



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00664**

(22) Data de depozit: **21/09/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CONSTANTIN CAROLINA,
STR.TEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1,
AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEAGU MONICA, STR.ALECU
MATEEVICI NR.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **MARINESCU BOGDAN, STR.
VISCOLULUI NR. 52, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ZURAC SABINA ANDRADA, STR. TOPAZ
NR. 5D, BRAGADIRU, IF, RO**

(54) **CLONĂ DE CELULE TUMORALE OBTINUTĂ DIN MODEL
MURIN DE CARCINOGENEZĂ INDUSĂ CHIMIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unei clone de celule primare cu potențial tumorigen, utilizată în studii de testare a unor compuși antitumorali pentru patologia dermatologică. Metoda conform invenției constă în inducerea carcinogenezei chimice duble în model murin, analiza histopatologică a tumorilor rezultate, stabilirea clonelor celulelor primare din tumori, stabilirea culturilor de celule cu capacitate tumorigenă

care cuprinde etapa de verificare a tumorigenității celulelor primare, etapa de inducere a tumorii cu celule primare tumorigene și etapa de inducere a tumorii cu celule izolate din tumora reinoculată, fiind generate la 14 zile tumori cutanate localizate.

Revendicări: 2
Figuri: 6



DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la o metodă de izolare a unor culturi celulare primare cu potențial tumorigen dintr-un model de carcinogeneză chimică la șoarece nud, în scopul obținerii unui model pentru testarea eficienței unor compuși cu potențial terapeutic și/sau fotosensibilizator de tipul ftalocianinelor în tumorile cutanate. Testarea și validarea de compuși cu potențial terapeutic fotosensibilizator face parte din dezvoltarea continuă a terapiei fotodinamice (TFD) ca procedură alternativă de tratament topic în dermato-oncologie, în special în tumorile non-melanom.

Stadiul actual este prezentat în literatura de specialitate prin studii care fac referire la metode ce descriu tehnici de izolare și de inițiere a unor culturi celulare de diferite origini (umane sau animale), menite să servească drept instrument de studiu pentru dezvoltarea de noi agenți antitumorali. Astfel, Lovitt C.J. și colab. abordează liniile celulare tumorale în contextul tridimensional (3D), ca o parte integrantă a procesului de descoperire de noi agenți terapeutici. Autorii studiului consideră modelele 3D benefice pentru investigarea proceselor moleculare și a rezistenței la terapie în celula tumorală. Cu toate acestea modelarea complexității cancerului cu ajutorul acestor linii celulare aderate pe suport de plastic nu reprezintă cu acuratețe micromediul tumoral; în plus, autorii susțin că multe mecanisme moleculare studiate în modele celulare 3D arată că celulele tumorale cultivate bidimensională (2D) nu răspund la compuși terapeutici în manieră similară. Deși aceste culturi celulare 3D sunt promițătoare în descoperirea de medicamente, sunt necesare studii viitoare care să includă deopotrivă caracterizarea atât a proprietăților fizice cât și celulare ale unei tumori [1]. Ham S.L. și colab. integrează culturile celulare 3D în fluxul analizei celulei tumorale și a descoperirii și dezvoltării de agenți terapeutici, și susțin includerea celulelor tumorale primare în acest flux în scopul personalizării tratamentului cancerului [2]. Astfel modelul celular propus prin prezenta invenție contribuie pe lângă eficiența testării, la design-ul medicinei personalizate în schema de testare a unui nou compus antitumoral.

Culturi primare de celule din piele au fost testate în studiile realizate de Popovic A și colab. Pentru testarea TFD cu hipericină au fost utilizate keratinocite umane primare, melanocite și fibroblaste normale care reprezintă compartimentele epidermal și dermal ale pielii. Studiile au relevat prin metode de imagistică date privind acumularea intracelulară a hipericinei (citoplasmică și nu nucleară) la doze sub-letale ($3\mu\text{M}$). A fost evaluată generarea de specii reactive de oxigen în urma TFD cu hipericină, cea mai mare eliberare de specii fiind înregistrată pentru fibroblaste comparativ cu melanocite și keratinocite. Totodată procentul de celule apoptotice a fost de 64% pentru fibroblaste și 20% pentru melanocite ceea ce s-a

corelat cu nivelul de specii toxice generate în cursul TFD. În opinia autorilor studiul contribuie la cunoașterea răspunsului celular al pielii la TFD oferind posibilitatea aplicării eficiente a tratamentelor fotobiologice [3].

Printre compusii cu potențial antitumoral, *ftalocianinele* își găsesc aplicații ca agenți fotosensibilizatori (FS) și sunt studiați cu precădere în contextul TFD al tumorilor solide, localizate și accesibile aplicării acestei proceduri. TFD este pe scurt un tratament medical care utilizează FS înglobați de celulele țintă și care prin activare cu lumină specifică generează specii reactive de oxigen care cauzează moartea celulară a celulelor tumorale, transformate. Îndeosebi ftalocianinele clorurate și metalate sunt utilizate pentru acest gen de proceduri.

Maduray K. și colab. [4] au testat ftalocianine cu fier (III) sau indium (III) la celule umane de melanom, celule pe care le-au însămânțat și apoi tratat cu diferite concentrații de ftalocianine. Ulterior celulele încărcate au fost iradiate și analizate din punct de vedere al viabilității și proliferării post-iradiere. Rezultatele au oferit date privind concentrațiile optime de FS și de doza de lumina laser aplicabile *in vitro* în această TFD experimentală dar studiul nu oferă perspective în ceea ce privește extrapolarea efectului *in vivo*. De altfel Maduray K. [5] inițiasse studii cu ftalocianine cu câțiva ani înainte, când a testat citotoxicitatea de întuneric pentru ftalocianine metalate cu aluminiu (III) și zinc (II) pe o linie de melanom uman (UACC-62), fibroblaste și keratinocite umane normale. De asemenea studiul este realizat pe linie standard de melanom dar cea mai bună reproductibilitate trebuie realizată în conexiune cu culturi tumorale primare care, prin heterogenitatea lor, transpun mult mai fidel situația fiziologică și reproduc mult mai acurat micromediul tumoral.

Literatura de brevete evidențiază metode de obținere a unor linii celulare continue, de ex. brevetul US20150072414 A1 [6], definește metode de producere a unor linii celulare continue umane sau animale pornind de la material celular primar (non-continuu), fără introducerea de gene virale străine. Celulele de start sunt tratate cu lumina UV, lăsate să prolifereze apoi sunt selectate drept linie celulară continuă acele celule capabile să prolifereze cel puțin 20 de pasaje. O asemenea linie continuă poate fi utilizată pentru expresia recombinată a proteinelor, obținerea de antigene virale sau obținerea de populație virală integrală utilă în special pentru prepararea de vaccinuri.

O altă abordare privind celulele primare este descrisă în brevetul US20110092378 A1 [7] unde este prezentată o invenție legată de diagnoza și tratamentul cancerului cu ajutorul celulelor „stem” care se găsesc în componența tumorilor solide stabilite. Invenția descrie o metodă de creștere *in vivo* a celulelor din tumori solide, precum și o metodă de creștere a celulelor tumorale care sunt în suspensie uni-celulară sau sub formă de agregate mici. În plus,

invenția propune un model animal de xenogrefă în care se stabilesc noi tumori mamare pornind de la tumori primare, prin injectarea suspensiei tumorale în glanda mamară la șoareci cu imunodeficiență severă. Tumorile mamare derivate sunt inițiate de celulele tumorale stem clonogenice, și pot fi testate în diverse scopuri biomedicale cum ar fi testarea de agenți anticanceroși, noi terapii, dezvoltarea de agenți pentru terapie țintită a unei căi de semnalizare sau monitorizarea pacienților (ca demers adjuvant la mamografie).

Brevetul US20120289948 A1 [8] evidențiază o abordare pentru tratarea unei zone de piele prin radiație de scanare, invenție care este în relație cu instrumentele și metodele de tratament dermatologic radiologice, de ex. raze laser care furnizează tratament fracțional.

Un alt brevet din sfera dermato-oncologiei US 20120322743A1 [9] face referire la o metodă de diagnostic, prevenție și tratament al melanomului, pe baza explorării moleculelor microARN asociate cu melanomul malign, ca și pe baza a altor specii de acizi nucleici componenți sau derivați ai acestei patologii.

Un alt brevet care face referire la o metodă de obținere a unor populații celulare este brevetul US 20090221070A1 [10] care definește o metodă de expansiune a populației de limfocite T reglatoare umane pe celule-suport (denumit *feeder*) de la insecte. Aceste celule suport sunt modificate prin adăugarea unor receptori pentru molecule CD de pe suprafața celulelor T, respectiv anti-CD3, anti-CD28, anti-CD2, anti-IL2 și anti-IL4; prin această metodă limfocitele T proliferază cu ajutorul celulelor *feeder*, sunt expandate și pot fi menținute în faza exponențială de creștere pentru cel puțin o lună.

Din brevetul WO/2016/139192 [11] este cunoscută o metodă *in vitro* pentru evaluarea prognosticului și a timpului de supraviețuire la pacienți cu cancer, prin parcurgerea următoarelor etape: determinarea nivelului de expresie a markerilor DNMT3A/ISGF3Y în proba biologică de la pacient; compararea nivelului de expresie al markerilor cu o valoare de referință precalculată; definirea prognosticului bun când nivelul de expresie este mai scăzut față de referința și a unui prognostic nefavorabil când expresia cuplului de markeri este mai crescută față de referință.

Toate aceste date științifice prezentate în literatura de brevete și în literatura de specialitate ne-au servit drept argumente pentru stabilirea unei metode de obținere a unei clone de celule primare cu capacitate tumorigenă utilă în studii de testare compuși antitumorali pentru patologia dermatologică.

Problemele tehnice pe care invenția prezentă urmărește să le rezolve au în vedere următorul context:

- Metoda propusă de noi propune o alternativă mai puțin costisitoare comparativ cu modelele tridimensionale dar cu aceeași eficiență în testarea compușilor candidați pentru terapia tumorilor solide, cu precădere cutanate.
- Studiile recente din literatura de specialitate vin în sprijinul invenției prezente, deoarece datele de testare a compușilor fotobiologici terapeutici în *culturi de celule primare normale* ale pielii prevalează, în timp ce modelele de culturi cu *celule primare tumorale* lipsesc încă în acest gen de demersuri experimentale.
- Cea mai bună reproductibilitate a unei metode de testare *in vitro* a unor potențiali compuși antitumorali trebuie realizată în conexiune cu culturi tumorale primare care, prin heterogenitatea lor, transpun mult mai fidel situația fiziologică și reproduc mult mai acurat micromediul tumoral.

Prin urmare, invenția urmărește să rezolve următoarele probleme:

- Obținerea unei clone de celule primare murine cu proprietăți tumorigene, metodă care nu este abordată actual în sistemele experimentale curente ce vizează testarea *in vitro* de compuși noi cu potențial antitumoral sau fotosensibilizator de tip ftalocianină;
- Integrarea etapei de obținere clona primară tumorigenă în modelul de inducere a formațiunii tumorale cutanate, ca parte integrantă a fluxului metodologic privind testarea *in vivo* a eficienței compusului (faza preclinică) ca etapa de trecere la studii clinice.

Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare:

Exemplul 1

Inducerea carcinogenezei chimice

Acest exemplu descrie modul de inducere a carcinogenezei chimice în model murin, carcinogeneza chimică cutanată fiind prima etapă în fluxul tehnic care conduce la stabilirea metodei de izolare clonă cu potential tumorigen, așa cum reiese din Figura 1. Modelul de carcinogeneză chimică dublă a utilizat carcinogenii DMBA și PMA pentru inducerea de tumori cutanate la șoarecii nuzi.

Au fost utilizați următorii reactivi și animale de laborator:

- Carcinogeni: DMBA (*7, 12-dimethylbenz [alpha] anthracene*; producător firma Sigma Aldrich) care a fost solubilizat în acetona (99.99% pura); PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate; producător Sigma Aldrich), solubilizat în etanol absolut. Soluția de lucru

DMBA a fost preparată *extemporaneum*. Soluția de lucru PMA a fost preparată în etanol, porționată și păstrată la temperatura de -20°C , până la utilizare.

- Animale de laborator: șoareci nuzi BALB/c CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/Crl, furnizați de *Jackson Laboratories*, întreținuți în Biobaza institutului „Victor Babeș”.

Protocolul de lucru:

Modelul experimental de carcinogeneză chimică în două etape utilizează DMBA și PMA după metodologia descrisă de literatură [12,13] și publicată de grupul nostru în 2010 [14].

- S-au folosit șoareci nuzi, un număr egal de femele și masculi, care au primit prin aplicare cu pipeta în regiunea dorsal caudală câte 0,010 mg/ml DMBA (0,1 ml/șoarece). După un interval de 7 zile, au primit în aceeași zonă, de două ori pe săptămână, câte 0,001 mg/l PMA (0,1 ml/șoarece), până în ziua 128. Grupul de șoareci control a primit aceeași procedură, prin aplicarea de două ori pe săptămână de alcool etilic.
- Șoarecii au fost cântăriți regulat și controlați clinic pentru apariția carcinogenezei cutanate induse chimic, timp de 128 de zile. Multiplicitatea tumorală (număr mediu de tumori/șoarece) a fost înregistrată săptămânal.
- Începând din ziua 55, la șoarecii nuzi a început dezvoltarea de mici excrescențe în zona aplicării carcinogenilor. Până la finalul perioadei de observație (ziua 128) leziunile au crescut atât în diametru (3 mm-diametrul maxim atins) dar și ca număr, observându-se aproximativ 20 de formațiuni tumorale cu diametrul între 1-3 mm.
- La finele perioadei de observație șoarecii au fost sacrificați și au fost colectate toate tumorile apărute. Tumorile recoltate au fost supuse la investigația realizată de către un patolog și în paralel secțiuni tumorale nefixate au fost supuse obținerii de culturi celulare.

Exemplul 2

Analiza histopatologica a tumorilor rezultate în urma carcinogenezei chimice duble

Tumorile cutanate recoltate de la șoarece au fost înghețate la -70°C imediat după excizie. Au fost prelucrate prin secțiuni de 5 μm cu un criostat și colorate prin metoda de marcarea cu eozina și hematoxilină după un protocol adaptat [15]. Secțiunile au fost examinate prin evaluare anatomo-patologică. În urma investigației histo-patologice, s-a stabilit existența heterogeneității tumorale, prin identificarea în secțiunile analizate de papiloame și carcinoame scuamoase cutanate.

Protocolul de lucru aferent analizei histopatologice s-a desfășurat astfel:

- Piesele recoltate au fost orientate macroscopic și au fost selecționate fragmente conținând ariile de interes. Fragmentele tisulare recoltate au fost imersate în formol 10% tamponat imediat după recoltare. Prelucrarea histopatologică s-a efectuat prin deshidratare, clarificare și impregnare cu parafină prin procedură automată (histoprosesor Leica ASP 200s), spălare piese 1½ h apă curentă, apoi introducere în aparat, urmată de următoarea rețeta prezentată în tabelul următor:

Nr. etapa	Reactiv	Timp procesare	temp	Presiune/ Vacum	Timp scurgere
1.	Apa	10 minute	-	P/V	80 sec.
2.	Alcool etilic 70°	1½ h	40°C	P/V	80 sec.
3.	Alcool etilic 80°	1¾ h	40°C	P/V	80 sec.
4.	Alcool etilic 96°	1¾ h	40°C	P/V	80 sec.
5.	Alcool etilic absolut	1 h	40°C	P	80 sec.
6.	Alcool etilic absolut	1½ h	40°C	P/V	80 sec.
7.	Alcool etilic absolut	1½ h	40°C	P/V	80 sec.
8.	Xilen	2 h	52°C	P	80 sec.
9.	Xilen	2 h	52°C	P	80 sec.
10.	Xilen	2 h	55°C	P/V	80 sec.
11.	Parafina	1 h	58°C	P	80 sec.
12.	Parafina	2 h	58°C	P	80 sec.
13.	Parafina	3 h	58°C	P	80 sec.

- Fragmentele impregnate cu parafină au fost incluse în blocuri de parafină cu ajutorul unor stații de includere Thermo Fisher Microm EC 1150 H și secționare la 3μ cu ajutorul unor microtoame rotative Leica RM 2255 și RM 2265; secțiunile au fost etalate pe lame simple pentru colorații de rutină (Hematoxilină Eozină - HE) sau speciale (PAS, Giemsa, Perls, Fontana-Masson, Gomori) sau acoperite cu polilizină pentru colorațiile imunohistochimice (IHC). Colorația HE a fost efectuată cu ajutorul coloratorului automat Microm HMS 760; lamelele au fost montate cu ajutorul montatorului automat Leica CV 5030.

Protocolul de lucru pentru colorația hematoxilină-eozină a cuprins următoarele etape:

- Deparafinare
- Hidratare alcool etilic absolut, 96°, 70°
- Spălare în apă
- Colorare cu hematoxilină (hemalaun) Mayer – 30sec. - 5 minute*
- Spălare în apă
- Diferențiere rapidă în alcool- acid clorhidric

- Spălare în apă
- Contrastare în apă litinată – 10 min
- Colorare cu eozină 10-90 secunde*
- Deshidratare
- Clarificare
- Montare.

Reactivii necesari acestei etape:

- Hematoxilina (hemalaun) Mayer: hematoxilina 1,5 g + alaun de potasiu 75g + iodat de sodiu 0,3g + apa distilata 1 litru.
- Eozina: eozina galbena 6g + eozina albastra 6g + orange G 0,4g + alcool etilic 70° 700 ml + solutia saturata carbonat de litiu 80 ml + acid acetic glacial 3 ml.
- Alcool- acid clorhidric: 99 ml alcool etilic 70°+ 1 ml acid clorhidric 1N
- Apă litinată : 99 ml apă de robinet + 1 ml sol. saturată de carbonat de litiu

Exemplul 3

Stabilirea clonelor celulare primare din tumori

În acest exemplu este descris procedeul de obținere a clonelor celulare primare rezultate în urma modelului de carcinogeneză chimică cutanată în două etape. Din cauza neomogenității tumorale recunoscute pe plan internațional a culturilor obținute prin aplicarea carcinogenezei chimice, am inițiat o serie de culturi celulare primare din tumorile rezultate în urma modelului experimental cu carcinogenii DMBA și PMA.

Au fost utilizați următorii reactivi: mediu de cultura DMEM-F12 (Sigma-Aldrich); ser fetal bovin; solutie antibiotic-antimicotic (100X, Sigma Aldrich); solutie tripsina- EDTA (0.25% cu rosu fenol, Sigma Aldrich); tampon fosfat salin (1X, steril, Sigma-Aldrich); mediu de crioprezervare celule cu DMSO (1X, Sigma Aldrich); colorant vital Tripan Blue (soluție sterila 0.4%, Sigma-Aldrich).

Protocolul de lucru:

Metodologia descrisă de realizare culturi celulare primare este adaptată după [16, 17, 18]. Tumori de dimensiuni cuprinse între 2 - 5 mm² au fost recoltate de la animalele incluse în modelul experimental, și menținute peste noapte la 4°C în soluție de antibiotic/antimicotic.

- Tumorile au fost prelucrate în condiții sterile având în vedere cultivarea pe termen lung intenționată: au fost secționare în fragmente de 0,5 mm² și introduse în 0,25% tripsina în TFS, la 4°C, peste noapte.

- A doua zi, celulele desprinse din fragmentele tumorale au fost trecute prin vată sterilă pentru îndepărtarea fragmentelor, debriurilor tisulare și celulare. Suspensia celulară obținută a fost o suspensie de celule cu viabilitate peste 90% evaluată prin colorație cu colorant vital (Trypan Blue).
- Suspensia celulară a fost supusă cultivării în mediu DMEM-2 cu 1% FBS, 0.04% soluție de antibiotic/antimicotic, cu o concentrație finală de calciu de 0.04 mM. Celulele au fost cultivate în flacoane sterile de plastic cu suprafață de 25 cm² la o densitate de 10⁷ celule/100-mm suprafață vas de cultură, la 37°C în atmosfera de 5% CO₂.
- După 48 de ore de la cultivarea primară, toate celulele neaderente au fost îndepărtate din flacon și mediul de cultura a fost înlocuit cu mediu proaspăt. Acest tratament a fost repetat până toată cultura celulară a devenit aderentă și a început proliferarea celulară.
- După 2 săptămâni de la inițierea culturii celulare primare, celulele au fost tratate cu o soluție de tripsina-EDTA și re-cultivate la densitatea inițială.
- După alte 2 săptămâni cultura celulară a fost considerată omogenă și a fost analizată de anatomo-patolog pentru evaluarea caracteristicilor histomorfologice.
- Suspensia celulară omogenă au fost apoi repartizată în fiole sterile conținând 5 x 10⁶ celule/ml mediu standard de stocare cu dimetil sulf-oxid (DMSO), și au fost stocate în banca de celule a Institutului "Victor Babeș", pentru verificarea periodică a stabilității în timp.

Exemplul 4

Stabilire culturi de celule cu capacitatea tumorigenă

În acest exemplu este descrisă stabilirea culturilor de celule primare murine cu capacitate tumorigenă obținute din formațiuni tumorale de la șoareci nuzi.

Protocolul de lucru a constat în:

- **Etapa de verificare tumorigenitate celule primare:** pentru verificarea tumorigenității culturilor celulare obținute, fiolele cu celule stocate timp de 6 luni la azot lichid (-196°C) au fost dezghețate în condiții standard, și celulele au fost re-cultivate până la obținerea unei confluente de 80% evaluată la microscopul ranversat, exemplificarea aspectului confluentei celulare după primele pasaje, fiind redat în Figura 2. Alicote din culturile celulare au fost investigate de anatomo-patolog pentru determinarea caracteristicilor histologice și morfologice. În urma analizei histopatologice și a analizei de imunofluorescență pentru markerii enolazei neuronale

specifice (NSE), receptor estrogen (ER) și receptor progesteron (PR), s-a stabilit existența de celule tumorale mari, poligonale, unele cu vacuole citoplasmice, așa cum reiese din Figura 2. La pasajele inițiale (1 și 2) s-au observat de asemenea în populația celulară analizată un număr ușor crescut de fibroblaști și puține celule inflamatorii (<10%), așa cum reiese din Figura 3. În histologie, tumora este un carcinom slab diferențiat cu schițe glandulare și slabă secreție mucoidă.

- **Etapa de inducere tumora cu celule primare tumorigene:** suspensii celulare cultivate *in vitro* timp de 4 săptămâni au fost inoculate subcutan la șoareci nuzi, la o concentrație de 1×10^6 /ml/șoarece. Animalele reinoculate au fost monitorizate pentru dezvoltarea tumorii. Tumori cutanate au apărut la 2 săptămâni de la inoculare, fiind identificate ca tumori omogene de carcinom scuamos, după cum este ilustrat în Figura 4.
- **Etapa de inducere tumora cu celule izolate din tumora reinoculata:** aceste culturi celulare au fost de asemenea reinoculate la șoareci nuzi, în concentrația de 1×10^6 /ml/șoarece, utilizând 2 rute de inoculare. Ruta intraperitoneală a fost utilizată pentru expandarea culturii celulare *in vivo*, aspectul culturii obținute fiind prezentat în Figura 5. Ruta de inoculare subcutană a fost utilizată pentru dezvoltarea localizată a tumorii iar animalele re-inoculate subcutan cu suspensii celulare pasate în animale au dezvoltat de asemenea tumori cutanate, după cum este prezentat în Figura 6. Acest fapt denotă stabilitatea antigenicității celulei tumorale din clona obținută inițial fără ca aceste proprietăți să fie influențate de pasajul în animale experimentale.

Exemplul reflectă omogenitatea culturii de celule tumorale și potentialul de a genera tumori cutanate mult mai rapid (14 zile) decât modelul de carcinogeneza chimică (peste 100 de zile). Acest model accelerat de carcinogeneza cutanată cu clona celulară obținută poate fi utilizat în următoarele aplicații: testarea compușilor fotosensibilizatori în terapia fotodinamică a leziunilor cutanate; testarea compușilor anti-tumoralii cu aplicare locală în dermato-oncologie; testarea compușilor cu aplicare sistemică pentru studiul eficienței terapeutice în dermato-oncologie; testări de toxicologie cu implicare în dermatologie.

DESCRIERE FIGURI

Figura 1. Stabilire cultură primară tumorigenă – flux de lucru.

Figura 2. Celule primare cu potențial tumorigen; evaluare de imunofluorescență pentru markerii enolazei neuronale specifice (NSE), receptor estrogen (ER) și receptor progesteron (PR) – celule mari cu aspect poligonal.

Figura 3. Celule primare cu potențial tumorigen la pasajele inițiale; număr ușor crescut de fibroblaști și puține celule inflamatorii.

Figura 4. Tumoră șoarece inoculat cu celule tumorigene: carcinom slab diferențiat care exprimă NSE și foarte slab citokeratine; markerii melanocitari sunt negativi.

Figura 5. Celule primare cu potențial tumorigen cultivate *in vivo* (lichid ascitic)

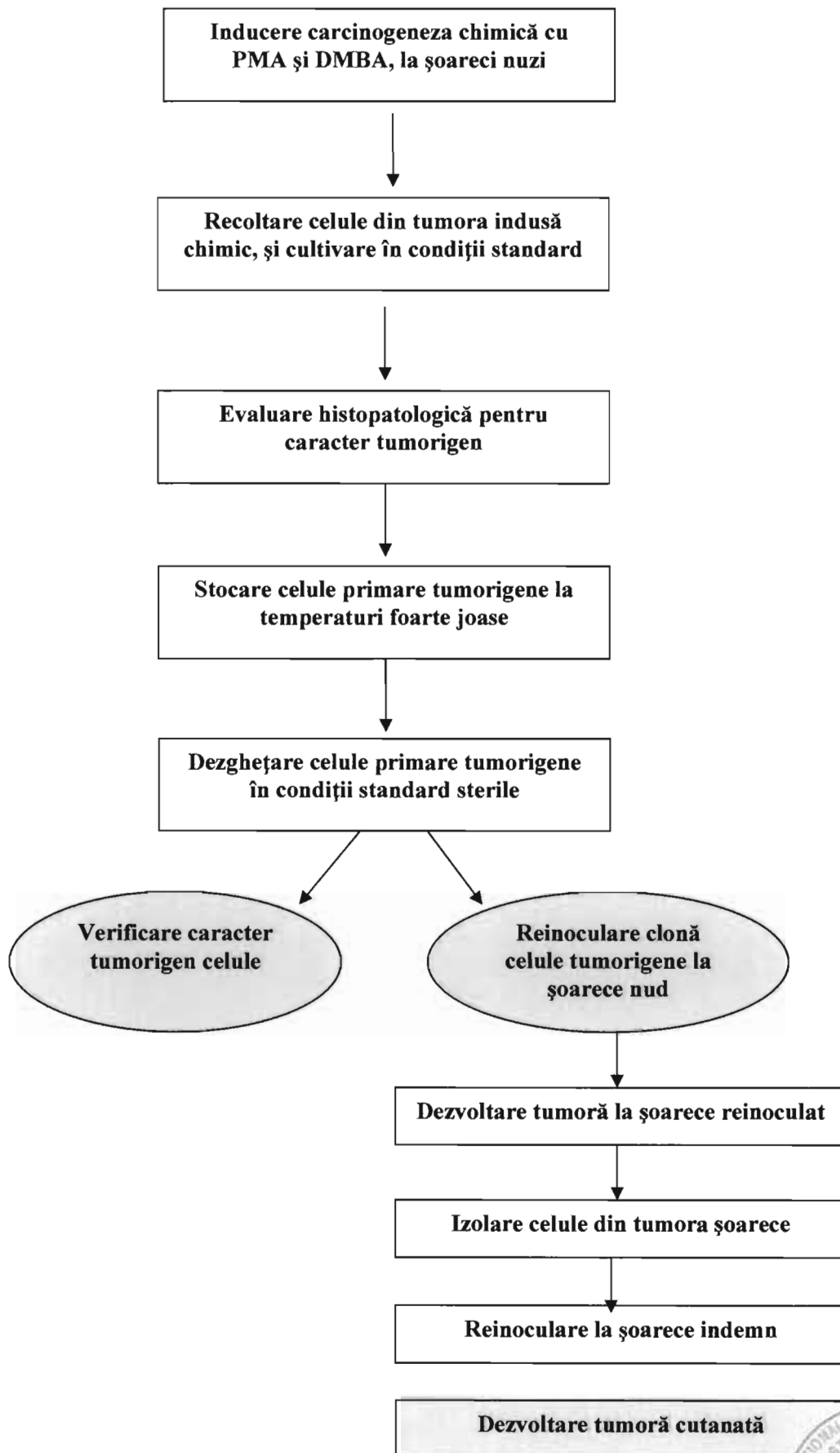
Figura 6. Tumoră șoarece indemn inoculat cu celule tumorale recoltate de la șoarece - vezi tumora caracterizată în Fig 4.

REVENDICĂRI

O metodă de stabilire cultură de celule primare murine cu capacitate tumorigenă pentru inducerea de tumori cutanate ce constituie un instrument de studiu în modele experimentale preclinice.

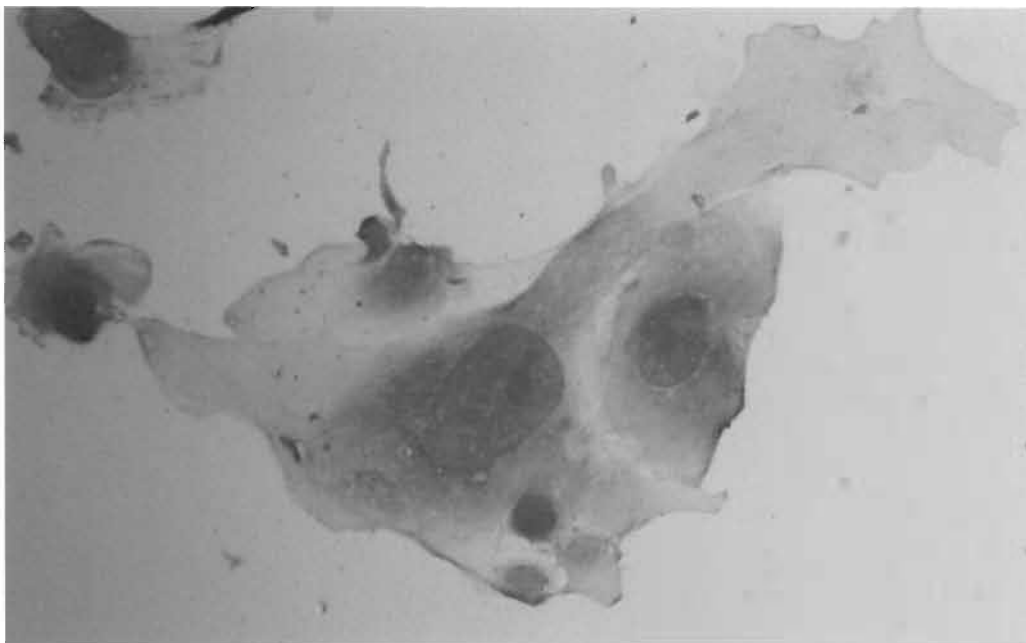
Utilizarea acestui model de celule tumorigene de la revendicarea 1 pentru testare compuși cu potențial antitumoral sau fotosensibilizator de tipul ftalocianinelor metalate, în domeniul dermato-oncologiei.

FIGURA 1



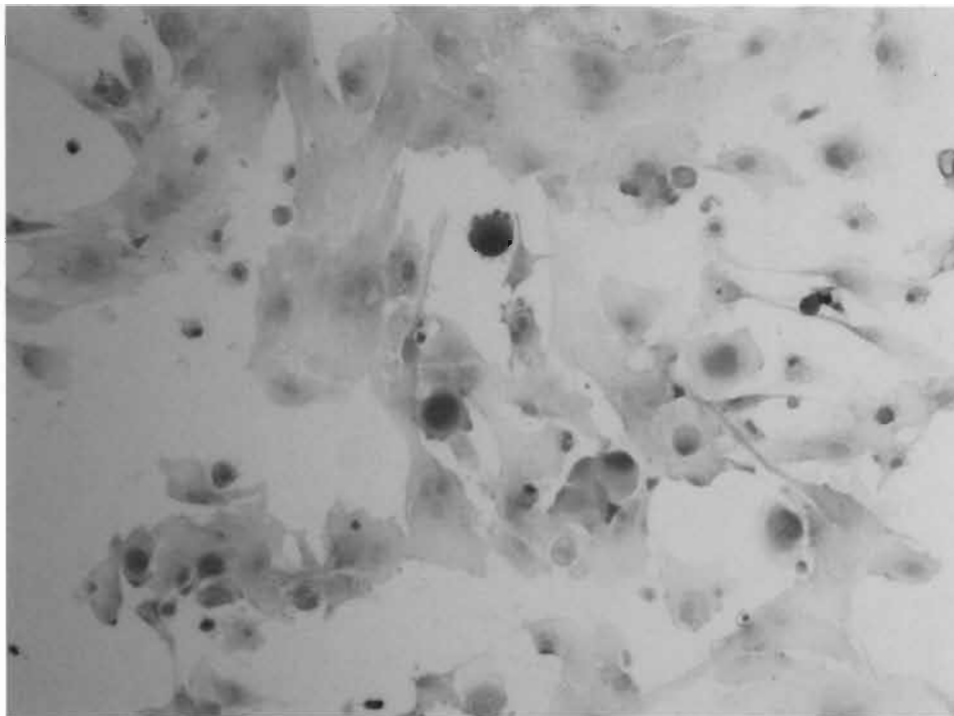
45

FIGURA 2

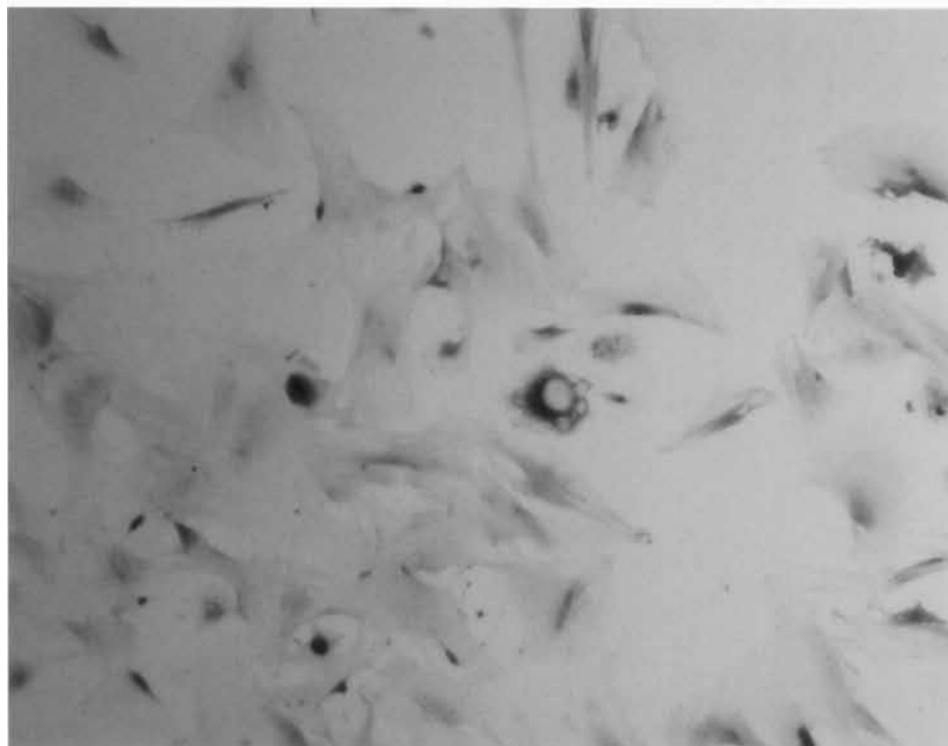


64

FIGURA 3



Pasaj 1



Pasaj 2



FIGURA 4

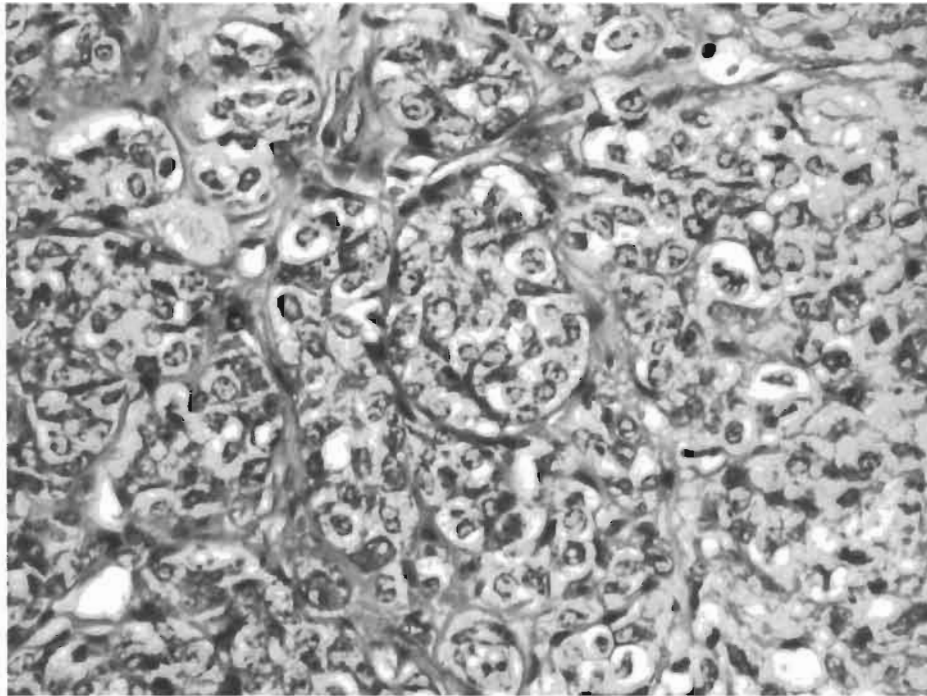
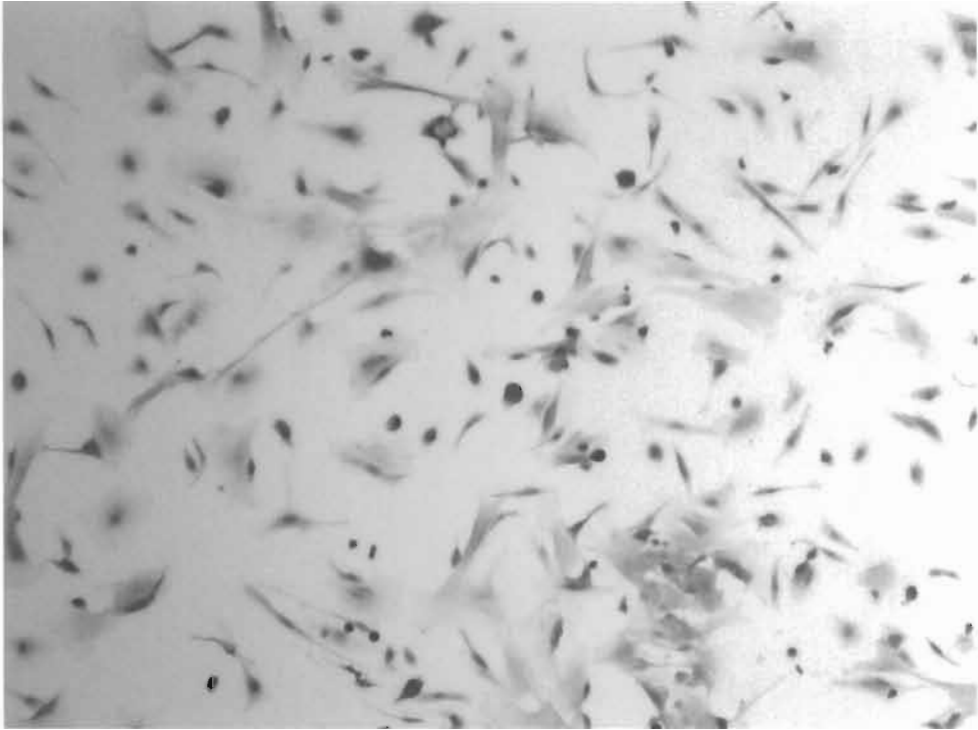
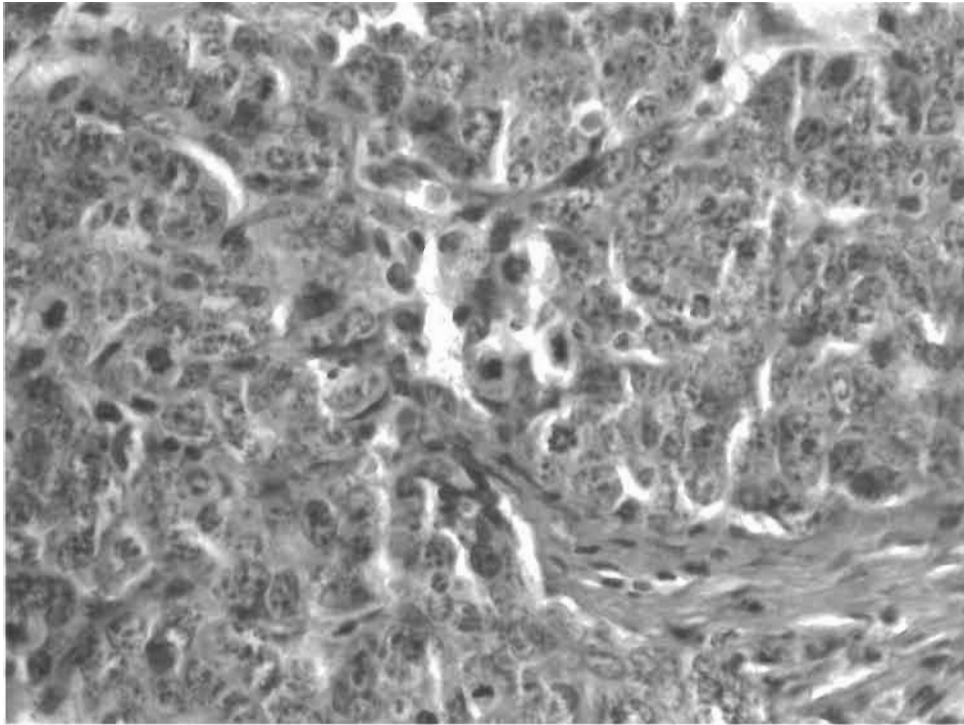


FIGURA 5



41

FIGURA 6



Handwritten signature and a circular stamp.