiogenese. Stage I: Perivasculaire organisatie waarbij tumorcellen zich concentreren rondom bloedvaten. Endotheelcellen brengen Ang-2 tot expressie. **Stage II:** Proliferatie fase waarin tumorcellen prolifereren rondom bloedvat. **Stage III:** Degeneratie van de bloedvaten. Dit leidt tot necrose en hypoxia, wat de VEGF expressie op tumorcellen en angiogenese promoot. **Stage IV:** Angiogenese vindt plaats zodra bloedvaten groeien in de richting van de necrotische tumor. De overexpressie van HIF-1 en VEGF mRNA in pseudopalisade cellen leidt tot de release van VEGF en de inductie van angiogenese in nabijgelegen bloedvaten. {{105 Fischer, I. 2005}}

De eerste fase van angiogenese vereist toegenomen vasculaire permeabiliteit van de al bestaande bloedvaten. Zoals te zien in figuur 11 accumuleren gliomacellen zich rondom al bestaande bloedvaten. De endotheelcellen brengen angiopoietin-2 (Ang-2) tot expressie. Dit leidt tot destabilisatie van de bloedvatwand en een afname van pericyten. Hierop volgend gaan de gliomacellen rondom het bloedvat prolifereren. De omringende bloedvaten degenereren wat leidt tot necrose en hypoxia van de overgebleven tumorcellen. Deze hypoxia, wat dus het resultaat is van verminderende vasculaire perfusie van de tumor, leidt tot tumorcel migratie om pseudopalisades te vormen rondom het necrotische gebied (Figuur 12). In respons op pro-angiogene cytokines en de overexpressie van HIF-1 en VEGF op pseudopalisade cellen, beginnen endotheelcellen rondom het necrotische gebied te prolifereren en te migreren in de richting van deze chemotactische omgeving. Eenmaal gevestigd vormen de endotheelcellen nieuwe bloedvaten om de necrotiserende tumor te vasculariseren (Chi *et al.*, 2009, Fischer *et al.*, 2005).

Zoals eerder genoemd is deze angiogene respons het resultaat van een veranderde balans in een groot aantal pro-angiogene en anti-angiogene factoren. Een van de meest belangrijke en kritieke pro-angiogene factoren die geproduceerd wordt door pseudopalisades en verantwoordelijk is voor angiogenese in GBM is de vasculair endothelale groeifactor (VEGF). Pseudopalisade cellen zijn erg hypoxisch en brengen hoge levels van hypoxia-induceerbare transcriptie factoren tot expressie, waaronder HIF-1. Het VEGF gen bevat een hypoxia-responsief element dat bindt aan HIF-1 en waardoor transcriptie van VEGF wordt geactiveerd (Fukumura *et al.*, 2001). De VEGF concentratie van patiënten met GBM kan 200 tot 300x hoger zijn in het vloeistof rondom de tumor dan in het serum (Takano *et al.*, 1996).

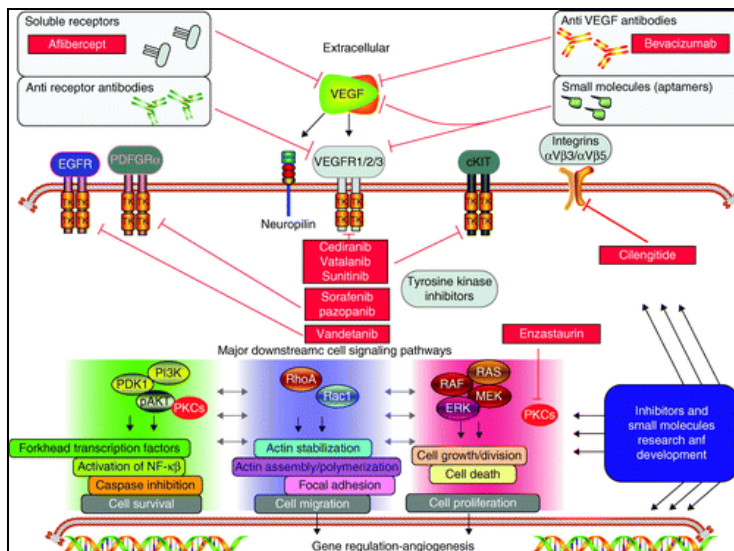


Figuur 12. Histopathologische kenmerken van glioblastoma. Pseudopaliserende necrose bestaat uit gliomacellen (pijl) die zich rondom een centraal gebied van fibrillaire necrose vestigen (pallisade). De pseudopaliserende cellen brengen opgereguleerde vasculaire endothele groeifactor tot expressie en induceren microvasculaire proliferatie in omliggende gebieden. {{106 Chi,A.S. 2009}}

Enmaal tot expressie gebracht en gesecreteerd bindt extracellulair VEGF aan de receptoren VEGFR-1 en VEGFR-2 die opgereguleerd zijn op endotheelcellen van glioblastoma's en afwezig zijn in normaal omringend weefsel (Fischer *et al.*, 2005). Receptor activatie leidt tot proliferatie, differentiatie, overleving en migratie van endotheelcellen (angiogenese) in regionen rondom de pseudopalisades wat leidt tot een hogere vasculaire densiteit in GBM. De genetische veranderingen, waaronder EGFR activatie en PTEN mutaties, leiden tot de toegenomen VEGF expressie in glioblastoma's (Chi *et al.*, 2009, Fischer *et al.*, 2005). Hypoxia is de voornaamste trigger voor VEGF expressie in gliomacellen door een mechanisme gemedieerd door de transcriptie factor HIF-1. Veel andere factoren zijn ook in staat om de VEGF expressie te laten toenemen, waaronder veranderde oncogenen en tumorsuppressor genen (TP53), cytokines, epidermale groeifactor (EGF) en geactiveerde intracellulaire signaal routes zoals fosfatidylinositol 3' kinase (PI3K)/Akt en Ras/mitogen-geactiveerde proteïne kinase (MAPK) (Chi *et al.*, 2009, Jain *et al.*, 2007). Inhibitie van deze HIF-VEGF pathway onderdrukt tumorgroei in experimenten (Kung *et al.*, 2000). Aangezien bewezen is dat tumorgroei en metastase afhankelijk zijn van nieuwe bloedvatformatie in diermodellen, heeft dat een nieuwe kijk gegeven op anti-angiogene strategieën als kankerbehandeling (Jain *et al.*, 2007).

4.2.2 Anti-Angiogenese Therapieën

In figuur 13 is aangegeven op hoeveel punten anti-angiogenese therapie kan aangrijpen binnen de VEGF pathway. Naast VEGF zijn ook veel andere moleculen geïdentificeerd die endotheelcellen kunnen stimuleren tot proliferatie en migratie in glioma's, waaronder angiopoietin-1 en 2 en IL-8. Er wordt veel onderzoek gedaan naar therapieën die op deze verschillende factoren kunnen aangrijpen. Monoclonale antilichamen tegen circulerende angiogene factoren blijken een effectieve manier te zijn om pro-angiogene stimuli te verminderen. Deze antilichamen hoeven niet zoals vele andere antilichamen tegen tumorcellen de BBB te passeren om een effect te bereiken. Daarmee wordt een groot obstakel binnen de neurotherapeutica omzeild {{108 Wong,M.L. 2009}}. Het best ontwikkelde antilichaam in deze klasse tot nu toe is het anti-VEGF antilichaam genaamd Bevacizumab.



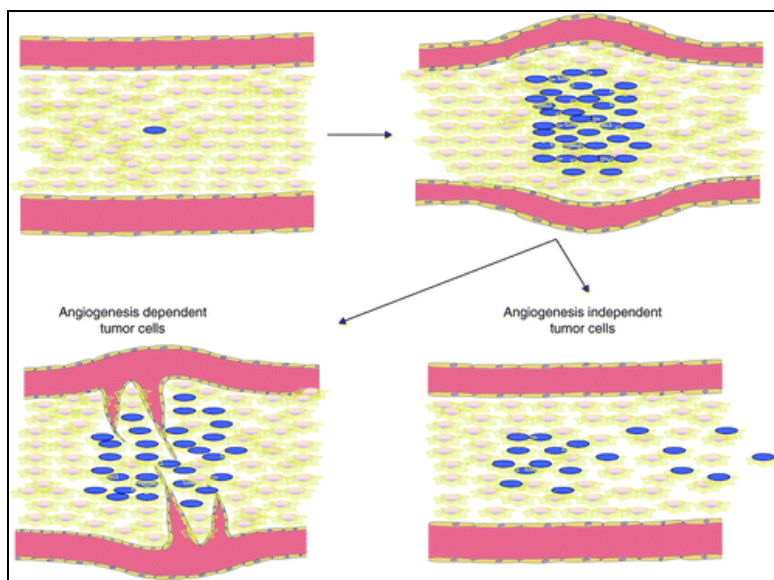
Figuur 13. Schematische weergave van de huidige behandeling strategieën gericht op het VEGF systeem.

Anti-VEGF antilichamen zoals Bevacizumab reduceren of blokkeren het extracellulaire VEGF dat de VEGF-receptoren kan activeren. In ontwikkeling zijn ook anti-receptor antilichamen of kleine moleculen die direct binden aan de receptor of liganden. Tevens zijn er nog kleine moleculen die downstream celsignalen kunnen remmen.

Bevacizumab is het humane monoclonale antilichaam dat VEGF neutraliseert. Dit antilichaam werd in 2004 als eerste goedgekeurd als een anti-angiogenese remmer voor het gebruik bij endeldarmkanker en later ook bij longkanker. In een fase II studie, met 35 patiënten met GBM, werd bevacizumab in combinatie met irinotecan toegediend (een combinatie die doorgaans wordt gebruikt bij endeldarmkanker). De 6 maanden progressie vrije overleving (PFS) van alle 35 patiënten was 46% en de 6 maanden totale overleving was 77%. Deze resultaten waren significant beter dan een behandeling met alleen temozolomide (PFS van 21% en 6 maanden totale overleving 60%) (Vredenburgh *et al.*, 2007). Van alle 35 participanten ontwikkelde een patiënt intracerebrale bloedingen en vier patiënten ontwikkelden trombo-embolische aandoeningen. In een andere studie met 10 patiënten met kwaadaardige glioma's, waarbij resectie, chemotherapie en radiotherapie geen effect hadden, gaf 80% een objectieve respons op therapie met bevacizumab in combinatie met irinotecan. In een fase II studie van (Friedman *et al.*, 2009) werd bevacizumab met en zonder irinotecan vergeleken. De respons was 28.2% voor alleen bevacizumab en 37.8% voor de combinatietherapie met irinotecan. De progressie vrije 6 maanden was 42.6% en 50.3% respectievelijk. Er zijn echter nog geen gerandomiseerde klinische studies die een duidelijk synergetisch effect tussen bevacizumab en irinotecan hebben aangetoond. Ook al was de respons bij een combinatie therapie hoger dan de respons op gebruik van alleen irinotecan (Buie & Valgus, 2008). De verschillende fase II studies verschilden op diverse gebieden waaronder op het aantal patiënten, het gebruik van een anticoagulant (antistollingsmiddel) en of het een herhaling van de tumor betrof of dat het om een eerste diagnose ging. Toch kwamen de studies tot overeenstemmende conclusies. Wat nog steeds onzeker blijft, is dat er nog geen complete studies zijn die bevacizumab vergelijken met een standaard therapie en of de gemiddelde overleving ook verbetert. Tot nu toe hebben vrijwel alle studies alleen gekeken naar of de respons op de behandeling verbeterde met bevacizumab en hoeveel patiënten 6 maanden lang progressie vrij kunnen leven. Om een duidelijk positief effect van bevacizumab op de gemiddelde overleving van patiënten met GBM te kunnen aantonen, zijn grotere gerandomiseerde studies met veel patiënten

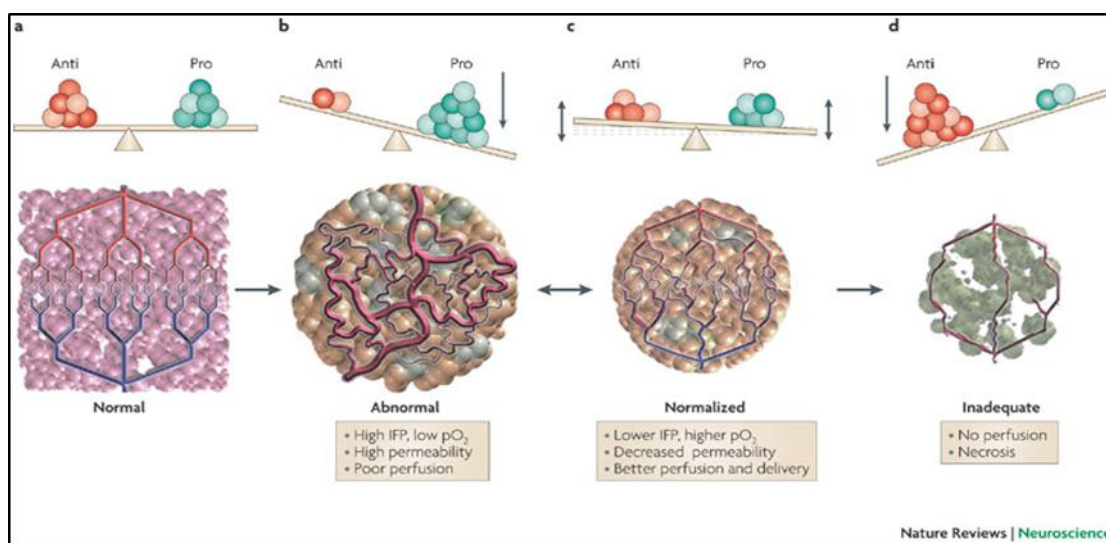
nodig. Deze studies zijn op dit moment gaande (Chamberlain, 2011). Naast activiteit van bevacizumab gecombineerd met chemotherapeutica, is ook aangetoond dat bevacizumab de respons laat toenemen wanneer het als enige middel wordt toegediend. In een fase II studie van patiënten met GBM waarbij de tumor terugkeerde na chemotherapie (TMZ), was de objectieve respons op een bevacizumab behandeling 28% (Friedman *et al.*, 2009). In twee andere studies (fase II en een retrospectieve analyse) is ook het effect van enkel toediening van bevacizumab geëvalueerd. De respons in deze twee studies was 25% en 42% respectievelijk en de 6 maanden progressie vrije overleving waren 32% en 42% respectievelijk (Chamberlain & Johnston, 2010, Raizer *et al.*, 2010). Naar het effect van bevacizumab als monotherapie kan echter nog meer onderzoek gedaan worden (Kazazi-Hyseni *et al.*, 2010).

Inhibitie van angiogenese door anti-VEGF antilichamen is niet irreversibel. De ~20% van de tumor vasculatuur die niet aangetast wordt door anti-VEGF antilichamen, kan terug groeien na onderbreking van het medicijngebruik waardoor de tumor opnieuw wordt gevasculiseerd en kan groeien (Wong *et al.*, 2009). Dit suggereert dat de duur van bevacizumab therapie van groot belang is en dat een lange termijn behandeling vereist is bij patiënten die responderen op bevacizumab (Chamberlain, 2010). Gliomacellen zijn erg invasief en bevatten tumorcellen die ver kunnen migreren vanaf de oorspronkelijke tumormassa. Deze cel populaties overleven zonder angiogenese en zijn angiogenese onafhankelijke tumorcellen (Figuur 14) (Sakariassen, P.O. 2006). Met anti-angiogene therapie wordt dus tegen het probleem aangelopen dat de voornamelijk angiogene tumor massa verwijderd wordt, maar dat de invasieve gliomacellen (die angiogenese onafhankelijk zijn) aanwezig blijven en er dus verantwoordelijk voor zijn dat de tumor steeds teruggroeit (Miletic, H. 2009). Er is zelfs bewijs dat suggereert dat anti-VEGF behandeling tumormigratie en invasie in glioblastoma's induceert. Daarom zijn er therapieën nodig die ook aangrijpen op de invasie gliomacellen zodat deze gecombineerd kunnen worden met anti-angiogene therapieën.



Figuur 14. Glioblastoma's bestaan uit angiogenese afhankelijke en onafhankelijke cellen. De angiogenese onafhankelijke cellen vertonen uitgebreide migratie in de hersenen langs bloedvaten. (Miletic *et al.*, 2009)

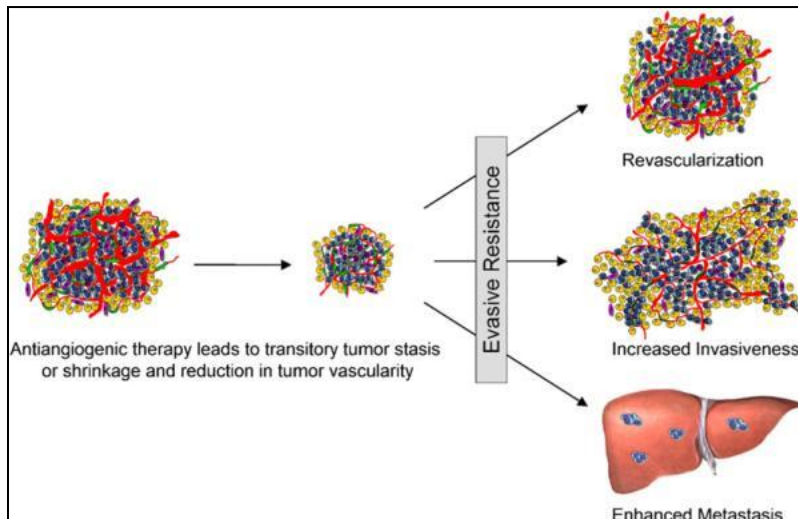
De effecten die met een anti-VEGF behandeling bedoeld worden zijn normalisering van het vaatbed in de tumor waardoor de interstitiële druk afneemt en de toegang van chemotherapeutische middelen tot de tumor verbeterd wordt (Figuur 15) (Miletic *et al.*, 2009). Daarom doen veel studies onderzoek naar de combinatie van bevacizumab en chemotherapeutische middelen om te zien of de respons op deze chemotherapeutische middelen toeneemt. Daarnaast resulteert een verminderde vascularisatie in hypoxische tumor celdood en worden endotheelcellen gevoeliger voor chemotherapie en radiotherapie omdat VEGF dient als een overlevingsfactor voor endotheelcellen. De vasculaire remodeling die geïnduceerd wordt door anti-VEGF behandeling leidt niet alleen tot een normalisering van de vasculatuur, maar ook tot een meer hypoxische tumor micro-omgeving. Dit begunstigt een metabolische verandering in de tumorcellen in de richting van glycolyse, wat leidt tot tumorcel invasie in normaal hersenweefsel (Keunen *et al.*, 2011). Dit zijn tumorcellen die zich aanpassen en resistent worden tegen anti-angiogenese behandelingen.



Figuur 15. A. In gezonde personen wordt een balans van pro- en anti-angiogene moleculen in stand gehouden voor een georganiseerde en efficiënte vasculaire aanvoer. **B.** Tumoren produceren angiogene factoren die een abnormaal en inefficiënt vasculair netwerk induceren. **C.** Anti-angiogene therapie kan de balans terugbrengen naar normaal zodat het vasculaire netwerk genormaliseerd wordt en waardoor drug delivery en perfusie verbeterd worden. **D.** Als anti-angiogenese dominant is, wordt het netwerk compleet vernietigd zodat zuurstof en voedingsstoffen niet meer aangeleverd worden en de tumor uiteindelijk zal afsterven. In menselijke tumoren keert C vaak terug naar B. IFP, interstitiële vloeistof druk; pO₂, weefsel zuurstof level. (Wong *et al.*, 2009)

Toegenomen cel infiltratie na anti-angiogene behandeling is ook gerapporteerd in andere studies (Norden, A.D. 2008). In een studie van (Lucio-Eterovic *et al.*, 2009) is aangetoond dat glioblastoma tumorcellen kunnen ontsnappen aan de anti-angiogene therapie door reactivatie van angiogenese door opregulatie van andere pro-angiogene factoren en invasie in normaal hersenweefsel door opregulatie van allerlei extracellulaire matrixcomponenten (Figuur 16). Naast de paracrine effecten van VEGF op endotheelcellen, blijkt een autocrien effect van VEGF de invasie van glioblastoma's te reguleren, aangezien anti-VEGF therapie de tumorinvasie in vitro laat toenemen. Deze bevindingen benadrukken het belangrijke effect van VEGF in tumorinvasie en identificeren potentiële mediators bij resistentie tegen anti-VEGF therapie. Deze resultaten zijn belangrijk om combinatietherapieën te ontwikkelen om dit resistente fenotype te verslaan. In (Keunen *et al.*, 2011) werd een opregulatie van de PI3K en Wnt signaalroute aangetoond na

behandeling met bevacizumab. Deze twee signaalroutes zijn eerder gelinkt aan invasieve cellen in GBMs (Sakariassen *et al.*, 2006). Interessant is dat de PI3K/Akt route ook betrokken is bij diverse stappen in anaerobe en aerobe glycolyse regulatie. Door activatie van Akt als resultaat van bevacuzimab geïnduceerde hypoxia, neemt de intracellulaire glucose toe en wordt de anaerobe glycolyse gestimuleerd met als gevolg toenemende invasie. Deze data benadrukken de vraag naar anti-angiogene behandeling in GBM in combinatie met medicijnen die zich richten op de specifieke of metabolische pathway die gelinkt is aan het glycolytische fenotype van de tumor.



Figuur 16. Schematische weergave van adaptieve responsen op angiogenese remmers die gepaard gaan met resistentie. Tumoren reageren op anti-VEGF door tumor regressie en verdwijning van bloedvaten. Echter kunnen dan mechanismen worden aangeschakeld die resistentie tegen anti-angiogene behandelingen induceren via alternatieve pro-angiogene signalen, toegenomen invasie en of metastase. (Paez-Ribes *et al.*, 2009)

Naast de effecten van bevacizumab op issues gerelateerd aan respons en progressie vrije , is er een afwezigheid van studies die dosering en duur van de behandeling evalueren. De juiste dosering en een toedieningschema van bevacizumab zijn nog onbekend. Daarnaast moet er ook onderzoek gedaan worden naar biomarkers die de respons op bevacizumab kunnen voorspellen aangezien over het algemeen maar 25% van de patiënten een objectieve respons op bevacizumab laat zien (Chamberlain, 2011). Verder zijn oudere patiënten met GBM een uitdagende groep patiënten aangezien ze een korte overleving hebben in vergelijking met jongere patiënten. Er zijn data die suggereren dat oudere patiënten (> 70 jaar) met GBM het beste reageren op een behandeling met bevacizumab in combinatie met chemotherapie (Nghiemphu *et al.*, 2009). Deze leeftijdsafhankelijke respons zou verklaard kunnen worden door biologische verschillen (bijvoorbeeld VEGF expressie) in GBM tussen verschillende leeftijdsgroepen. Deze resultaten ondersteunen de mogelijkheid om bevacizumab voor oudere patiënten met GBM te gebruiken. Deze hypothese moet echter verder onderzocht worden met andere klinische studies.

Anti-angiogene behandelingen worden over het algemeen goed getolereerd maar gaan vaak gepaard met bijwerkingen waaronder hypertensie en proteïnurie. Daarnaast kunnen er nog ernstigere bijwerkingen optreden waaronder trombo-embolische aandoeningen en bloedingen, aangezien bevacizumab circulerend VEGF neutraliseert (Buie & Valgus, 2008). Deze ernstige bijwerkingen treden echter infrequent op. Ten minste de helft van alle patiënten reageert niet op een behandeling met anti-angiogene middelen en de respons is afhankelijk van de duur van de

behandeling. Resistentie tegen anti-angiogene therapie impliceert de aanwezigheid van alternatieve pro-angiogene factoren. Ondanks dat er positieve resultaten over de combinatie met bevacizumab en irinotecan naar boven komen, zijn er duidelijk patiënten die niet reageren op bevacizumab. Dit zou verklaard kunnen worden door heterogeniteit in de vasculaire respons op bevacizumab of door andere onafhankelijke patiëntkarakteristieken die hen minder gevoelig maakt voor deze therapie. Deze karakteristieken hangen weer samen met de genetische en moleculaire verschillen tussen tumoren van individuele patiënten. Daardoor reageren ze allemaal verschillend op anti-angiogene therapie en chemotherapie (Buie & Valgus, 2008).

Een grote gerandomiseerde dubbel-blinde placebo-gecontroleerde fase III studie is nu gaande met 920 nieuw gediagnostiseerde GBM patiënten van over de hele wereld waarbij de doeltreffendheid en veiligheid van bevacizumab in combinatie met standaard therapieën wordt onderzocht (Chinot, O.L. 2011). Er blijven nog steeds veel vragen onbeantwoord. Gerandomiseerde klinische studies zijn nodig om een dergelijk effect op overleving te achterhalen, om de optimale combinatie met chemotherapeutische middelen te vinden, om een juiste dosering en toedieningsschema op te zetten en om de behandelingsduur van patiënten die reageren op de behandeling te bepalen. Veel van deze onbeantwoorde vragen zullen in toekomstige klinische studies beantwoord worden zodat bevacizumab in de toekomst mogelijk op patiënten met GBM toegepast kan worden. Tevens moet er meer onderzoek gedaan worden naar biomarkers die de respons op bevacizumab kunnen voorspellen aangezien maar een gedeelte van de patiënten een respons laat zien en om de angiogenese-onafhankelijke cellen en de resistent wordende cellen voor anti-angiogenese therapie te kunnen aanpakken. Eerder werd gedacht dat anti-angiogene behandeling door reductie van nieuw gevormde bloedvaten de tumor zou ontdoen van voedingsstoffen en zuurstof en dat daardoor tumorgroei geremd en tumor celdood geïnduceerd wordt. Het mechanisme van anti-angiogene therapie blijkt echter gecompliceerder te zijn en af te hangen van tumortype en individu (Keunen *et al.*, 2011).

5. Discussie

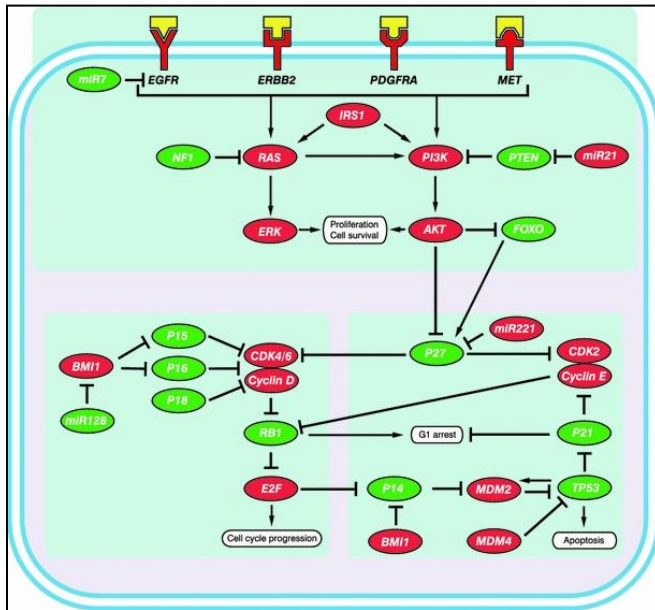
Dit review heeft een overzicht gegeven van hoe complex primaire hersentumoren in elkaar zitten. Door de slechte prognose van patiënten met voornamelijk glioblastoma's is het noodzakelijk om nieuwe effectieve therapieën te ontwikkelen. De laatste paar jaren is het onderzoek op dit gebied sterk toegenomen, aangezien de overlevingskans van GBM patiënten in de laatste decennia nog niet is toegenomen ondanks vorderingen op het gebied van chemotherapie, radiotherapie en chirurgie. De meest optimistische klinische studie tot nu toe met een specifieke nieuwe therapie rapporteerde 2 jaar overleving bij 25% van de patiënten met GBM (Stupp *et al.*, 2005). Glioblastoma's ontwikkelen zich niet allemaal op dezelfde manier. Sommige GBMs kunnen zich vormen vanuit lagere graad hersentumoren en zich ontwikkelen tot een GBM. Dit zijn de secundaire glioblastoma's. Primaire glioblastoma's worden ook wel de novo glioblastoma's genoemd. GBMs kunnen voorkomen op alle leeftijden, maar zijn meer frequent in oudere patiënten en dat betreft vaak primaire GBMs (gemiddelde leeftijd 62) (Ohgaki *et al.*, 2004). Mede door verschillende mutaties en pathways die per tumor en individu verschillen, is het moeilijk om hersentumoren te bestrijden. Omdat GBM de meest kwaadaardige en meest voorkomende hersentumor is, vraagt vooral dit type om nieuwe behandelmethoden. De analyse van prognose factoren in GBM is complex en er is maximale informatie nodig om met specifieke markers het type tumor te bepalen. Aan de hand daarvan kan dan een individueel behandelplan worden opgesteld. Dat vrouwen minder vaak gediagnosticeerd worden met glioma's en vaker met meningioma's dan mannen, lijkt te komen door een beschermend effect van vrouwelijke geslachtshormonen zoals progesteron en oestrogeen in de pathogenese van glioma's. Dit effect wordt echter nog niet in alle studies aangetoond en er is ook nog geen mechanisme bekend. Hier zou meer onderzoek naar gedaan kunnen worden zodat vrouwelijke geslachtshormonen eventueel voor een therapeutisch doeleinde gebruikt kunnen worden zodra het beschermend effect bewezen is.

De toegenomen glutamaat rondom glioblastoma's is het gevolg van verhoogde glutamaat release van gliomacellen via systeem Xc gecombineerd met de afwezigheid van glutamaat heropname door EAAT transporters. Het remmen van de systeem Xc transport heeft aangetoond dat het niet alleen de glutamaat excretie remt, maar dat daardoor ook de intracellulaire GSH productie afneemt. Het verlagen van de glutamaat excretie is gunstig voor het remmen van migratie en invasie van tumorcellen en verlaging van de GSH productie maakt de tumorcellen gevoeliger voor ROS. De resultaten uit klinische trials zijn tot nu toe erg positief. Een groot voordeel van het aangrijpen op de Xc transporter is dat het erg selectief is, aangezien de Xc transport voornamelijk een grote rol speelt op tumorcellen en remming van de Xc transport op andere hersencellen nauwelijks, of in ieder geval geen, negatieve effecten heeft. De resultaten van een van de eerste klinische trials met het gebruik van SAS bij patiënten met kwaadaardige glioma's waren vrij negatief (Robe *et al.*, 2009), aangezien er geen objectieve klinische respons op SAS werd gevonden. Tevens overleden twee patiënten vrij kort nadat begonnen was met de SAS behandeling. Dit wekt ongerustheid over de veiligheid van het gebruik van SAS bij glioblastoma's. Mede door dit voorval, de aanwezigheid van diverse bijwerkingen en de afwezigheid van therapeutische voordelen, werd deze klinische trial voortijdig gestopt. Ondanks dat dit maar een studie met 10 patiënten betrof, moet er eerst nog veel onderzoek gedaan worden naar de veiligheid van SAS bij het gebruik van hersentumoren voordat nieuwe klinische trials van start gaan. Tevens zijn er nog geen farmacologische data bekend die bewijzen dat SAS de BBB doordringt. In vitro en in vivo studies hebben aangetoond dat de remming

van de Xc transporter afhankelijk is van de duur en dosering van SAS. Toekomstig onderzoek zou zich kunnen richten op het bepalen van maximale dosering SAS en duur van de behandeling en of SAS in combinatie met huidige therapieën zoals bijvoorbeeld chemotherapie gebruikt kan worden en of dat een synergetisch effect oplevert. Tevens kan gezocht worden naar een manier om de biologische beschikbaarheid van SAS te verhogen, zodat voorkomen wordt dat de patiënt continue hoge doseringen moet innemen en dat het met zekerheid de BBB passeert (bijvoorbeeld met hersenimplantaten). Aangezien glutamaat zo'n belangrijke rol blijkt te spelen in de pathogenese van glioblastoma's, moet verder onderzoek zich blijven richten op stoffen die aangrijpen op deze glutamaat pathway, waaronder Talampanel en het beta-lactam antibioticum ceftriaxone. Voor Talampanel moet wel gezocht worden naar een combinatietherapie, aangezien Talampanel alleen geen significante activiteit liet zien (Iwamoto *et al.*, 2010).

Tumor gerelateerde angiogenese is een goed onderzoeksgebied voor het ontwikkelen van antikankerbehandelingen. Anti-angiogene stoffen kunnen een belangrijke rol spelen in de behandeling van hersentumoren aangezien ze de BBB goed kunnen passeren. GBM is een van de meest angiogene tumoren in mensen en zou daarom een ideale target zijn voor anti-angiogene behandelingen. De meeste angiogenese remmers zijn als monotherapie niet zo effectief als combinatietherapie met bijvoorbeeld temozolomide of radiotherapie (Norden *et al.*, 2008). Deze combinatietherapieën hebben veel potentie om therapeutisch erg doeltreffend te zijn aangezien met deze therapieën op verschillende oncogene mechanismen wordt aangegrepen. Zoals gebleken reageert maar een beperkt aantal patiënten op therapie met bevacizumab, een anti-VEGF antilichaam. Dit omdat er ook tumorcellen zijn die angiogenese onafhankelijk zijn en dus resistent zijn tegen anti-angiogene therapie. Bij de patiënten die op bevacizumab reageren blijkt het positieve resultaten te geven, maar er blijven nog steeds een aantal belangrijke vragen omtrent het gebruik van bevacizumab onbeantwoord. Zo moet er onderzoek gedaan worden naar dosering, de juiste therapeutische partner (chemotherapeutisch middel, bepaalde radiotherapie of andere moleculaire verbindingen), een toedieningschema, duur van de behandeling en moet er gezocht worden naar mogelijke behandelingen die de angiogenese onafhankelijke cellen kan aanpakken. Daarvoor moet eerst het complete mechanisme en karakter van resistente tumorcellen achterhaald worden. Tevens moet onderzoek bepalen of anti-angiogene medicijnen het best gebruikt kunnen worden voor net gediagnosticeerde of terugkomende tumoren. Ondanks de ernstige complicaties die kunnen optreden bij het gebruik van bevacizumab en andere anti-angiogene middelen (trombo-embolische aandoeningen, bloedingen), worden de meeste anti-angiogenese middelen goed getolereerd en is er een steeds toenemend bewijs dat bevacizumab als effectieve therapie voor kwaadaardige glioma's gebruikt kan worden (Norden *et al.*, 2008). Huidige klinische trials zijn gaande om het gebruik van bevacizumab en andere anti-angiogene middelen te optimaliseren.

6. Conclusie



Figuur 17. Versimpelde weergave van belangrijke pathways betrokken bij Glioblastoma. Onder andere de groeifactor receptor/PI3K/AKT pathway, de RB pathway en de P53 pathway. (Bleeker *et al.*, 2012)

Er is nog steeds ontzettend veel werk te doen om hersentumoren te kunnen karakteriseren aan de hand van moleculaire en genetische veranderingen en op die manier zicht te krijgen in de etiologie, progressie en prognose van de tumor. Figuur 17 toont een versimpelde weergave van enkele pathways die betrokken zijn bij glioblastoma's. Dit geeft aan dat er ontzettend veel factoren zijn die kunnen worden aangegrepen bij eventuele toekomstige behandelmethoden. Zodra alle mechanismen en genetische eigenschappen bekend zijn, kan verder gezocht worden naar doelgerichte behandelmethoden. Tevens kan dan worden bepaald of het individu resistent is voor deze behandelmethoden. In de toekomst wordt gestreefd naar een geïndividualiseerde tumorbehandeling. Er zijn al veelbelovende resultaten bekend over verschillende typen glioblastoma's met specifieke genetische en moleculaire patronen. De glutamaat pathway en angiogenese pathway in glioblastoma's lijken een goede target te zijn voor nieuwe therapieën aangezien deze eigenschappen belangrijk zijn in welk type glioblastoma dan ook. Bij het gebruik van SAS in toekomstige klinische trials moet echter voorzichtigheid worden geboden vanwege de negatieve resultaten van de klinische trial uit 2009. Daarom is het ook van belang dat huidig onderzoek zich blijft richten op andere farmacologische remmers van de glutamaat pathway.

7. Referenties

- Andras, I. E., Deli, M. A., Veszelka, S., Hayashi, K., Hennig, B. & Toborek, M. (2007). The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 27, 1431-1443.
- Bethke, L., Murray, A., Webb, E., Schoemaker, M., Muir, K., McKinney, P., Hepworth, S., Dimitropoulou, P., Lophatananon, A. & other authors (2008). Comprehensive analysis of DNA repair gene variants and risk of meningioma. *J.Natl.Cancer Inst.* 100, 270-276.
- Bleeker, F. E., Molenaar, R. J. & Leenstra, S. (2012). Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J.Neurooncol.* 108, 11-27.
- Bogler, O., Huang, H. J., Kleihues, P. & Cavenee, W. K. (1995). The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15, 308-327.
- Bondy, M., Wiencke, J., Wrensch, M. & Kyritsis, A. P. (1994). Genetics of primary brain tumors: a review. *J.Neurooncol.* 18, 69-81.
- Buckingham, S. C., Campbell, S. L., Haas, B. R., Montana, V., Robel, S., Ogunrinu, T. & Sontheimer, H. (2011). Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat.Med.* 17, 1269-1274.
- Buie, L. W. & Valgus, J. (2008). Bevacizumab: a treatment option for recurrent glioblastoma multiforme. *Ann.Pharmacother.* 42, 1486-1490.
- Burnet, N. G., Jefferies, S. J., Benson, R. J., Hunt, D. P. & Treasure, F. P. (2005). Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden--and should be considered when allocating research funds. *Br.J.Cancer* 92, 241-245.
- Butowski, N. A., Sneed, P. K. & Chang, S. M. (2006). Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. *J.Clin.Oncol.* 24, 1273-1280.
- Castro, M. G., Cowen, R., Williamson, I. K., David, A., Jimenez-Dalmaroni, M. J., Yuan, X., Bigliari, A., Williams, J. C., Hu, J. & Lowenstein, P. R. (2003). Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol.Ther.* 98, 71-108.
- Chamaon, K., Stojek, J., Kanakis, D., Braeuninger, S., Kirches, E., Krause, G., Mawrin, C. & Dietzmann, K. (2005). Micromolar concentrations of 2-methoxyestradiol kill glioma cells by an apoptotic mechanism, without destroying their microtubule cytoskeleton. *J.Neurooncol.* 72, 11-16.
- Chamberlain, M. C. (2010). Emerging clinical principles on the use of bevacizumab for the treatment of malignant gliomas. *Cancer* 116, 3988-3999.
- Chamberlain, M. C. (2011). Treatment of glioblastoma with bevacizumab: has a new standard therapy been defined? *CNS Drugs* 25, 815-818.
- Chamberlain, M. C. & Johnston, S. K. (2010). Salvage therapy with single agent bevacizumab for recurrent glioblastoma. *J.Neurooncol.* 96, 259-269.

- Chandana, S. R., Movva, S., Arora, M. & Singh, T. (2008). Primary brain tumors in adults. *Am.Fam.Physician* 77, 1423-1430.
- Chang, S. M., Parney, I. F., Huang, W., Anderson, F. A., Jr, Asher, A. L., Bernstein, M., Lillehei, K. O., Brem, H., Berger, M. S. & other authors (2005). Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA* 293, 557-564.
- Chi, A. S., Sorensen, A. G., Jain, R. K. & Batchelor, T. T. (2009). Angiogenesis as a therapeutic target in malignant gliomas. *Oncologist* 14, 621-636.
- Chung, W. J., Lyons, S. A., Nelson, G. M., Hamza, H., Gladson, C. L., Gillespie, G. Y. & Sontheimer, H. (2005). Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J.Neurosci.* 25, 7101-7110.
- Cowppli-Bony, A., Bouvier, G., Rue, M., Loiseau, H., Vital, A., Lebailly, P., Fabbro-Peray, P. & Baldi, I. (2011). Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control* 22, 697-714.
- de Groot, J. & Sontheimer, H. (2011). Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59, 1181-1189.
- Estrela, J. M., Ortega, A. & Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.* 43, 143-181.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann.Oncol.* 18, 581-592.
- Fischer, I., Gagner, J. P., Law, M., Newcomb, E. W. & Zagzag, D. (2005). Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol.* 15, 297-310.
- Fojo, T. & Bates, S. (2003). Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 22, 7512-7523.
- Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., Yung, W. K., Paleologos, N., Nicholas, M. K. & other authors (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J.Clin.Oncol.* 27, 4733-4740.
- Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B. & Jain, R. K. (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.* 61, 6020-6024.
- Grant, R., Walker, M., Hadley, D., Barton, T. & Osborn, C. (2002). Imaging response to chemotherapy with RMP-7 and carboplatin in malignant glioma: size matters but speed does not. *J.Neurooncol.* 57, 241-245.
- Grossman, S. A., Ye, X., Chamberlain, M., Mikkelsen, T., Batchelor, T., Desideri, S., Piantadosi, S., Fisher, J. & Fine, H. A. (2009). Talampanel with standard radiation and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma: a multicenter phase II trial. *J.Clin.Oncol.* 27, 4155-4161.
- Iwamoto, F. M., Kreisl, T. N., Kim, L., Duic, J. P., Butman, J. A., Albert, P. S. & Fine, H. A. (2010). Phase 2 trial of talampanel, a glutamate receptor inhibitor, for adults with recurrent malignant gliomas. *Cancer* 116, 1776-1782.

- Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G. & Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat.Rev.Neurosci.* 8, 610-622.
- Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. (2010). Bevacizumab. *Oncologist* 15, 819-825.
- Keunen, O., Johansson, M., Oudin, A., Sanzey, M., Rahim, S. A., Fack, F., Thorsen, F., Taxt, T., Bartos, M. & other authors (2011). Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 108, 3749-3754.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C. & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 61, 215-25; discussion 226-9.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J. P., Heese, O. & other authors (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 2596-2606.
- Kung, A. L., Wang, S., Klco, J. M., Kaelin, W. G. & Livingston, D. M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat.Med.* 6, 1335-1340.
- Laws, E. R., Parney, I. F., Huang, W., Anderson, F., Morris, A. M., Asher, A., Lillehei, K. O., Bernstein, M., Brem, H. & other authors (2003). Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J.Neurosurg.* 99, 467-473.
- Lipton, S. A. (2004). Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1, 101-110.
- Lopez-Gonzalez, M. A. & Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg.Neurol.* 53, 157-162.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W. & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97-109.
- Lovely, M. P. (2004). Symptom management of brain tumor patients. *Semin.Oncol.Nurs.* 20, 273-283.
- Lucio-Eterovic, A. K., Piao, Y. & de Groot, J. F. (2009). Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin.Cancer Res.* 15, 4589-4599.
- Lyons, S. A., Chung, W. J., Weaver, A. K., Ogunrinu, T. & Sontheimer, H. (2007). Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res.* 67, 9463-9471.
- Macdonald, D. R., Kiebert, G., Prados, M., Yung, A. & Olson, J. (2005). Benefit of temozolomide compared to procarbazine in treatment of glioblastoma multiforme at first relapse: effect on neurological functioning, performance status, and health related quality of life. *Cancer Invest.* 23, 138-144.

- McKinley, B. P., Michalek, A. M., Fenstermaker, R. A. & Plunkett, R. J. (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J.Neurosurg.* 93, 932-939.
- Miletic, H., Niclou, S. P., Johansson, M. & Bjerkvig, R. (2009). Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin.Ther.Targets* 13, 455-468.
- Montano, N., Cenci, T., Martini, M., D'Alessandris, Q. G., Pelacchi, F., Ricci-Vitiani, L., Maira, G., De Maria, R., Larocca, L. M. & Pallini, R. (2011). Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia* 13, 1113-1121.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H. J., Furnari, F. B. & Cavenee, W. K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res.* 62, 6764-6769.
- Nghiempfu, P. L., Liu, W., Lee, Y., Than, T., Graham, C., Lai, A., Green, R. M., Pope, W. B., Liau, L. M. & other authors (2009). Bevacizumab and chemotherapy for recurrent glioblastoma: a single-institution experience. *Neurology* 72, 1217-1222.
- Noch, E. & Khalili, K. (2009). Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. *Cancer.Biol.Ther.* 8, 1791-1797.
- Norden, A. D., Drappatz, J. & Wen, P. Y. (2008). Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol.* 7, 1152-1160.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M. & other authors (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64, 6892-6899.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am.J.Pathol.* 170, 1445-1453.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer.Sci.* 100, 2235-2241.
- Okamoto, Y., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Yasargil, M. G. & other authors (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 108, 49-56.
- Ostrom, Q. T. & Barnholtz-Sloan, J. S. (2011). Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* 11, 329-335.
- Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D. & Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer.Cell.* 15, 220-231.
- Piao, Y., Lu, L. & de Groot, J. (2009). AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro Oncol.* 11, 260-273.

- Rahmathulla, G., Toms, S. A. & Weil, R. J. (2012). The molecular biology of brain metastasis. *J.Oncol.* 2012, 723541.
- Raizer, J. J., Grimm, S., Chamberlain, M. C., Nicholas, M. K., Chandler, J. P., Muro, K., Dubner, S., Rademaker, A. W., Renfrow, J. & Bredel, M. (2010). A phase 2 trial of single-agent bevacizumab given in an every-3-week schedule for patients with recurrent high-grade gliomas. *Cancer* 116, 5297-5305.
- Raza, S. M., Lang, F. F., Aggarwal, B. B., Fuller, G. N., Wildrick, D. M. & Sawaya, R. (2002). Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* 51, 2-12; discussion 12-3.
- Robe, P. A., Martin, D. H., Nguyen-Khac, M. T., Artesi, M., Deprez, M., Albert, A., Vanbelle, S., Califice, S., Bredel, M. & Bours, V. (2009). Early termination of ISRCTN45828668, a phase 1/2 prospective, randomized study of sulfasalazine for the treatment of progressing malignant gliomas in adults. *BMC Cancer* 9, 372.
- Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. & Brat, D. J. (2006). 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 65, 529-539.
- Roslin, M., Henriksson, R., Bergstrom, P., Ungerstedt, U. & Bergenheim, A. T. (2003). Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. *J.Neurooncol.* 61, 151-160.
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S. & other authors (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73-77.
- Sakariassen, P. O., Prestegarden, L., Wang, J., Skaftnesmo, K. O., Mahesparan, R., Molthoff, C., Sminia, P., Sundlisaeter, E., Misra, A. & other authors (2006). Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103, 16466-16471.
- Sant, M., van der Sanden, G. & Capocaccia, R. (1998). Survival rates for primary malignant brain tumours in Europe. EURO CARE Working Group. *Eur.J.Cancer* 34, 2241-2247.
- Schlehofer, B., Blettner, M. & Wahrendorf, J. (1992). Association between brain tumors and menopausal status. *J.Natl.Cancer Inst.* 84, 1346-1349.
- Scott, J. N., Rewcastle, N. B., Brasher, P. M., Fulton, D., MacKinnon, J. A., Hamilton, M., Cairncross, J. G. & Forsyth, P. (1999). Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann.Neurol.* 46, 183-188.
- Shiraishi, T. & Tabuchi, K. (2003). Genetic alterations of human brain tumors as molecular prognostic factors. *Neuropathology* 23, 95-108.
- Shy, H., Malaiyandi, L. & Timiras, P. S. (2000). Protective action of 17beta-estradiol and tamoxifen on glutamate toxicity in glial cells. *Int.J.Dev.Neurosci.* 18, 289-297.

- Simmons, M. L., Lamborn, K. R., Takahashi, M., Chen, P., Israel, M. A., Berger, M. S., Godfrey, T., Nigro, J., Prados, M. & other authors (2001). Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 61, 1122-1128.
- Sontheimer, H. (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J.Neurochem.* 105, 287-295.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C. & other authors (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N.Engl.J.Med.* 352, 987-996.
- Surawicz, T. S., McCarthy, B. J., Kupelian, V., Jukich, P. J., Bruner, J. M. & Davis, F. G. (1999). Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol.* 1, 14-25.
- Takano, S., Yoshii, Y., Kondo, S., Suzuki, H., Maruno, T., Shirai, S. & Nose, T. (1996). Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res.* 56, 2185-2190.
- Takano, T., Lin, J. H., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J. & Nedergaard, M. (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat.Med.* 7, 1010-1015.
- Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S. & other authors (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J.Clin.Oncol.* 25, 4722-4729.
- Wigertz, A., Lonn, S., Hall, P., Auvinen, A., Christensen, H. C., Johansen, C., Klaeboe, L., Salminen, T., Schoemaker, M. J. & other authors (2008). Reproductive factors and risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17, 2663-2670.
- Wigertz, A., Lonn, S., Mathiesen, T., Ahlbom, A., Hall, P., Feychting, M. & Swedish Interphone Study Group (2006). Risk of brain tumors associated with exposure to exogenous female sex hormones. *Am.J.Epidemiol.* 164, 629-636.
- Wong, M. L., Prawira, A., Kaye, A. H. & Hovens, C. M. (2009). Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J.Clin.Neurosci.* 16, 1119-1130.
- Wrensch, M., Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Bondy, M., Berger, M. & Aldape, K. D. (2005). The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurg.Focus.* 19, E5.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 4, 278-299.
- Ye, Z. C. & Sontheimer, H. (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.* 59, 4383-4391.