



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00990

(22) Data de depozit: 16.12.2013

(41) Data publicării cererii:
30.09.2015 BOPI nr. 9/2015

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL ONCOLOGIE
PROF.DR.ALEXANDRU TRESTIOREANU,
ȘOS. FUNDENI NR. 252, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GRUIA MARIA IULIANA, BD. BASARABIA
NR. 244, BL. MY8, SC. A, ET. 4, AP. 19,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• UIVAROSI VALENTINA,
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 31, BL. 15,
SC. 2, ET. 4, AP. 49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEGOIȚĂ VALENTINA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 231, BL. V1,
SC. B, ET. 7, AP. 63, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VASILESCU MONICA, STR. CÎRLENI
NR. 6, BL. C84, SC. A, ET. 2, AP. 16,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• DUMITRU MIRELA, BD. ION MIHALACHE
NR. 168, BL. 1, SC. B, AP. 34, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GLAVAN DANIELA, STR. IANCU JIANU
NR. 6, BL. M192, SC. 1, AP. 50, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NIȚU CRISTINA, STR. IZVORUL OLTULUI
NR. 9, BL. 22, SC. 2, ET. 3, AP. 87,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• PANAIT MARIETA,
STR. CĂPITAN NICOLAE LICAREȚ NR. 6,
BL. PM43, SC. 2, ET. 3, AP. 74, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **MODELE MURINE PENTRU EVALUAREA STRATEGIILOR
TERAPEUTICE ÎN CANCER BAZATE PE COMPUȘI CU
RUTENIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a efectelor antitumorale a unor compuși cu ruteniu (III). Metoda conform invenției constă în inocularea a 1×10^6 celule tumorale/ml în flancul drept al unui animal experimental, la 4 zile post-implant se inițiază un tratament anti-tumoral, bazat pe un compus cu Ru 75 mg/kg corp, de 3 ori pe săptămână, timp de 3 săptămâni, și se

monitorizează săptămânal greutatea, dimensiunile tumorale și parametrii biochimici de stres oxidativ din ser și țesuturi.

Revendicări: 3
Figuri: 9



MODELE MURINE PENTRU EVALUAREA STRATEGIILOR TERAPEUTICE IN CANCER BAZATE PE COMPUSI CU RUTENIU

Invenția se referă la trei modele experimentale preclinice concepute și aplicate pentru studierea acțiunii antitumorale a unor compuși de ruteniu(III) cu chinolone și dimetilsulfoxid.

Descoperirea și dezvoltarea medicamentelor împotriva cancerului, în special agenți citotoxici, diferă semnificativ de procesul de dezvoltare a medicamentelor pentru orice altă indicație. Provocările și oportunitățile unice în cercetarea acestor agenți sunt reflectate în fiecare etapă a procesului de dezvoltare a medicamentului: (1) obținerea unor compuși potențiali prin sinteză chimică sau prin extracție din surse naturale, (2) screening-ul medicamentului și farmacologia preclinică și (3) dezvoltarea clinică. Farmacologia preclinică presupune un screening preliminar pe modele de culturi celulare realizat pentru a identifica măsura și specificitatea acțiunii antitumorale, urmat de evaluarea eficacității și toxicității pe modele animale (Narang, A.S.; Desai, D. S., Anticancer drug development. Unique aspects of pharmaceutical development in Lu, Y.; Mahato, R.I. (eds.), Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics, Ed. Springer, pag 49-92).

Culturile de celule *in vitro* au fost utilizate pe scară largă în biologia cancerului și examinarea chimioterapicelor și a substanțelor terapeutice țintite, fiind cu certitudine responsabile de primele progrese în cercetarea din domeniul cancerului. Ele au o serie de avantaje, cum ar fi stabilirea condițiilor experimentale și a factorilor de mediu, precum și abilitatea de a manipula aproape orice țintă relativ ușor și la un cost redus. Cu toate acestea, ele au dezavantaje importante, cum ar fi incapacitatea de a reproduce structura tridimensională a tumorii, absenta unui micromediu tumoral și niveluri artificiale ale factorilor de creștere și citokinelor în mediul de cultură celulară (Cook, N.; Jodrell, D. I.; Tuveson, D. A., Predictive in vivo animal models and translation to clinical trials. Drug Discov. Today 2012, 17, 253-260).

De aceea, modelele murine au devenit o parte principală a cercetării în multe laboratoare ca fiind cel mai accesibil model animal. Există rapoarte ample care subliniază progresele realizate în biologia cancerului prin utilizarea acestor sisteme (Jonkers, J.; Berns, A.,

Conditional mouse models of sporadic cancer. Nat. Rev. Cancer 2002, 2, 251–265; Ocana, A.; Pandiella, A.; Siu, L. L.; Tannock I. F., Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2010, 8, 200–209).

În prezent este disponibilă o mare varietate de sisteme de tumori diferite pentru evaluarea *in vivo* a noilor medicamente antineoplazice. Cea mai mare parte a sistemelor gazdă murine sunt utilizate pentru tratamentul tumorilor experimentale datorită disponibilității de linii de rasă, a costurilor relativ scăzute, ușurintei de a obține modele de tumori și de a stabili puncte finale experimentale acceptate pe scară largă (Zips, D.; Thames, H. D.; Baumann, M., New anticancer agents: *in vitro* and *in vivo* evaluation. In vivo 2005, 19, 1-8; Taghian, A. G.; Suit, H. D., Animal systems for translational research in radiation oncology. Acta Oncol. 1999, 38, 829-838).

Tumorile murine spontane sau transplante pot fi studiate la șoareci imunocompetenți, în timp ce investigarea tumorilor umane necesită gazde imunodeficiente, de exemplu, șoareci nuzi, pentru a se evita respingerea țesutului. Modelele de tumori spontane oferă unele avantaje față de liniile de celule tumorale transplantate, de exemplu, diversitatea genetică, creșterea în mediul inițial, angiogeneza mult mai probabil asemănătoare cu cea de la pacienți, dar sunt destul de dificil de obținut și de menținut (Hansen, K.; Khanna, C., Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. Eur J Cancer 2004, 40, 858-880).

Tumorile injectate ortotopic, de exemplu în organul de origine, prezintă evident o similitudine mai mare cu situația clinică, iar răspunsul la medicamentele anticancer poate fi dependent de locul de implantare (Killion, J. J.; Radinsky, R.; Fidler, I. J., Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. Cancer Metastasis Rev. 1998, 17, 279-284; Sterling-Levis, K.; White, L., The role of xenografting in pediatric brain tumor research with specific emphasis on medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumors of childhood. In Vivo 2003, 17, 329-342).

Din considerente practice, sunt mult mai utilizate tumorile implantate ectopic, modele tumorale cu creștere subcutanată. Deși au apărut rezerve cu privire la valoarea tumorilor ectopice cu creștere rapidă atunci când unele medicamente noi nu au fost la fel de eficiente în trialurile clinice, comparativ cu studiile pre-clinice, compararea detaliată a rezultatelor pre-clinice și a datelor clinice indică faptul că modelele de tumori implantate ectopic pot fi extrem de predictive, atunci când experimentele sunt efectuate în condiții relevante clinic.

Testul întârzierii creșterii tumorii este o determinare funcțională robustă, standardizată, larg acceptată și utilizată în majoritatea experimentelor în care se studiază agenții anticancer *in vivo* (Kerbel, R. S., Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol. Ther.* 2003, 2, S134-139). O întârziere a creșterii tumorale ar oferi un beneficiu pentru pacienții cu cancer și este, prin urmare, un punct final experimental cu relevanță clinică. Un număr mare de date experimentale arată în mod clar că testul întârzierii creșterii tumorii este un instrument valoros pentru a evalua un nou agent anticanceros pe animale, oferind dovezi pentru evaluarea ulterioară a unui medicament în studiile clinice.

Trebuie făcută, însă, următoarea precizare: biologia tumorilor maligne ale animalelor de experiență nu se suprapune peste cea a cancerelor umane. Tumorile maligne animale au o capacitate spontană de metastazare mult redusă în comparație cu cele umane. Ritmul de creștere al cancerelor la animal este mult mai rapid (adaptat la durata medie de viață a speciei). Experimental, deși se încearcă să se reproducă cât mai fidel condițiile din patologia tumorală umană, se realizează artificial și din acest motiv, extrapolarea rezultatelor la om nu este întotdeauna fidelă. Cu toate acestea, cercetările experimentale pe animal reprezintă singura cale valabilă de descifrare a numeroaselor procese implicate în apariția și evoluția tumorilor maligne.

Inducerea tumorilor prin diferiți agenți cancerigeni, menținerea acestora prin transplantări seriate, selecționarea unor subpopulații celulare cu comportament biologic diferențiat, evidențierea unor factori stimulatori sau inhibitori ai creșterii tumorale etc reprezintă etape de cunoaștere de importanță capitală pentru oncologia umană.

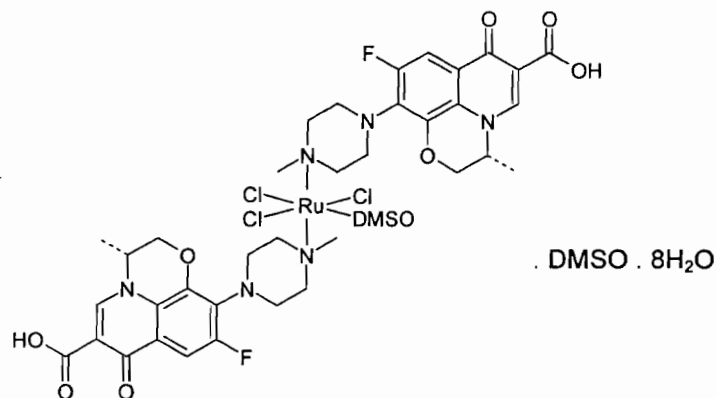
Medicamentele anticancer pe bază de complecși metalici s-au impus în practica clinică odată cu utilizarea cu succes a $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (Cisplatin) în tratamentul unor tipuri de cancer, inclusiv ovarian, cervical, al capului și gâtului și al unor limfoame (Rosenberg, B., Noble metal complexes in cancer chemotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977, 91, 129–150). În ciuda valorii terapeutice, utilizarea cisplatin și a derivaților săi carboplatin și oxaliplatin este limitată de efectele toxice destul de severe și de nivelul ridicat al rezistenței (Pérez, R.P., Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer* 1998, 34, 1535-1542; Fuertes, M.A.; Alonso, C.; Pérez, J.M., Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.* 2003, 103, 645-662).

Din cauza limitărilor utilizării clinice a derivaților platinici, cercetările s-au orientat către obținerea altor complecși metalici cu acțiune anticancer, unii compuși ai ruteniului dovedindu-se alternative viabile. Complecșii [*trans*-tetraclorobis(1*H*-indazol)rutenat (III)] de indazolium KP1019 (Jakupec, M.A.; Arion, V.B.; Kapitza, S.; Reisner, E.; Eichinger, A.; Pongratz, M.; Marian, B.; Graf von Keyserlingk, N.; Keppler, B.K., KP1019 (FFC14A) from bench to bedside: preclinical and early clinical development--an overview. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2005, 43, 595-596; Hartinger, C.G. Jakupec, M.A. Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P.J.; Keppler, B.K., KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem. Biodivers.* 2008, 5, 2140-2155) și [*trans*-tetracloro(*S*-dimetilsulfoxid)(1*H*-imidazol)ruthenat(III)] de imidazolium NAMI-A (Sava, G.; Pacor, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Mestroni, G.; Alessio, E. Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 1995, 95, 109–126), ambii aflați în prezent în faza II a trialurilor clinice, s-au dovedit cei mai promițători candidați ca alternativă la agenții platinici. Mecanismul de acțiune al acestor compuși de Ru(III) este încă necunoscut: NAMI-A este capabil să inhibe formarea metastazelor în diverse modele tumorale animale, deși nu exercită efecte citotoxice directe (Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M., Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S., Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 1898-1905), în timp ce compusul KP1019 prezintă efecte antitumorale directe prin inducerea apoptozei (Kapitza, S.; Jakupec, S.; Uhl, M.; Keppler, B.K.; Marian, B., The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer Lett.* 2005, 26, 115-121). Studii recente au evidențiat potențialul ca agenți anticanceroși ai unor complecși organoruteniu (II) cu chinolone având formula generală [(Cym)RuCl(L)] (cym = η^6 -*p*-cymene; L = ofloxacinat, cinoxacinat, nalidixicat, thionalidixicat anions) pe baza testelor pe linii de celule canceroase umane (Kljun, J.; Bytzeck, A.K.; Kandioller, W.; Bartel, C.; Jakupec, M.A.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K.; Turel, I., Physicochemical studies and anticancer potency of ruthenium η^6 -*p*-cymene complexes containing antibacterial quinolones. *Organometallics* 2011, 30, 2506–2512; Hudej, R.; Kljun, J.; Kandioller, W.; Repnik, U.; Turk, B.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K.; Miklavc \square ic \square , D.; Turel, I., The thionated derivative of the antibacterial agent nalidixic acid and

its organoruthenium complex were prepared. Organometallics 2012, 31, 5867–5874; Turel, I.; Kljiun, J.; Perdih, F.; Morozova, E.; Bakulev, V.; Kasyanenko, N.; Byl, J.A.; Osheroff, N., First ruthenium organometallic complex of antibacterial agent ofloxacin. Crystal structure and interactions with DNA. Inorg. Chem. 2010, 49, 10750-10752).

Avantajele unei terapii alternative pe baza de compuși cu ruteniu decurg din toxicitatea redusă, un nou mecanism de acțiune, perspectiva absenței rezistenței încrucișate și un spectru de activitate diferit comparativ cu antitumoralele tradiționale pe baza de platină.

Pornind de la aceste premise, prezenta invenție are ca obiect stabilirea unor modele animale murine pentru evaluarea preclinică a potențialului antitumoral al unor complecși de ruteniu (III) cu liganzi micști, un derivat chinolonic și dimetilsulfoxid. Aplicarea modelor elaborate este descrisă pentru complexul cu formula: $[RuCl_3(DMSO)(levof)_2] \cdot DMSO \cdot 8H_2O$ (levof = levofloxacină) și structura:



În conformitate cu tematica Conferinței de la Bratislava din 2002, « Etica în cercetarea științifică » și a Societății Regale pentru Prevenirea Violenței asupra Animalelor din Marea Britanie, susținem că suferințele provocate animalelor în cadrul acestor cercetări, prin modificările cauzate de reacția la stres, influențează corectitudinea datelor științifice. Drept urmare reducem nivelul durerii provocate asupra unui animal de către un experiment (principiul limitării durerii), existând o justificare asupra numărului de animale folosite și încercând de a scădea la maxim numărul lor (principiul reducerii). În cazul experimentelor pe rozătoare mici, conceperea experimentului și a metodelor de control trebuie să se țină seama de importanța problemei investigate și să permită determinarea limitelor de siguranță. Evaluarea efectelor toxice se bazează pe observarea comportamentului, a creșterii, pe testele hematologice și biochimice, și, de asemenea, pe analiza rapoartelor de autopsie și a datelor histologice care le

însoțesc Modelele experimentale s-au elaborat tinind cont de: Hotarirea nr. 63/2002 privind aprobarea Principiilor de bună practica de laborator, precum și inspecția și verificarea respectării acestora în cazul testărilor efectuate asupra substanțelor chimice; Ordinul 263/2003 ; Directiva Consiliului nr. 86/609/CEE privind protecția animalelor de laborator folosite în scop experimental sau în alte scopuri științifice; Legea nr. 471/2002 privind aprobarea Ordonanței nr. 37/2002 pentru protecția animalelor folosite în scopuri științifice sau în alte scopuri experimentale; Ordin nr. 143/2002 pentru aprobarea instrucțiunilor privind adăpostirea și îngrijirea animalelor folosite în scopuri științifice sau în alte scopuri experimentale.

Studii preclinice

S-au utilizat în studiu șobolani Wistar normali, sănătoși cu o greutate medie de 200 grame, cărora li s-au administrat compuși pe baza de ruteniu abreviat Ru-levo , animale tinere, cu aspect fiziologic normal, sănătoase

Tumorile animalelor de experiență obținute anterior, (carcinosarcomul Walker 256) au fost menținute prin pasaje seriate și inoculate în flancul drept circa 1.000.000 celule / ml, atunci când s-a inițiat experimentul.

Transplantările efectuate au fost cele subcutane, care sunt și cele mai obișnuite căi de grefare, deoarece tumorile obținute pot fi observate și măsurate cu ușurință. Dezvoltarea tumorilor este consecința creșterii numărului absolut al celulelor tumorale și survine atunci când rata proliferării celulelor tumorale o depășește pe cea a pierderilor. În cazul acestei tumori investigate, există o perioadă de lag care permite creșterea și urmărirea tumorilor, ceea ce face ca acest tip tumoral experimental să ofere o serie de avantaje pentru modelele experimentale

Parametrii biochimici investigați: au fost: indicele de peroxidare lipidică, evaluat prin măsurarea concentrației malondialdehidei serice, produs final al degradării hidroperoxidilor lipidici, evaluat prin reacția cu acidul 2-tiobarbituric, tiolii albuminici au fost măsurați prin metoda Schosinski utilizând reactiv Ellman într-o reacție măsurabilă spectrofotometric la 412 nm și antioxidanții totali, metoda utilizează abilitatea serului de a reduce fierul. La pH scăzut complexul Fe^{III} – tripiridil-s- triazina (Fe^{III} –TPTZ) este redus la forma feroasă cu formarea unui nou complex care dezvoltă o culoare intensă albastră, măsurabilă, cu un maxim de absorbție la 593 nm. Orice reacție cu un potențial redox pozitiv în condițiile menționate poate conduce la reducerea complexului Fe^{III} –TPTZ. Utilizându-se un exces de Fe, factorul limitativ al complexului Fe^{III} –TPTZ și a formării culorii reprezintă abilitatea reducătoare a probei. Reacția

măsoară reducerea complexului ion feric-2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) la un produs colorat.

Determinările au fost efectuate din ser și din extrase tisulare brute ale următoarelor organe: ficat, rinichi ca filtre primare, plămâni, creier, țesut peritumoral și țesut tumoral.

S-a administrat doza calculată conform datelor din literatura și anume 75 mg / kg corp

Exemplul 1

Se inoculează 1×10^6 celule tumorale / ml in flancul drept al animalului experimental și la 4 zile post-implant se inițiază un tratament anti-tumoral bazat pe compusul cu Ru 75mg / kg corp de 3 ori pe săptămână timp de 3 săptămâni. Se monitorizează săptămânal greutatea individuală, dimensiunile tumorale și parametrii biochimici de stres oxidativ din ser și tesuturi

Exemplul 2

Se lucrează similar procedului de la exemplul 1, inițierea tratamentului in aceeași doza 75mg / kg corp se face la 7 zile post-implant cand tumora are dimensiuni palpabile. Săptămânal se monitorizează parametrii menționați in exemplul 2.

Exemplul 3

După inocularea celulelor tumorale identic ca in exmplul 1 și 2 se inițiază tratamentul cu compusul de testat in aceeași doză 75mg / kg corp la 14 zile post-implant cand apar manifestări celulare care sugerează apoptoza și necroza tesutului tumoral. Tratamentul se desfășoara de 3 ori pe săptămână până in ziua 21 de la implant. Se monitorizează aceeași parametrii.

lot	Inainte tratam	4 zile tratam	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
1.	200 g	204g	212	218 g	219g
2.	214 g	-	236g	230 g	230g
3	202 g	-	-	231g	233g
Lot martor netratat	217 g	221 g	223g	229 g	232g

Tabel 1. Evoluția greutății corporale

Creșterea greutății corporale se datoreaza masei tumorale in evolutie. Se observa că nu există modificări semnificative între loturile testate

Volumul tumoral pentru fiecare tumoră în parte se calculeaza cu relația:

$$V_{\text{tumoral}} = a \times b^2 \times 0,52,$$

unde:

a = diametrul mare al tumorii (mm);

b = diametrul mic al tumorii (mm);

0,52 = grosimea tegumentului (mm).

lot	4 zile tratam	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
1.	14 mm	25 mm	33 mm	38
2.	-	25 mm	35 mm	43
3	-	-	36mm	40mm
Lot martor netratat	21 mm	32mm	39 mm	42mm

Tabel 2 Evoluția diametrelor tumorale

Tumorile au crescut fără înregistrarea unui efect antitumoral marcant, in plus s-au înregistrat și tumori gigante in lotul 2. există și cateva cazuri de rejectii in limita marjei de rejectii spontane. Creșterea tumorală înregistrată a fost de până la 60% față de valoarea de la 7 zile post-implant.

La examenul necropsic efectuat in dinamica tratamentului și evolutiei tumorale s-au înregistrat următoarele aspecte:

lot	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
Lot tratat	Tumora cu aspect preponderent sarcomatos, consistența fermă, invazivălocal. Ficat distrofic, friabil	Tumora aspect mixt (carcinosarcomatos) necrozată intens, invazivă local. Ficat, rinichi intens distrofici, foarte friabili. Creier friabil	Tumora suprainfectata, invaziva local
Lot martor netratat	Tumora cu aspect mixt, carcino-sarcomatos, infiltrativă, invazivălocal	Tumora voluminoasă, intens necrozata, invazivălocal	Stare proastă de intretinere, slabire, blana aglutinată, stomatita, secretii nazale sero-mucoase

Tabel 3 Evaluarea toxicității generale

In urma examenelor necropsice nu se înregistrează modificări semnificative intre loturi care să sugereze o actiune antitumorală a compusului testat.

Evaluarea activității antitumorale prin determinarea parametrilor de stres oxidativ

Lot	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
ser			
Lot 1	5,83	8,91	9,57
Lor 2	8,08	7,89	13,61
Lot 3	13.06	7,77	9,13

16-12-2013

ficat			
Lot 1	32,58	17,94	21,83
Lor 2	29,81	38,35	12,16
Lot 3	25,61	41,06	50,59
rinichi			
Lot 1	10,08	4,78	9,23
Lor 2	9,33	16,19	11,77
Lot 3	6,62	11,23	17,04
plaman			
Lot 1	6,15	4,05	4,40
Lor 2	5,24	7,57	8,76
Lot 3	7,75	7,81	7,41
creier			
Lot 1	9,06	9,85	8,49
Lor 2	16,20	12,45	12,41
Lot 3	11,06	12,34	11,16
Tesut peritumoral			
Lot 1	4,41	4,26	4,05
Lor 2	5,16	4,44	6,25
Lot 3	6,94	5,21	6,9
Tesut tumoral			
Lot 1	2,95	4,90	4,05
Lor 2	12,52	8,17	10,68
Lot 3	3,82	9,68	8,68

Tabel 4 Valorile peroxizilor lipidici exprimate in μ moli / 100 ml

Rezultatele obținute indica o creștere a reacțiilor de oxidare manifestate la nivelul lipidelor. Există diferențe față de fiecare țesut, înregistrându-se valorile cele mai mari la nivelul ficatului, sediul metabolizării acestor compuși, dar și la nivelul rinichilor. S-au înregistrat valori mari și la creier. Nu s-au obținut valorile scontate la nivelul țesutului tumoral

Lot	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
ser			
Lot 1	372	141	192
Lor 2	157	137	679
Lot 3	143	171	171
ficat			
Lot 1	1732	1655	1254
Lor 2	1529	1802	1492
Lot 3	1276	1673	1163
rinichi			
Lot 1	517	623	337
Lor 2	482	729	858
Lot 3	233	936	693
plaman			
Lot 1	1110	328	280
Lor 2	269	328	346
Lot 3	231	510	282
creier			

Lot 1	581	353	377
Lor 2	513	499	152
Lot 3	344	531	209
Tesut peritumoral			
Lot 1	700	200	328
Lor 2	262	271	167
Lot 3	321	266	232
Tesut tumoral			
Lot 1	369	435	232
Lor 2	709	484	484
Lot 3	382	827	435

Tabel 5. Valorile tiolilor totali exprimate in $\mu\text{moli} / \text{l}$

S-au inregistrat valori crescute ale tiolilor albuminici la nivelul ficatului al plămănilor și al țesutului peritumoral. Pentru o eficiență antitumorală a acestor compuși ar fi fost de dorit să inregistrăm o mai puternică degradare oxidativă in țesutul tumoral cunoscandu-se și faptul că acest țesut produce in exces proteine cu sulf.

Lot	7 zile tratam	14 zile tratam	21 zile tratam
ser			
Lot 1	0,72	0,96	1,10
Lor 2	0,86	0,78	0,60
Lot 3	0,77	0,72	0,48
ficat			
Lot 1	4,99	4,69	3,83
Lor 2	4,24	4,73	4,64
Lot 3	5,60	3,76	5,98
rinichi			
Lot 1	2,96	2,88	2,76
Lor 2	2,63	2,99	2,17
Lot 3	2,35	2,03	5,19
plaman			
Lot 1	2,02	1,63	1,16
Lor 2	1,19	1,72	1,88
Lot 3	1,72	2,66	1,73
creier			
Lot 1	1,81	0,75	0,36
Lor 2	0,85	0,89	1,55
Lot 3	0,66	1,06	0,48
Tesut peritumoral			
Lot 1	1,21	2,06	1,56
Lor 2	1,58	1,82	1,10
Lot 3	2,05	1,34	2,78
Tesut tumoral			
Lot 1	0,37	2,78	1,76
Lor 2	3,03	2,95	1,35
Lot 3	1,01	2,28	2,61

Tabel 6. Valorile antioxidanților totali, exprimate in $\mu\text{moli} / \text{l}$

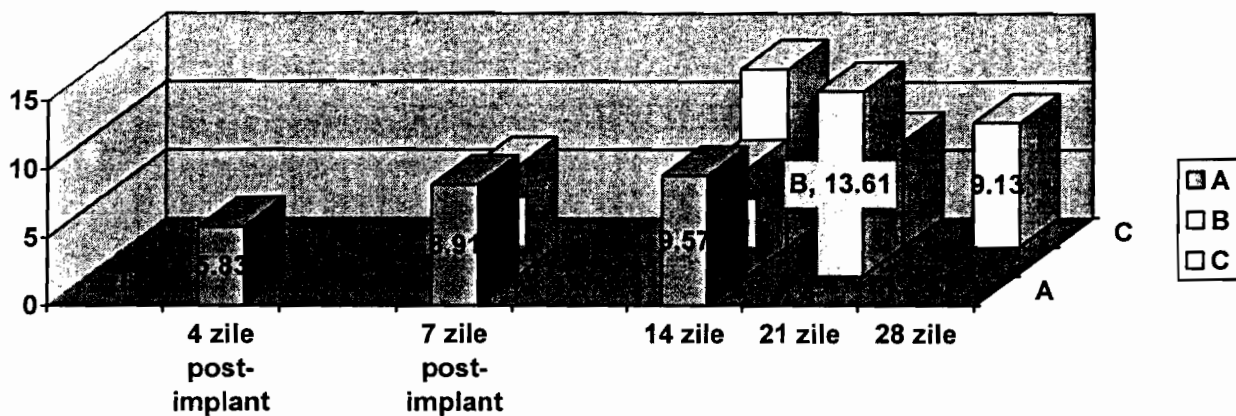
REVENDICARI

1. Model experimental preclinic in care se inoculeaza 1×10^6 celule tumorale / ml in flancul drept al animalului experimental și la 4 zile post-implant se inițiază un tratament anti-tumoral bazat pe compusul cu Ru 75mg / kg corp de 3 ori pe saptamana timp de 3 saptamani. Se monitorizeaza saptamanal greutatea individuala, dimensiunile tumorale și parametrii biochimici de stres oxidativ din ser și țesuturi

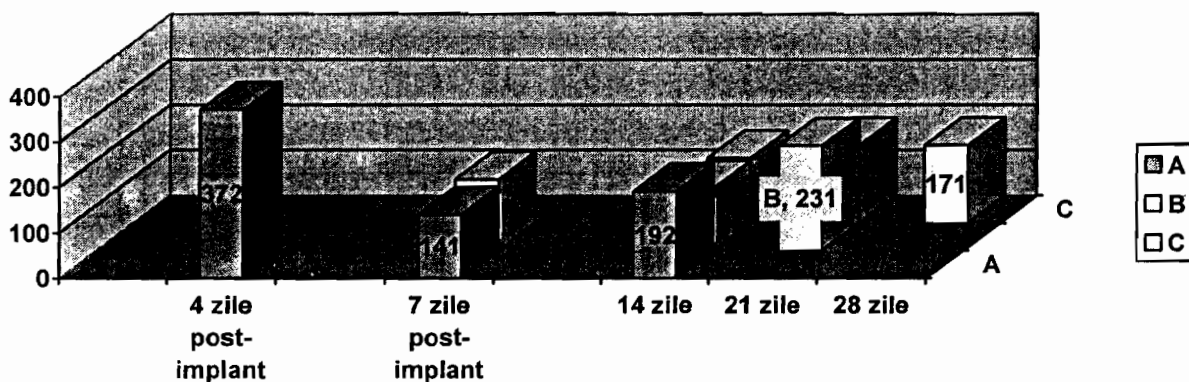
2 Model experimental conform revendicarii 1 in care inițierea tratamentului in aceeași doza 75mg / kg corp se face la 7 zile post-implant cand tumora are dimensiuni palpabile. Saptamanal se monitorizeaza parametrii menționați in revendicarea 1.

3. Model experimental conform revendicarii 1 in care se inițiază tratamentul cu compusul de testat in aceeași doza 75mg / kg corp la 14 zile post-implant cand apar manifestari celulare care sugereaza apoptoza și necroza țesutului tumoral. Tratamentul se desfasoara de 3 ori pe saptamana pana in ziua 21 de la implant. Se monitorizeaza aceeași parametrii.

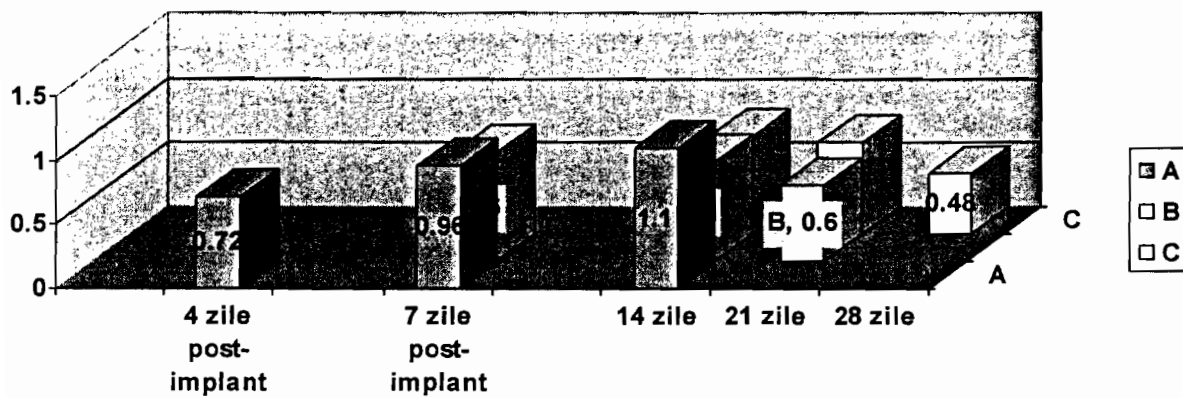
Compusul testat a avut capacitatea de a activa sistemele endogene antioxidante fapt măsurat prin valorile crescute ale antioxidantilor, cele mai afectate țesuturi au fost cel hepatic și renal sugerand o toxicitate crescută la acest nivel și nu la țesutul tumoral așa cum ne așteptam. Posibil să apară cateva blocaje la sistemele de transport sau reacții încrucisate



Grafic 7. Determinarea peroxizilor lipidici in dinamica tratamentului



Grafic 8. Tiolii albuminici la loturile investigate



Grafic 9. Antioxidanții totali