

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Tratamentul multimodal în gliomele maligne cerebrale

Doctorand

**Cristian Ionel Abrudan**

Conducător de doctorat

**Prof. Univ. Dr. Ștefan Florian**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCERE</b>  | 3  |
| <b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>  |    |
| <b>1. Gliomele maligne cerebrale</b>  | 3  |
| <b>2. Tratamentul multimodal în gliomele maligne cerebrale</b>  | 4  |
| <b>3. Nanotehnologia în gliomele maligne cerebrale</b>  | 5  |
| <b>4. Celulele stem tumorale</b>  | 6  |
| <br>  |    |
| <b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>  |    |
| <b>1. Studiul 1 - Rolul chirurgiei în tratamentul multimodal al gliomelor de grad înalt - argumente în favoarea rezecției totale</b>                                  | 6  |
| <b>2. Studiul 2 - Rezultatele tratamentului multimodal al gliomelor de grad înalt în funcție de vârstă.</b>   | 10 |
| <b>3. Studiul 3 - Rezultatele tratamentului multimodal în gliomele de grad înalt în funcție de rezultatul histopatologic</b>  | 11 |
| <b>4. Studiul 4 - Evaluarea acțiunii temozolomidei încapsulate în nanostructuri de chitosan și polimeri pe linii de celule stem tumorale de glioblastom multiform</b> | 13 |

**Cuvinte cheie:** gliomele maligne, celule stem tumorale, glioblastom, nanoparticule, chitosan

## INTRODUCERE

Tumorile cerebrale maligne continuă să constituie o problemă importantă de diagnostic dar mai ales de tratament.

În țara noastră, incidența tumorilor cerebrale maligne este de 4,3/100 000 locuitori, ele constituind 2% din totalitatea neoplaziilor la adult, contribuind la mortalitatea generală cu 4,65/100 000 locuitori. De asemenea, tumorile cerebrale maligne constituie 3% din totalitatea bolilor sistemului nervos.

După 2005, odată cu apariția studiului multicentric publicat de Stupp și colaboratorii privitor la rolul radioterapiei concomitente cu chimioterapia cu Temozolamidă, rolul chirurgiei, în special în tratamentul glioblastomului multiform a pierdut considerabil din interes. În ultimii ani tot mai multe publicații din diferite centre neurochirurgicale readuc în discuție rolul important al chirurgiei și mai ales al ablației complete în prelungirea duratei medii de supraviețuire în cazul gliomelor maligne cerebrale[i].Evoluția strategiilor terapeutice noi în tratamentul tumorilor cerebrale se bazează pe o mai bună înțelegere a aspectelor neurobiologice. În ultimii ani, în ciuda diversificării tratamentului, morbiditatea și mortalitatea prin tumori maligne cerebrale a rămas ridicată, motiv pentru care au fost încercate noi metode de tratament (imunoterapia, terapia genică, sensibilizatori pentru radioterapie și chimioterapie, nanotehnologie etc.).

Descoperirea celulelor stem neurale tumorale a schimbat viziunea asupra originii tumorilor cerebrale și a deschis perspectiva dezvoltării unei noi căi inovative de abordare a terapiilor antitumorale.

Scopul prezentei lucrări este evaluarea rezultatelor tratamentului multimodal în gliomale maligne cerebrale și identificarea de noi compuși cu acțiune antitumorală, prin testarea unor noi clase de structuri in vitro, pe culturile celulare de glioblastom multiform (nanoparticule).

Realizarea lucrării s-a făcut cu ajutorul colectivului clinicii de Neurochirurgie, al laboratorului Institutului Oncologic din Cluj Napoca și Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare a Tehnologiilor Izotopice și Moleculare din Cluj-Napoca.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### 1. Gliomale maligne cerebrale

Gliomale maligne cerebrale sunt cele mai frecvente tumori ale sistemului nervos central.

Reprezintă 1,3% din toate cancerule diagnosticate și cca 2% din decesele din S.U.A.. Pot apare la orice vârstă, dar media de vârstă este de 62 ani. Sexul masculin este mai afectat decât cel feminin.

Conform Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon, 2000 principalele clase de gliomale maligne cerebrale sunt:

Glioblastomul multiform (GBM)

Astrocitomul anaplastic (AA)

Oligodendrogliomul anaplazic (ODA)  
 Ependimomul anaplazic (EA)  
 Oligoastrocitomul anaplazic (OAA)  
 Glioblastomul cu celule gigante  
 Gliosarcomul  
 Gliomatosis cerebri

## 2. Tratamentul multimodal standard în gliomele maligne cerebrale.

**Tratamentul astocitomului anaplazic** este multimodal cuprinzând chirurgie, radioterapie și chimioterapie adjuvantă cu temozolomidă. Datorită caracterului agresiv al acestor astrocitoame se preferă practicarea ablației tumorale. Ablația tumorală totală crește supraviețuirea medie a pacienților comparativ cu rezecția subtotală. Postoperator la majoritatea pacienților se constată o îmbunătățire a performanțelor neurologice și a simptomatologiei.

Aceste tumori răspund mai bine la tratamentul chimioterapic comparativ cu glioblastomul multiform [5,6]. Pentru astrocitoamele anaplazice recurente tratate anterior cu nitrozuree, temozolomida a determinat o rată de răspuns de 35%, și, comparativ cu terapiile cu rată de răspuns mai scăzută, temozolomida a crescut rata de supraviețuire la 6 luni (46% comparativ cu 31%). Unele beneficii mai modeste în ceea ce privește supraviețuirea au fost demonstrate prin folosirea BCNU ca tratament adjuvant .

**Tratamentul glioblastomului multiform** poate cuprinde o gamă largă de metode: biopsierea tumorală pentru examenul histopatologic, ablația tumorală, radioterapia și chimioterapia. În perioada preoperatorie tratamentul se îndreaptă către combaterea hipertensiunii intracraniene, a hiponatremiei, a crizelor epileptice și corticoterapia preoperatorie. O rezecție largă a glioblastomului asigură o îmbunătățire a calității, duratei supraviețuirii și o îmbunătățire din punct de vedere neurologic, dar oricât de agresivă este intervenția operatorie, chiar și în cazul hemiemisfectoriei, nu se obține o vindecare .

Glioblastoamele infiltrează rapid și distrug arhitectura tisulară normală, făcând rezecția chirurgicală totală imposibilă. În prezent intervențiile chirurgicale beneficiază de importante avantaje tehnologice care au contribuit la scăderea complicațiilor postoperatorii: rezonanță magnetică în secvență de difuzie preoperatorie pentru a evidenția modificarea tracturilor cortico-spinale de către tumoră, stimularea electrică directă corticală și subcorticală, ultrasonografia intraoperatorie microneurochirurgia, neuronavigație, stereotaxie etc. Deficitul neurologic postoperator se întâlnește la aproximativ 8% din tumorile operate.

Radioterapia este folosită pentru efectul ei citotoxic prin afectarea enzimelor celulare și a materialului genetic. Studiile din literatură demonstrează creșterea netă a supraviețuirii la pacienții la care s-a efectuat radioterapie postoperatorie comparativ cu cei la care s-a efectuat doar intervenție chirurgicală sau doar radioterapie. Postradioterapie poate apare o agravare a stării neurologice datorate edemului cerebral în primele 2 săptămâni de la tratament, demielinizarea subacută ce apare după 6-12 săptămâni de la tratament sau necrozele cerebrale ce apar după 4 -40 luni de la tratament.

Chimioterapia cu temozolomidă a demonstrat o creștere a supraviețuirii și a intrat în terapia standard a pacienților diagnosticați cu glioblastom multiform. Temozolomida se administrează oral și se absoarbe rapid și complet. Studiile clinice și de laborator demonstrează capacitatea de a traversa bariera hematoencefalică. O cantitate semnificativă (peste 30%) intră rapid în LCR, dar are un timp de înjumătățire scurt ceea ce impune administrarea frecventă .

O bună calitate a supraviețuirii celor cu glioblastom multiform depinde de: vârsta (sub 45 ani), durata între debutul simptomatologiei și operație (mai mare de 6 luni), debutul cu crize comițiale și nu cu alterarea stării de conștiență, localizarea frontală a tumorii și un status neurologic bun preoperator. Pentru un prognostic bun este nevoie și de o rezecție tumorală largă, dacă se poate totală. La pacienții la care s-a practicat ablarea totală supraviețuirea este mai bună comparativ cu cei la care s-a practicat ablarea subtotală.

Deși rămân paleative, terapiile curente cresc calitatea vieții pacientului. Fără tratament, glioblastomul multiform duce la deces în aproximativ 3 luni. Pacienții la care se aplică tratamentul multimodal (chirurgie, radioterapie, chimioterapie) au o supraviețuire medie de aproximativ 12 luni, mai puțin de 25% supraviețuind până la 2 ani respectiv 10% la 5 ani. Rămâne un subiect controversat dacă prognosticul pacienților cu glioblastom secundar este mai bun sau similar cu cel al pacienților cu glioblastom primar.

**Tratamentul multimodal al oligodendrogliomului anaplastic** cuprinde chirurgie, radioterapie și chimioterapie. Având în vedere frecvența crescută a crizelor convulsive, terapia anticonvulsivantă este recomandată imediat ce pacientul este diagnosticat cu această patologie. Rezecția chirurgicală este primul și cel mai important tratament al oligodendrogliomelor maligne. Gradul rezecției tumorale depinde de localizarea tumorii și apropierea ei de zonele elocvente ale creierului. Rolul chimioterapiei în tratamentul oligodendrogliomelor a fost stabilit de mai multe studii. Se utilizează o combinație de procarbazine, lomustină (CCNU) și vincristină (PCV). Studiile asupra temozolomidei folosite ca a doua linie de chimioterapie în cazul oligodendrogliomului recurent au arătat o rată de răspuns de 25%. Studiile EORTC care au evaluat temozolomida ca prima linie de chimioterapie la pacienții cu tumori oligodendrogliale recurente au evidențiat o rată de răspuns de 54%, 39% dintre pacienți prezentând interval liber de boală la 12 luni.

**Tratamentul ependimomului anaplastic** are ca scop rezecția tumorală cât mai completă, fără a determina apariția unor noi deficite neurologice datorate actului chirurgical urmat de radioterapie. În cazul în care invazia planșeului ventriculului IV este extinsă, ablarea totală nu este posibilă. Radioterapia se realizează după rezecția chirurgicală (supraviețuirea medie de a fost cu 2 ani mai mare la pacienții care au beneficiat de radioterapie în postoperator). Se administrează 45-48Gy la nivelul rezecției tumorale (pentru recurențe se poate suplimenta radioterapia cu 15-20 Gy). Iradierea axului spinal în cazul metastazelor spinale sau citologie LCR pozitivă pentru celule tumorale se face cu doze mai mici (în medie 30 Gy). Radioterapia profilactică la acest nivel este controversată. Utilitatea agenților chimioterapici este insuficient documentată în tratamentul ependimomului anaplastic.

Tratamentul tumorilor gliale mixte de grad înalt este multimodal. Oligoastocitoamele, în comparație cu oligodendrogliomele răspund mai puțin favorabil la tratamentul chimioterapie, probabil datorită componenței astrocitare.

Viitorul tratamentului multimodal în gliomele maligne cerebrale constă într-o mai bună înțelegere a tumorii la nivel genetic și molecular cu dezvoltarea unor terapii individualizate pentru fiecare caz în parte. Tratamentul urmează să fie completat, diversificat, eficientizat, individualizat pentru fiecare tip de tumoră și apoi eventual pentru fiecare pacient în parte, pentru a oferi o rată de supraviețuire cât mai ridicată.

### 3. Nanotehnologia în gliomele maligne cerebrale

Nanotehnologia este un termen colectiv pentru dezvoltările tehnologice la scară nanometrică (1nm=10<sup>-9</sup>m). Nanobiotehnologia este utilă atât în domeniul metodelor de diagnostic cât și al tratamentului în GBM.

Îmbunătățirea tratamentului GBM se bazează pe o mai bună înțelegere a tumorii la nivel molecular. Nanotehnologia va juca un rol important în acest domeniu. Nanoparticulele sunt utile în diagnosticul precoce, în transportul chimioterapicelor intracelular și reprezintă o bună alternativă pentru vectori virali în terapia genică din GBM.

#### 4. Celulele stem tumorale

Este bine cunoscut faptul că medicina modernă abundă în studii privind posibilitatea vindecării anumitor boli (diabet, boala Parkinson, boala Chron, boli genetice) cu ajutorul celulelor stem. Acestea sunt celule nediferențiate, care se divid prin mitoză, transformându-se astfel în celule înalt specializate, ce pot alcătui orice țesut sau organ din corp. Proprietatea lor fundamentală este aceea de auto-reînnoire, ce le permite să formeze mai multe celule stem identice, care apoi se diferențiază.

Celule stem multipotente, progenitoare cu capacitate de auto-reînnoire a descrise în zona subventriculară a creierului

În anul 1997 apare și dovada existenței celulelor stem canceroase (CSC), utilizând celule leucemice s-a reușit izolarea unei subpopulații de “celule tumorale ce au proprietățile celulelor stem”, Ulterior, un grup de oameni de știință conduși de Luis F. Parada publica un studiu afirmând că celulele canceroase pot proveni din diferențierea celulelor stem. Studiile lui Parada și colegii săi s-au efectuat pe animalele de laborator cărora le-a fost indus glioblastomul multiform. În tumorile cerebrale, celulele stem canceroase se găsesc în procent de 1% până la 30% și, conform datelor publicate în literatura de specialitate, prezintă proprietăți similare celulelor stem neurale (Beier et al. 2007). În prezent, markerii de suprafață ai celulelor stem canceroase au fost identificați în numeroase tipuri de cancere.

Conform teoriei moderne, transformarea malignă a celulei normale în celulă canceroasă se petrece la nivelul celulelor stem existente în țesutul adult. În pofida cercetărilor intense din ultima perioadă, originea exactă a celulelor stem canceroase (CSC) rămâne necunoscută.

Noile descoperiri pot schimba radical modul de tratare a cancerului, întrucât nu mai este suficientă cunoșterea volumului tumorii pentru o terapie eficientă. Scopul devine determinarea gradului în care celulele stem tumorale din țesutul canceros sunt afectate de terapia respectivă.

### CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

#### **Studiu 1. Rolul chirurgiei în tratamentul multimodal al gliomelor de grad înalt – argumente în favoarea rezecției totale**

Într-un studiu EORTC recent s-a arătat că în ceea ce privește supraviețuirea, chirurgia nu pare să aibă nici un rol prognostic. Ultimele studii axate pe rolul chirurgiei au arătat prelungirea mediei de supraviețuire la doi ani.

Acesta lucrare este un studiu retrospectiv realizat asupra gliomelor maligne operate în 12 ani între 01.01.2000 și 31.12.2011 în secția de neurochirurgie Cluj-Napoca. Pacienții luați în studiu au fost adulți și copii cu vârsta cuprinsă între 6 și 82 ani în momentul diagnosticului de gliom malign. Toate tumorile au fost operate și scopul inițial al operației a fost rezecția macroscopică în totalitate a tumorii. Gradul rezecției a fost raportat de către neurochirurg ca fiind parțială sau totală. Tumorile au fost din punct de vedere histologic

glioame de grad înalt. Date privind evoluția pe termen lung (supraviețuirea la 12,18 și 24 luni) au fost disponibile pentru 312 de pacienți.

Au fost utilizate următoarele metode statistice pentru descrierea grupului:

1. descriptiv: valoarea de distribuție (medie  $\pm$ deviația standard), interval de încredere, valorile min /max, în tabele de contingență și frecvență.

2. analitic: analiza supraviețuirii și intervalul de boală în funcție de vârstă, tipul histopatologic de diagnostic, procedura chirurgicală, gradul rezecției, protocol terapeutic (aplicate în cadrul IOCN sau în teritoriu) prin metoda Kaplan-Meier și evaluarea existenței unei diferențe de supraviețuire între grupurile luate în studiu prin testul log-rank.

Grupul de 312 de pacienți a fost divizat pentru analiza timpului de supraviețuire de la intervenție chirurgicală la 12, 18 și 24 luni după cum urmează:

- pentru observarea intervalul boală la 12 luni toți cei 312 de pacienți au fost incluși
- pentru observarea bolii la 18 și 24 luni au fost incluși 260 de pacienți (pacienții operați în 2010, fiind excluși).

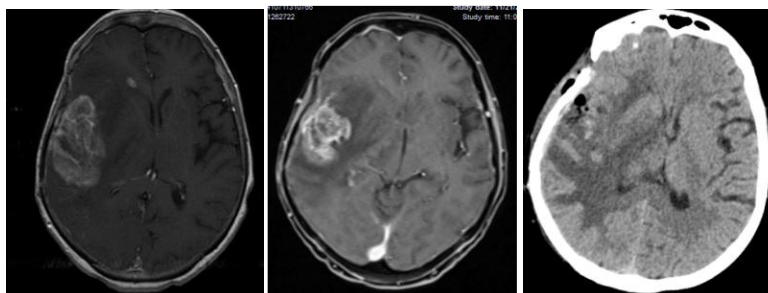
## Rezultate

În perioada 1 ianuarie 2000-31 decembrie 2012 au fost operate un număr de 597 de cazuri de glioame maligne. Din totalul tumorilor cerebrale operate în această perioadă (3004 cazuri) glioamele maligne reprezintă 23,26%. Distribuția temporală a cazurilor a fost variabilă, peak-ul înregistrându-se în anul 2008 (79 cazuri dintr-un total de 218 tumori operate).

Din punct de vedere histopatologic glioblastomul multiform a fost diagnosticat în cele mai multe cazuri 393 (66%), urmat de astocitomu anaplazic 152 (26%). Oligodendrogliomul malign și ependimomul anaplazic au fost întâlnite într-un procent de 5% (35 cazuri), respectiv 3% (17 cazuri).

Cel mai frecvent simptom al pacienților în momentul internării a fost hipertensiunea intracraniană (78%) urmat de deficitele motorii (43%), crizele comițiale (18,9%) și afazia (11,5%).

Intervalul dintre debutul simptomelor și internarea în Clinica de Neurochirurgie Cluj-Napoca a fost pentru majoritatea cazurilor de o lună (39%). O evoluție a simptomatologiei mai lungă de 6 luni s-a întâlnit la 12% din cazuri.



**Examen RMN preoperator și examen CT postoperator pentru un glioblastom multiform temporo-insular drept**

Rata globală de supraviețuire 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.

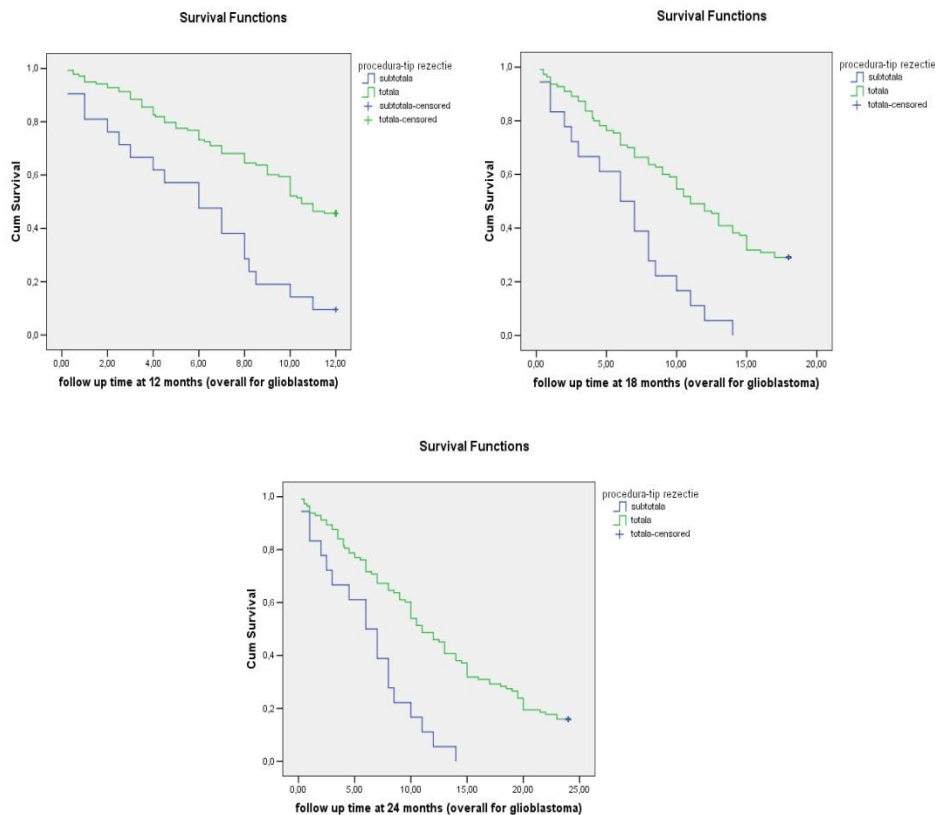
Vârsta și tipul de rezecție sunt factori care influențează supraviețuirea la 12, 18 și 24 luni. Diagnosticul histopatologic influențează supraviețuirea la 24 luni

Din totalul de 312 de cazuri, ablația macroscopic totală s-a realizat la 268 de pacienți în timp ce rezecția parțială a tumorilor s-a realizat în 44 din cazuri. A existat o diferență semnificativă în ceea ce privește supraviețuirea în cazul tipului de rezecție.

La 12 luni de urmărire, media supraviețuirii a fost de 9,2 luni la pacienții la care rezecția tumorală a fost totală, cu un interval de confidență cuprins între 8,7 și 9,7. La pacienții cu ablație tumorală subtotală media supraviețuirii a fost de 6,4 luni, cu un interval de confidență 95% de la 5,2 la 7,7.

Când urmărirea s-a realizat la 18 luni, media supraviețuirii la pacienții cu ablație tumorală totală a fost de 11,5 luni (cu un interval de confidență de 95% de la 11,1 la 13,8), semnificativ mai mare decât media supraviețuirii la pacienții din al 2-lea lot (7,1 luni, cu un interval de confidență de la 4,3 la 7,6,  $p < 0,005$ )

Urmărirea supraviețuirii la 24 luni a evidențiat de asemenea o diferență statistic semnificativă în ceea ce privește supraviețuirea la cele 2 loturi ( $p < 0,005$ ). Media supraviețuirii a fost la primul lot de 12,6 luni, comparativ cu 7,5 luni la cei din al 2-lea lot



Graficele supraviețuirii la 12, 18 și 24 luni, în funcție de tipul de intervenție chirurgicală pentru lotul glioblastom multiform



## Discuții

Majoritatea datelor din literatura studiată sunt în favoarea tratamentului citoreductiv.

În studiul nostru retrospectiv de 312 de cazuri, care au întrunit criteriile de includere pentru monitorizare statistică la 12, 18 și 24 de luni, datele obținute, susțin deasemenea, chirurgia citoreductivă în scopul de a prelungi supraviețuirea pacienților cu gliome maligne. În acest studiu sunt comparate rezecția totală și subtotală.

La monitorizarea la 12 luni, supraviețuirea a fost de 9,2 luni la pacienții cu GTR, cu un interval de încredere între 8,7 și 9,7, în timp ce în grupul cu STR media de supraviețuire a fost de 6,4 luni, cu un interval de încredere de 95%, de la 5,2 la 7,7.

Rezultate similare se găsesc la monitorizarea la 18 luni, supraviețuirea pentru pacienți cu GTR a fost de 11.5 luni (cu un interval de încredere de 95% de la 10,7 la 12,4), semnificativ mai mare decât supraviețuirea pentru grupul STR (7,1 luni, cu un interval de încredere de la 5,5 la 8,7,  $p < 0,005$ ).

Monitorizarea supraviețuirii la 24 de luni a evidențiat, de asemenea, o diferență semnificativă între grupurile GTR și STR ( $p < 0,005$ ). Supraviețuirea la grupul GTR a fost de 12,6 luni, comparativ cu 7,5 luni pentru grupul STR. După cum se observă, diferența crește de la aproape trei luni pentru prima perioadă de monitorizare (12 luni) până la 5 luni la monitorizarea de la 24 luni. O diferență medie de supraviețuire de la trei luni la cinci luni între GTR și STR reprezintă în opinia noastră argumente în favoarea citoreducției maxime tumorale.

Rezultatele noastre, le considerăm încadrabile ca și studiu faza III. Imposibilitatea de a demonstra prelungirea supraviețuirii printr-un studiu faza I nu trebuie să se împiedice realizarea unei rezecții complete având în vedere și beneficiile îndepărtării totale a tumorii.

Singurul mod de a controla cu succes și speranța pentru vindecarea în viitor a gliomelor maligne recurente este combinarea chimioterapiei standard, cu noi metode ca și imunoterapia. În ciuda îmbunătățirii metodelor de tratament actuale, trebuie înțeles faptul că în gliomelor maligne există mecanisme pe care nu le înțelegem responsabile de rezistența la tratamentul actual. Astfel utilizarea de droguri care au ca țintă elemente celulare la nivel molecular (terapia moleculară) care ar putea inhiba eficient sau cel puțin încetini proliferarea celulelor stem tumorale este viitorul în tratamentul gliomelor maligne agresive [**Error! Bookmark not defined.**]. Numai prin înțelegerea în continuare a biologiei de gliomelor maligne putem spera să fie găsit un tratament și mai eficient în viitor.

## Concluzii

Revizuirea literaturii de specialitate sugerează că rezecția totală pentru pacienții cu gliome maligne poate îmbunătăți supraviețuirea și calitatea vieții. Diferite studii arată că rezultatele postoperatorii precoce și pe termen lung după rezecția chirurgicală radicală sunt mai bune decât rezultatele pentru rezecția parțială sau biopsia simplă din punct de vedere a stării neurologice și duratei de supraviețuire.

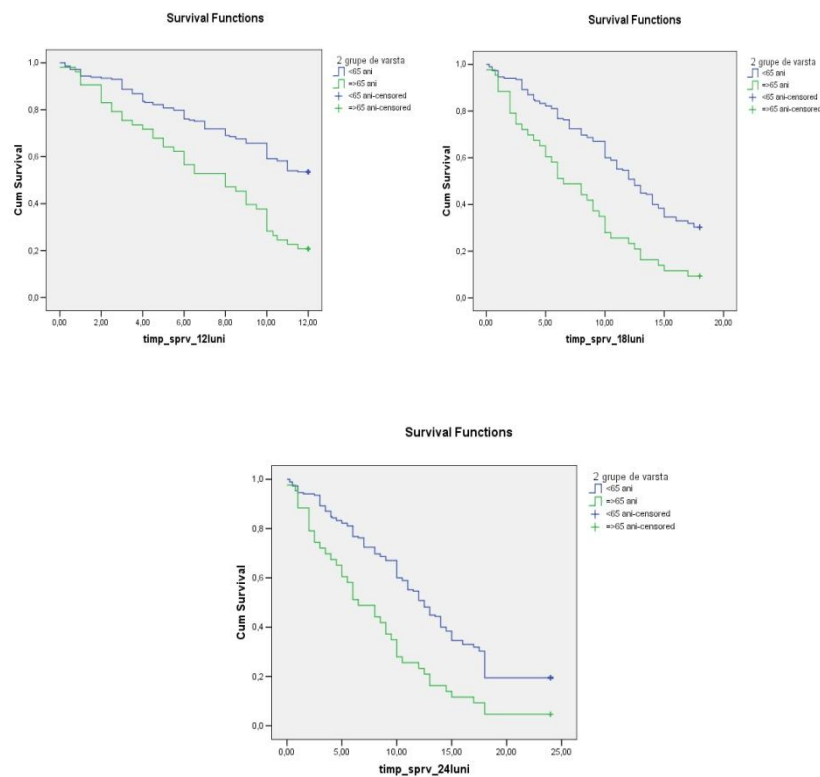
Studiul nostru oferă un nou argument în favoarea rezecției totale. Am arătat că intervențiile chirurgicale radicale îmbunătățesc supraviețuirea globală iar rezecția totală ar trebui să fie considerată ori de câte ori este posibil. Rezecția totală în cazul recidivelor tumorale nu modifică semnificativ supraviețuirea globală comparativ cu rezecția parțială, dar ameliorarea calității vieții prin scăderea presiunii intracraniene este de luat în considerare în acest caz.

## Studiu 2. Rezultatele tratamentului multimodal al gliomelor de grad înalt în funcție de vârstă.

### 2.3. Rezultate

Cei 312 de pacienți (207 cu glioblastom) au fost împărțiți în 2 loturi și anume un lot cu pacienți cu vârsta sub 65 ani și alt lot de pacienți cu vârsta peste 65 ani. Primul lot a fost alcătuit din 249 pacienți (160 cu glioblastom) iar în al-2 lea lot s-au regăsit 63 (47 cu glioblastom). Cele mai multe cazuri de gliome maligne s-au înregistrat în decada 50-59 ani, iar sexul masculin a fost mai frecvent interesat.

Cele 2 loturi și anume cu pacienți cu vârsta sub 65 ani alcătuit din 249 pacienți și cei cu vârsta peste 65 ani cu 63 pacienți au fost urmărite în ceea ce privește supraviețuirea la 12, 18 și 24 luni. În toate situațiile s-a găsit o asociere statistic semnificativă între vârstă și supraviețuire. Pacienții mai tineri au avut o supraviețuire mai bună comparativ cu persoanele peste 65 ani.



Grafic de supraviețuire la 12, 18 și 24 luni în funcție de vârstă

### Discuții și concluzii

În cel mai recent studiu a lui Chaichana (2010) s-a constatat că pacienții care au suferit rezecții chirurgicale au avut o supraviețuire medie de 5,7 luni, în timp ce pacienții care au beneficiat de biopsie

stereotactică au avut o supraviețuire medie de 4,0 luni fără creșterea morbidității sau mortalității postoperatorii .

Suntem în favoarea rezecției complete și în cazul pacienților vârstnici (peste 65 ani) chiar dacă supraviețuirea medie în cazul lor este mai mică decât în cazul pacienților tineri. Pe de altă parte, la grupa de vârstă sub 65 ani supraviețuirea medie a fost de 9,3 luni (cu minima 8,802 și maxima 9,797) iar în grupul de peste 65 de ani supraviețuirea medie a fost de 7,1 luni cu minima 6,113 și maxima 8,228. Diferența a fost însă semnificativă la monitorizarea de 18 luni, cu o diferență a supraviețuirii medii de 4 luni, în favoarea grupului mai tânăr ( 11,7 vs 7,7 luni ), diferență care este deasemenea menținută la monitorizarea la 24 de luni ( 12,8 comparativ cu 8,0 luni ) . În ciuda faptului că am comparat doar pacienții cu GTR și STR, fără pacienții cu biopsie stereotactică, dar luând în considerare datele recente furnizate de studiul lui Chaichana, putem concluziona că rezecția maximală este recomandată și la pacienții vârstnici, menționând că mortalitatea este mai mare în grupul de pacienți de peste 65 de ani.

Suntem în favoarea rezecției complete și în cazul pacienților vârstnici (peste 65 ani) chiar dacă supraviețuirea medie în cazul lor este mai mică decât în cazul pacienților tineri.

### **Concluzii**

Datele strânse din literatură și rezultatele studiului nostru arată că supraviețuirea în cazul gliomelor maligne cerebrale este mai scăzută la pacienții vârstnici (peste 65 de ani ) comparativ cu cei tineri (sub 65 ani). Cu toate acestea suntem de părere că rezecția chirurgicală maximală și chiar tratamentul multimodal complet este de ales ori de câte ori este posibil (pacienți cu IK >70, fără comorbidități importante).

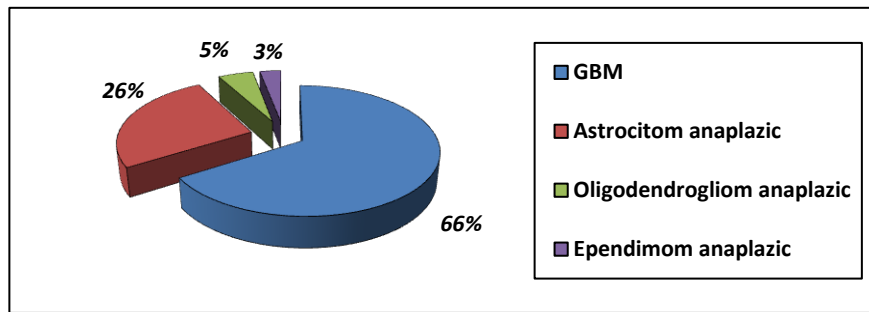
## **Studiu 3. Rezultatele tratamentului multimodal în gliomele de grad înalt în funcție de rezultatul histopatologic**

### **Rezultate**

Astrocitomul anaplastic a fost diagnosticat în 152 de cazuri (26% din totalul gliomelor maligne. Cu o netă preponderență a sexului masculin (60,9%) și un vârf de incidență în decada 40-49 ani, la acești pacienți ablarea macroscopică totală a fost realizată în 84% din cazuri. Interesarea unui lob s-a produs în 61,4 % iar în 30,1 % din cazuri localizarea a fost multilobară. Localizările la nivelul fosei posterioare precum și cea intraventriculară s-au întâlnit la 6% respectiv 2,5%.

Pentru GBM localizarea unilobară a fost preponderentă (58,6%), glioblastomul multiform cu interesarea mai multor lobi fiind întâlnit în 36,8% din cazuri. S-au mai descris localizări la nivelul corpului calos (1,8%), fosa posterioară (1,4%) și ventriculi (1,4%). Sexul masculin a fost mai frecvent interesat (52,60%) iar rezecția totală a fost posibilă în 89% din cazuri

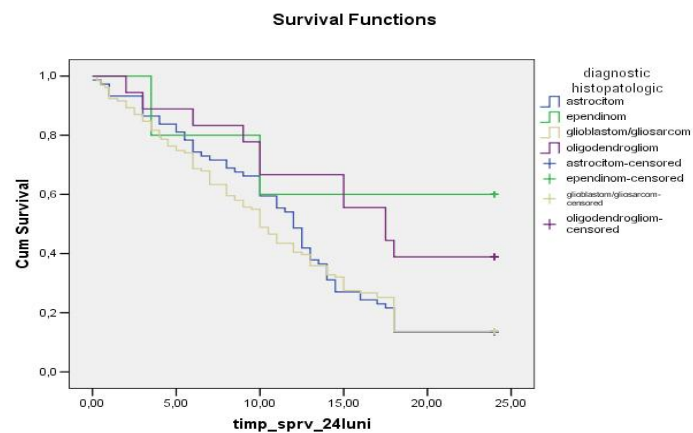
Oligodendrogliomul și ependimomul anaplastic s-au întâlnit în 5% respectiv 3% din cazuri. În ambele situații preponderența a fost a sexului masculin iar decada de vârstă cel mai frecvent afectată a fost a cincea. Pentru oligodendrogliom și ependimom anaplastic ablarea macroscopică totală s-a realizat în marea majoritate a cazurilor (85% pentru oligodendrogliomul anaplastic și 81% pentru ependimomul anaplastic



Distribuția după diagnosticul histopatologic

Nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește supraviețuirea pacienților din punct de vedere al diagnosticului histopatologic atunci când urmărirea s-a făcut la 12 și 18 luni. ( $p=0,09$  respectiv  $p=0,122$ ).

Pentru supraviețuirea la 24 luni, media supraviețuirii la pacienți diagnosticați cu glioblastom multiform a fost de 11,2 luni, la cei cu astrocitom anaplazic a fost de 11,9 luni. Pacienții cu oligoastrocitom malign au supraviețuit în medie 16,1 luni (cu un interval de încredere 95% între 11,3 și 22,6) iar cei cu ependimom malign 17,1 ( $p=0,031$ ).



Graficul supraviețuirii la 24 luni în funcție de diagnosticul histopatologic.

## Discuții și Concluzii

În ceea ce privește rezultatele histopatologice studiului nostru arată că nu există o diferență semnificativă statistic pentru monitorizarea la 12 și 18 luni ( $p = 0,09$ , respectiv  $p = 0,122$ ). Pentru grupul supravegheat la 24 de luni, pentru pacienții diagnosticați cu glioblastom multiform supraviețuirea medie fost de 11,2 luni, pentru cei cu astrocitom anaplazic a fost 11,9 luni. Cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul ependimoamelor anaplazice și oligodendrogliomelor anaplazice, pacienții cu oligodendrogliom malign au supraviețuit aproximativ 16,1 luni (cu un interval de încredere de 95% între 12,6 și 19,6) iar cei cu ependimom malign 17,1 luni ( $p = 0,031$ ). Având în vedere că pentru cele patru tipuri histologice rezecția totală s-a realizat în proporții apropiate (între 81-89%) supraviețuirea în funcție de tipul histopatologic este influențată de agresivitatea tumorii.

Cele mai bune rezultate în ceea ce privește supraviețuirea în gliomele maligne cerebrale este înregistrată în cazul oligodendrogliomelor și ependimoamelor anaplazice.

Viitorul tratamentului multimodal în gliomele maligne cerebrale constă într-o mai bună cunoaștere a tumorii la nivel genetic și molecular cu dezvoltarea unor terapii individualizate pentru fiecare caz în parte.

## Studiul 4. Evaluarea acțiunii temozolomidei încapsulate în nanostructuri de chitosan și polimeri pe linii de celule stem tumorale de glioblastom multiform

### Introducere

Glioblastomul multiform (GBM) rămâne una dintre bolile cele mai devastatoare cunoscute de om și afectează mai mult de 17000 de pacienți în Statele Unite în pace în fiecare an. Această tumoră malignă infiltrază rapid creierului și face rezecția neurochirurgicală completă aproape imposibilă.

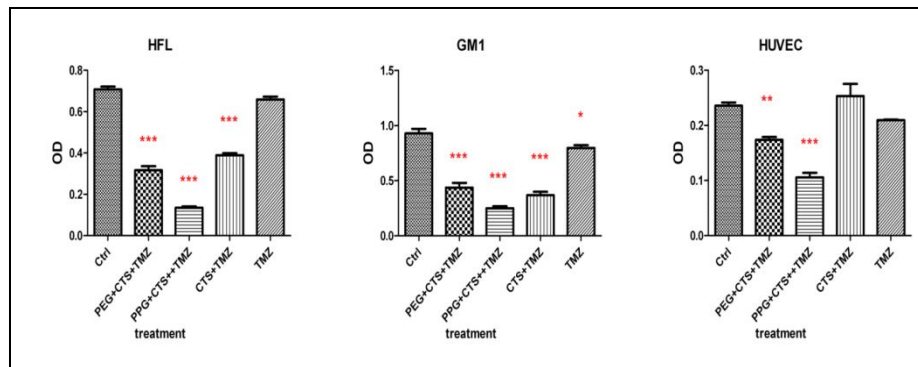
### Material și metodă

La Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare a Tehnologiilor Izotopice și Moleculare din Cluj-Napoca au fost sintetizate trei tipuri de nanostructuri chitosan - TMZ, TMZ-chitosan-PEG (poli-etilen-glicol), TMZ-chitosan-PPG (polipropilen glicol).

Cele trei linii celulare (GM 1, HFL și HUVEC) după ce a fost numărate sunt însămânțate în plăci cu 96 de godeuri, aproximativ 7500 de celule/ godeu, se suspendă în 200 ml de mediu. După 24 h celulele au fost supuse tratamentului iar după alte 24 ore a fost efectuat testul MTT (testul de măsurare a viabilității celulare).

### Rezultate

În studiul nostru, a existat o diferență importantă între rezultate tratamentului cu TMZ (la aceeași concentrație) și proba de control pe de o parte și cele trei tipuri de nanostructuri studiate (PEG + chitosan + TMZ, TMZ + PPG + chitosan, chitosan + TMZ) pe de altă parte pentru fiecare tip de celule (GM1, HFL și HUVEC)



**Graficul supraviețuirii celulare după chimioterapie pentru cele trei tipuri de linii de celule (o linie de celule stem tumorale de glioblastom multiform – GM1; o linie celulară de fibroblaști normali izolați din plămân – HFL; și o linie celulară de celule endoteliale umane izolate din vena ombilicală – HUVEC) tratate cu cele 3 tipuri de nanostructuri și terapia standard (TMZ). Axa verticală reprezintă densitatea optică (populație de celule rămase) și orizontală axa diferitelor opțiuni terapeutice.**

## Discuții

Celulele stem neurale de la adult se găsesc în zona subgranulară a hipocampului și în regiunea subventriculară a ventriculilor laterali. Celulele stem sunt entități care au capacitatea de a se auto-reînnoi și de a produce linii celulare specializate funcțional, fiind foarte utile în procesele de reparare celulară (neurogeneza).

Eșecul tratamentului glioblastomului multiform a fost atribuită în ultima vreme existenței unei subpopulații de celule canceroase tumorale (CSC), care au capacitatea de a rezista la chimioterapie și radiații ionizante datorită unor proprietăți specifice celulelor stem: elaborarea de proteine anti-apoptotice, exprimare crescută a pompelor ABC, și o capacitate de reparare a ADN-ului remarcabilă [ii, iii, iv]. Terapiile tradiționale, cu agenți alchilanți de tipul temozolomidei și radioterapia, au eficacitate scăzută asupra acestor tipuri de celule. Din acest motiv, au fost încercate o serie de tratamente complexe capabile să prevină dezvoltarea CSC. O combinație de tratament tradițional (chimio și radioterapie) cu implicarea nanotehnologiei ar reprezenta o posibilitate atractivă de transport a chimioterapicului. Mai eficiente și mai puțin toxice, nanostructurile, pe baza proprietăților lor unice electronice, optice, magnetice și structurale pot traversa barierele de protecție ale CSC. Aceste particule au multe avantaje care le recomandă în fața drogurilor administrate clasic. Din cauza dimensiunii lor (nm) și maleabilității, nanoparticulele ajung la celulele canceroase și mai ales la componentele intracelulare (chiar la nivel molecular intracelular), fiind capabile de a menține concentrații mari de droguri în țesuturile țintă. Datorită distribuției lor speciale, nanoparticulele încărcate cu medicament au un risc scăzut de efecte adverse sistemice care apar în mod normal la doze crescute de droguri, menținând în același timp concentrații eficiente la nivel local. Nanoparticulele încărcate cu diferite citostatice pot avea numeroase avantaje suplimentare. Creșterea concentrațiilor de medicamente pot fi de asemenea explicată prin facilitarea pătrunderii particulelor în tumora prin endocitoză, ocolind sistemele de transfer mediate de transporteri (internalizare). Mai mult, creșterea concentrației intracelulare de droguri, prevenind selectarea de celule multirezistente la tratamentul chimioterapic. Un alt punct de vedere foarte important al nanoparticulelor este capacitatea lor de a traversa bariera hemato-encefalică, crescând cantitatea de chimioterapic care ajunge în creier. Cele mai multe medicamente trec parțial bariera hemato-encefalică, dar încorporarea lor în nanoparticule ar putea ajuta trecerea acestora ducând la creșterea concentrației lor la nivel cerebral. Prin urmare, utilizarea nanoparticulelor încărcate cu temozolomida ar putea fi de o importanță capitală pentru tratamentul glioblastomului, tumori agresive, cu un prognostic foarte sumbru, pentru care Temozolomida a fost chimioterapicul cu cel mai bun răspuns clinic.

Testul standard pentru a determina dacă o celulă stem este sau nu o CSC implică studiul lor pe o serie la modelele animale. Markerii de suprafață ai CSC includ următoarele: CD133, aldehyd dehidrogenaza 1 (ALDH1), CD44, și CD24. Efluxul coloranților tip Hoechst sau rodamina, a fost de asemenea utilizat pentru a identifica potențiale CSC. Cu toate acestea, acești markeri nu reușesc să identifice toate CSC ci doar o subpopulație cu activitate clonogenică și carcinogenică crescută. De asemenea, nu toate celulele cu markerii ai fenotipului CSC se comportă ca CSC. Cei mai mulți markeri pentru diferențierea CSC au fost alese pentru ca sunt exprimate și pe celulele stem normale ale anumitor țesuturi și în mod interesant, există o serie de molecule care sunt exprimate în celulele normale și canceroase stem care conduc la manifestă diferit în funcție de mediul local.

Utilizând testul de comparare multiplă Bonferroni, am găsit rezultate semnificative statistic ( $p < 0,05$ ) între CSC (control) și PEG+CTS+TMZ (95% interval de încredere de la 0,3394 la 0,6471), CTR și PPG-CTS-TMZ (95% CI de la 0,5249 la 0,83260), CTR și CTS-TMZ (95% de la 0,4064 la 0,7141). De asemenea există o diferență statistică între PEG+CTS+TMZ și celulele tratate doar cu temozolamidă (TMZ) (95% CI de la -0.5146 la -0.2069), PPG-CTS-TMZ și TzM (95% CI de la -0.7001 la -0.3924), CTS-TMZ și CTR (95% of -0.5816 to -0.2739). Pentru fiecare linie celulară (HFL, HUVEC) există o diferență semnificativ statistic de scădere a populației celulare în urma tratamentelor cu nanostructuri și eșantioanele de celule control sau tratate doar cu temozolamidă. Excepția este cazul CTS-TMZ pe linia celulară HUVEC la care s-a constatat chiar o ușoară creștere a populației celulare comparativ cu CTRL sau celulele tratate doar cu TzM. Eficacitatea nanostructurilor de tipul PEG+CTS+TMZ, PPG-CTS-TMZ, CTS-TMZ în ceea ce privește apoptoza, asupra celulelor stem derivate din glioblastom este mai bună comparative cu temozolomida singură. Când una sau mai multe modificări genetice inițiatore a apărut la nivelul celulei progenitoare, toate celulele fiice prezintă această modificare. Într-un caz particular, este posibil ca o celulă fiică să dobândească nu numai proprietățile celulelor stem, dar și modificări suplimentare care permit gliomului să treacă la pasul următor invazia țesuturilor înconjurătoare. Datorită acestei populații de celule stem derivate din glioblastom apare răspunsul negativ la tratamentele convenționale.

## Concluzii

Există o scădere netă a populației celulare după tratarea lor cu nanostructuri pentru toate cele trei tipuri de celule stem luate în studiu față de celulele tratate doar cu temozolamidă sau eșantionul de celule control.

Rata de scădere a populației de celule a fost mai mare în culturile celulare tumorale (GM1), comparativ cu celulele normale fibroblaste (HFL) sau celule endoteliale (HUVEC). Cel mai bun rezultat din acest punct de vedere a fost obținut în cazul Chitosan-TMZ.

Rezultatele vor trebui confirmate de studii in vivo.

Nanostructuri precum chitosanul, PEG, PPG pot fi utili ca vectori pentru transportul temozolomidei.

Studiul nostru arată o scădere netă a populației celulare după tratarea lor cu nanostructuri. Scăderea populației de celule a fost mai mare în culturile celulare tumorale (GM1), comparativ cu celulele normale fibroblaste (HFL) sau celule endoteliale (HUVEC). Cel mai bun răspuns a fost obținut de chitosan-Tz, având în vedere că un bun agent chimioterapic ar trebui să fie agresiv asupra celulelor tumorale și mai puțin agresiv asupra celulelor normale.

Studiul nostru încearcă să găsească noi medicamente pentru tratamentul glioblastomului. În ciuda terapiei combinate (chirurgie, radioterapie, chimioterapie), în prezent supraviețuirea medie a pacienților este de 10-12 luni. Cheia pentru îmbunătățirea speranței de viață ar putea fi un tratament eficient direcționat,

poate personalizat pentru fiecare caz în parte. Un rol tot mai important vor avea noile metode de tratament, cum ar fi imunoterapia, terapia genică sau nanoterapia. Celulele canceroase sunt structuri foarte complexe biologice care îndeplinesc funcții de la invazie sau metastazare și eliminarea citostaticelor prin membrana celulară. Deși mecanismele exacte trebuie să fie explorate în continuare, nanotehnologia oferă posibilitatea unor noi metode de diagnostic și tratament în cazul glioblastomului . Am arătat că nanostructuri de genul chitosan, și polimeri (PEG sau PPG) pot constitui vectorii pentru temozolomidă (TMZ ), cel mai folosit citostatic în tratamentul GBM. Rezultatele trebuie să fie confirmate de studii in vivo.



UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

DOCTORAL SCHOOL

THESIS ABSTRACT

# Multimodal treatment in malignant brain gliomas

PhD

**Cristian Ionel Abrudan**

PhD coordinator

**Prof. Univ. Dr. Ștefan Florian**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>3</b>  |
| <b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>   |           |
| <b>1. Malignant brain gliomas</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. Standard multimodal therapy in malignant brain gliomas</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3. Nanotechnology in malignant brain glioma</b>  | <b>5</b>  |
| <b>4. Tumor stem cells</b>  | <b>5</b>  |
| <b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>  |           |
| <b>Studiul 1 - Role of surgery in the multimodal treatment of high grade gliomas – pros in favor of total resection</b>             | <b>6</b>  |
| <b>Studiul 2 - Results of multimodal treatment of high grade gliomas based on age.</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Studiul 3 - Results of multimodal treatment of high grade gliomas based on histopathology results</b>                            | <b>11</b> |
| <b>Studiul 4 - Assessment of temozolomide action encapsulated in chitosan and polymer nanostructures on glioblastoma cell lines</b> | <b>12</b> |

**Keywords: malignant brain gliomas, tumor stem cells, glioblastoma, nanoparticles, chitosan**

## INTRODUCTION

Malignant brain tumors continues to be a significant problem for diagnosis and especially treatment. In our country, the incidence of malignant brain tumors is 4.3 / 100 000 population, they accounted for 2% of all malignancies in adults, contributing to overall mortality 4.65 / 100 000 inhabitants. In addition, malignant brain tumors is 3% of all diseases of the nervous system.

After 2005, with the advent of multi-center study published by Stupp et al. regarding the role of radiotherapy with concomitant temozolomide chemotherapy, the role of surgery, especially in the treatment of glioblastoma multiforme lost considerable interest. In recent years an increasing number of publications in various neurosurgical centers bring forward the important role of surgery and especially the complete ablation of extending the average of survival in malignant brain gliomas. Evolution of new therapeutic strategies in the treatment of brain tumors is based on a better understanding of the neurobiological fetures. In recent years, despite diversification of treatment , morbidity and mortality from malignant brain tumors remained high, which is why they have been tried new methods of treatment ( immunotherapy, gene therapy, radiation therapy and chemotherapy sensitizers, nanotechnology , etc.).

After discovery of neural stem cells and tumoral stem cells the origin of brain tumors vision changed and opened up the prospect of developing an innovative new ways to tackle anti-tumor therapies.

The purpose of this paper is assessment of multimodal treatment outcomes in malignant brain gliomas and identification of new antitumoral drugs testing of new classes of structures, in vitro, in cells cultures of glioblastoma multiforme (nanoparticles).

Our study was done with help of Neurosurgery Departement, Laboratory of Oncologic Institute Cluj and the National Institute of Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies Cluj -Napoca .

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

### 1. Malignant brain gliomas

Gliomas are the most common malignant brain tumors of the central nervous system.

Represents 1.3% of all cancers diagnosed and about 2 % of deaths in the U.S.. Can occur at any age, but the average age is 62 years. Males are more affected than women. After Pathology and Genetics of Tumours of Nervous System, World Health Organization Classification of Tumours , IARC Press, Lyon , 2000, the main classes of cerebral malignant gliomas are :

Glioblastoma multiforme (GBM )

Anaplastic astrocytoma (AA )

Anaplastic oligodendroglioma (ODA )

Anaplastic ependymoma ( EA )

Anaplastic oligoastrocytoma (OAA )

Glioblastoma giant cell

Gliosarcoma

Gliomatosis cerebri

## 2. Standard multimodal therapy in malignant brain gliomas .

**Treatment of anaplastic astocitoma** is multimodal including surgery, radiotherapy and adjuvant temozolomide. Due to her aggressive feature the resection of anaplastic astrocytomas is preferred in practice. Total tumor ablation increases the median survival of patients compared with subtotal resection . Postoperatively, for most patients there is a performance improvement and neurological symptoms amelioration.

These tumors respond better to chemotherapy compared with glioblastoma multiforme. For recurrent anaplastic astrocytomas previously treated with nitrosourea , temozlomide have a response rate of 35 % , temozolomide increased survival rate at 6 months ( 46 % versus 31 % ). Some modest benefits in terms of survival was demonstrated using the adjuvant BCNU.

**Treatment of glioblastoma multiforme** may include a variety of methods: tumor biopsy for histopathological examination, tumor resection, radiotherapy and chemotherapy. During preoperative treatment goes to combat intracranial hypertension hyponatraemia, a preoperative seizures and corticosteroids. A large resection of glioblastoma provides an improvement in the quality of life, improved survival and neurologically status, but an aggressive surgical intervention, even in the case hemiemisfectorie, not give a cure.

Glioblastomas infiltrates rapidly and destroy normal tissue architecture, making total surgical resection impossible. Currently surgery receive important technological advantages that have contributed to the decrease postoperative complications: magnetic resonance diffusion sequence to highlight preoperative cortico- spinal tracts modified by tumor, cortical and subcortical direct electrical stimulation, intraoperative ultrasonography, microneurosurgery, neuronavigation, stereotaxis etc. Postoperative neurological deficit occurs in about 8 % of tumors operated.

Radiation therapy is used for its cytotoxic effect by affecting cell enzymes and genetic material. Studies in the literature show a net increase in survival in patients who underwent postoperative radiotherapy compared with those who underwent only surgery or radiotherapy only. Radiation recall may occur due to worsening neurological brain edema during the first 2 weeks of treatment, subacute demyelination occurring 6-12 weeks after treatment and necrosis of brain that appear after 4 -40 months after treatment. Temozolomide chemotherapy showed an increase in survival and became standard therapy for patients diagnosed with glioblastoma multiforme . Temozolomide is administered orally and is rapidly and completely absorbed. Laboratory and clinical studies demonstrating the ability to cross the blood brain barrier. A significant amount( 30% ) falls rapidly in the CSF, but has a short half-life which requires frequent administration.

A good quality of survival of glioblastoma multiforme depends on: age( under 45 years), duration between onset of symptoms and surgery ( more than 6 months) onset seizures and not impaired consciousness, frontal location of the tumor and a good preoperative neurological status. For a good

prognosis a large tumor resection, if possible total is required. In patients who underwent total resection survival is better than those who underwent subtotal resection.

Since the treatment remain palliativ, current therapies improve the quality of life. Without treatment , glioblastoma mutiform lead to death in about three months. Patients with multi-modal treatment (surgery, radiotherapy , chemotherapy ) had a median survival of about 12 months, less than 25 % survival up to two years and 10 % at 5 years. Remains controversial if the prognosis of patients with secondary glioblastoma is better or similar to that of patients with primary glioblastoma.

**Multimodal treatment of anaplastic oligodendroglioma** includes surgery, radiotherapy and chemotherapy. Given the increased frequency of seizures , anticonvulsivant therapy is recommended as soon as the patient is diagnosed with this condition. Surgical resection is the first and most important treatment of malignant oligodendrogliomas . The extent of tumor resection depends on tumor location and its proximity to eloquent areas of the brain. The role of chemotherapy in the treatment oligodendrogliomas was established by several studies. It uses a combination of procarbazine , lomustine ( CCNU ) and vincristine ( PCV ) . Studies of temozolomide used as second-line chemotherapy for recurrent oligodendroglioma showed a response rate of 25 % . EORTC studies that evaluated temozolomide as first-line chemotherapy in patients with recurrent oligodendroglial tumors showed a response rate of 54 % , 39 % of patients having a disease-free interval of 12 months.

**Treatment of anaplastic ependymoma** aims as complete tumor resection, without causing new neurological deficits due to the surgical followed by radiotherapy. When the invasion of the fourth ventricle floor is extended, the total resection is not possible. Radiation therapy is performed after surgical resection ( mean survival was 2 years longer than patients who received postoperative radiotherapy ). Administer 45 - 48Gy to the tumor resection ( for recurrences can supplement radiotherapy 15-20 Gy). Irradiation of spinal metastasis spinal axis or CSF cytology positive for tumor cells is done with lower doses (median 30 Gy ). Prophylactic radiotherapy at this level is controversial. Utility chemotherapeutic agents is poorly documented in the treatment of anaplastic ependymoma. **Treatment of mixed glial tumors** is highly multimodal. Oligoastocytomas compared to oligdendrogliomas respond less favorably to chemotherapy, probably due astrocytic component.

The future of multimodal therapy in malignant brain gliomas is a better understanding of tumor genetic and molecular level with the development of individualized therapies for each case. Treatment must completed, diversified, streamlined, customized for each type of tumor and then eventually for each patient to provide a high. survival rate.

### 3. Nanotechnology in malignant brain gliomas

Nanotechnology is a collective term for nanoscale technological development ( 1nm = 10<sup>-9</sup>m ). Nanobiotehnologia is useful both in methods of diagnosis and treatment of GBM. The nanoparticles useful in the early diagnosis, to transport of chemotherapeutic agents intracellularly and is a good alternative to viral vectors for gene therapy in the GBM .

### 4 . Tumor stem cells

It is well known that modern medicine is replete with studies on the possibility of healing certain diseases (diabetes, Parkinson's disease, Crohn's disease, genetic diseases ) with stem cells. They are undifferentiated cells that divide by mitosis , turning it into highly specialized cells that can form any tissue or organ in the body. Their property is fundamental for self-renewal, allowing them to form several identical stem cells , which then differentiate.

Multipotent stem cells, progenitors with self-renewing capacity described in the subventricular zone of the brain.

In 1997 appears evidence of cancer stem cells (CSC ) using leukemia cells managed to isolate a subpopulation of " tumor cells that have stem cell properties " Subsequently, a group of scientists led by Luis F. Parada publish a study stating that cancer cells may come from stem cell differentiation . Studies by Parada and colleagues have conducted on laboratory animals has been induced glioblastoma multiforme . In brain tumors , cancer stem cells are in a proportion of 1% to 30 % and , according to the published literature , the neural stem cell -like properties ( Beier et al, 2007). At present , surface markers of cancer stem cells have been identified in many types of cancers .

According to modern theory, malignant transformation of normal cells into cancer cells occurs at the level of stem cells exist in adult tissue. Despite intense research in recent years, the exact origin of cancer stem cells (CSC ) remains unknown.

The new findings can radically change the treatment of cancer , since there is not enough to target all tumor volume for an effective therapy . The goal becomes to establish if the tumor stem cells in cancerous tissue are affected by therapy .

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Study 1. Role of surgery in the multimodal treatment of high grade gliomas – pros in favor of total resection**

In the recent EORTC trial surgery seems to have no prognostic role concerning the survival rate. Latest studies are focused on the role of surgery in prolonged median of survival and survival at two years. The purpose of this study is to add some arguments in favour of surgery and especially of the radical surgery in malignant gliomas.

#### **Patients and methods**

This is a retrospective study of a single centre, single surgeon and represents the last 12 years of the senior author. The study is based on 597 cases of high grade cerebral gliomas operated between 01.01.2000 and 31.12.2011. at the Neurosurgical Department of Cluj County Emergency Hospital. 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 hours. The tumours were histological proven high grade gliomas. Data for long term follow up were available for 312 patients.

The following statistic methods have been used for group description:

- Descriptive: the distribution value (mean  $\pm$  standard deviation, confidence interval, min/max values, contingency tables and frequencies.

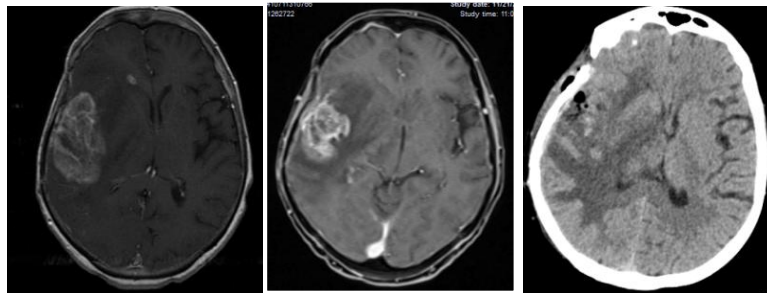
- Analytical: the survival analysis and the disease free interval depending on age, pathological diagnostic, surgical procedure/resection type through Kaplan-Meier method and the evaluation of a difference of survival existence between groups through log-rank test.

The group of 312 patients have been split for the analysis of survival from surgery to 12, 18 and 24 months as it follows:

- for observing the disease free interval at 12 months all the 312 patients were included in the group
- for observing the disease free interval at 18 and 24 months 260 patients were included (patients operated in 2009 have been excluded)

## Results

Between the 1st of January 2000 and the 31st of December 2011, 597 malignant glioma have been operated. From all the cerebral tumour cases operated in this period (3004 cases) malignant gliomas represent 23.26%. In this period the temporal distribution of cases varied, the peaks being present in 2008. The patients were aged between 6 and 82 years old. Most of the malignant glioma cases have been recorded in the fifth decade. From pathological point of view the glioblastoma multiforme was met in most of the cases (66%), followed by anaplastic astrocytoma (26%). The malignant oligodendroglioma and anaplastic ependymoma were met in 5%, 3% respectively. The most frequent symptom of the patients while they were admitted in our hospital was the increased intracranial pressure (ICP) (78%) followed by focal weakness, seizures (18.9%), and aphasia (11.5%). The interval between the debut of symptoms and admission in the hospital was one month for 39% of cases. An evolution of symptoms longer than 6 months has been met for 12% cases.



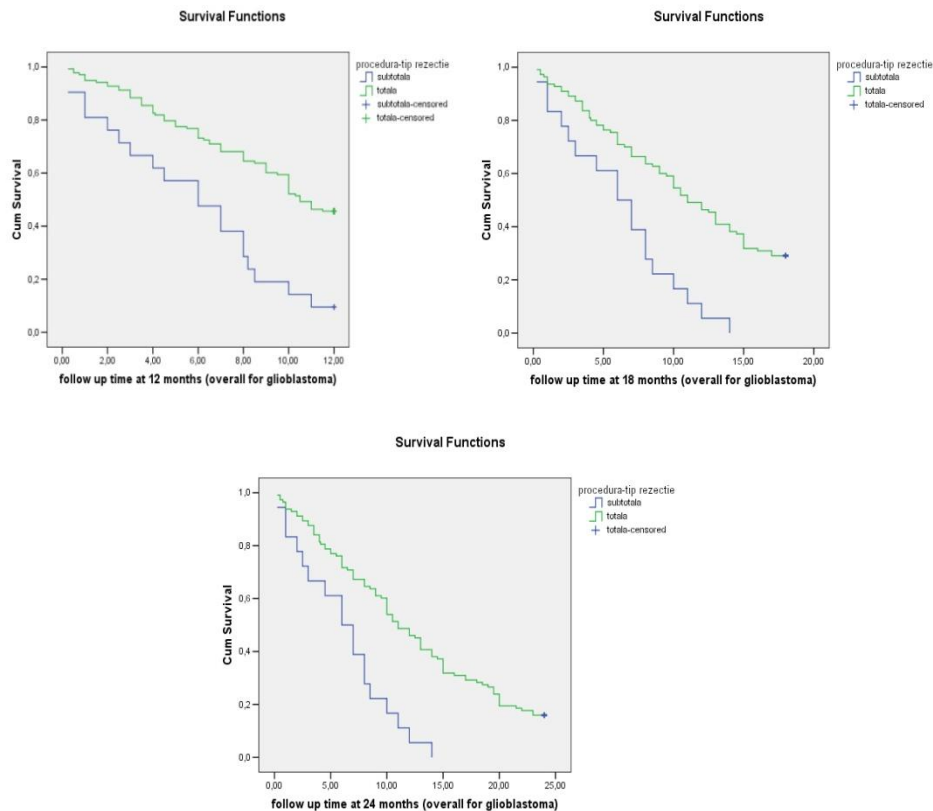
**Fig. Preoperative enhanced MRI and postoperative contrasted CT scan of a temporal and insular GBM**

The global survival rate for 312 patients included in our study was 47 % at 12 months, 26,3% at 18 months and 16,7% at 24 months. The age and type of surgery are prognostic factors that significantly influenced the survival at 12, 18 and 24 months, meanwhile the pathological diagnostic significantly influenced the survival only at 24 months. There has been a significant difference between expected frequencies and the observed ones in resection type that concerns survival.

At 12 months monitoring, the survival was around 9,2 months in patients with GTR, with a confidence interval between 8,7 and 9,7, meanwhile in the STR group the survival mean was 6,4 months, with a confidence interval of 95% from 5,2 to 7,7.

Similar findings are found at 18 months interval monitoring, the survival mean for patients with GTR has been of 11.5 months (with a confidence interval of 95% from 10,7 to 12,4), significantly higher than survival rate for STR group (7,1 months, with confidence from 5,5 to 8,7,  $p < 0,005$ ).

The survival monitoring at 24 months also highlighted a significant difference of survival between GTR and STR groups ( $p < 0,005$ ). The survival mean at GTR group was of 12,6 months, compared to the 7,5 months one for the STR group.



Survival time at 12, 18 and 24 months depending on the type of surgery.

## Discussions

The majority of the reviewed data supports maximal cytoreductive surgery.

In our retrospective study of 266 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. In this study only GTR with STR are compared, based on the senior author intraoperative impression and confirmed on immediate postoperative enhanced CT scan or MRI. Based on postoperative imaging we consider STR any contrasted remnants visible on more than two adjacent slices



from the initial volume of tumour. At 12 months monitoring, the survival was around 9,2 months in patients with GTR, with a confidence interval between 8,7 and 9,7, meanwhile in the STR group the survival mean was of 6,4 months, with a confidence interval of 95% from 5,2 to 7,7. Similar findings are found at 18 months interval monitoring, the survival mean for patients with GTR was of 11.5 months (with a confidence interval of 95% from 10,7 to 12,4), significantly higher than survival rate for STR group (7,1 months, with confidence from 5,5 to 8,7,  $p < 0,005$ ). The survival monitoring at 24 months has also highlighted a significant difference of survival between GTR and STR groups ( $p < 0,005$ ). The survival mean at GTR group was of 12,6 months, comparing to 7,5 months for the STR group. As it is shown, the difference increases from almost three months on the first period of monitoring (12 months) up to 5 months in the 24 months monitoring period. A median survival difference from three months up to five months between GTR and STR represents findings that are consistently in favour of maximal cytoreduction, at least in our opinion. Based on our data we consider our study a class III recommendation.

In our experience we also could document a global improvement of neurological status in more than 85% of the GTR operated cases, with a less than 10% rate of neurological complications, and a mortality rate below 4%, large majority of them being patients with more than 70 years of age.

The only way to successfully control recurrent malignant gliomas and even hope for a cure in the future is by combining standard chemotherapy with immunotherapy. Despite the apparent improvements of current treatments, it should be realized that the characteristic brain tumor niche may provide recurrent gliomas an “escape mechanism” from anticancer treatments. Thus, the use of targeted molecular therapy drugs may effectively inhibit or at least slow down cancer stem cell proliferation and stop the brain microenvironment from allowing furtive invasion and proliferation of highly aggressive malignant gliomas[9]. Only through further understanding of the biology of gliomas can we hope to find a cure in the future.

## **Conclusion**

The review of the literature suggests that gross total resections for patients with malignant gliomas can improve both survival and quality of life. Different studies show that early and long term postoperative outcome after radical surgical resection are better than the results of either partial resection or simple biopsy, in terms of neurological status and duration of survival. Similarly, reoperation for recurrence of glioma offers reasonable extension of quality survival.

Our study provides a new argument in favour of gross total removal. We have shown that radical surgery improves the overall survival and total resection should be considered whenever possible. Total removal for patient with tumour recurrence does not change statistically significant the global survival comparing to partial removal but the quality of life sure benefits from it, by decreasing the intracranial pressure.

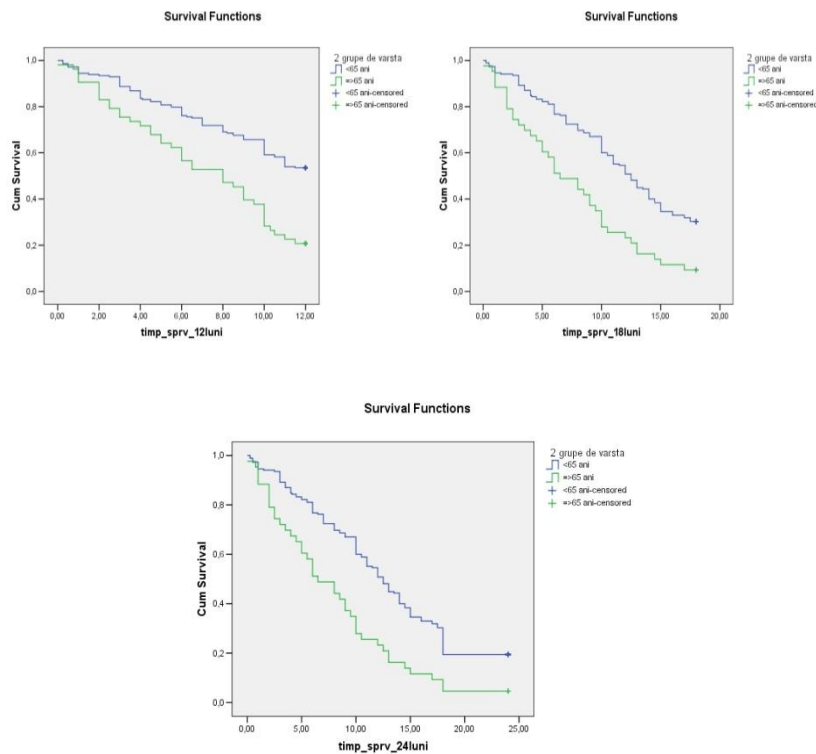
## **Study 2. Results of multimodal treatment of high grade gliomas based on age.**

### **Results**

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. Meanwhile in the under 65 years of age group the mean survival was of 9,3 months (with lower bound at 8,802 and the upper bound at 9,797), in the group over 65 the mean survival was of 7,1 months with the lower bound at 6,113 and the upper bound at 8,228.

The difference was more significant at the 18 months monitoring, with a difference of mean survival of 4 months in favour of the younger group. At the 24 months monitoring the difference was also significant, with a mean of 4,8 months in favour of the patient younger than 65.



Survival graphic at 12, 18 and 24 months depending on age

## Discussions and conclusions

Related to age there are some studies that provide useful data regarding elderly patients, namely those over 65. In the latest study of Chaichana (2010) they found that patients who underwent surgical resection had median survival of 5.7 months, while patients who underwent needle biopsy without resection had median survival of 4.0 months. Although modest in absolute terms, older patients did have significantly prolonged survival with aggressive resection as compared to needle biopsy, without an increase in surgical morbidity or mortality. Their study demonstrates that older patients undergoing aggressive resection did not have an increase in surgical morbidity, and had prolonged survival as compared to matched older patients undergoing needle biopsy. Older patients, as with younger patients, may therefore benefit from aggressive surgical resection, and aggressive resection should be considered for older patients who present with GBM.

We are also in favour of aggressive surgery in patients older than 65, despite the fact that their median of survival is significantly lower than that of the younger patients. Meanwhile in the under 65 years old group the mean survival was 9,3 months (with lower bound at 8,802 and the upper bound at 9,797), in the group

over 65 the mean survival was 7,1 months with the lower bound at 6,113 and the upper bound at 8,228. The difference was more significant at the 18 months monitoring, with a difference of mean survival of 4 months in favour of the younger group (11,7 vs. 7,7 months), difference which is also maintained at the 24 months monitoring (12,8 versus 8,0 month). Despite the fact that we compare only patients with GTR and STR, without Needle biopsy sampling, and considering the recent provided data from the Chaichana's study, we can conclude that maximal cytoreduction surgery is recommendable in the elderly patients, mentioning also the fact that the mortality is higher in the group of patient over 65.

An aggressive cytoreduction is recommendable also in patients over the age of 65.

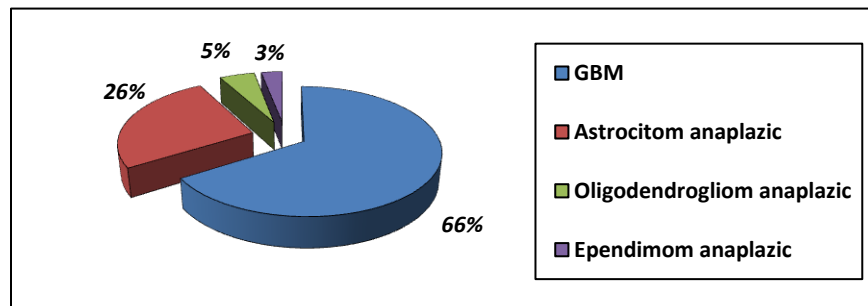
### Study 3. Results of multimodal treatment of high grade gliomas based on histopathology results

#### Results

The anaplastic astrocytoma have been diagnosed in 152 cases (26% of all the malignant glioma). Having males as majority (60,9%) and the peak incidence between 40-49, the total removal has been reached in 84% of the cases. The lobar localization of the tumour was met in 61.4% of the cases, and in 30.1% of the cases it was multilobar. The posterior fossa localisations and the intraventricular one were met at 6%, and 2.5% respectively.

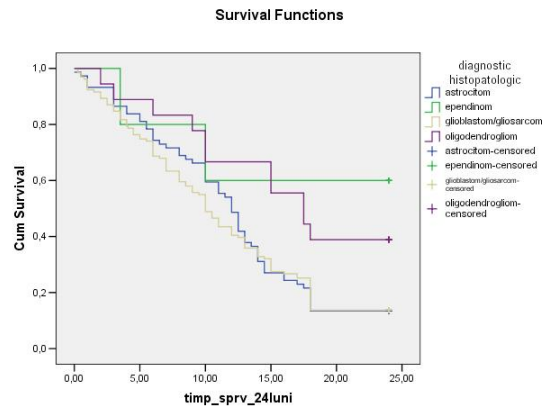
The glioblastoma multiforme was met in 393 cases (66% from all the malignant tumours). The sex distribution has shown a majority of males (52.6%). Unlike the anaplastic astrocytoma the most affected ages were between 50-59. The gross total removal has been obtained in 89% cases. The lobar localization has been considered as majority in this case (58,6%), the glioblastoma multiforme with multilobar localization being met in 36,8% of the cases. There were descriptions of the localizations at the callosal (1,8%) posterior fossa (1,4%) and ventricles (1,4%).

The malignant oligodendrogliomas and anaplastic ependymomas were met in 5% and respectively 3% of cases. In both situations there have been a male majority and the most affected was the fifth decade of life. The total removal was reached in most of cases.



Pathological distribution of malignant gliomas in the present study

Regarding de pathological findings, there is no statistical significant difference at 12 and 18 months monitoring ( $p=0.09$  respectively  $p=0,122$ ). For survival at 24 months, the survival mean for glioblastoma multiforme diagnosed patients was of 11,2 months, for the ones having anaplastic astrocytoma was of 11,9 months. Patients with malignant oligodendrogliomas survived approximately for 16,1 months (with a confidence interval of 95% between 12,6 and 19,6) and the ones with malignant ependymoma for 17,1 months ( $p=0.031$ ).



**Survival functions depending on the pathological findings at 24 mounts monitoring**

## Discussions and conclusion

Concerning the pathological findings, not surprisingly in our study there is no statistical significant difference at 12 and 18 months monitoring ( $p=0.09$  respectively  $p=0,122$ ). For survival at 24 months, the survival mean for glioblastoma multiforme diagnosed patients was 11,2 months, for the ones having anaplastic astrocytoma was 11,9 months. Patients with malignant oligodendrogliomas survived for approximately 16,1 months (with a confidence interval of 95% between 12,6 and 19,6) and the ones with malignant ependymoma 17,1 ( $p=0.031$ ).

The best results in terms of survival in malignant gliomas is recorded for anaplastic oligodendrogliomas and anaplastic ependimomas.

The future of multimodal therapy in malignant gliomas is a better understanding of tumor genetic and molecular features with the development of individualized therapies for each case.

## Study 4. Assessment of temozolomide action encapsulated in chitosan and polymer nanostructures on glioblastoma cell lines

### Introduction

The failure of current approaches to the treatment of malignant gliomas has been attributed to the existence of a sub-population of cancer cells malignant glioma cancer stem cells (CSCs), which have the ability

to withstand chemotherapeutics and ionizing radiation based on certain of their unique properties: high expression of anti-apoptotic proteins, high expression of ABC pumps, and remarkable DNA repair capability.

## Methods

At the National Institute for R & D of Isotopic and Molecular Technologies from Cluj Napoca were synthesized three types of nanostructures chitosan-TMZ, TMZ-chitosan-PEG (poly-ethylene glycol), TMZ-chitosan-PPG (polypropylene glycol).

The three type of cell lines (Glioma-derived stem, HFL-Normal fibroblasts human isolated from lung and endothelial cell line HUVEC-Human Umbilical Vein endothelial cell.) were treated with the 3 types of nanostructures and the survival rate of the cells was compare to standard therapy (TMZ).

We used three cell lines to study the difference between tumor cells and normal cell lines (fibroblasts and endothelial cells).

## Results

In our experiments, there was an important difference between TMZ alone (at the same concentration) and the control sample on the one hand and the three types of nanostructures studied (PEG + chitosan + Tz, Tz + PPG + chitosan, chitosan + Tz) on the other hand for each cell type (Glioma-derived stem, HFL and HUVEC). After cell GM1 treatment with chitosan+TMZ autophagic cells were observed.

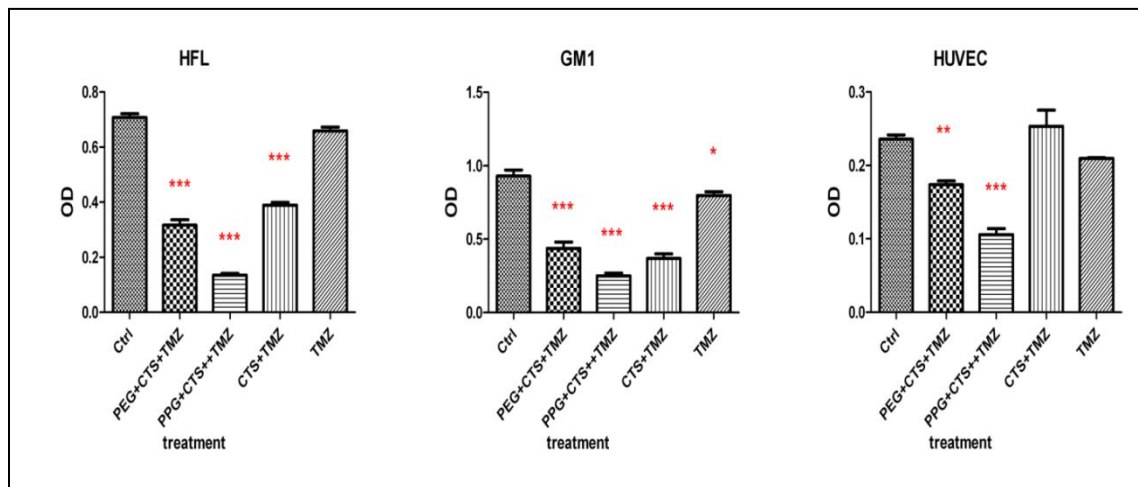


Figure 1. Survival chemotherapy graphics for the three type of cell lines (Glioma-derived stem, HFL-Normal fibroblasts human isolated from lung and endothelial cell line HUVEC-Human Umbilical Vein endothelial cell.) treated with the 3 types of nanostructures and standard therapy (TMZ). The vertical axis represents the optical density (remaining cell population) and the horizontal axis the various therapy options.

## Discussions

The attention of the scientific community is currently focused on nanoparticles, a novel vector for the delivery of anticancer drugs to target cancer cells. These particles have many advantages which recommend it over classically administered drugs. Due to their submicroscopic size and modifiability, nanoparticles have an

enhanced access to cancer cells, being able to maintain high concentrations of drugs in target tissues. Because of their special distribution, drug-loaded nanoparticles may even have a decreased risk of systemic adverse effects which normally occur at increased drug doses, while locally maintaining effective concentrations. Nanoparticles loaded with various cytostatics may prove to have numerous additional advantages. The increased drug concentrations may also be explained by the facilitated penetration of the particles in the tumor through endocytosis, which has the advantage of bypassing the transporter-mediated drug internalization systems. Moreover, the intracellular drug concentration increases in spite of tumor cell multidrug resistance protein activity, which may result in better tumor-level effect of the drug in spite of multidrug resistant tumor phenotype. Another positive viewpoint of using nanoparticles is their capacity to cross the blood brain barrier, which shapes new directions for drug delivery into the brain. Most drugs partially cross the blood brain barrier, but its incorporation into nanoparticles may enhance its passage and increase the relative amount of drug reaching brain tissue. Therefore, the use of loaded nanoparticles could be of paramount importance for glioblastomas, aggressive tumors with a very dismal prognosis, for which temozolomide has been entitled “the most clinically relevant drug ever reported for targeting of glioma-initiating cells”. The failure of current approaches to the treatment of malignant gliomas has been attributed to the existence of a sub-population of cancer cells malignant glioma cancer stem cells (CSCs), which have the ability to withstand chemotherapeutics and ionizing radiation based on certain of their unique properties: high expression of anti-apoptotic proteins, high expression of ABC pumps, and remarkable DNA repair capability .

The gold standard assay to determine whether a stem cell is or not a CSC involves serial transplantation in animal models. Potential surface markers of CSCs include the following: CD133, aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1), CD44, and CD24. Efflux of Hoechst or Rhodamine dyes, also referred to as Side Population (SP), have also been used to identify putative CSCs. However, these markers have certain limitations in that they fail to identify all CSCs and merely designate a subpopulation that is enriched for clonogenic and tumorigenic activity. Also, not all cells with a CSC marker phenotype behave as CSCs. Most markers for separating CSCs were chosen due to their expression on normal stem cells of certain tissues, and, interestingly, there are a number of molecules that are commonly expressed in normal and cancer stem cells that lead to different phenomena depending on the local environment.

Using Bonferroni's Multiple Comparison Test, we found statistically significant results ( $P < 0.05$ ) between the CSCs (control) and the CTR+ PEG+CTS+TMZ (95% CI of 0,3394 to 0,6471), CTR+PPG-CTS-TMZ (95% CI of 0,5249 to 0,83260), CTR+CTS-TMZ (95% of 0,4064 to 0,7141) . When one or more initiating genetic changes appeared at the progenitor level, all of the downstream cells continued this change. In one particular case, it is possible that a daughter cell acquired not only the properties of the stem cell, but also the additional alterations that allow the glioma to progress to the next step and invade surrounding tissues. Due to the small population of glioblastoma-derived stem cells, the malignant gliomas have a negative response to various conventional treatments. The killing efficiency of the PEG+CTS+TMZ, PPG-CTS-TMZ, CTS-TMZ nanostructures on glioblastoma-derived stem cells is better compared with the drug temozolomide, alone. Our proposed nanoscaled drug delivery system offers also a new chemotherapy strategy for patients diagnosed with unresectable or recurrent malignant gliomas. Current therapies are not yet curative, as CSCs may survive as a result of the increased efflux of chemotherapy agents due to ABCG2 cell membrane proteins and increased DNA repair.

Cancer cells are very complex biological structures that perform functions ranging from invasion or metastasis to the elimination of anticancer drugs from the cell membrane. Although the exact mechanisms need to be explored further, combining advances in fundamental oncology and nanotechnology offers the opportunity to significantly impact future diagnostics and therapeutics. We have shown that drug delivery vectors based on chitosan and polymers have the ability to deliver temozolomide (TMZ), a cytostatic drug, to

treat malignant gliomas. Our studies have shown that a novel drug delivery has low toxicity and the ability to internalize TMZ.

### **Conclusions**

Nanostructures like chitosan, PEG, PPG are useful as vectors for temozolomide transport.

Our study shows a net decrease of cell population by treating them with drug-nanostructures. Cell population decrease was more important in tumor cell cultures (GM1) compared with normal cells fibroblasts (HFL) or endothelial cells (HUVEC). The best response was obtained for chitosan-Tz, considering that drug chemotherapy should be aggressive on tumor cells and less aggressive on normal cells. Our study tries to find new drugs for the treatment of glioblastoma. Results must be confirmed by in vivo studies.

Despite combined therapy (surgery, radiotherapy, chemotherapy), currently median patient survival is 10-12 months. The key to improving life expectancy could be an effective therapy targeted, customized for each case. An increasingly important role will be new methods of treatment such as immunotherapy , gene therapy or nanotherapy.

---