

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ NAPOCA

SCOALA DOCTORALĂ

TEZA DE DOCTORAT

**SENSIBILIZATORI AI TRATAMENTULUI MULTIMODAL AL
GLIOAMELOR MALIGNNE**

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROF. UNIV. DR. IOAN ȘTEFAN FLORIAN

DOCTORAND

COCIȘ ADRIANA (CĂS. BARIȚCHII)

CLUJ NAPOCA

2017

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. **Glioame maligne cerebrale**

- 1.1 Epidemiologia gliomelor maligne cerebrale
- 1.2 Clasificarea gliomelor maligne cerebrale
- 1.3 Glioblastomul multiform
- 1.4 Astrocitomul anaplazic
- 1.5 Oligodendrogliomul anaplazic
- 1.6 Ependimomul anaplazic
- 1.7 Alte glioame maligne cerebrale

2. **Tratamentul multimodal în glioamele maligne cerebrale**

- 2.1. Tratamentul chirurgical
- 2.2. Tratamentul adjuvant
- 2.3. Tratamentul multimodal standard în glioamele maligne cerebrale

3. **Celulele stem tumorale**

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. **Studiul 1 - Rolul chirurgiei radicale ca sensibilizator al tratamentului multimodal în glioamele maligne**

- 1.1 Introducere
- 1.2. Ipoteza de lucru
- 1.3 Pacienți și metodă
- 1.4 Rezultate
- 1.5. Discuții
- 1.6. Concluzii

2. **Studiul 2 – Evaluarea in vitro a efectului terapeutic combinat al temozolomidei, tamoxifenului, raloxifenului, pirimetaminei și al alphanizomenon flos-aquae pe linii celulare de glioblastom**

2.1 Introducere

2.2. Ipoteza de lucru

2.3 Material și metodă

2.4 Rezultate

2.5. Discuții

2.6 Concluzii

3. Studiul 3 - Evaluarea efectului radiosensibilizator al tamoxifenului, raloxifenului, pirimetaminei și al alphanizomenon flos-aquae pe linii celulare de glioblastom

3.1. Introducere

3.2. Ipoteza de lucru

3.3. Material și metodă

3.4. Rezultate

3.5. Discuții

3.6. Concluzii

4. Concluzii generale

REFERINȚE

Glioamele maligne sunt cancere agresive ale creierului. După multe decade de cercetări intense, glioamele de grad înalt continuă să reprezinte o cauză majoră de morbiditate și mortalitate prin cancer. Sunt cele mai frecvente tumori primare ale creierului și reprezintă 2% din totalul cancerelor.

În ultimii ani, în ciuda diversificării tratamentului multimodal (chirurgie, radioterapie, chimioterapie), morbiditatea și mortalitatea prin tumorile gliale maligne a rămas ridicată. Din acest motiv există un interes deosebit pentru descoperirea unor noi metode de tratament având ca scop final realizarea unor combinații terapeutice capabile să producă vindecarea clinică a glioamelor maligne. Cele mai noi terapii includ imunoterapia, terapia genică, sensibilizatori pentru radioterapie și chimioterapie și nanotehnologia.

Obiectivul cercetării științifice este de evaluare a rezultatelor tratamentului multimodal în glioamele maligne cerebrale, stabilirea unor standarde de calitate și compararea diferitelor strategii chirurgicale sub raportul eficacității și impactului acestora asupra calității vieții pacienților tratați, cuantificarea conexiunii între rezecția chirurgicală totală/subtotală a glioamelor maligne cerebrale precum și de identificare de noi medicamente care pot potența acțiunea terapiilor standard utilizate în prezent (radiochimioterapia) prin testarea acestora in vitro, pe culturi celulare de glioblastom multiform.

Capitolul 1. reprezintă o succintă trecere în revistă a datelor generale, epidemiologice, clinice, imagistice și anatomopatologice, prognosticul și evoluția celor mai frecvente glioame maligne în practica curentă. **Clasificarea glioamelor maligne cerebrale** a constituit multă vreme subiect de controversă datorită heterogenității acestor tumori. În prezent există mai multe sisteme de gradare a glioamelor dar numai două dintre ele au o largă utilizare actuală: St. Anne-Mayo și WHO (World Health Organisation). Organizația Mondială a Sănătății (WHO) clasifică astrocitoamele pe baza caracteristicilor histologice în patru grade prognostice: gradul I (astrocitomul pilocitic), gradul II (astrocitomul difuz), gradul III (astrocitomul anaplastic) și gradul IV (glioblastomul). Gradele III și IV sunt considerate glioame maligne. Astrocitomul anaplastic se caracterizează prin creșterea celularității, atipii nucleare și activitate mitotică. Glioblastomele conțin de asemenea arii de proliferare microvasculară, necroză sau ambele.

Capitolul 2 constituie o trecere în revistă a metodelor terapeutice actuale. **Tratamentul chirurgical** beneficiază în prezent de avantaje tehnologice importante care au contribuit la scăderea complicațiilor operatorii: rezonanța magnetică cu secvențe de difuzie preoperatorie pentru a evidenția modificarea tracturilor cortico-spinale de către tumoră, microneurochirurgia, stimulare electrică directă corticală și subcorticală ce ghidează limitele rezecției tumorale, ultrasonografia intraoperatorie, RMN intraoperator, aspirație ultrasonică, neuronavigație și stereotaxie. În general, tehnica abordării unei tumori cerebrale depinde de localizarea tumorii în raport cu zonele funcționale cerebrale importante. Intervenția chirurgicală agresivă are rezultate mai bune comparativ cu biopsia sau rezecția chirurgicală parțială. Decizia de tratament pentru pacienții cu recidive tumorale trebuie să fie individualizată deoarece terapiile nu sunt curative și nu există studii randomizate care să compare intervenția activă față de cea paleativă. Beneficiul reintervenției chirurgicale trebuie să fie contrabalansat cu riscul neurotoxicității iatrogene și impactul acestuia asupra calității vieții.

Tratamentele adjuvante includ: radioterapia externă, chimioterapia, brahiterapia, terapia genică, imunoterapia etc. **Radioterapia** este utilă, teoretic, postoperator, fără să existe un consens al momentului în care aceasta trebuie efectuată, precoce sau tardiv. Radioterapia convențională actuală tinde să fie înlocuită cu o metodă focală hiperfracționată ce are ca scop diminuarea la maxim a efectelor secundare asupra structurilor nervoase. Prin fracționarea dozelor în ședințe multiple sau chiar prin hiperfracționare sau fracționare accelerată (doze standard de 1,6-2 Gy, de mai multe ori pe zi) se pot limita efectele toxice asupra SNC în același timp cu împiedicarea reparării celulei tumorale și repopularea lor. În glioamele maligne eficacitatea radioterapiei externe apare la doze de 60 Gy fracționate în 30 de ședințe. **Chimioterapia** citostatică este indicată după efectuarea tratamentului chirurgical și concomitent sau după radioterapie,

pentru prevenirea recidivelor. Chimioterapia orală sau intravenoasă se efectuează în mai multe cure terapeutice combinată cu corticoterapia. Răspunsul la chimioterapie este limitat de bariera hemato-encefalică. Medicația liposolubilă și cu moleculă mică poate traversa BHE, concentrându-se în SNC dar nu poate pătrunde în aria necrotică centrală. În general se folosesc diverși agenți chimioterapici: derivații de nitrozuree -ce sunt liposolubili și trec bariera hemato-encefalică (BCNU, CCNU), procarbazona, vincristina, hidroxyureea, carboplatin, etoposide, temozolomidă, ciclofosfamida. Chimioterapia constituie o parte importantă a tratamentului multimodal în gliomele maligne putând fi aplicată chiar și sub vârsta de 3 ani.

Terapia genică se referă la tratamente experimentale care folosesc material genetic (ADN sau ARN) în scopul eliminării celulelor tumorale –așa numitele gene suicidare- care nu afectează celulele normale. Aceste gene pot fi introduse în organism folosind un vector, care cel mai adesea este un virus. Vectorii cei mai utilizați în tratamentul gliomelor sunt: retrovirusuri (Moloney murine leukemia virus), adenovirusuri, virusuri asociate adenovirusurilor, herpes simplex virus, herpes simplex virus ampliconi, liposomi, complexe polisine-DNA. **Imunoterapia** este o nouă abordare inovativă a gliomelor maligne ce are ca scop stimularea sistemului imunitar al organismului împotriva tumorii prin utilizarea celulelor dendritice autologe și a celulelor tumorale lizate ca vaccin terapeutic.

Tratamentul multimodal standard în gliomele maligne cerebrale, este o sinteză a terapiei multimodale pentru fiecare tip de gliom prezentat. **Tratamentul astocitomului anaplastic** constă în ablația tumorală totală, care crește supraviețuirea medie a pacienților comparativ cu rezecția subtotală, iar temozolomida a crescut rata de supraviețuire la 6 luni. **Tratamentul glioblastomului multiform** cuprinde o gamă largă de metode, standardul actual pledând pentru ablarea tumorală, radioterapia și chimioterapia. O rezecție largă a glioblastomului asigură o îmbunătățire a calității, duratei supraviețuirii și o îmbunătățire din punct de vedere neurologic. **Tratamentul multimodal al oligodendrogliomului anaplastic** cuprinde chirurgie, radioterapie și chimioterapie. Terapia anticonvulsivantă este recomandată imediat ce pacientul este diagnosticat cu această patologie. Rezecția chirurgicală este primul și cel mai important tratament al oligodendrogliomelor maligne. Rolul chimioterapiei pentru tratamentul oligodendrogliomelor a fost stabilit de câteva studii. Majoritatea au utilizat procarbazona, lomustina și vincristina ca regim chimioterapic combinat. Utilizarea Temozolamidei ca prima linie a fost demonstrată pe o serie de studii EORTC. **Tratamentul ependimomului anaplastic** include rezecția chirurgicală cât mai completă, fără a determina apariția unor noi deficite neurologice, radioterapia și chimioterapia. Utilitatea agenților chimioterapici este insuficient documentată în tratamentul ependimomului anaplastic.

Capitolul 3 oferă datele legate de rolul celulelor stem atât în apariția tumorilor cerebrale, cât și în studiul înțelegerii mecanismelor polirezistenței acestor tumori la terapia multimodală de până în prezent. Celulele stem canceroase se numesc astfel pentru că prezintă următoare proprietăți, foarte similare cu celulele stem normale: capacitatea de auto-înnoire, posibilitatea de diferențiere, expresie mare a telomerazei, sustragere de la apoptoză, creșterea transportului de substanțe prin membrană, abilitatea de migrare și, în cazul celulei stem tumorale, de generare a metastazelor. În ciuda faptului că CD133 este cel mai larg utilizat marker pentru identificarea celulelor stem canceroase din tumorile cerebrale, el nu poate fi privit ca un marker absolut deoarece multe celule normale exprimă această glicoproteină.

Cercetările efectuate în ultimii ani au evidențiat faptul că celulele stem tumorale reprezintă acea populație celulară în cadrul unei tumori, responsabilă de rezistența tumorii la tratamentul uzual radio și chimioterapic, atât datorită capacitații lor de a intra într-o perioadă de “hibernare” cu stoparea diviziunilor celulare, cât și datorită capacitații de sinteză a unor proteine tip MDR (multi drug resistance) cum ar fi proteina Breast Cancer Resistance Protein-1 (BCRP1). Unele studii au analizat markerul celular CD133 al celulelor de glioblastom care au fost expuse la iradiere. Celulele CD133 pozitive au avut caracteristici atribuite celulelor stem canceroase și au supraviețuit la doze mai crescute comparativ cu majoritatea

celulelor care au fost CD133 negative, și au fost capabile să repopuleze tumora. În celulele CD133 pozitive leziunile ADN-ului au fost mai eficient reparate și la aceste celule apoptoza a fost mai redusă.

Partea a doua a lucrării, cea de **Contribuții Personale** cuprinde descrierea cercetărilor proprii alături de rezultatele și concluziile obținute în urma efectuării acestora.

Studiul 1. Rolul chirurgiei radicale ca sensibilizator al tratamentului multimodal în gliomele maligne. Ipoteza de lucru definește premisele de la care a pornit cercetarea și anume rolului chirurgiei în cadrul abordării multimodale a gliomelor maligne cerebrale. După 2005, odată cu apariția studiului multicentric publicat de Stupp și colaboratorii precum și studii EORTC recente au arătat că în ceea ce privește supraviețuirea, chirurgia nu pare să aibă nici un rol prognostic. În ultimii ani studii multicentrice readuc în discuție rolul chirurgiei citoreductive în prelungirea mediei de supraviețuire.

Material și metodă. Un studiu retrospectiv a fost realizat pe gliomele cerebrale operate în Secția de Neurochirurgie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj Napoca într-o perioadă de 16 ani: 01.01.2000-31.12.2015. Din totalul gliomelor cerebrale operate gliomele maligne au reprezentat 59,24% (695 de cazuri). Pacienții incluși în studiu au avut vârste cuprinse între 6 și 82 ani. Toate tumorile au beneficiat de tratament chirurgical sub forma rezecției chirurgicale totale sau subtotale. Gradul de rezecție a fost raportat de către chirurg ca fiind total sau subtotal și confirmat de examinările CT sau RMN postoperatorii realizate în primele 48 de ore. Supravegherea pe termen lung și evaluarea supraviețuirii a fost posibilă pentru 312 pacienți. Au fost folosite metode analitice și descriptive pentru descrierea grupurilor.

Rezultate. În intervalul urmărit au fost operate 1173 de gliome cerebrale. 59,24% din cazuri au fost reprezentate de gliomele de grad înalt. Gliomele de grad mic au fost diagnosticate în 478 de cazuri. Cel mai frecvent simptom al pacienților cu gliome de grad înalt a fost hipertensiunea intracraniană (78%). Pe locul 2 s-au situat deficitele motorii (întâlnite în 43% din cazuri) și într-o măsură mai mică crizele comițiale și afazia.

Ratele de supraviețuire globală pentru cei 312 de pacienți incluși în studiu a fost de 46.5% la 12 luni, 23,7% la 18 luni respectiv 13,8% la 24 luni. Supraviețuirea la 12, 18 și 24 de luni a fost influențată de vârstă și tipul de rezecție. Pe de altă parte diagnosticul histopatologic a influențat semnificativ supraviețuirea la 24 de luni.

În cazul urmăririi la 12 luni media supraviețuirii a fost de 9,2 luni la pacienții cu rezecție tumorală totală, intervalul de confidență fiind cuprins între 8,7 și 9,7. Media supraviețuirii a fost de 6,4 luni la pacienții la care ablația tumorală a fost subtotală, cu un interval de încredere 95% de la 5,2 la 7,7. Media supraviețuirii la pacienții din primul lot a fost semnificativ mai mare decât aceea a pacienților din al 2-lea lot. În cazul urmăririi la 18 luni, media supraviețuirii pacienților la care s-a realizat ablația tumorală totală a fost de 11,5 luni (interval de încredere de 95% fiind de la 11,1 la 13,8). Aceasta a fost semnificativ mai mare decât media supraviețuirii la pacienții din al 2-lea lot. Când urmărirea supraviețuirii s-a făcut la 24 luni s-a evidențiat de asemenea o diferență statistic semnificativă între cele 2 loturi ($p < 0,005$). Media supraviețuirii a fost de 12,6 luni la primul lot, în timp ce la cel de-al 2-lea lot a fost de 7,5 luni.

Din totalul de 312 pacienți incluși în acest studiu, glioblastomul multiform a fost diagnosticat în 207 cazuri. Ratele de supraviețuire globală la acești pacienți au fost de 43% la 12 luni, cu o medie de 8,62 luni, 24,2% la 18 luni (media fiind 10,48 luni) respectiv de 12,6 % la 24 luni (media fiind de 11,57 luni). Rezecția chirurgicală a fost totală în 184 de cazuri iar restul de 23 de pacienți au beneficiat de rezecții parțiale. Media de supraviețuire a fost mult superioară în cazul pacienților cu ablație macroscopic totală comparativ cu media înregistrată la cei cu rezecție parțială atunci când urmărirea s-a făcut la **12 luni** (8,9 luni față de 5,8). Când urmărirea s-a efectuat **la 18 luni** s-au găsit următoarele rezultate: media supraviețuirii în cazul pacienților cu rezecție tumorală totală a fost de 11 luni, cu intervalul de încredere 95% între 9 și 12,1; media supraviețuirii a pacienților la care s-a realizat ablație tumorală subtotală a fost de 6,2 luni, intervalul de încredere 95% fiind cuprins între 4,3 și 8,0, în timp ce mediana a fost în acest caz de 6 luni. **La 24 luni**, supraviețuirea medie a pacienților la care s-a realizat rezecția tumorală subtotală a rămas neschimbată comparativ cu urmărirea la

18 luni (6,2 luni). Pe de altă parte media supraviețuirii la pacienții cu ablare tumorală totală a fost de 12,2 luni, intervalul de încredere fiind cuprins între 10,8 și 13,7.

Pentru evidențierea supraviețuirii la vârste mai înaintate, cei 312 pacienți au fost împărțiți în două loturi: <65 ani (249 pacienți), > 65 ani (63 pacienți). Urmărirea supraviețuirii s-a făcut de asemenea la 12, 18 și 24 luni. În toate analizele statistice s-a găsit o asociere semnificativă între vârstă și supraviețuire în sensul că pacienții mai tineri au avut o supraviețuire mai bună comparativ cu cei peste 65 ani.

După efectuarea intervenției chirurgicale o parte din pacienți au beneficiat de tratamente adjuvante chimio și radioterapice în Cluj Napoca la Instiului Oncologic Ioan Chiricută pe când alți pacienți au fost tratați în teritoriu.

Nu s-au găsit diferențe statistic semnificative privind supraviețuirea la 12, 18 respectiv 24 luni între cele două loturi (pacienți care au efectuat terapia adjuvantă la Institutul Oncologic Cluj Napoca și cei care au fost tratați în teritoriu) ($p=0,862$; $p=0,216$; $p=0,323$).

Discuții. Primul pas în tratamentul gliomelor maligne îl reprezintă intervenția chirurgicală. Citoreducția mecanică a masei tumorale poate ajuta pacientul să obțină timpul necesar pentru alte intervenții terapeutice (radioterapie, chimioterapie). Efectul benefic al rezecției tumorale a fost observat atât la nivelul fluxului sangvin cerebral cât și la nivelul metabolismului, chiar la distanță de locul tumorii.

Impactul chirurgiei în gliomale maligne asupra intervalului liber de boală și a supraviețuirii globale a fost o preocupare constantă și un motiv de dezbateri în rândul neurochirurgilor în ultimele decenii. Natura infiltrativă a acestor tumori face imposibilă rezecția curativă. Largirea marginii de rezecție tumorală cuplată cu terapiile adjuvante crează condițiile necesare întârzierii recidivei tumorale și prelungirii supraviețuirii.

Unul dintre cele mai extinse studii care au încercat să găsească o corelație între gradul de rezecție tumorală și supraviețuire aparține lui Lacroix și colaboratorilor. 416 pacienți cu glioblastoame la care s-a efectuat rezecția tumorală pe o perioadă de 6 ani au fost incluși în studiu. Volumul tumoral pre și postoperator a fost evaluat folosind analiza imaginilor asistate de calculator. Cinci factori independenți predictivi ai supraviețuirii au fost identificați de autori, utilizând analizele statistice multivariate: vârstă, scorul Karnofski, gradul de rezecție tumorală, gradul de necroză și de captare a substanței de contrast pe studiile imagistice preoperatorii. La cazurile în care s-a obținut o extensie a rezecției tumorale de 98% sau mai mare s-a asociat un avantaj de supraviețuire semnificativ. Supraviețuirea medie a fost de 13 luni în cazul pacienților cu rezecție totală sau aproape totală (98% sau mai mare) comparativ cu 8,8 luni pentru pacienții cu rezecție mai mică de 98% ($p=0,02$). Autorii au propus o scală a rezultatelor clinice cu valori între 0 și 5 în funcție de vârstă, scorul Karnofski și evidența radiologică de necroză. O îmbunătățire semnificativă a supraviețuirii a fost observată în cazul pacienților cu scoruri reduse (1-3) la care s-a efectuat o rezecție agresivă iar în cazul pacienților cu scoruri mai înalte (4-5) s-a observat un trend spre o ușoară creștere a supraviețuirii. Acest studiu susține conceptul chirurgiei citoreductive agresive ca parte a managementului gliomelor maligne, totuși nu cu costul unor deficite neurologice nou apărute sau al unor complicații chirurgicale.

Managementul pacienților vârstnici cu gliome de grad înalt este în principal concentrat pe utilizarea optimă a radio și chimioterapiei. Vârsta precum și severitatea patologiilor asociate sunt vitale atunci când se ia în considerare gradul de extensie tumorală datorită riscurilor chirurgicale și a potențialelor complicații postoperatorii.

Datele obținute de studiul retrospectiv de 312 cazuri efectuat în cadrul Clinicii de Neurochirurgie Cluj Napoca, susțin, de asemenea faptul că chirurgia citoreductivă are un rol important în prelungirea supraviețuirii pacienților cu gliome maligne. În acest studiu sunt comparate rezecția totală și subtotală. Gradul de rezecție tumorală s-a bazat pe aspectul intraoperator și a fost confirmat de examenul CT sau RMN

postoperator. Au fost considerate rezecție subtotală cazurile cu priza de contrast restantă pe mai mult de două secțiuni adiacente din volumul inițial al tumorii.

Citoreducția tumorală în urma chirurgiei oferă timp pentru alte intervenții terapeutice (radioterapie, chimioterapie, imunoterapie). Reducerea masei tumorale s-a dovedit a avea un efect benefic asupra fluxului sanguin cerebral și a metabolismului, chiar în zone situate la distanța de rezecția tumorală. Nu este de neglijat faptul că rezecția chirurgicală a unei mari mase tumorale poate să constituie un ajutor prețios în cercetare. Colectarea unor probe tumorale considerabile permite o analiză moleculară minuțioasă care poate determina dezvoltarea unor terapii moleculare individuale. De asemenea eficacitatea tratamentului adjuvant este crescută atunci când volumul tumoral este mai mic. Un volum tumoral mare în cazul glioblastomului crește rezistența la chimioterapie așa cum a fost demonstrat în studiile in vivo.

Concluzii. După trei decade de cercetări intensive prognosticul pacienților cu gliome de grad înalt continuă să fie dezamăgitor. Natura infiltrativă a acestor cancere exclude vindecarea chirurgicală dar cu toate acestea chirurgia rămâne o parte importantă a tratamentului multimodal. Diferitele studii publicate în ultimii 25 ani au oferit evidențe că extensia rezecției chirurgicale în gliomele de grad înalt poate influența timpul până la progresia bolii și supraviețuirea medie, deși până în momentul de față nu există nici un trial prospectiv randomizat de clasă I care să răspundă în totalitate la această întrebare. O rezecție maximală este de preferat dar nu cu orice cost.

Tratamentul standard pentru pacienții vârstnici cu gliome maligne rămâne controversat și nedefinit. Deși gliomele de grad înalt pot să apară la orice vârstă, vârstnicii reprezintă jumătate dintre pacienții cu glioblastome. Vârsta înaintată rămâne cel mai puternic factor de prognostic negativ deoarece se asociază cu o biologie tumorală mai puțin favorabilă, un abord terapeutic mai puțin agresiv și anumite comorbidități.

Studiul 2. Evaluarea efectului terapeutic combinat al temozolomidei, tamoxifenului, raloxifenului, pirimetaminei și al alphanizomenon flos-aquae pe linii celulare de glioblastom . Ipoteza de lucru pleacă de la premiza că deși chirurgia și radioterapia și-au atins eficiența maximă, chimoterapia are potențialul de a îmbunătăți supraviețuirea

Material și metodă. Liniile de celule tumorale utilizate în acest studiu au fost izolate din fragmentele de biopsie de glioblastom multiform recoltate la Secția Clinică de Neurochirurgie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj Napoca. Fragmentele tumorale au fost imersate în mediu de cultura complet. Au fost procesate mecanic cu instrumente sterile pentru obținerea de fragmente cât mai mici. Pentru cultivarea celulelor tumorale s-a folosit următorul mediu: DMEM cu 4.5g glucoza/l +F-12 HAM (1:1), 15% FCS, 1% NEA (aminoacizi non esențiali), 1% antibiotice, 1% NEA, 2mM L-glutamina, 55μM beta-mercaptoetanol, 1mM piruvat de sodiu.

Izolarea celulelor stem s-a făcut prin metoda selecției în cultură a explantelor în picatura de ser. Principala caracteristică a acestor celule stem-like a fost o rată foarte mare de proliferare începând de la pasajul 3, cu un timp de dedublare a populației celulare la 4-6 ore, aspect întâlnit doar la celulele stem embrionare. La pasajul 4 aceste celule au prezentat o schimbare drastică a morfologiei , devenind mult mai mici și cu o formă cuboidală. Celulele stem au prezentat markerii caracteristici la colorarea imunohistochimică: Oct 3/4, Nanog, CD 29, CD 105 dar pozitivitate și pentru markerii ai progenitorilor gliali : CD 133, NF (neurofilamente), GFAP.

Temozolomida, tamoxifenul și raloxifenul au fost dizolvate în DMSO în timp ce pentru dizolvarea pirimetaminei am folosit etanolul în concentrație de 70%. Toate medicamentele au fost păstrate ca soluție stoc și diluțiile au fost făcute utilizând apa bidistilată. Prepararea extractului de algă a fost făcută adăugând 1

g de algă la 10 ml etanol 70% și ulterior incubată la 4°C pe un shaker pentru 24 ore. Suspensia a fost centrifugată la 400 rpm la 4°C timp de 10 minute și supernatantul a fost filtrat. Extractul rezultat a fost păstrat în întuneric la -80°C în timp ce restul medicamentelor au fost ținute la -20°C.

Celulele au fost tratate cu următoarele doze de medicamente: temozolomidă (TMZ) 50 μg/mL, metotrexat (MTX) 1 μg/mL, tamoxifen (TMX) 2,75 μg/mL, raloxifen (RAL) 15 μg/mL, pirimetamină (PYR) 15 μg/mL, AFA 1,75 mg/mL. De asemenea s-au folosit următoarele combinații de medicamente: TMZ/TMX, TMZ/RAL, TMZ/AFA, TMZ/PYR, MTX/TMX, MTX/RAL, MTX/AFA, MTX/PYR. În cazul combinațiilor de medicamente chimioterapice a fost adăugat după 24 de ore de la primul tratament. După 48 de ore s-a cuantificat viabilitatea celulară prin testul MTT.

Rezultate. Celulele stem tumorale au prezentat o reducere a supraviețuirii în cazul tratamentului cu tamoxifen (TMX), raloxifen (RAL), alphanizomenon flos-aquae (AFA), pirimetamina (PYR) dar s-au dovedit rezistente la terapia cu temozolomida. Analiza statistică nu a evidențiat existența unor diferențe semnificative din punct de vedere statistic între supraviețuirea celulelor stem din control comparativ cu cele tratate cu temozolomidă. Celulele tratate cu toate celelalte medicamente sau combinații de medicamente au avut o supraviețuire statistic semnificativ mai redusă comparativ cu controlul.

Linia celulară de glioblastom a fost rezistentă la toate cele 5 medicamente (TMZ, TMX, RAL, AFA, PYR). Combinarea temozolomidei cu TMX, RAL, AFA și PYR au dus la scăderea semnificativă a supraviețuirii acestor celule.

Discuții. Glioblastomul multiform este cea mai agresivă tumoră cerebrală. Caracterul lui infiltrativ face imposibilă îndepărtarea chirurgicală completă și în mod inevitabil va duce la recidiva tumorii. Terapia standard pentru aceste tumori este rezecția chirurgicală maximală urmată de radiochimioterapie. Temozolomida a demonstrat unele avantaje pentru supraviețuirea pacienților deoarece crește radiosensibilitatea celulelor canceroase. Rezistența la chimioradioterapie, creșterea agresivă și infiltrarea țesutului cerebral au dus la rezultate nesatisfăcătoare în tratamentul acestor cancere ale sistemului nervos central.

O serie de studii au demonstrat că proliferarea gliomelor de grad înalt depinde parțial de activarea căilor mediate de protein kinaza C (PKC) și blocarea acestei enzime poate oferi o nouă abordare pentru inhibarea creșterii celulelor canceroase. Acest lucru a determinat creșterea interesului pentru tamoxifen, un antiestrogen ce are și o acțiune de inhibare semnificativă a PKC. Mai multe cercetări au demonstrat că la doze de câteva ori mai mari decât cele folosite ca agent de legare la receptorii estrogenici tamoxifenul poate inhiba in vitro creșterea celulelor gliale maligne. Acest medicament este evaluat în trialuri clinice la pacienții cu gliome maligne.

Utilizând testul de comparare multiplă Bonferroni am găsit rezultate statistic semnificative între celulele stem tumorale de control și cele tratate cu TMX și RAL. Pe de altă parte linia celulară de glioblastom a fost rezistentă nu doar la TMZ dar și la cele două SERMs. Pentru fiecare linie celulară testată a existat o diferență statistic semnificativă de scădere a populației celulare în urma tratamentelor cu combinațiile TMZ-TMX respectiv TMZ-RAL față de eșantioanele de control. Eficacitatea combinațiilor TMZ-TMX și TMZ-RAL asupra celulelor stem tumorale și a liniei celulare de glioblastom este superioară tratamentului unic cu temozolomidă. Chiar dacă rolul tamoxifenului de chimiosensibilizator al celulelor canceroase este bine cunoscut și studiat, nu același lucru se poate spune despre raloxifen. Prezentul studiu a arătat că și acest medicament din clasa SERMs a exercitat împreună cu TMZ un efect sinergic asupra celulelor de glioblastom determinând creșterea apoptozei lor. Acest lucru poate avea o importanță deosebită în condițiile în care raloxifenul este un medicament care prezintă un profil terapeutic mai sigur decât tamoxifenul.

Combinarea temozolomidei cu pirimetamina a fost eficientă atât la nivelul celulelor stem canceroase cât și la nivelul liniei celulare de glioblastom. Acest medicament ar putea constitui o opțiune atractivă pentru îmbunătățirea eficienței temozolomidei la pacienții cu glioblastom multiform datorită biodisponibilității crescute după administrarea orală precum și a faptului că PYR este administrată la pacienții cu malarie pentru perioade lungi de timp cu puține efecte adverse. Mai mult, pentru că este un agent lipofilic, poate trece cu ușurință bariera hemato-encefalică.

Spirulina și alphanizomenon flos-aquae (AFA) sunt cele mai frecvent întâlnite cianobacterii care conțin ficocianină, o moleculă care induce apoptoza în liniile celulare de leucemie mieloidă cronică, K562 precum și în alte tipuri de cancere. Un alt studiu a arătat că extractul de AFA activează monocitele liniei celulare THP-1. Studiul nostru a arătat că extractul etanolic de alphanizomenon flos-aquae a inhibat atât celulele stem canceroase cât și pe cele ale liniei de glioblastom în combinație cu TMZ.

Concluzii. Eșecul terapiei multimodale în gliomurile maligne este atribuit dezvoltării unei subpopulații de celule tumorale care au caractere comune cu celulele stem. Dezvoltarea rezistenței acestor celule este responsabilă de recurența acestor tumori maligne. Viitorul tratamentului gliomurilor maligne va fi ținut împotriva acestor celule. Datele acestui studiu susțin ideea că există unele medicamente care pot sensibiliza celulele gliale maligne la tratamentul chimioterapic utilizat în prezent. Aceste studii trebuie extinse in vivo pentru demonstrarea eficienței.

Studiul 3. Evaluarea efectului radiosensibilizator al tamoxifenului, raloxifenului, pirimetaminei și al alphanizomenon flos-aquae pe linii celulare de glioblastom. Glioblastomul multiform este una dintre cele mai radio-rezistente tumori. În literatura de specialitate diverse substanțe au fost explorate ca potențiali radiosensibilizatori. Dintre acestea temozolomida s-a dovedit a fi un model de radiosensibilizator care poate să determine creșterea supraviețuirii și a intrat în arsenalul terapeutic al pacienților diagnosticați cu gliomuri maligne. În acest studiu s-a evaluat acțiunea in vitro a două medicamente cunoscute pentru efectele radiosensibilizatoare (temozolomida și tamoxifenul) și de asemenea s-a urmărit testarea unor alți agenți terapeutici ușor de administrat, relativ ieftini și cu puține efecte secundare (raloxifenul, pirimetamina și alphanizomenon flos-aquae) cu scopul identificării unor radiosensibilizatori ai celulelor de glioblastom.

Material și metodă. În acest studiu am folosit o linie de celule stem tumorale precum și o linie celulară de glioblastom. Celulele au fost tratate cu următoarele doze de medicamente: temozolomidă (TMZ) 50 μg/mL, metotrexat (MTX) 1 μg/mL, tamoxifen (TMX) 2,75 μg/mL, raloxifen (RAL) 15 μg/mL, pirimetamină (PYR) 15 μg/mL, AFA 1,75 mg/mL. După 48 de ore plăcile au fost supuse iradierii cu 2 Gy în cadrul Departamentului de Radioterapie al Institutului Oncologic "Ion Chiricuță" utilizând o sursă de cobalt de megavoltaj. La 15 minute după iradiere a fost determinată viabilitatea celulară folosind testul MTT.

Rezultate. Celulele stem tumorale tratate cu temozolomidă s-au dovedit rezistente la radioterapie dar postiradiere s-a observat o reducere a viabilității statistic semnificativă la celulele tratate cu celelalte medicamente testate (TMX, RAL, PYR, AFA). Celulele de glioblastom au prezentat o radiosensibilitate crescută prin tratamentul anterior al acestora cu TMZ, TMX, RAL și AFA. Pe de altă parte combinația TMX, RAL și AFA cu TMZ nu a evidențiat o inhibare a proliferării statistic semnificativă comparativ cu celulele ce au fost supuse doar iradierii. Singura combinație care s-a dovedit eficientă în cazul acestor celule a fost cea a TMZ cu PYR.

Discuții. Tamoxifenul și raloxifenul au sensibilizat celulele canceroase la acțiunea radioterapiei dar combinarea acestora cu temozolomida nu a oferit un beneficiu adițional. Pe de altă parte combinarea temozolomidei cu pirimetamina a sensibilizat atât celulele stem tumorale cât și celulele de glioblastom la radioterapia standard. Pirimetamina ar putea deveni o opțiune atractivă pentru eficientizarea radio și chimioterapiei standard la pacienții cu glioblastom deoarece are o bună biodisponibilitate după administrarea orală și a fost administrată în condiții de siguranță la pacienții cu malarie pentru perioade lungi

de timp. Mai mult, deoarece este un agent antifolat lipofilic poate străbate cu ușurință bariera hemato-encefalică. Interesul crescut din ultima vreme pentru medicina alternativă justifică eforturile de identificare a unor compuși naturali cu proprietăți antitumorale. AFA ar putea fi un asemenea compus în condițiile în care a demonstrat sensibilizarea celulelor canceroase la radioterapie.

Concluzii. Prin combinarea temozolomidei cu pirimetamina celulele tumorale au fost sensibilizate la acțiunea radioterapiei. Utilizarea unor agenți sistemici capabili să sporească eficiența radioterapiei este de un interes deosebit deoarece constituie o bună strategie pentru reducerea dozei locale de iradere. Combinarea temozolomidei cu tamoxifenul, raloxifenul precum și AFA a evidențiat o accentuare a morții celulelor stem tumorale după expunerea la radioterapie comparativ cu temozolomida.

Concluziile generale sunt următoarele:

- Tratamentul în gliomele maligne cerebrale rămâne o provocare având în vedere rezultatele încă slabe obținute până în prezent.

-Tratamentul chirurgical este primul și cel mai important în cadrul tratamentului multimodal al gliomelor maligne cerebrale. Pe de altă parte supraviețuirea la distanță este influențată de eficiența tratamentului adjuvant.

-Deși chirurgia și radioterapia și-au atins eficiența maximă, chimoterapia are potențialul de a îmbunătăți supraviețuirea și tot mai multe studii din literatură din ultima perioadă s-au concentrat pe identificarea unor compuși care pot sensibiliza celulele canceroase la acțiunea chimioterapiei.

-Eșecul terapiei multimodale în gliomele maligne este atribuit dezvoltării unei subpopulații de celule tumorale care au caractere comune cu celulele stem. Dezvoltarea rezistenței acestor celule este responsabilă de recurența acestor tumori maligne. Viitorul tratamentului gliomelor maligne va fi ținut împotriva acestor celule.

-Cheia pentru îmbunătățirea speranței de viață ar putea fi un tratament eficient direcționat, personalizat pentru fiecare caz în parte. Singurul mod de a controla cu succes gliomele maligne recurente este combinarea diferitelor metode de tratament adjuvant în funcție de biologia și caracteristicile fiecărei tumori.

Cuvinte cheie: gliome maligne, rezecție totală, rezecție subtotală, astrocitom anaplastic, oligodendrogliom anaplastic, ependimom anaplastic, glioblastom, model in vitro, pirimetamină, tamoxifen, temozolomidă, raloxifen, alphanizomenon flos-aquae.

IULIU HAȚIEGANU UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ NAPOCA

PH.D. SCHOOL

PH.D THESIS

**SENSITIZERS FOR MULTIMODAL TREATMENT OF
MALIGNANT GLIOMAS**

SUMMARY

PH.D SUPERVISOR

PROF. DR. IOAN ȘTEFAN FLORIAN

PH.D STUDENT

COCIȘ ADRIANA (căs. BARIȚCHII)

SUMMARY

ABBREVIATIONS

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

- 1. Cerebral malignant gliomas**
 - 1.1. Malignant gliomas epidemiology
 - 1.2. Classification of malignant gliomas
 - 1.3. Glioblastoma multiforme
 - 1.4. Anaplastic astrocytoma
 - 1.5. Anaplastic oligodendroglioma
 - 1.6. Anaplastic ependymoma
 - 1.7. Other malignant gliomas
- 2. Multimodal treatment of cerebral malignant gliomas**
 - 2.1. Surgical treatment
 - 2.2. Adjuvant treatment
 - 2.3. Standard multimodal treatment of malignant gliomas
- 3. Tumoral stem cells**

PERSONAL CONTRIBUTION

- 1. The role of radical surgery as sensitizer in the treatment of malignant gliomas**
 - 1.1. Introduction
 - 1.2. The working hypothesis
 - 1.3. Patients and method
 - 1.4. Results
 - 1.5. Discussions
 - 1.6. Conclusions
- 2. In vitro evaluation of the combined therapeutic effect of temozolomide, tamoxifen, raloxifene, pyrimethamine and alphanizomenon flos-aquae on glioblastoma cells lines**
 - 2.1. Introduction
 - 2.2. The working hypothesis
 - 2.3. Material and method
 - 2.4. Results
 - 2.5. Discussions
 - 2.6. Conclusions

3. The evaluation of the radiosensitizing effect of tamoxifen, raloxifene, pyrimethamine and alphanizomenon flos-aquae on glioblastomas cells lines

- 3.1. Introduction
- 3.2. The working hypothesis
- 3.3. Material and method
- 3.4. Results
- 3.5. Discussions
- 3.6. Conclusions

4. General conclusions

REFERENCES

Malignant gliomas are aggressive cancers of the brain. After many decades of intense research, high-grade gliomas continue to be a major cause of morbidity and cancer mortality. They are the most common primary tumors of the brain and represent 2% of all cancers.

In recent years, despite the diversification of multimodal treatment (surgery, radiotherapy, chemotherapy), morbidity and mortality through malignant glial tumors has remained high. For this reason, there is a particular interest in discovering new methods of treatment with the ultimate goal of achieving therapeutic combinations capable of producing clinical healing of malignant gliomas. The latest therapies include immunotherapy, gene therapy, sensitizers for radiotherapy and chemotherapy, nanotechnology.

The objective of the scientific research is to evaluate the results of multimodal treatment in cerebral malignant gliomas, to establish quality standards and to compare different surgical strategies under their effectiveness and impact on the quality of life of treated patients, to quantify the connection between total/ subtotal surgical resection of cerebral malignant gliomas, to identify new drugs that can potentiate the action of standard therapies currently used (radiochemotherapy) by testing them in vitro on glioblastoma cell cultures.

First chapter is a brief review of general, epidemiological, clinical, imaging and anatomopathological data, prognosis and evolution of the most common malignant gliomas in current practice. Classification of brain malignant gliomas has long been a subject of controversy due to the heterogeneity of these tumors. There are currently several grading systems, but only two of them have a wide current use: Anne-Mayo and WHO (World Health Organization). The World Health Organization (WHO) classifies astrocytomas based on histological features in four prognostic grades: grade I (pilocytic astrocytoma), grade II (diffuse astrocytoma), grade III (anaplastic astrocytoma) and grade IV (glioblastoma). Grades III and IV are considered malignant gliomas. Anaplastic astrocytoma is characterized by increased cellularity, nuclear atypia, and mitotic activity. Glioblastomas also contain microvascular proliferation, necrosis or both.

Second chapter is a review of current therapeutic methods. Surgical treatment currently benefits from important technological advantages that have contributed to the reduction of surgical complications: magnetic resonance with preoperative diffusion sequences to highlight the change of the cortical and spinal tracts by the tumor, microsurgery, direct cortical and subcortical stimulation that guides the limits of tumor resection, intraoperative ultrasound, intraoperative MRI, ultrasonic aspiration, neuronavigation and stereotaxia. Generally, the technique of approaching a brain tumor depends on the location of the tumor relative to important brain functional areas. Aggressive surgery has better results compared to biopsy or partial surgical resection. The treatment decision for patients with tumor recurrence needs to be individualized because therapies are not curative and there are no randomized studies comparing active treatment to palliative care. The benefit of surgical reintervention should be counterbalanced by the risk of iatrogenic neurotoxicity and its impact on quality of life.

Adjuvant treatments include: external radiation therapy, chemotherapy, brachytherapy, gene therapy, immunotherapy, etc. Radiotherapy is useful, theoretically, postoperatively, without consensus on when it should be done early or late. Current conventional radiotherapy tends to be replaced by a hyperfractional focal method aimed at minimizing side effects on brain structures. By fractionating multiple doses or even by accelerated fractional (standard doses of 1.6-2 Gy, several times a day), it is possible to limit the CNS toxic effects while preventing tumor repair and repopulation. In malignant gliomas the efficacy of external radiotherapy occurs at doses of 60 Gy divided into 30 sessions. Cytostatic chemotherapy is indicated after surgical treatment and concomitantly or after radiotherapy to prevent relapses. Oral or intravenous

chemotherapy is performed in several therapeutic cures combined with corticotherapy. The response to chemotherapy is limited by the blood-brain barrier (BBB). Lipid-soluble and low-molecule medication can cross the BBB, concentrating on the CNS, but can't penetrate into the central necrotic area. Generally, various chemotherapeutic agents are used: nitrozurae derivatives are liposoluble and pass the blood-brain barrier (BCNU, CCNU), procarbazine, vincristine, hydroxyurea, carboplatin, etoposide, temozolomide, cyclophosphamide. Chemotherapy is an important part of multimodal treatment in malignant gliomas and can be applied even under the age of 3 years.

Gene therapy refers to experimental treatments that use genetic material (DNA or RNA) to eliminate tumor cells - so-called suicide genes - that do not affect normal cells. These genes can be introduced into the body using a vector, which is most often a virus. The most useful vectors for the treatment of gliomas are: Moloney murine leukemia virus, adenoviruses, adenovirus-associated viruses, herpes simplex virus, herpes simplex virus amplicons, liposomes, polysin-DNA complexes. Immunotherapy is a new innovative approach to malignant gliomas that aims to stimulate the body's immune system against the tumor by using autologous dendritic cells and tumor cells lysed as a therapeutic vaccine.

Standard multimodal treatment in cerebral malignant gliomas is a synthesis of multimodal therapy for each type of glioma presented. **Treatment of anaplastic astrocytoma** consists of total tumor ablation, which increases the average survival of patients compared to subtotal resection and temozolomide increased the survival rate at 6 months. **Treatment of glioblastoma multiform** comprises a wide range of methods, the current standard advocating for tumor ablation, radiotherapy and chemotherapy. A widespread resection of glioblastoma provides an improvement in quality of life and survival. Multimodal **treatment of anaplastic oligodendroglioma** includes surgery, radiotherapy and chemotherapy. Anticonvulsant therapy is recommended as soon as the patient is diagnosed with this pathology. Surgical resection is the first and most important treatment of malignant oligodendrogliomas. The role of chemotherapy for the treatment of oligodendrogliomas was determined by several studies. Most used procarbazine, lomustine and vincristine as a combination chemotherapy regimen. The use of Temozolomide as the first line has been demonstrated on a series of EORTC studies. **Treatment of anaplastic ependymoma** includes complete surgical resection without causing new neurological deficits, radiotherapy and chemotherapy. The usefulness of chemotherapeutic agents is insufficiently documented in the treatment of anaplastic ependymoma.

Chapter 3 provides data on the role of stem cells in the development of brain tumors as well as the study of the mechanisms of polyresistance of these tumors to multimodal therapy to date. Cancer stem cells are so named because they have the following properties, very similar to normal stem cells: self-renewal ability, differentiation, high telomerase expression, increased membrane transport, migratory ability and in the case of tumor stem cells, to generate metastases. Despite the fact that CD133 is the most widely used marker for identifying cancer stem cells in brain tumors, it can't be regarded as an absolute marker because many normal cells express this glycoprotein.

Research over the past few years has shown that tumor stem cells represent that cell population within a tumor, responsible for tumor resistance to conventional radio and chemotherapy treatment, both because of their ability to enter a period of "hibernation" with stopping of the cellular divisions, as well as the ability to synthesize MDR (multi drug resistance) proteins such as the Breast Cancer Resistance Protein-1 (BCRP1) protein. Some studies have analyzed the CD133 cell marker of glioblastoma cells that have been exposed to irradiation. CD133 positive cells had features attributable to cancer stem cells and survived at higher doses compared to most cells that were CD133 negative, and were able to repopulate the tumor. In CD133-positive cells, DNA damage was repaired more efficiently and apoptosis was lower in these cells.

The second part of the thesis, the Personal Contributions, contains the description of the own research along with the results and the conclusions obtained from these.

Study 1. The role of radical surgery as a sensitizer of multimodal treatment in malignant gliomas. The working hypothesis defines the premises from which research has started, namely the role of surgery in the multimodal approach of cerebral malignant gliomas. Since 2005, with the advent of the multicenter study published by Stupp and colleagues, and recent EORTC studies have shown that in terms of survival, surgery does not seem to have any prognostic role. In recent years, multicentre studies have brought into discussion the role of cytoreductive surgery in prolonging the survival rate.

Material and method. A retrospective study was conducted on brain gliomas operated in the Neurosurgery Department of the Cluj Napoca County Hospital for a period of 16 years: 01.01.2000-31.12.2015. Of the total cerebral gliomas operated the malignant one accounted for 59.24% (695 cases). Patients considered for the study were adults and children aged from 6 to 82 years old with the initial diagnosis of a malignant glioma. All the tumours were operated and gross total removal was the goal in all of the cases. The extent of surgery was reported by the neurosurgeon as partial or total removal, and confirmed on enhanced CT or MRI in the first 24-48 postoperative. Long-term surveillance and survival assessment was possible for 312 patients. Analytical and descriptive methods have been used to describe the groups.

Results. 1173 cerebral gliomas were operated in this interval. 59.24% of cases were high-grade gliomas. Low grade gliomas were diagnosed in 478 cases. The most common symptom of patients with high grade gliomas was intracranial hypertension (78%). On the second place were the motor deficits (found in 43% of cases) and to a lesser extent the seizures and aphasia.

The overall survival rates for the 312 patients enrolled in the study were 46.5% at 12 months, 23.7% at 18 months and 13.8% at 24 months. Survival at 12, 18 and 24 months was influenced by age and type of resection. On the other hand, the histopathological diagnosis significantly influenced survival at 24 months.

For 12-month survival monitoring, the mean survival was 9.2 months in patients with gross total tumor resection, with the confidence interval ranging from 8.7 to 9.7. The mean survival was 6.4 months in patients with subtotal resection with a 95% confidence interval from 5.2 to 7.7. The mean survival in patients in the first group was significantly higher than the patients in the 2nd group. For 18 months survival monitoring the mean survival for the patients with gross total tumor resection was 11.5 months (confidence interval of 95% being from 11.1 to 13.8). This was significantly higher than the mean survival of patients in the 2nd group. When survival was monitored at 24 months, a statistically significant difference between the two groups ($p < 0.005$) was also observed. The mean survival was 12.6 months in the first group, while in the second group it was 7.5 months.

From the total of 312 patients included in this study, glioblastoma was diagnosed in 207 cases. Overall survival rates in these patients were 43% at 12 months, with an average of 8.62 months, 24.2% at 18 months (mean being 10.48 months) and 12.6% at 24 months (mean of 11.57 months). Surgical resection was total in 184 cases and the remaining 23 patients had partial resections. The mean survival was significantly higher for patients with gross total resection compared to the mean of those with partial resection when the surviving monitoring was at 12 months (8.9 months vs. 5.8 months). When the survival monitoring was at 18 months, the following results were found: the mean survival for patients with gross total resection was 11 months with a confidence interval of 95% between 9 and 12.1. The mean survival of patients undergoing subtotal tumor resection was 6.2 months, the confidence interval of 95% was between 4.3 and 8.0, while the median was in this case 6 months. At 24 months, the mean survival of

patients who underwent subtotal tumor resection remained unchanged compared with follow-up at 18 months (6.2 months). On the other hand, the average survival in patients with gross total tumor resection was 12.2 months, the confidence interval ranging from 10.8 to 13.7.

For determining the role of age as a prognostic factor all the 312 patients were split in 2 groups: one under 65 years old and another one above 65. The first group contained 249 patients and the second one 63 patients. The survival rate had been observed at 12, 18 and 24 months. In all situations a statistic association has been found between age and survival. The younger patients had a better survival than the ones over the age of 65.

After surgery, some patients received chemotherapy and radiotherapy adjuvant treatments in Cluj Napoca at "Ioan Chiricuta" Oncology Institute while other patients were treated in the territory.

There were no statistically significant differences in survival at 12, 18 and 24 months between the two groups (patients who performed adjuvant therapy at the Oncology Institute Cluj Napoca and those who were treated in the territory) ($p = 0.862$, $p = 0.216$; $p = 0.323$).

Discussions. The first step in the treatment of malignant gliomas is surgical intervention. Mechanical cytoreduction of tumor mass can help the patient get the time needed for other therapeutic interventions (radiotherapy, chemotherapy). The beneficial effect of tumor resection was observed in both the cerebral blood flow and the metabolism, even distant from the tumor site.

The impact of surgery of high grade gliomas on progression free survival and overall survival was a constant preoccupation and debate for decades among neurosurgeons. The infiltrative nature of these tumors makes impossible the curative resection. A wider margin resection coupled with adjuvant therapy creates the condition of delaying the recurrence and prolonging the survival.

One of the most comprehensive studies that attempt to find a correlation between the extent of the resection and survival comes from Lacroix et al. 416 patients who underwent resection for glioblastoma over a period of 6 years were included. The tumoral volume pre and postoperative was assessed using computer assisted image analyses. Five independent predictors of survival were identified by the authors following multivariate statistical analyses: age, Karnofsky Performance Scale (KPS) score, extent of resection, and the degree of necrosis and enhancement on preoperative MR imaging studies. When a resection of 98% or greater of the tumor was achieved a significant survival advantage was associated. The median survival was 13 months in patients with gross or near gross total resection (98% or greater) compared with 8.8 months for patients with less than 98% resection ($p=0.02$). A clinical outcome scale ranging from 0 to 5 was proposed based on age, KPS and radiographic evidence of necrosis. A significantly improved survival was observed in patients with lower scores (1-3) who underwent aggressive resections and a trend toward slightly longer survival was found in patients with higher scores (4-5). This study supports the concept of aggressive cytoreductive surgery as part of the management of high grade gliomas, yet not at the expense of neurologic function or surgical complications.

The management of elderly patients with high grade gliomas is mainly focused on the optimal use of radiotherapy and chemotherapy. Age and number and severity of additional illness are vital when considering the extent of resection in older patients, due to surgical risks and potential postoperative complication.

In this retrospective study of 312 cases that met inclusion criteria for statistical monitoring at 12, 18 and 24 months, the obtained data also supported maximal cytoreductive surgery in order to prolong survival of patients with malignant gliomas. The obvious benefits from resection are symptomatic relief from mass effect and obstructed cerebrospinal fluid. The tumoral mass produces compression of neural pathways and distortion of brain structures that contribute to both general symptoms and focal deficits and explain the neurologic improvement following surgical resection. After surgery there are some global symptoms

(headache, nausea, vomiting, general malaise) that show dramatic improvement. The partial reversal of neurological deficit is due to the relief of local compression.

Conclusions. After three decades of intensive research, the prognosis of patients with high-grade gliomas continues to be disappointing. The infiltrative nature of these cancers excludes surgical healing, yet surgery remains an important part of multimodal therapy. The various studies published over the past 25 years have shown evidence that the extension of surgical resection in high grade gliomas may influence time to disease progression and mean survival. Failure to demonstrate prolonged survival with Class I data should not stop surgeons from considering surgical resection thanks to the numerous other benefits of tumour removal.

Standard treatment for elderly patients with malignant gliomas remains controversial and undefined. Although high-grade gliomas may occur at any age, the elderly represent half the patients with glioblastomas. Old age remains the strongest negative prognostic factor because it is associated with less favorable tumor biology, a less aggressive therapeutic approach, and some comorbidities.

Study 2. Evaluation of the combined therapeutic effect of temozolomide, tamoxifen, raloxifene, pyrimethamine and alphanizomenon flos-aquae on glioblastoma cell lines. The working hypothesis is based on the premise that although surgery and radiotherapy have reached their maximum effectiveness, chemotherapy has the potential to improve survival.

Material and method. Cancer stem cells (CSCs) and primary glioma cells were isolated from two glioblastoma biopsies. One hour after tumor removal the biotic material was minced with fine scissors into fragments of $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ and cultured in 1 ml of fetal calf serum (FCS) in Petri dishes. Four hours later, 2 ml of Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) were added, supplemented with FCS, antibiotics, non-essential aminoacids and glutamine. The explants were stored in a 37°C incubator with 95% air and 5% CO_2 . After one week, a monolayer of tumor cells was formed. CSC were proven to be CD133+, Oct $\frac{3}{4}$ +, CD 90+ and Nanog +.

Temozolomide (TMZ), tamoxifen (TMX) and raloxifen (RAL) were dissolved in DMSO while pyrimethamine (PYR) was dissolved in 70% ethanol. All drugs were stored at -20°C . Preparation of algal extract was made adding one gram of algae (AFA) to 10 ml of 70% ethanol and incubated at 4°C on a shaker for 24 hours. The slurry was centrifuged at 400 g for 10 min at 4°C and the supernatant was filtered through 413-grade filter paper. The resulting extract was kept in the dark at -80°C . All drugs were stored as a stock solution and dilution were made using bidistilled water.

Cell survival was assessed using the MTT assay. The cancer stem cells were seeded at 5000 cells per well in 96-well plates whereas primary glioblastoma cells were plated at a density of 1×10^4 . They were incubated at 37°C overnight to allow them to attach. The drugs were added to cell cultures either alone or in combination with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ temozolomide or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methotrexate. The drug concentrations used were: tamoxifen 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, raloxifen 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Pyrimethamine 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and AFA 1.75 mg/mL .

Results. When adding each of the tested drugs prior to treatment the result showed a reduced survival of cancer stem cells for TMX, RAL AFA and PYR but not for TMZ. On the other hand primary glioblastoma cells were resistant to all tested drugs. Statistical analyses showed no significant survival in the case of control vs TMZ (95% CI from -0.1653 to 0.7990), control vs TMX (95% CI from -0.2200 to 0.7442), control vs RAL (95% CI from -0.2158 to 0.7485), control vs AFA (95% CI from -0.07429 to 0.08900) and control vs PYR (95 % CI from -0.1485 to 0.8157). We used Bonferroni's multiple comparison test and statistically significant survival data ($p < 0.05$) were noticed between control vs TMZ+TMX (95% CI from 1.035 to 2.00), control vs TMZ+ RAL (95% CI from 0.9337 to 1.898), control vs TMZ+ AFA (95% CI from 0.7890 to 1.753), control vs TMZ+ PYR (95% CI from 0.5640 to 1.528). In cancer stem cell survival statistically significant data were obtained between CSC vs CSC+TMZ+TMX (95% CI from 0.9526 to 4.604), CSC vs

CSC+TMZ+RAL (95% CI from 1.342 to 4.472), CSC vs CSC+TMZ+AFA (95% CI from 1.317 to 4.532) CSC vs CSC+TMZ+PYR (95% CI from 0.1775 to 4.468).

Discussions. Today's standard therapy for glioblastoma is maximal tumor resection followed by chemoradiotherapy. Temozolomide, a DNA methylating agent was proved to provide some survival advantage, enhancing the radiosensitivity of cancer cells and therefore is the front line drug for the treatment of glioblastoma. Resistance to chemoradiotherapy and the aggressive growth and infiltration of these tumors have led to little improvement in the treatment of this brain cancer. Cancer stem cells were demonstrated to influence the tumor growth and resistance to treatment and to have a prognostic role in predicting the clinical outcome in primary glioblastoma patients.

A series of studies have demonstrated that the proliferation of high grade gliomas relies partially on the activation of protein kinase C (PKC) mediated pathways and blocking this enzyme could provide a novel approach for inhibition of glioma cell growth. This led to the increasing attention of glioma researchers for tamoxifen, an antiestrogen that has a significant PKC inhibition. Tamoxifen was proved to block glioma cells in vitro at concentration several fold higher than the dose used for traditional role as an estrogen receptor-binding agent. This drug is now being evaluated in clinical trials for patients with malignant gliomas. Even if the role of tamoxifen in the treatment of high grade gliomas was studied in the last 2 decades, the efficacy of raloxifene, a second generation of the selective estrogen receptor modulator (SERM) is not documented.

In our study we have showed that raloxifene exhibited the same inhibitory property on cancer stem cell as tamoxifen. In case of primary glioblastoma cells that proved to be resistant to both SERMs, the survival curves shifted downward dramatically when adding temozolomide.

The combination of temozolomide with pyrimethamine was effective for both cancer stem cells and primary glioblastoma cells. PYR could be an attractive option to improve the efficiency of temozolomide in glioblastoma patients due to its bioavailability after oral administration and also the fact that PYR has been safely administered to malarial patients for prolonged periods with limited side effects. Moreover, because is a lipophilic antifolate agent can easily cross the blood brain barrier.

Spirulina and AFA are the most common edible cyanobacteria which contain phycocyanin, a molecule that was proved to induce apoptosis in the chronic myeloid leukemia cell line, K562 and other types of cancer. *A. flos-aquae*, a freshwater species of cyanobacteria, is known to produce hepatotoxin cylindrospermopsin (CYN) and paralytic shellfish poisons, a potent neurotoxin. In the present study, we demonstrated that ethanol extracts from *aphanizomenon flos-aquae* (AFA) inhibited cancer stem cells and primary glioblastoma cells when combined with temozolomide.

Conclusions. The failure of multimodal therapy in malignant gliomas is attributed to the development of a subpopulation of tumor cells that share same properties as stem cells. The development of these cells' resistance is responsible for the recurrence of these malignant tumors. The future treatment of malignant gliomas will be targeted against these cells. Data from this study support the idea that there are some drugs that can sensitize malignant glial cells to the chemotherapy currently used. These studies should be expanded in vivo to demonstrate efficacy.

Study 3. Evaluation of the radiosensitization effect of tamoxifen, raloxifene, pyrimethamine and alphanizomenon flos-aquae on glioblastoma cell lines. Glioblastoma multiform is one of the most radio-resistant tumors. Different substances have been explored as potential radiosensitizers. Of these, temozolomide has been shown to be a radiosensitizer model that can increase survival and enter the therapeutic arsenal of patients diagnosed with malignant gliomas. In this study is evaluated the activity of two known radiosensitizing drugs (temozolomide and tamoxifen). Raloxifene, pyrimethamine and alphanizomenon flos-aquae were also tested for the purpose of identifying others glioblastoma cell radiosensitizers.

Material and method. The cancer stem cells were seeded at 5000 cells per well in 96-well plates whereas primary glioblastoma cells were plated at a density of 1×10^4 . They were incubated at 37° C overnight

to allow them to attach. The drugs were added to cell cultures either alone or in combination with 50 µg/mL temozolomide or 1 µg/mL methotrexate. The drug concentrations used were: tamoxifen 2.75 µg/mL, raloxifen 15 µg/mL, Pyrimethamine 15 µg/mL and AFA 1.75 mg/mL. After 48 hours the cells were irradiated with 2 Gy as used in the clinic, at the Radiotherapy Department of “Prof. Dr. Ion Chiricută” Oncology Institute, using a high megavoltage source (Theratron 1000 ⁶⁰Co source).

Results. Cancer stem cell treated with TMX, RAL, AFA and PYR were sensitized to radiotherapy but the combination of these drugs with TMZ showed no additional benefit. Primary glioblastoma cells were killed when treated with TMZ, TMX, RAL and AFA prior to radiotherapy. PYR showed no significant statistical difference comparing with control cells but when combined with TMZ the survival curves shifted downward dramatically.

Discussions. Tamoxifen and raloxifene sensitized cancer cells to radiotherapy but their combination with temozolomide did not provide any additional benefit. On the other hand, combining temozolomide with pyrimethamine sensitized both tumor stem cells and glioblastoma cells to standard radiotherapy. Pyrimethamine could become an attractive option for sensitizing tumoral cells to radio and chemotherapy because it has good bioavailability after oral administration and has been safely administered to patients with malaria for long periods of time. Moreover, because it is a lipophilic antifolate agent it can easily cross the blood-brain barrier. Increased interest in alternative medicine recently justifies efforts to identify natural compounds with antitumor properties. AFA could be such a compound as it demonstrated the sensitization of cancer cells to radiotherapy.

Conclusions. By combining temozolomide with pyrimethamine, the tumor cells were sensitized to radiotherapy. The use of systemic agents capable of increasing the effectiveness of radiotherapy is of particular interest as it constitutes a good strategy for reducing the local irradiation dose. The combination of temozolomide with tamoxifen, raloxifene and AFA revealed an increase in tumor stem cell death after exposure to radiotherapy compared to temozolomide.

The **general conclusions** are as follows:

- Treatment in brain malignant gliomas remains a challenge given the still poor results achieved so far.
- Surgery is the first and most important step of multimodal treatment of cerebral malignant gliomas. On the other hand long term survival is influenced by the effectiveness of adjuvant treatment.
- Although surgery and radiotherapy have reached their maximum effectiveness, chemotherapy has the potential to improve survival, and more and more literature studies have recently focused on identifying compounds that can sensitize cancer cells to chemotherapy.
- Failure of multimodal therapy in malignant gliomas is attributed to the development of a subpopulation of tumor cells that have common features with stem cells. The development of these cells' resistance is responsible for the recurrence of these malignant tumors. The future treatment of malignant gliomas will be targeted against these cells.
- The key for improving life expectancy could be a targeted, personalized treatment for each case. The only way to successfully control recurrent malignant gliomas is to combine different adjuvant treatment methods according to the biology and characteristics of each tumor.

Key words: malignant gliomas, gross total removal, subtotal removal, anaplastic astrocytoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic ependymoma, glioblastoma, in vitro model, tamoxifen, raloxifene, pyrimethamine, temozolomide, alphanizomenon flos-aquae.

