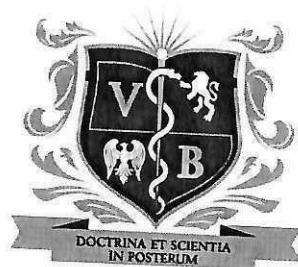


UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL III – ȘTIINȚE FUNCȚIONALE



MEMORIU ȘTIINȚIFIC AL TEZEI DE DOCTORAT

*INvestigarea mecanismelor citotoxice anti-Tumorale
mediate de Exozomii proveniți de la Limfocite T și celule
NK cu receptori chimerici de antigen (IntErLiNK)*

Doctorand:

TÎRZIU ALEXANDRU

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. PĂUNESCU VIRGIL

**Timișoara
2026**

1. MOTIVAREA CERCETĂRII

Imunoterapia cancerului a cunoscut o revoluție fără precedent odată cu dezvoltarea terapiilor bazate pe receptori himerici de antigen (CAR), reprezentând o nouă eră în tratamentul afecțiunilor maligne. Celulele CAR-T au demonstrat rezultate remarcabile în tratamentul neoplaziilor hematologice, conducând la aprobarea mai multor produse terapeutice de către FDA și modificând semnificativ prognosticul pacienților cu leucemii și limfoame refractare cu celule B. Cu toate acestea, aplicabilitatea clinică extinsă a acestor terapii este limitată de provocări majore: toxicități severe (sindromul de eliberare citokinică, neurotoxicitate), eficacitate redusă în tumorile solide, costuri crescute de producție și complexitatea procesului de producție.

În paralel, celulele natural killer (NK) au atras un interes crescut ca platformă alternativă pentru terapiile CAR, oferind avantaje semnificative: capacitate citotoxică MHC-independentă, risc redus de boală grefă-contra-gazdă, posibilitatea utilizării alogene și profil de siguranță îmbunătățit. Generarea de celule CAR-NK din linii celulare stabilizate (NK-92) sau din celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) reprezintă strategii promițătoare pentru dezvoltarea de terapii "off-the-shelf" accesibile și scalabile.

Exozomii, vezicule extracelulare nanometrice (30–150 nm) secretate de toate tipurile celulare, s-au remarcat ca mediatori esențiali ai comunicării intercelulare, transportând proteine, acizi nucleici și lipide bioactive. Recent, exozomii derivați din celulele CAR-T și CAR-NK (CAR-Exo) au atras un interes științific crescut datorită potențialului lor de a reproduce efectele citotoxice ale celulelor de origine, oferind simultan avantaje semnificative: profil de siguranță îmbunătățit, penetrabilitate crescută în micromediul tumoral, posibilitatea producției "off-the-shelf" și cost redus. Această abordare acelulară ("cell-free") ar putea reprezenta o paradigmă terapeutică alternativă, depășind limitările terapiilor celulare clasice.

Deși terapiile CAR-T au obținut aprobări clinice remarcabile pentru neoplaziile hematologice, aplicabilitatea lor în cazul tumorilor solide rămâne o provocare majoră. Micromediul tumoral imunosupresiv, heterogenitatea antigenică și barierele fizice limitează eficacitatea acestor terapii. În acest context, explorarea mecanismelor citotoxice ale exozomilor derivați din celule CAR reprezintă o direcție de cercetare inovatoare.

Prezenta teză de doctorat își propune să investigheze potențialul citotoxic al exozomilor proveniți de la limfocitele CAR-T și CAR-NK, abordând astfel un domeniu de interes major pentru oncologia translațională. Ipotezele de lucru postulează că: celulele mononucleare din sânge periferic (PBMC) pot fi eficient transduse cu receptori CAR generând o populație heterogenă citotoxică; regimul de stimulare celulară influențează compoziția și eficiența transducției; celulele CAR-NK92 generate prin tehnici de transducție non-virală exprimă receptori CAR funcționali; exozomii CAR-NK92 păstrează receptori funcționali și molecule efectorii pe suprafața lor; exozomii CAR-NK92 se leagă specific de celulele Her2-pozitive și exercită efecte citotoxice superioare exozomilor wild-type.

Cercetarea a utilizat o abordare comprehensivă integrând tehnici de inginerie celulară, biologie moleculară și evaluare funcțională. Celulele mononucleare din sânge periferic au fost izolate, stimulate diferențiat (microsfere anti-CD3/CD28 sau citokine) și transduse lentiviral

cu vectori anti-EGFR. Celulele NK-92 au fost transduse non-viral (piggyBac) cu receptori anti-Her2, urmate de selecție cu puromicină. Expresia receptorilor CAR a fost evaluată prin citometrie în flux, iar capacitatea citotoxică celulară prin Real-Time Cell Analysis (RTCA) și teste de viabilitate. Exozomii au fost izolați prin centrifugare seriată și precipitare cu polietilenglicol, apoi caracterizați prin cuantificare proteică, fluorimetrie și imunofenotipare (MACSPlex, Western Blot). Interacțiunea dintre exozomi și celulele tumorale a fost investigată prin microscopie cu fluorescență și citometrie de flux, iar efectele citotoxice exozomale au fost cuantificate prin teste de viabilitate pe linii celulare Her2-pozitive (SK-BR3) și Her2-negative (MCF-7).

Cercetarea contribuie la înțelegerea mecanismelor citotoxice ale exozomilor CAR și oferă noi perspective pentru dezvoltarea de terapii imunoterapeutice acelulare ("cell-free") în oncologie. Rezultatele au fost valorificate prin publicarea a patru articole științifice în reviste internaționale de prestigiu, demonstrând relevanța și impactul acestei cercetări în comunitatea științifică.

2. LISTA DE LUCRĂRI CARE FAC PARTE INTEGRANTĂ DIN TEZA DE DOCTORAT

Publicații ISI/WOS indexate:

1. Tîrziu, A.; Bojin, F.M.; Gavriluc, O.I.; Faur, C.I.; Păunescu, V. *From CAR-T Cells to Exosome-Based Immunotherapy: Exploring the Frontiers of Cell-Free Targeted Cancer Therapeutics*. **Cells**, 2026, 15, 70. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells15010070>. [Indexat ISI/WOS (Factor de Impact = 5,2)]
2. Tîrziu, A.; Bojin, F.M.; Gavriluc, O.I.; Buzan, R.M.; Zbîrcea, L.E.; Grijincu, M.; Păunescu, V. *Anti-Her2 CAR-NK92 Cells and Their Exosomes: Generation, Characterization, and Selective Cytotoxicity Against Her2-Positive Tumor Cells*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2025, 26, 7648. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26157648>. [Indexat ISI/WOS (Factor de Impact = 4,9)]
3. Tîrziu, A.; Gavriluc, O.-I.; Bojin, M.-F.; Păunescu, V. *Exploring CAR-PBMCs: A Novel Strategy Against EGFR-Positive Tumor Cells*. **Biomedicines**, 2025, 13, 264. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13020264>. [Indexat ISI/WOS (Factor de Impact = 3,9)]

Publicații BDI:

4. Tîrziu, A.; Pleșca D.; Anghel S.; Panaitescu C.; Păunescu V. *Exosomes as valuable players in health and diseases*. **Fiziologia – Physiology**, 2021, 31(1):101, 4–12. [Indexat BDI]

Total: 3 articole indexate ISI/WOS (FI total cumulat = 14,0) + 1 articol indexat BDI = 4 publicații totale rezultate direct din teza de doctorat.

3. DATE DESPRE EVOLUȚIA CERCETĂRII — CONGRESE ȘI CONFERINȚE

Rezultatele cercetării doctorale au fost diseminate treptat în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale, contribuind la fundamentarea, validarea și consolidarea direcțiilor de investigare asumate în prezenta teză.

Datele din teza de doctorat au fost prezentate în cadrul următoarelor manifestări științifice naționale și internaționale:

1. Congresul European de Alergologie și Imunologie Clinică – 12-15 iunie 2026, Istanbul, Turcia

Zbîrcea LE, **Tîrziu A**, Buzan RM, Grijincu M, Gavriluc OI, Bojin FM, Păunescu V. *Protein Profiling of CAR-Engineered NK92-Derived Exosomes Using Western Blot* – poster oral

2. Simpozionul STOP Cancer - 23-26 aprilie 2025 – București, România

Tîrziu A, Bojin FM, Gavriluc OI, Buzan RM, Zbîrcea LE, Grijincu M, Păunescu V. *Engineering Anti-Her2 CAR-NK92 Cells and Their Exosomes for Targeting Breast Cancer Cells* – prezentare orală

3. Sesiunea Academiei de Științe Medicale din cadrul Zilelor UMFT - 5 decembrie 2024, Timișoara, România

Păunescu V, **Tîrziu A**. *Engineered CAR-PBMCs against EGFR-positive tumor cells* - prezentare orală

4. Simpozionul STOP Cancer - 20-22 aprilie 2023 – București, România

Păunescu V, **Tîrziu A**. *Cancer Vaccines* – prezentare orală

Cercetarea doctorală s-a desfășurat în perioada 2021–2026, cu o progresie tematică coerentă: de la revizuirea sistematică a biologiei exozomilor (2021), elaborarea unor protocoale de transducție celulară, selecție a celulelor CAR-pozitive, izolare și caracterizare exozomală (2022-2023), la generarea și caracterizarea celulelor CAR-PBMC anti-EGFR (2024) și culminând cu generarea, caracterizarea și testarea funcțională a celulelor CAR-NK92 anti-Her2 și a exozomilor derivați (2025–2026).

4. APRECIEREA CONDUCĂTORULUI DE DOCTORAT

Teza de doctorat elaborată de studentul-doctorand **Tîrziu Alexandru**, intitulată "INvestigarea mecanismelor citotoxice anti-Tumorale mediate de Exozomii proveniți de la Limfocite T și celule NK cu receptori himerici de antigen (IntErLiNK)", reprezintă o contribuție originală și valoroasă în domeniul imunoterapiei oncologice. Lucrarea abordează o problemă de actualitate — terapiile bazate pe receptori himerici de antigen (CAR) și posibilitatea utilizării exozomilor derivați din celule CAR ca agenți terapeutici acellulari — cu rigoare științifică, metodologie solidă și o viziune translațională bine articulată.

Doctorandul a demonstrat capacitate remarcabilă de sinteză și integrare a cunoștințelor din domenii diverse: biologie celulară și moleculară, inginerie genetică, citometrie de flux, analiza în timp real a citotoxicității și de caracterizare a veziculelor extracelulare. Rezultatele

experimentale obținute sunt coerente, reproductibile și susțin ipotezele de lucru formulate la debutul cercetării.

Teza este construită în jurul a patru studii, două de tip review și două de tip cercetare originală, care explorează biologia exozomilor, tehnicile de transfecție a celulelor imune în vederea obținerii de celule purtătoare de receptori himerici de antigen (CAR), analizează expresia proteică în cadrul populațiilor de exozomi eliberați de celulele imune, și evidențiază efectul citotoxic al acestor vezicule extracelulare.

Primul studiu (*Exosomes as valuable players in health and diseases*), publicat în anul 2021, oferă o analiză comprehensivă a exozomilor, a căilor de sinteză, a rolurilor multiple de semnalizare intercelulară în diverse stări fiziologice și patologice și descrie tehnicile de izolare și caracterizare pentru aceste vezicule extracelulare.

Al doilea studiu (*Exploring CAR-PBMCs: A Novel Strategy Against EGFR-Positive Tumor Cells*), publicat în anul 2024, descrie un protocol de generare a celulelor purtătoare de CAR provenind din celule mononucleare din sânge periferic, în vederea obținerii unei populații eterogene de celule CAR-pozitive cu potențial disruptiv asupra barierei hemato-tumorale. În continuarea acestui studiu, exozomii eliberați de aceste celule au fost caracterizați din punct de vedere al conținutului proteic, iar efectul citotoxic anti-tumoral a fost evidențiat prin experimente de tip real-time cell analysis (RTCA).

Cel de-al treilea studiu (*Anti-Her2 CAR-NK92 Cells and Their Exosomes: Generation, Characterization, and Selective Cytotoxicity Against Her2-Positive Tumor Cells*), publicat în anul 2025, a rezolvat o limitare cunoscută în literatură referitoare la transducția lentivirală a celulelor NK. Utilizând tehnica de transducție non-virală prin electroporare a transpozonilor din sistemul PiggyBac, eficiența transfecției a crescut semnificativ, permițând expansiunea și generarea unei culturi celulare omogene CAR-NK anti-Her2, cu efect citotoxic marcat asupra liniei celulare tumorale Her2+ SK-BR3.

Ultimul articol (*From CAR-T Cells to Exosome-Based Immunotherapy: Exploring the Frontiers of Cell-Free Targeted Cancer Therapeutics*), publicat în anul 2025, sintetizează ultimele progrese referitoare la dezvoltarea exozomilor derivați din celule CAR ca nanovezicule bioactive care exprimă CAR la suprafață și pot vehicula încărcături citotoxice și imunomodulatoare, inducând liza antigen-specifică a celulelor tumorale cu profil de toxicitate mai redus decât terapia celulară CAR clasică.

Publicarea a trei articole în reviste ISI/WOS cu factori de impact cumulați de 14,0 puncte, alături de un articol în revistă BDI, demonstrează că rezultatele tezei au atins standardele internaționale de calitate și au fost validate de comunitatea științifică prin procesul de peer-review. Prezentările la congresele naționale și internaționale reflectă angajamentul doctorandului față de diseminarea și valorificarea rezultatelor cercetării.

Rezultatele cercetării sunt susținute de date solide și sunt corelate cu literatura de specialitate, oferind informații valoroase despre biologia exozomilor eliberați de celulele imune purtătoare de receptor himeric de antigen. Concluziile acestei teze au potențial de aplicabilitate clinică, putând contribui la tratamentul pacienților oncologici.

Apreciez în mod deosebit originalitatea abordării prin combinarea tehnicilor de transducție lentivirală (pentru CAR-PBMC anti-EGFR) cu cele de transducție non-virală bazată pe sistemul de transpozoni piggyBac (pentru CAR-NK92 anti-Her2), demonstrând flexibilitate metodologică și capacitate de adaptare la cerințele specifice ale fiecărei platforme celulare. Caracterizarea comprehensivă a exozomilor derivați din celulele CAR-NK92 — prin Western Blot, MACSPlex și teste funcționale de citotoxicitate — constituie o contribuție de referință în domeniu.

Consider că prezenta teză de doctorat constituie o contribuție semnificativă în domeniul imunologiei anti-tumorale, aducând elemente de originalitate și perspective relevante pentru aplicabilitatea clinică. Această teză îndeplinește toate criteriile academice și științifice necesare pentru susținerea publică și acordarea titlului de Doctor în Medicină al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara.

Conducător de doctorat,

Prof. Univ. Dr. Virgil Păunescu

Semnătura: _____

Data: 24.08.2026

Student-doctorant,

Alexandru Tîrziu

Semnătura: _____

Data: 24.08.2026