

## CHIMIOSENSIBILITATEA ŞI CHIMIOREZISTENŢA GLIOMULUI MALIGN. Reviu al literaturii

**Dan Lîsî – dr. şt. med., Valeriu Matcovschi – dr. hab. şt. med.,  
Valeriu Timirgaz – prof., dr. hab. şt. med., Grigore Zapuhlîh – prof., dr. hab. şt. med., director INN,  
Institutul de Neurologie şi Neurochirurgie**

### Rezumat

Rezistenţa la diferite preparate farmaceutice este un fenomen bine cunoscut şi a apărut ca concept pentru prima dată în privinţa rezistenţei bacteriilor la antibiotice. Rezistenţa la preparate chimioterapice poate fi reprezentată prin mecanisme asemănătoare dar şi totalmente independente, ceea ce denotă atât aspectul specific maladiei dar şi un mecanism conservat în evoluţia speciei. După cum s-a demonstrat în multiple studii, majoritatea cancerelor sunt susceptibile la chimioterapie într-o perioadă iniţială, precum este şi cazul gliomului malign. Ulterior survine recidiva tumorii, iar în cazul glioblastomului vorbim mai curând de reluarea creşterii după remisie. Preparatele chimioterapice uzuale cu efect antimetabolic şi mutaţional al ADN devin ineficace datorită unor mecanisme variate, unele mai bine cunoscute cum sunt reparaţiile ale ADN, inactivarea preparatului anticanceros, alterarea sau eliminarea acestuia din celulă dar ş.a. Mecanismele studiate în principal pe teste de laborator al tumorilor recidivante, dar şi studii prin inducerea chimiorezistenţei la nivel de cultură *in vitro*, au elucidat diverse mecanisme atât la nivel celular cât şi al organismului. Aceste studii devin tot mai larg utilizate şi apreciate pentru efortul de a identifica factorii de răspuns la tratamentul anticanceros, de a determina pronosticul şi în final pentru a putea administra un tratament specific atât maladiei cat şi pacientului în cadrul aşa numitei medicină personalizată.

**Cuvinte-cheie:** chimiorezistenţa, gliom, celule stem, *in vitro*

### Summary. Chemosensitivity and chemioresistence of malignant glioma: Literature review

Resistance to various pharmaceutical preparations is a well-known phenomenon and has emerged as a concept for the first time with regard to bacterial resistance to antibiotics. Resistance to chemotherapeutic drugs can be represented either by similar or totally independent mechanisms, which denotes a specific aspect of the disease along with a mechanism preserved during the evolution. As has been demonstrated in many studies, most cancers are susceptible to chemotherapy, at an early stage, as is the case with malignant glioma. Subsequently, as for glioblastoma, the tumor recurrence occurs, and we rather speak of regrowth after remission. The most chemotherapeutic drugs are antimetabolites or susceptible cause DNA strand breaks, the effect of which is counteracted due to various mechanisms, some of which are well characterized such as DNA repair, drug inactivation, alteration or elimination out of the cell. Mechanisms mainly studied in laboratory

condition on relapsing tumors, or studies of chemoresistance selection cell clones in vitro, elucidated various mechanisms at both cellular and body level. These studies are becoming increasingly appreciated for the effort to identify markers to anticancer treatment, to determine prognosis, and ultimately to provide specific treatment for both the disease and the patient in the so-called personalized medicine.

**Key words:** chemoresistance, glioma, stem cells, in vitro

#### **Резюме. Хеморезистентность и Хемочувствительность злокачественной глиомы: обзор литературы**

Хеморезистентность к различным фармацевтическим препаратам является широко известным явлением и впервые стало концепцией устойчивости бактерий к антибиотикам. Устойчивость к химиотерапевтическим лекарственным средствам может быть представлена либо с помощью аналогичных, либо полностью независимых механизмов, что указывает на специфический аспект заболевания наряду с механизмом сохраненным во время эволюции. Как было показано во многих исследованиях, большинство видов рака чувствительны к химиотерапии на ранней стадии, как в случае злокачественной глиомы. Впоследствии, как и для глиобластомы, происходит рецидив опухоли, и мы скорее говорим о разрастании после ремиссии. Химиотерапевтические препараты являются антиметаболитами или восприимчивые разрывы цепи ДНК, эффект которых противодействует из-за различных механизмов, некоторые из которых хорошо охарактеризованы, такие как восстановление ДНК, инактивация лекарственного средства, изменение или элиминация клетки. Механизмы, которые в основном изучались в лабораторных условиях на рецидивирующих опухолях, или исследования отбора клонов резистентных клеток к химиотерапии in vitro, выявили различные механизмы как на клеточном, так и на тканевом уровне. Эти исследования все более ценятся за усилия по выявлению маркеров для противоракового лечения, определению прогноза и, в конечном счете, к предоставлению конкретного лечения как болезни, так и пациента в так называемой персонализированной медицине.

**Ключевые слова:** хеморезистентность, глиома, стволовые клетки, in vitro

#### **Introducere**

Glioblastomul reprezintă un cancer al sistemului nervos central cu cea mai mare rată a mortalității și o supraviețuire globală de până la 12-14 luni. Aplicarea tratamentului radioterapic și chimioterapic adjuvant în complement rezecției chirurgicale reprezintă standardul de aur în tratamentul glioblastomului, cu o rată de supraviețuire fără progresie de la 3 la 4 luni. Metodele cele mai recente de screening pre-operator, morfopatologice cu introducerea markerilor biologici ce permit identificarea alterațiilor genetice IDH 1 și 2, expresia MGMT, codelețiile 1p și 19q au permis ameliorarea pronosticului tumoral cu creșterea ratei de supraviețuire totală, dar nu și a ratei de supraviețuire fără progresie. În cazul tumorilor de gradul II și III, și IV după regresia lor ca răspuns la chimioterapia neo-adjuvantă, celulele tumorale reziduale sunt detectate în majoritatea cazurilor. Celulele tumorale care supraviețuiesc rămân latente ani de zile, înainte de a relua creșterea și a cauza recurența tumorii. Tumorile recurente fiind cauza principală a morbidității și mortalității pacientului cu glioblastom, problema actuală a oncologiei este determinarea susceptibilității celulelor canceroase reziduale sau latente la tratamentul chimioterapic. Studiile actuale sunt axate pe aspectul chimioresistenței cât și a factorilor imuni, biochimici, electrici care pot influența răspunsul tumoral la tratamentul adjuvant.

#### **Analiza și rezultatele obținute**

Principalele articole din literatură din ultimii 10

ani au fost selecționate cu o emfază pentru studii ale mecanismelor de chimioresistență și testele examinate in vitro pe culturile de celule izolate de gliom uman. După un reviu al mecanismelor implicate au fost selecționate acele articole care s-au adresat problemei în liniile celulelor de gliom selectate pentru chimioresistență. În total au fost selecționate 18 articole, atât divergențele cât și concluziile care s-au suprapus au fost scoase în evidență.

#### **Discuție**

Au fost trecute în revistă principalele mecanisme responsabile de generarea chimioresistenței la gliom.

**Mecanismele intrinsece.** Unul din cele mai răspândite mecanisme este inactivarea substanței xenobiotice: modificarea, degradarea sau atașarea la proteine sau alte molecule. Cele mai răspândite substanțe anticanceroase sunt pro-medicamente, substanțe metabolizate în celulă pentru a deveni clinic active. Atât activarea cât și inactivarea acestora este legată de interacțiunea cu sistemele bine cunoscute de detoxifiere cum sunt citocromul P450, glutatión-S-transferaza, uridin difosfo-glucuronoziltransferaza. CYP1A1 și CYP1A2 din ficat sunt capabile să metabolizeze pro-carcinogenele în carcinogene, astfel disfuncția sau creșterea nivelului de degradare a anticanceroaselor și eliminarea lor prin rinichi va duce la diminuarea eficacității acestora.

Deseori mecanismele de rezistență și însăși geneza cancerului sunt inter-dependente. Spre exemplu, proteina supresor a tumorii p53 (TP53) este respon-

sabilă pentru menținerea unui genom intact, denuită și gardianul genomului cu efect de promotor al apoptozei, este în mod constant absentă în tumorile agresive de tip glioblastom. Când această genă este non-funcțională sau mutată, iar cel mai des produsul inactiv al acesteia este acumulat în celulă, îi conferă celulei chimiorezistență prin lipsa inducerii apoptozei la efectele mutagenice ale preparatelor anticanceroase. În marea majoritate a glioblastomului, încă din primele faze ale maladiei (peste 60%), această genă p53 este nonfuncțională.

Expresia enzimelor de detoxifiere a compușilor nocivi ca GST (glutathion-s-transferaza) este deseori mărită, ceea ce explică uneori creșterea chimiorezistenței.

**Preparatele antiangiogenice.** Dacă mecanismele de mai sus sunt elucidate în privința preparatelor anticanceroase clasice, mecanismele sunt diferite în privința preparatelor de ultima generație care acționează asupra căilor de semnalizare sau a receptorilor căilor de proliferare celulară. Este bine cunoscut efectul inițial de inhibiție și chiar devascularizare tumorală indusă de preparatele care inhibă receptorii EGFR (epidermal growth factor receptor) de pe membrana celulară a vaselor. În multe dintre cancere această cale a EGFR este supraexprimată, atât prin creșterea numărului de receptori de pe membrana celulei, cât și prin expresia de receptori activi intrinseci fără a fi necesară legarea factorului de creștere. Majoritatea de gliome mixte, sau oligodendrogliome sunt cu receptori EGFR activi, ceea ce a servit drept propunerea de a administra inhibitori specifici de EGFR în al doilea rând de chimioterapie în caz de recidivă. Rezistența la aceste preparate este datorată, la rândul ei, de niște mecanisme inedite, prin alterarea a însăși locului de acțiune, deci a receptorilor EGFR sau a multiplicării acestora. Astfel, prin expresia genei NF-kb și a produsului acesteia survivină (BIRC5) a fost demonstrată implicarea în blocajul caspazei 3/7 inductoare de apoptoză. În mod normal, nu toate celulele vor exprima această proprietate, dar datorită heterogeneității tumorale și a comunicării interclonale această proprietate este generalizată pentru toată populația în interval de doar câteva luni [1].

Declanșarea răspunsului EGFR rezultă în activarea tirozin-kinazei (TK) din citoplasmă și a căilor de semnalizare următoare ca fosfatidil-inozitol 3-kinaza (PI3K) responsabile de proliferare, supraviețuire și metabolism celular. Unii markeri ai sensibilității cum sunt mutațiile în exonii 19 și 21 ai TK prezic un răspuns pozitiv la preparatele ce blochează EGFR sunt prezente în cancerul pulmonar, dar sunt practic absente în glioblastom, fapt ce ar putea explica lipsa răspunsului acestor preparate în astfel de tumori.

Un alt factor al rezistenței la aceste preparate ar fi însăși masa moleculară a acestora, ele fiind anticorpi cu masa moleculară relativ mare ceea ce împiedică trecerea lor prin bariera hemato-encefalică [2].

Una din mutațiile cele mai frecvente ale glioblastomului este pierderea genei (PTEN) fosfatazei și tenzin omolog de pe cromozomul 10, care se regăsește în aproximativ 40-50% de cazuri. PTEN face legătura dintre EGFR și căile de inhibiție ale proliferării PI3K, astfel reactivarea PTEN prin inhibiția produsului (mTOR, ținta rapamicinei la mamiferi) poate restabili eficacitatea inhibitorilor de EGFR [3].

În concluzie la utilizarea preparatelor ce inhibă EGFR atât ca regiment solitar sau ca agent de sensibilizare în combinație cu radioterapia, nici un studiu clinic nu a putut confirma eficacitatea acestora în cazul gliomului malign.

### **Imunoterapia față de receptorii EGFRvIII**

Spre diferența de EGFR forma originală, EGFRvIII este exprimat în mod exclusiv în celulele canceroase, fapt ce a determinat un interes spre a elabora o tactică de a bloca selectiv acest receptor. Una din tendințele moderne este imunoterapia sau vaccinarea contra tumorilor agresive, pentru a spori răspunsul imun al organismului față de tumorile rezistente. Pacienții cu gliom și expresia la nivel tumoral al EGFRvIII au fost imunizați cu o peptidă în combinație cu tratamentul pe bază de temozolomidă. Surprinzător, expresia EGFRvIII în tumorile recurente a fost diminuată, fapt ce ar putea fi explicat prin eradicarea celulelor sensibile din tumoare. Reluarea creșterii tumorii sugerează evaziunea imunologică cu continuarea proliferării datorită noului contingent de celule. O strategie de identificare a structurilor de control substanțiale (check-point) în proliferarea tumorală este actualmente în cercetare, cum ar fi factorul de transformare a creșterii din gliom (beta signaling transforming growth factor) [4].

### **Rezistența prin efluxul preparatului anticanceros din celulă**

Unul din principalele procese fiziologice de detoxifiere cum eliminarea toxinei din celulă prin intermediul transportorilor ATP dependenți este responsabil de multiple rezistențe la preparatele chimioterapice. Un astfel de mecanism implică 3 transportori (MDR1-multidrug resistance protein, MRP1-multidrug resistance-associated protein, și BCRP Breast cancer resistance protein). Expresia MDR1 a fost determinată de 8 ori mai crescută în celule stem de gliom în cultura de sferoizi în comparație cu țesutul primar de glioblastom, asociat cu un grad crescut de rezistență față de chimioterapie convențională cu doxorubicina, etopozida, carboplastina [5]. Studii precedente au evidențiat de asemenea creșterea

expresiei MDR1 în sferoizi și față de cultura pe strat atașat, fapt ce demonstrează selecția unor clone mai rezistente în cultura de sferoizi.

Acest mecanism se dovedește a fi selectiv nu doar față de culturile selectate dar și față de preparatul antichimioterapic. Inducerea și selecția chemorezistenței în linia de celule C6 a glioblastomului la șoarece față de doxorubicină și vincristină a determinat afinitatea preferențială a *mdr 1b* genei la vincristina, fiind și mai puțin eficace decât *mdr 1a* [6].

#### **Mecanismele de reparație ale ADN**

Efectul de principiu al anticanceroaselor este inducerea apoptozei în urma dereglării structurii ADN. Astfel preparatele ce conțin platină cum e cisplatina, induc interconecțiuni de ADN ce duc la deformarea structurii terțiare. Ca rezultat al acestor perturbări intră în joc mecanisme de reparație ale ADN, clasic reprezentate prin excizia perechilor de nucleotide cu recombinația omologică. Aceste mecanisme compensatorii reprezintă o adaptare clasică a celulei, și în unele cancere aceste mecanisme sunt hiperexprimate, fenomen ce poate contribui la rezistența la drogurile anticanceroase. Agenții de alchilare induc la nivel de ADN alchilarea guaninei O6. Expresia excesivă a O6-metilguanină DNA metiltransferază cauzează o protecție a celulei față de acești agenți. Expresia genei *MGMT* sau statutul de demetilare a ADN care va favoriza expresia acesteia este utilizată în mod de rutină în unele clinici pentru a prezice eficacitatea la temozolomidă a glioblastomului. Studiile recente au demonstrat faptul genele *MGMT* metilate epigenetic reprezintă un factor favorabil la tratamentul antichimioterapic, asociat cu ratele de supraviețuire și a ratei de supraviețuire fără recidiva superioară [7]. Un interes deosebit reprezintă elaborarea unei strategii de inhibiție a expresiei *MGMT*.

#### **Cercetarea chimiorezistenței și a factorilor care le cauzează**

Una din principalele probleme ale studiului cancerului și a chimiorezistenței este eterogeneitatea populației canceroase. Prin selecția unor colonii rezistente la preparatele în cauză este vizată proprietatea de a se adapta la factorii nocivi. Această abordare presupune administrarea unor cantități subletale, în cele mai multe studii o doză de inhibiție a creșterii IC50 este administrată timp de aproximativ 2 ore populației de celule în cultură pentru a induce pe termen scurt o eventuală chimiorezistență. Prin aceste tehnici experimentatorii încearcă să anticipeze o eventuală chimiorezistență pentru a putea interveni prin metode țintite de contracarare.

Mai multe impedimente sunt clasic evocate în fața clinicianului și a experimentatorului.

Eterogeneitatea populației cu expresia doar a

unor tipuri în cultura respectivă. Diferențele de cultură sunt și ele capabile să inducă modificări de genotip și fenotip, care se distanțează de proprietățile tumorii în vivo. Culturile in vitro au tendința de a favoriza în funcție de proprietățile mediului doar unele subtipuri de celule, astfel în comparație cu țesutul in vivo ele sunt relativ omogene. Diferite modalități au fost propuse pentru a se apropia cât mai mult de condițiile ideale in vivo, în special culturi mixte 3D sau co-cultura cu celule conjunctive pentru a simula stroma tumorală, de asemenea culturi de țesuturi numite și organotipice. Culturile de țesuturi sunt în mod evident cele mai apropiate de a simula condițiile in vivo, dar apanajul de cercetări și metode de examinare sunt limitate în special la fluorescența microscopică pentru studiul calitativ.

Diferite tehnici sofisticate au fost propuse pentru a facilita interpretarea și a multiplica rezultatele fără a recurge la o tehnică laborioasă și în special este vorba despre cultura și dozajul prin microfluide a mediului și a substanțelor testate. Micromediul glioblastomului este unul din cele mai complexe, iar proprietățile mecanice denotă o densitate sporită celulară cât și proprietăți distincte care ar favoriza creșterea și invazivitatea tumorală. Nișa perivasculară și celulele stromale asociate reprezentate prin astrocite favorizează interacțiuni și semnalizări autocrine care promovează creșterea glioblastomului [8].

Studiile realizate pe celule de gliom supuse la tratamentul chimioterapic sunt extrem de variate, doar între anii 1966 și 1995 au fost raportate aproximativ 1643 de articole. Eficacitatea a fost descrisă în mod general pentru o concentrație de chimioterapie cu efect letal de 50% din populația de celule (LC50). Din tehnicile de cuantificare ale viabilității, testul colorimetric cu sărurile de tetrazoliu [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltrazolium bromidă] au fost cel mai des utilizate. Într-o metodă mai nouă de totalizare utilizând meta-analiză a acestor studii, s-a reușit transformarea rezultatelor pentru a calcula LC50 pentru toate studiile simulând testul colorimetric. Din contingentul de preparate anticanceroase principalele sunt redată mai jos, reprezintă valoarea LC50 în mg/l (10), actinomycin-D 0.042, vincristina 0.075, mitoxantrona 0.12, vinblastina 0.21, doxorubicina 0.29, diaziquone 0.76, cisplatina 1.1, metotrexat 1.1, citazin arabinozid 1.59, 5-fluorouracil 2.33, bleomicină 18.6, carboplatin 29.8, carmustina 37.0, nimustina 48.9, lomustina 76.7.

Din preparatele chimioterapice utilizate în mod de rutină în clinicile din West, se enumeră temozolomida, carboplatina (CBDCA), cis-platina (CDDP) și preparatele derivate ale nitrozureei ACNU. Într-un studiu clinic și experimental de tratament cu ACNU

şi BICNU au fost examinate rata de supravieţuire şi corelate cu expresia genei MGMT prin cuantificarea mRNA. Ulterior, două culturi de celule de gliom au fost supuse tratamentului atât cu ACNU cât şi cu carboplatina, unde s-a demonstrat un efect de diminuare a expresiei MGMT pentru celulele tratate cu carboplatina. Mai mult decât atât, celule după tratamentul cu carboplatina au fost mai sensibile la a doua linie de tratament cu ACNU. Studiul clinic de asemenea corelează cu datele experimentale, arătând că rata de supravieţuire a fost mai mare la contingentul de pacienţi trataţi cu carboplatină. Aceste rezultate evidenţiază rolul chimiorezistenţei şi mecanismele diverse care pot juca rol determinant în răspunsul tumoral. Carboplatina ar putea fi, după spusele autorilor indicată în prima linie datorită diminuării expresiei de MGMT [11].

Factorii care ar putea să influenţeze chimiorezistenţa atât ca stimulant cât şi ca inhibitori sunt foarte diverşi, şi deseori sunt ignoraţi. Unele tratamente concomitente s-au dovedit a fi, cel puţin in vitro, chimiosensibilizanti, cum ar fi administrarea de verapamil. De asemenea mai puţin studiat dar deseori speculat a fost tratamentul cu antiedematoase cerebrale cum este Dexametazonul. Pentru a diminua edemul malign asociat în special cu tumorile cerebrale maligne, tratamentul cu Dexametazon reprezintă o ultimă recurgere. O iniţiere precoce cu Dexametazon a fost asociat de unele studii observaţionale cu o rată de recidivă şi progresie crescută. Pentru a evalua efectul concomitent al Dexametazonului cu cisplatina (CDPP) în cultura cu celule de gliom, linia de gliom C6 a fost incubată pentru 2, 24 şi 72 ore cu o concentraţie de LD50% de  $2 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M, şi  $7 \times 10^{-7}$  M CDDP în mod respectiv. Adăugarea de  $10^{-6}$  M de dexametazon a rezultat în dublarea numărului de celule care au supravieţuit la concentraţia de CDDP  $5 \times 10^{-5}$  M pentru 72 ore de incubare. Efectul de protecţie a Dexametazonului faţă de tratamentul chimioterapic a fost observat de asemenea la liniile de celule de rabdomiosarcom TE671, celule de gliom uman T98G, spre deosebire de celule de gliom uman A172. Dexametazonul a redus de asemenea sensibilitatea C6 la carboplatina, doxorubicina, actinomicina D, metotrexat, fără a avea o influenţă asupra sensibilităţii faţă de vincristina, iradiere, 6-mercaptopurină sau tioguanină [12]. Efectul divers şi imprevizibil al dexametazonei ar merita o utilizare cu precauţie, sau, în mod elective după o testare a sensibilităţii tumorii în cauză.

Eterogeneitatea tumorală este practic sinonimă cu eterogenitatea faţă de tratamentul chimioterapic. Pe cât sunt de diverse metodele aplicate în inhibiţia creşterii tumorale, pe atât răspunsurile sunt deseori contradictorii. Ultimele reuşite în tratamentul anticanceros cum este terapia genică. Dar şi răspunsul la tratamentul ge-

nic nu într-una corelează cu cel antichimioterapic. Pe o cultură de termen scurt de celule de gliom obţinută din biopsii chirurgicale, au fost comparate rezultatele terapiei genice prin infectarea cu adenovirus recombinant urmat de administrarea de ganciclovir. Expresia timidin kinazei al virusului herpes concomitent cu ganciclovir a indus apoptoza în toate liniile de gliom, inclusiv şi cele rezistente la CCNU. Predictibilitatea răspunsului la tratament adjuvant, fie chimioterapic, cu sensibilizare sau tratament prin terapie genică poate fi testat sau prin metoda de cultură sau prin utilizarea markerilor specifici de pronostic [13].

Dat fiind faptul că atât chimioterapia cât şi iradierea tumorală vizează întreruperea secvenţei normale sau desperecherea catenei de ADN, fapt ce duce la modificări iremediabile ale ADN şi deci sistarea diviziunii celulare cu moartea ei, una din tactici propuse este compromiterea sistemului propriu zis de reparare cum este proteina Poli(ADP-riboza) polimerase sau PARP. Această proteină se ataşează la locurile de rupturi ale catenei de ADN, generate de substanţele toxice. Inhibitorii PARP acţionează independent de MGMT, şi pot fi astfel utilizaţi în tumorile gliale cu MGMT gena metilată. Una din substanţe propuse este 3-Aminobenzamida care are drept acţiune potenţierea selectivă a citotoxicităţii compuşilor nitrozureei: nimustina, carmustina, lomustina şi lomustina în 10 din 12 linii de celule de gliom. În contrast, 3-aminobenzamida nu a influenţat efectul citotoxic al doxorubicinei, tenipozidei, vincristinei, camptotecina sau citarabina [14].

Spre deosebire de ceilalţi potenţatori ai chimioterapiei, PARPi a crescut sensibilitatea faţă de temozolomida nu doar în celule proliferante intens, ci şi în celulele încet proliferante, acţionând asupra ADN în faza pre-diviziunii [15].

Concentraţia intracelulară de agent chimioterapic reprezintă un impediment major în eficacitatea acestuia. Cel puţin in vitro datele experimentale pe efecte de electroporabilizare şi electrofor au testat modul de delivrare a genelor în interiorul citoplasmei prin microporii membranei celulare. Efectul citotoxic de combinare a agentului anticanceros şi a stimulării electrice pe linia de celule C6 şi gliom uman T98G a fost examinat in vitro. Stimularea electrică a crescut semnificativ toxicitatea bleomicinei de 1000 de ori. Acest efect de stimulare dispăruse când concentraţia bleomicinei scăzuse la 100 pg/ml. Citotoxicitatea carboplatinei a fost uşor sporită la o doză înaltă de carboplatină, şi practic nu a modificat efectul nimustinei hidrocloreide (ACNU), etopozidei şi vincristinei. Aceste rezultate indică faptul că combinaţia dintre bleomicină şi electroforaţie este un candidat viabil pentru electrochimioterapie in vivo [16].

După ce au fost elucidate majoritatea mecanism-

lor responsabile de chimiorezistență și au fost etalate metodele de cultură și testing prechimioterapic care, după părerea noastră ar putea preveni lipsa răspunsului la tratament și s-ar încadra cel mai probabil în viitorul apropiat în conceptul medicinei personalizate, ne limităm la constatarea ca orice metodă utilizată nu este exclusivă și nu rezolvă problema globală a apariției chimiorezistenței. Ne amintim că chimioterapia în sine este primul factor de dezvoltare a chimiorezistenței, cu selecționarea unor tumori cu fenotip rezistent.

Pentru a depista principalele mecanisme afectate este necesar de a oglindi schimbările genetice declanșate la tratamentul chimioterapic. Astfel, autorii studiului de mai jos au investigat schimbările de ordin genetic la administrarea a ACNU pe celule C6 de gliom de șobolan, cu obținerea la distanță a unei linii rezistente. Analiza dintre linia de cultură chemorezistentă și cea originală a pus în evidență o expresie mărită de MGMT, după cum a fost subliniat în text anterior, dar și o creștere a expresiei prin cADN a 19 gene cât și o diminuare a expresiei de 16 gene. Aceste gene aparțin unor clase funcționale variate, în afara grupului de chimiorezistență. Astfel, diminuarea expresiei a c-kit, pleiotrofina, factor de creștere receptor alfa derivate din trombocite PDGFrA, proteina-22 a mielinei periferice, NG2 hondroitin sulfat proteoglican, care sunt inițial exprimate în celule de origine glială. Adicional sunt diminuate expresiile a GFAP, vimentinei și nestinei ceea ce reprezintă în totalitate o progresie spre un statut mai puțin diferențiat a gliomului [17].

**În concluzie:** cu sporirea diferitor mecanisme evaluate în achiziția unui fenotip agresiv al tumorii înaintea dar și în timpul tratamentului multimodal, se conturează un tablou tot mai complex al mecanismelor de rezistență datorat unor factori multipli, în special heterogeneității cancerului și a deficitului de rezistență al organismului. Abordarea acestei probleme este prin urmare și ea complexă, cu un rol aparte al medicinei personalizate pentru a acorda șansa unei remisii îndelungate și a evita generarea unor chimiorezistențe secundare.

### Bibliografie

1. Ciro Zanca, Frank Furnari. *Tumor heterogeneity contributes to resistance to anti-egfr therapy in glioblastoma*. Neuro-Oncology, Volume 18, Issue suppl\_6, 1 November 2016, Pages 52.
2. Roth P, Weller M. *Challenges to targeting epidermal growth factor receptor in glioblastoma: escape mechanisms and combinatorial treatment strategies*. Neuro-Oncology. 2014;16(Suppl 8):viii14-viii19.
3. Marie Y, Carpentier AF, Omuro AM, Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K, Delattre JY. *EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas*. Neurology. 2005 Apr 26; 64(8):1444-5.
4. Gatson NT, Weathers SP, de Groot JF. *ReACT Phase II trial: a critical evaluation of the use of rindopepimut plus bevacizumab to treat EGFRvIII-positive recurrent glioblastoma*. CNS Oncol. 2016;5(1):11-26.
5. Nakai E1, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K. *Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma*. Cancer Invest. 2009 Nov;27(9):901-8.
6. Schott, B., Bennis, S., Pourquier, P., Ries, C., Londos-Gagliardi, D. and Robert, J. (1993), *Differential over-expression of mdr1 genes in multidrug-resistant rat glioblastoma cell lines selected with doxorubicin or vincristine*. Int. J. Cancer, 55: 115–121.
7. Dong X., Liu R., Chen W. *Correlation of promoter methylation in MGMT gene with glioma risk and prognosis: A meta-analysis*. Mol. Neurobiol. 2014.
8. Rape A, Ananthanarayanan B, Kumar S. *Engineering Strategies to Mimic the Glioblastoma Microenvironment*. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;0:172-183.
9. Li S, Kennedy M, Payne S, Kennedy K, Seewaldt VL, et al. (2014) *Model of Tumor Dormancy/Recurrence after Short-Term Chemotherapy*. PLoS ONE 9(5): e98021.
10. Wolff JE<sup>1</sup>, Trilling T, Mölenkamp G, Egeler RM, Jürgens H. *Chemoresensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis*. J Cancer Res Clin Oncol. 1999 Aug-Sep;125(8-9):481-6.
11. Tanaka S<sup>1</sup>, Kobayashi I, Utsuki S, Oka H, Yasui Y, Fujii K. *Down-regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by platinum compounds*. Oncol Rep. 2005 Nov;14(5):1275-80.
12. Wolff JE<sup>1</sup>, Denecke J, Jürgens H. *Dexamethasone induces partial resistance to cisplatin in C6 glioma cells*. Anticancer Res. 1996 Mar-Apr;16(2):805-9.
13. Maleniak TC<sup>1</sup>, Darling JL, Lowenstein PR, Castro MG. *Adenovirus-mediated expression of HSV1-TK or Fas ligand induces cell death in primary human glioma-derived cell cultures that are resistant to the chemotherapeutic agent CCNU*. Cancer Gene Ther. 2001 Aug;8(8):589-98.
14. Winter S<sup>1</sup>, Weller M. *Poly(ADP-ribose) polymerase-independent potentiation of nitrosourea cytotoxicity by 3-aminobenzamide in human malignant glioma cells*. Eur J Pharmacol. 2000 Jun 16;398(2):177-83.
15. Tentori L, Portarena I, Bonmassar E, Graziani G. *Combined effects of adenovirus-mediated wild-type p53 transduction, temozolomide and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in mismatch repair deficient and non-proliferating tumor cells*. Cell Death Differ. 2001;8:457–469.
16. Horikoshi T<sup>1</sup>, Naganuma H, Ohashi Y, Ueno T, Nukui H. *Enhancing effect of electric stimulation on cytotoxicity of anticancer agents against rat and human glioma cells*. Brain Res Bull. 2000 Mar 15;51(5):371-8.
17. Nakagawa T<sup>1</sup>, Kubota T, Ido K, Sakuma T, Matsuda K. *Gene expression profiles of 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU)-resistant C6 rat glioma cells*. J Neurooncol. 2006 Sep;79(3):271-9.