

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA**

TEZĂ DE DOCTORAT

- REZUMAT -

**INVESTIGAREA ROLULUI FACTORILOR DE
CREȘTERE ȘI A CELULELOR STEM
MEZENCHIMALE ÎN TRATAMENTUL
CANCERULUI CEREBRAL**

**Conducător științific:
Prof. Univ. Dr. ANICA DRICU**

**Doctorand:
FOLCUȚI ROXANA-MIHAELA**

**CRAIOVA
2017**

INTRODUCERE

Glioblastomul, tumoră cerebrală malignă de gradul IV WHO, este cea mai frecventă și letală tumoră cerebrală primară, reprezentând o provocare terapeutică a secolului XXI. Cu toate că în practica oncologică există un tratament complex multimodal, rata de supraviețuire a pacienților rămâne în continuare scăzută. Datele publicate în literatura de specialitate arată că CSM prezintă un tropism particular în cazul gliomelor și pot interacționa cu celulele tumorale prin contact direct sau prin intermediul factorilor secretați.

La nivel tumoral, există perturbări în creșterea și proliferarea celulară, la care se adaugă și modificări ale expresiei factorilor de creștere, având ca rezultat activarea aberantă a receptorilor acestora. Aceste fenomene au drept consecință afectarea răspunsului tumoral la terapia convențională.

CUVINTE CHEIE: glioblastom, celule stem mezenchimale, factori de creștere.

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I

Glioblastomul reprezintă una dintre cele mai severe forme de gliom malign cu prognostic sever și o supraviețuire medie de 14,6 luni în ciuda tratamentelor complexe bazate pe chirurgie, radioterapie și chimioterapie cu temozolomidă (TMZ). (Frosina G. și colab., 2015)

Datorită faptului că opțiunile terapeutice ale glioblastomului sunt limitate, este necesară identificarea altor metode viabile de tratament. Totuși, în ciuda informațiilor științifice copleșitoare despre fenomenele moleculare și genomice în glioblastom, transformarea acestor date în terapii eficiente rămâne de cele mai multe ori, fără validare clinică. (Gilbert MR, 2013)

CAPITOLUL II

IMPORTANȚA FACTORILOR DE CREȘTERE ÎN TUMORILE CEREBRALE

Factorii de creștere acționează asupra micromediului tumoral, controlând angiogeneza, remodelarea vasculară, inflamația, expansiunea fibroblaștilor stromali și recrutarea celulelor stem, modulând astfel creșterea tumorală, invazia și metastazarea. (Hanahan D și colab., 2011) Din aceste motive, investigarea potențialului terapeutic al inhibitorilor factorilor de creștere reprezintă o abordare corectă și de actualitate a tratamentului glioblastomului

CAPITOLUL III

CELULELE STEM MEZENCHIMALE

Terapia cu CSM și-a găsit aplicabilitatea în ultima perioadă, fiind utilizată experimental *in vitro* și *in vivo*, inducând apoptoza celulelor tumorale și inhibând metastazarea carcinomului hepatocelular și de prostate. (Alessandro R et al.,2014) În plus, terapia cu CSM și-a dovedit eficacitatea într-un model de sarcom Kaposi, o tumoră angiogenică puternic inflamatorie, prin efectele antitumorale exercitate. (Khakoo AY et al.,2006) Cu toate acestea, s-a stabilit că CSM joacă un rol și în dezvoltarea anumitor boli maligne prin factorii secretați ce activează diverse căi de semnalizare celulară, însă mecanismul prin care CSM acționează asupra creșterii tumorale și metastazării nu este pe deplin elucidat. Impedimentul principal în interpretarea cu precizie a efectelor CSM în bolile maligne este reprezentat de utilizarea a diverse linii celulare tumorale și de variațiile în tehnicile și modelele experimentale. (Anja T et al., 2013)

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL IV

MATERIALE SI METODE

Culturile de celule de glioblastom (GB) au fost etablate din mostre de țesuturi proaspete oferite cu amabilitate de Spitalul "Bagdasar-Arseni", București, de la pacienți supuși unei intervenții chirurgicale pentru extirparea tumorii de glioblastom.

Liniile de celule HUC-1 și HUC-2 au fost etablate din țesut de cordon ombilical uman. Țesutul din cordonul ombilical a fost colectat după naștere naturală de la paciente care au fost internate cu sarcină adusă la termen la Spitalul Județean de Urgență din Craiova, România. Au fost excluși pacienții care prezentau anomalii cromozomiale, malformații congenitale sau alte patologii.

SU1498 (inhibitor selectiv al VEGFR2) a fost obținut de la Santa Cruz Biotechnologies.

AG1433 (inhibitor al PDGFR-β, slab inhibitor al VEGFR2 și al angiogenezei) au fost obținuți de la Sigma-Aldrich, Germania.

Liniile celulare tumorale au fost etablate urmând procedurile standard de etablare. Acestea au fost tratate cu diferite concentrații de inhibitori tirozin-kinazici cu molecule mici: SU1498 (0,1 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM, 60 μM, 80 μM), AG1433 (0,1 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM, 60 μM, 80 μM). Testul MTT a fost utilizat cu scopul determinării efectului antiproliferativ al tratamentului asupra celulelor tumorale

Liniile celulare de GB cultivate în plăci cu 96 de godeuri la o concentrație de 2×10^3 de celule/godeu au fost tratate cu mediu condiționat (CM) izolat din liniile celulare hUC-CSM și hBM-CSM. Tratamentul cu CM a durat pentru fiecare linie celulară GB timp de 24, 48, 72 și 96 de ore. La sfârșitul tratamentelor, proliferarea celulelor a fost cuantificată prin testul MTT.

CAPITOLUL V.

OBIECTIVE

1. Analiza efectului mediului condiționat recoltat de la culturile de celule stem mezenchimale umane izolate din țesut de cordon ombilical (HUC-1-CM și HUC-2-CM) asupra viabilității celulelor de glioblastom *in vitro* (liniile celulare GB1B, GB2B, GB3B).
2. Analiza efectului mediului condiționat recoltat de la culturile de celule stem mezenchimale medulare (CSM-CM) asupra viabilității celulelor de glioblastom *in vitro* (liniile celulare GB1B, GB2B, GB3B).
3. Analiza efectului inhibării receptorului VEGFR în glioblastom (linia celulară GB10B).

4. Analiza efectului inhibării receptorului PDGFR în glioblastoma (linia celulară GB10B).

Studiul intenționează să ofere o nouă abordare în terapia tumorii cerebrale primare de grad înalt, cât și bazele experimentale necesare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.1. Efectele HUC-CM asupra liniei GB1B

Rezultatele noastre arată că HUC-1-CM și HUC-2-CM inhibă proliferarea tuturor celor trei linii de celule de GB comparativ cu celulele de control netratate.

HUC-1-CM și HUC-2-CM produc o scădere a viabilității celulare în linia GB1B cu aproximativ 30%, la 24 de ore după tratament. De asemenea, efectul citotoxic al celulelor HUC-1-CM și HUC-2-CM asupra liniei de celule GB1B a fost ireversibil, persistând până la sfârșitul experimentului.

În linia celulară GB1B, atât tratamentul cu HUC-1-CM cât și tratamentul cu HUC-2-CM a avut efect citotoxic, prelungirea tratamentului până la 96 de ore, nu a produs însă un efect citotoxic mai puternic, procentul de celule moarte rămânând la aproximativ același nivel, cu o ușoară tendință de creștere celulară la 72 h (aprox 20%).

5.2. Efectele HUC-CM asupra liniei GB2B

În ceea ce privește efectele tratamentului cu HUC-1-CM asupra liniei GB2B, cea mai mare inhibiție s-a înregistrat la 48 h (aproximativ 37%). Cel mai puternic efect citotoxic al tratamentului cu HUC-2-CM (aproximativ 32%) s-a observat după 72 de ore de tratament. Aceste valori nu s-au menținut până la sfârșitul tratamentului, viabilitatea celulelor GB2B prezentând o ușoară creștere.

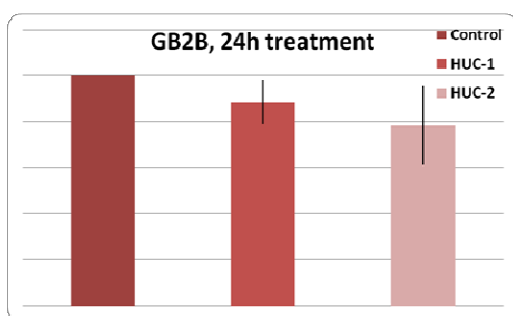


Fig. 1

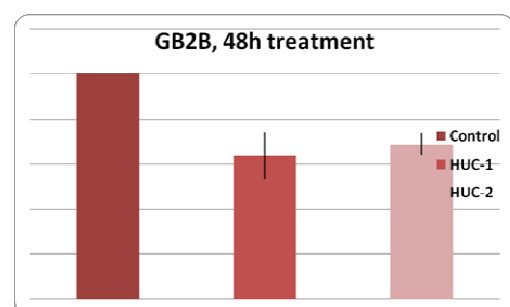


Fig. 2

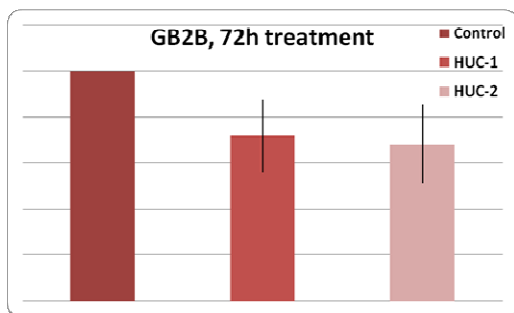


Fig. 3

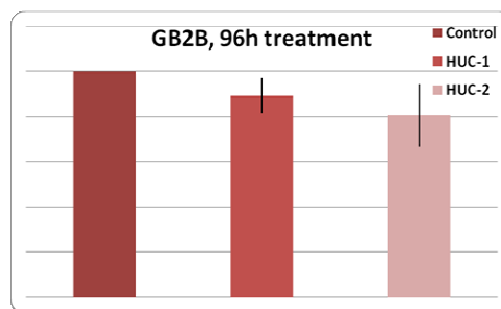


Fig. 4

Fig. 1, 2, 3, 4 - Efectul HUC-1-CM, HUC-2-CM asupra proliferării celulare în linia GB2B la 24, 48, 72 și 96 de ore după tratament. Rezultatele sunt exprimate ca procent din control, iar valorile sunt medii și deviația standard a trei experimente diferite.

5.3. Efectele HUC-CM asupra liniei GB8B

Mediul HUC-1-CM a determinat reducerea viabilității celulare în linia GB8B cu aproximativ 30% la 24 și 48 de ore după tratament, apoi s-a observat o scădere a citotoxicității mediului asupra celulelor aparținând liniei GB8B, la sfârșitul tratamentului observându-se o ușoară creștere a populației celulare. În schimb, efectul HUC-2-CM asupra celulelor GB8B fost ireversibil, viabilitatea celulară scăzând cu aproximativ 30%, la 24, 48, 72 și respectiv 96 de ore după tratament.

5.4. Efectul CSM-CM asupra celulelor de glioblastom

În ceea ce privește CSM CM, s-a observat o creștere semnificativă statistic a tuturor celulelor de glioblastom în primele 24 de ore, în timp ce tratamentul prelungit, timp de 96 de ore, a arătat o scădere minoră a viabilității celulare în liniile GB1B și GB8B și a stimulat proliferarea celulelor pentru linia GB2B.

5.5. Efectul tratamentului cu AG1433 asupra celulelor de glioblastom

Tratamentul liniei celulare GB10B cu inhibitorul PDGFR, AG1433 a determinat un efect linear asupra viabilității celulare la 48 de ore, dozajul maxim de inhibitor provocând o scădere maximă a populației celulare, în timp ce concentrația minimă de inhibitor a determinat cea mai mică scădere a viabilității celulare.

5.6. Efectul tratamentului cu SU1498 asupra celulelor de glioblastom

Tratamentul cu concentrația minimă de inhibitor SU1498 pentru 48 și 72 de ore a determinat un efect citotoxic minor asupra celulelor aparținând liniei celulare GB10B.

Prin creșterea progresivă a concentrațiilor de inhibitor până la 80 de μM s-a observat o descreștere continuă a viabilității celulare până la valoarea de 44,28% la 72 de ore de tratament.

CONCLUZII

- Factorii secretați de celulele stem mezenchimale izolate din cordonul ombilical au produs o scădere a viabilității celulare în toate liniile de glioblastom studiate:
 - În linia GB1B, la 24 de ore de tratament cu mediul condiționat al celulelor stem mezenchimale s-a produs o scădere cu aproximativ 30%, prelungirea tratamentului până la 96 de ore neproducând un efect citotoxic mai puternic, însă menținându-se o scădere a viabilității celulare.
 - În linia GB2B, cea mai mare scădere a viabilității celulare (aproximativ 37%) s-a înregistrat la 48 de ore de tratament pentru linia celulară HUC-1-CM, în timp ce pentru linia celulară HUC-2-CM, cel mai puternic efect citotoxic asupra celulelor tumorale s-a înregistrat la 72h de la începutul tratamentului.
 - În linia GB8B: mediul condiționat aparținând liniei celulare HUC-1 a determinat reducerea viabilității celulare la 24 și 48 de ore de tratament cu aproximativ 30%, observându-se la sfârșitul tratamentului o ușoară creștere a populației celulare GB8B. HUC-2-CM a produs un efect citotoxic ireversibil până la 72 de ore, înregistrându-se o ușoară revenire la 96 de ore de tratament, diferența nefiind însă semnificativă statistic ($p > 0,05$).
- În concluzie, setul de valori cu semnificație statistică se regăsește pentru ambele linii de celule stem mezenchimale izolate din cordonul ombilical (HUC-1-CM și HUC-2-CM) la 24-48 de ore de tratament. Cea mai semnificativă inhibiție a fost atinsă la 48 de ore pentru linia celulară HUC-1-CM, respectiv la 72 de ore pentru linia celulară HUC-2-CM. În ultima zi a tratamentului cu mediu condiționat s-a

observat un procent mediu de celule tumorale moarte de aproximativ 16% în toate liniile celulare de glioblastom utilizate.

3. Factorii secretați de celulele stem mezenchimale izolate din măduva osoasă (CSM-CM) a provocat o creștere a populației celulare semnificativă statistic a celor trei linii de glioblastom în primele 24 de ore și o reducere minoră a viabilității celulare în liniile GB1B și GB8B împreună cu proliferarea celulară pentru linia GB2B.
4. Inactivarea receptorilor factorilor de creștere PDGFR prin utilizarea inhibitorilor din clasa tirfostinei AG1433 a determinat un efect citotoxic asupra celulelor tumorale de glioblastom.
5. Inactivarea receptorului factorului de creștere VEGFR prin utilizarea inhibitorului SU1498 din clasa tirfostinelor a determinat o descreștere lineară a viabilității celulare a celulelor de glioblastom.
6. Liniile celulare de glioblastom utilizate în acest studiu au reacționat diferit la tipurile de tratament analizate în acest studiu, sugerând necesitatea aplicării terapiei individuale.
7. Rezultatele obținute în urma acestui studiu au fost în concordanță cu cele demonstrate în publicațiile anterioare și arată faptul că glioblastomul răspunde atât la terapia cu celule stem mezenchimale izolate din cordonul ombilical, cât și la cea cu inhibitori tirfostinici utilizați ca monoterapie.

BIBLIOGRAFIE

1. Anja T, Rolf B. Mesenchymal stem cells signaling in cancer progression. *Cancer Treatment Reviews* 2013;39:180-188.
2. Alessandro R, Domenica G, Maria CG, Tulia T, Aldo C. New perspectives for prostate cancer treatment: in vitro inhibition of LNCaP and PC3 cell proliferation by amnion-derived mesenchymal stromal cells conditioned media. *Aging Male*; Early online:1-8. 2014 Informa UK Ltd. DOI:10.3109/13685538.2014.896894.
3. Frosina G. Limited advances in therapy of glioblastoma trigger re-consideration of research policy. *Critical Rev In Oncology/Hematol* 2015;96:257-261.
4. Gilbert MR. On the pathway to success: defining subtypes of gliomas for better treatment selection and refining the meaning of success. *Curr Oncol Rep* 2013;15:24-26.
5. Hanahan D., Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
6. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA și colab. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006;203:1235-47.