

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

”ROLUL EXOZOMILOR ÎN MANAGEMENTUL PERSONALIZAT AL GLIOBLASTOAMELOR”

Doctorand: Georgiana-Mihaela Müller-Șerban

Conducător științific: Prof. Dr. Adrian Florian Bălașa

Context

Glioblastomul, definit de ultima clasificare din 2021 a Organizației Mondiale a Sănătății drept un gliom de grad 4, este cea mai agresivă tumoră primară cerebrală a pacientului adult, asociată cu o morbiditate și mortalitate importante, în ciuda diagnosticării rapide și aplicării precoce a tratamentului considerat *gold-standard* la momentul actual – protocolul Stupp (ablația tumorală, urmată de radio- și chimioterapie adjuvantă). Această patologie se caracterizează printr-o heterogenitate marcată intra- și intertumorală, motiv pentru care identificarea unor markeri de diagnostic și prognostic prin analiza histopatologică, imunohistochimică și moleculară a mostrelor de țesut biopsiat s-a dovedit zadarnică. În ultima vreme, s-a pus accent pe biopsia lichidă, o tehnică minim invazivă care permite, printre altele, izolarea veziculelor extracelulare eliberate de celulele glioblastomului din sângele periferic al pacienților. Aceste nanostructuri prezintă atât la suprafața, cât și în interiorul lor, molecule specifice celulelor care le secretă. Astfel, caracterizarea veziculelor extracelulare pe baza moleculelor din componență reflectă fidel proprietățile celulelor donoare, în speță ale celulelor glioblastomului. Importanța constă în posibilitatea identificării unor biomarkeri de diagnostic și prognostic accesibili și reproductibili, meniți să stabilească un profil fenotipic care să prezică evoluția acestei patologii și să orienteze conduita terapeutică într-o manieră personalizată.

Studiul 1 - Factori prognostici de supraviețuire la pacienții diagnosticați cu glioblastom – Studiu retrospectiv

Acest studiu retrospectiv a avut drept scop o caracterizare inițială a pacienților cu glioblastom din Clinica de Neurochirurgie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Târgu Mureș din punct de vedere socio-demografic, clinic și paraclinic, precum și identificarea unor potențiali markeri de diagnostic și prognostic. Au fost luați în considerare factori legați de pacient (sex, vârstă, status clinic pre- și postoperator), de tumoră (localizare, dimensiune, proprietăți histologice și imunohistochimice – Ki67, GFAP), de conduita terapeutică (amplerea rezecției chirurgicale, terapii adjuvante aplicate) și de răspunsul imun al organismului la agresivitatea tumorii prin intermediul valorilor absolute ale celulelor imuno-

inflamatorii din sângele periferic și al rapoartelor dintre ele. Similar celorlalte publicații, studiul nostru a demonstrat că dimensiunea tumorii la momentul diagnosticului și agravarea statusului clinic postoperator are o influență negativă asupra supraviețuirii acestor pacienți, iar vârsta pacienților se corelează negativ cu statusul clinic pre- și postoperator. În plus, leucocitoza preoperatorie prezice o evoluție nefavorabilă. Celelalte rezultate confirmă incertitudinea publicațiilor existente privind eficiența acestor factori în diagnosticarea și prezicerea comportamentului glioblastomului, cel puțin la momentul actual.

Studiul 2 - Conturarea unor profile antigenice distincte la pacienții cu glioblastom prin imunocaptarea veziculelor extracelulare

Acest studiu a propus analiza prin metoda citometriei în flux a veziculelor extracelulare eliberate de celulele glioblastomului în sângele periferic și identificarea unui profil exozomal care să prezică evoluția acestor pacienți pe baza markerilor de suprafață exprimați de veziculele extracelulare. Rezultatele au demonstrat o heterogenitate marcată a expresiei epitopilor între pacienți. Prima clusterizarea bazată pe markerii specifici tumorali a evidențiat clusterare în care predomină un fenotip al celulei donor de tip celulă stem, tumorală și, respectiv, endotelială. Singurul marker care poate distinge semnificativ între lotul de pacienți și lotul control este CD29, o moleculă cu rol central în toate mecanismele care conferă agresivitate glioblastomului. A doua clusterizare are la bază evaluarea răspunsului imun, dintre care se remarcă, pe de o parte, o posibilă activare limfocitară, și, pe de altă parte, o posibilă activare plachetară. Astfel, se confirmă heterogenitatea profilelor antigenice ale pacienților cu glioblastom și imperiozitatea unei abordări terapeutice personalizată.

Studiul 3 - Caracterizarea fenotipului de celulă stem în glioblastoame bazată pe veziculele extracelulare

Scopul acestui studiu a fost validarea unui pattern evolutiv al markerilor de celulă stem asociați veziculelor extracelulare eliberate de celulele glioblastomului (NANOGP8 – moleculă din încărcătura veziculelor extracelulare; CD44, SSEA4, CD133, CD326/EpCAM – markeri de suprafață), care să permită anticiparea comportamentului acestei malignități. Expresia tuturor moleculelor a scăzut semnificativ la o săptămână postoperator, însă evoluția pe termen lung (la 3 luni de la intervenția chirurgicală) a demonstrat tendințe extrem de variate, marcând din nou variabilitatea extraordinară intra- și interindividuală a acestei patologii.

Studiul 4 - Identificarea indicilor de agresivitate a glioblastomului prin citometrie în flux și Western blot

Ultimul studiu a urmărit evoluția în dinamică a moleculelor asociate veziculelor extracelulare derivate din celulele tumorale ale glioblastomului, aflate atât în încărcătura, cât și pe suprafața lor. S-a realizat o selecție de molecule astfel încât să se acopere toate mecanismele care stau la baza agresivității acestei malignități: proliferare celulară (EGFRvIII,

MCSP), invazie tumorală (anexina A1, EGFRvIII, ROR1, CD24), favorizarea unui fenotip de celulă stem (ROR1, CD24), eludarea răspunsului imun (anexina A1, PDL1, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ), chimio- și radiorezistență (anexina A1). Aceste căi moleculare sunt deseori interconectate, iar un profil molecular alcătuit din toți acești markeri reprezintă o caracterizare multifactorială a glioblastomului. Studiul nostru a demonstrat o heterogenitate inter- și intraindividuală importantă a expresiei acestor molecule de-a lungul timpului.

Originalitatea tezei de doctorat

Originalitatea acestei teze de doctorat constă în abordarea holistică și modernă a tumorigenezei glioblastomului prin izolarea și analizarea veziculelor extracelulare derivate din celulele tumorale, urmărindu-se o gamă variată de markeri de la suprafața și din interiorul acestor vezicule cu rol demonstrat în patogeneza acestei malignități; este primul studiu de acest fel din România și printre puținele de la nivel mondial.

În plus, studiul nostru a permis, în premieră națională, optimizarea unui protocol de izolare a veziculelor extracelulare din sângele periferic prin metoda ultracentrifugării în gradient de densitate, precum și a unui protocol de cuantificare a diferiților epitopi prin metoda citometriei în flux și a proteinelor din încărcătura veziculelor extracelulare prin Western blot.