



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00562

(22) Data de depozit: 20/09/2021

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. 3/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL CLINIC FUNDENI,
ȘOS. FUNDENI NR. 258, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL PENTRU
SĂNĂTATEA MAMEI ȘI COPILULUI
"ALESSANDRESCU-RUSESCU",
BD.LACUL TEI, NR.120, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CONSTANTINESCU DIANA ROXANA,
STR.PROGRESULUI, NR.5, BL.B8, ET.4,
AP.47, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;
• LIXANDRU DANIELA MIOARA,
ALEEA FIZICIENILOR, NR.1, BL.B, ET.10,
AP.1011, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• DIMA SIMONA OLIMPIA,
STR. NĂVODULUI, NR.5A, CONSTANȚA,
CT, RO;
• POPESCU IRINEL,
STR. DOMNIȚA RUXANDRA NR. 30, ET. 1,
AP. 2,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• BACALBAȘA NICOLAE, BD. UNIRII
NR. 76, BL. J3A, SC. 1, ET. 8, AP. 31,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SOROP ANDREI, TURBUREA, GJ, RO;
• FILIPPI ALEXANDRU, STR.HAȚEGANA,
NR.7A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• CRETOIU DRAGOȘ, STR.BALTAGULUI,
NR.3, V77/2/33, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SUCIU NICOLAE, STR. CONSTANTIN
STERE, NR.16, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **METODĂ DE CHEMOSENZITIVITATE A RĂSPUNSULUI
LA TRATAMENTUL CU AGENȚI
CHIMIOTERAPEUTICI-PLATFORMĂ PENTRU
TRATAMENTUL PERSONALIZAT AL CANCERULUI
OVARIAN**

(57) Rezumat:

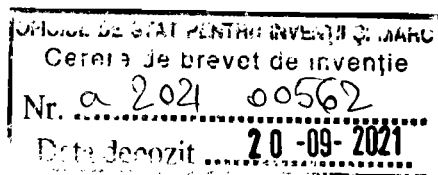
Invenția se referă la o metodă de chemosenzitivitate pentru prognosticul *in vitro* al răspunsului personalizat la terapie a unei paciente cu carcinom ovarian seros, selectată dintre chimioterapie hipertermică intraperitoneală (HIPEC) și chimioterapie sistemică. Metoda, conform invenției, cuprinde următoarele etape: obținerea probei de lichid de la pacientă, cultivarea în condiții care permit creșterea și proliferarea celulelor derivate din ascită, punerea în contact a celulelor cu com-

puși chimioterapici selectați dintre paclitaxel, doxorubicină și cisplatină, timp de 24 până la 72 h, măsurarea valorii EC₅₀ pentru agenții terapeutici, determinarea gradului de apoptoză indusă de tratamente și utilizarea informațiilor obținute pentru stabilirea tratamentului subiectului de la care a fost derivat materialul biologic.

Revendicări: 3
Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





I. Domeniul invenției

Invenția se referă la metode de chemosenzitivitate pentru determinarea *in vitro* a răspunsului celulelor tumorale de carcinom ovarian seros la diferiți compuși chimioterapeutici cu scopul prezicerii unui tratament personalizat la pacientele selectate pentru chirurgie citoreductivă și chimioterapie hipertermică intraabdominală (HIPEC).

II. Statusul cunoașterii în domeniu

Carcinomul ovarian seros are cea mai mare rată a mortalității dintre toate cazurile de cancere ginecologice la nivel mondial, fiind frecvent diagnosticat într-un stadiu avansat (Lengyel, 2010; Naora & Montell, 2005). Tratamentul standard de primă linie pentru acest tip de cancer constă în combinarea rezecției chirurgicale cu chimioterapia cu paclitaxel și un compus pe bază de platină administrate fie intravenos, fie intraperitoneal prin procedura HIPEC. (Dutch Guideline on Epithelial Ovarian Cancer. Oncoline). La aproximativ 15-20% dintre femeile cu carcinom ovarian seros, masa tumorală nu răspunde la chimioterapia de primă linie, iar în recurențe acest procent crește din cauza rezistenței la tratament (Cannistra, 2004). Prognosticul pacientelor care sunt supuse acestor tratamente este slab, procentul de supraviețuire pe o perioadă de 5 ani fiind de 47% (Torre et al., 2018). Acest tip de cancer se caracterizează printr-un mecanism de diseminare neobișnuit: o creștere rapidă, perturbarea capsulelor tumorale ovariene și implicat a celulelor maligne care se răspândesc în cavitatea peritoneală, implicând de obicei acumularea de lichid de ascită. A fost sugerat faptul că această eliberare a celulelor maligne din tumora primară le permite ancorarea pe cavitatea peritoneală, determinând formarea nodulilor peritoneali (carcinomatoza peritoneală) și metastazarea la organele îndepărtate (Ahmed & Stenvers, 2013; Shield, Ackland, Ahmed, & Rice, 2009). Un număr în creștere de studii raportează heterogenitatea moleculară și variația comportamentului clinic al cancerului ovarian seros, sugerând astfel necesitatea unor metode diferențiale de gestionare a formelor individuale. Majoritatea cercetărilor care și-au propus caracterizarea tumorală în scopul identificării tratamentelor optime au utilizat fie culturi celulare obținute din tumora primară fie biopsii lichide (Zavesky et al., 2019). Konecny și colab. au realizat teste de chimiosensibilitate tumorală *in vitro* prin metoda ATP-TCA pe culturi de celule tumorale derivate din biopsii ale pacientelor cu cancer ovarian. Datele au arătat o scădere semnificativă a ratei de supraviețuire fără progresie și a

ratei de supraviețuire globală la pacientele rezistente la medicamentele testate (Konecny et al., 2000). Analiza moleculară a probelor clinice este adesea împiedicată de cantitățile mici de material disponibil, limitând precizia și numărul de teste care pot fi întreprinse (Ford, Werner, Hacker, & Warton, 2020). Ascita este o excepție în acest sens, reprezentând în esență o eșantionare consecutivă a mediului în care se răspândește cancerul ovarian. Pacientele cu carcinom ovarian seros în stadiu avansat prezintă adesea volume mari de ascită malignă, care este ușor accesibilă și care este colectată în mod obișnuit în scopuri de diagnostic sau pentru ameliorarea simptomelor. Lichidul de ascită malignă este o sursă de componente celulare din care pot fi obținute informații valoroase înainte de rezecție, prin evaluarea diferitelor caracteristici biologice ale malignității subiacente, inclusiv mecanismele și profilurile sale moleculare (Huang et al., 2013; Kipps, Tan, & Kaye, 2013). Mai mult, s-a dovedit că heterogenitatea moleculară și celulară a conținutului din lichidul de ascită contribuie la rezistența la tratament a cancerului (Zhang et al., 2018). Dezvoltarea unor abordări terapeutice bazate pe particularitățile celulelor tumorale de la pacientele individuale, care să elimine celulele maligne și să controleze micromediul tumoral este raportată pe scară largă ca fiind o cale rațională pentru îmbunătățirea eficienței clinice și prevenirea progresiei bolii la pacientele cu cancer ovarian seros în stadii avansate. Acest concept cunoscut sub numele de medicină personalizată poate fi aplicat folosind modele ale micromediului tumoral, care să mimeze eficient procesele imunoregulatorie și tumorigenice relevante la pacienții cu cancer (RL et al., 2014) și medicamente selectate cu potențial sporit al eficienței terapeutice (Sevin, Perras, Averette, Donato, & Penalver, 1993). Alte studii descriu utilizarea biomarkerilor din ascită pentru a prezice răspunsul la terapia inițială (Kerr et al., 2013; Lane et al., 2015), deși în prezent nu există biomarkeri care să fie validați. Mai mult, nu există studii care să descrie utilizarea testelor de proliferare celulară *in vitro* pentru a prezice răspunsul la tratamentul primar la pacientele selectate pentru procedurile de HIPEC.

Problema pe care invenția actuală o rezolvă este stabilirea unei metode de chemosenzitivitate pentru a prezice schema de tratament, dar și răspunsul la tratament la pacientele cu cancer ovarian seros selectate pentru procedurile de HIPEC, de la care a fost derivat materialul biologic.

Prototipul pe care invenția actuală îl propune, este adecvat pentru investigarea răspunsului personalizat la agenții chimioterapeutici, astfel făcând colectarea probelor

reproductibilă și standardizată. În final, invenția aduce un potențial sporit al răspunsului la chimioterapia hipertermică intraabdominală pentru pacientele cu carcinom ovarian seros în stadiu avansat.

Soluția propusă de prezenta invenție este de a genera o platformă de medicină personalizată bazată pe culturi primare derivate din ascită în cazul pacientelor cu carcinom ovarian seros.

Metoda, conform invenției propuse, reconstituie micromediul tumoral, datorită faptului că varietatea de celule tumorale maligne (inclusiv celulele stem canceroase) sunt cultivate într-un mediu cu proprii factori de creștere solubili, citokine, chemokine și fragmente de matrice extracelulară. Toate aceste componente biologice active pot fi legate de chimiorezistență, iar analiza efectului unor agenți chimioterapeutici pe modelul conform invenției aduce informații utile pentru managementul terapeutic al pacientei cu cancer de ovar seros în stadiu avansat.

Avantajele metodei de chimiosensitivitate pentru prognosticarea *in vitro* a răspunsului personalizat la terapie a pacientei cu carcinom ovarian seros constau în faptul că:

- Metoda ajută la direcționarea schemei de tratament personalizat în cancerul ovarian seros prin selectarea unui agent chimioterapeutic care prezintă un indice terapeutic crescut la pacienta care necesită tratament
- Metoda de cultură primară derivată din ascita de la pacienta cu carcinom ovarian seros este mai puțin laborioasă decât metodele mai consacrate care utilizează culturi primare de țesut solid, putând duce astfel la costuri reduse pentru pacient și o implementare mai ușoară în practica medicală
- Metoda poate avea un impact semnificativ în decizia chirurgicală deoarece lichidul de ascită poate fi recoltat anterior operației chirurgicale prin procedura de paracenteză, iar rezultatele metodei sunt obținute caracteristic în mai puțin de două săptămâni de la obținerea probei biologice.

III. Rezumatul Invenției

Invenția furnizează o metodă de chemosensitivitate pentru prognosticul *in vitro* al răspunsului personalizat la terapie a unei paciente cu carcinom ovarian seros, care cuprinde următoarele etape:

- Obținerea unei probe de lichid de ascită de la pacienta

- Cultivarea în condiții care să permită creșterea și proliferarea celulelor derivate din ascită
- Punerea în contact a celulelor cu mai multe doze dintr-un interval de concentrații ale unor compuși chimioterapeutici pentru o perioadă de timp de la 24 la 72 ore
- Măsurarea viabilității/proliferării celulelor tratate, calcularea valorii concentrației eficiente la jumătate din maxim (EC50) pentru agentul chimioterapeutic testat și determinarea apoptozei.
- Utilizarea informațiilor obținute pentru stabilirea schemei de tratament a pacientei de la care a fost derivat materialul biologic

IV. Descrierea figurilor

Figura 1. Schema de cultivare în condiții care să permită creșterea și proliferarea celulelor tumorale derivate din ascită.

Figura 2. Dinamica și morfologia celulelor epiteliale tumorale obținute din ascita subiectului cu carcinom ovarian seros, timp de 1-6 zile în cultură.

Figura 3. Valorile EC50 obținute în urma tratamentelor cu doxorubicină

Figura 4. Valorile EC50 obținute în urma tratamentelor cu cisplatină

Figura 5. Reprezentarea grafică a inhibiției de creștere obținută în urma tratamentelor cu paclitaxel

Figura 6. Reprezentarea grafică a expresiei proteinelor (BCL-2, p53, CASP-3) implicate în procesul de apoptoză în urma tratamentelor cu CPT și DOX (A-F)

Figura 7. Compararea nivelului de expresie a proteinelor (BCL-2, p53, CASP-3) implicate în procesul de apoptoză între CONTROL (celule netratate) și dozele EC50 și EC25 pentru CPT și DOX. Linia indică eroarea standard a mediei (\pm SEM); valorile statistice au fost calculate cu testul Student t test , unpaired, astfel * $p < 0,05$, ** $p < 0.005$). (A- F)

Figura 8. Reprezentarea unui model conceptual de integrare a testelor de chemosenzitivitate în managementul terapeutic a pacientei cu cancer de ovar selectată pentru HIPEC.

V. Descrierea detaliată a invenției

Invenția utilizează un tip major de material biomedical derivat de la pacienta cu cancer ovarian seros de grad înalt pentru a obține cultura primară de celule tumorale: ascita (AS). AS fost colectată în condiții sterile în timpul intervenției chirurgicale realizată de specialiști din cadrul Institutului Clinic Fundeni, după obținerea consimțământului informat al pacientei, conform Ghidurilor Comitetului de Etică al Institutului Clinic Fundeni (52496 / 06.12.2018), care fac obiectul Declarației de la Helsinki privind principiile etice pentru cercetarea medicală care implică subiecți umani. Obținerea celulelor tumorale derivate din AS a fost efectuată în cadrul Centrului de Excelență în Medicină Translațională al Institutului Clinic Fundeni.

Într-o **primă etapă** a metodei conform invenției sunt obținute probe de AS cu ajutorul unei seringi sterile în timpul intervenției chirurgicale. AS este transferată într-un tub de 50mL steril și transportată pe gheață în cadrul laboratorului de culturi celulare din Departamentul de Biologie Moleculară al Centrului de Excelență în Medicină Translațională al Institutului Clinic Fundeni. Probele de AS sunt procesate în condiții sterile într-o hotă cu flux laminar de clasă II.

Într-o **a doua etapă** conform invenției celulele sunt cultivate în raport de 1: 1 în mediu de cultură DMEM-Dulbecco Modified Eagle Medium-GlutaMax (Gibco) conținând 4.5g / L glucoză, suplimentat cu 20% ser fetal bovin (FBS) și 1% penicilină-streptomicină (P/S) și incubate la 37 ° C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂ în aer, pentru 3-4 zile fără ca mediul să fie schimbat. Este necesară monitorizarea culturii la 24 și 48 ore pentru verificarea eficienței de creștere și a morfologiei celulelor. După 3-4 zile se schimbă mediul, urmând ca acesta să fie schimbat la 2 zile până în momentul în care celulele ajung la confluență. Când celulele ajung la confluență de 90%, se tripsinizează cu tripsină 0,25%, 5 min, la 37° C. După cele 5 min de incubare se inactivează tripsina cu mediu DMEM 20%FBS. Se centrifughează la 800xg, 5 min, 4° C și se înlătură supernatantul. Se resuspendă peletul în mediu DMEM și se numără celulele cu Hemocitometrul/Citometrul Tali. În funcție de planificarea experimentală, celulele sunt utilizate pentru propagare sau crioprezervare.

Într-o **a treia etapă** conform invenției celulele sunt tratate cu diferiți compuși chimioterapeutici utilizați în procedura HIPEC la paciente cu carcinom ovarian seros. Agenții chimioterapeutici se utilizează fie pentru întreruperea creșterii celulelor canceroase înainte de operație, fie pentru a distruge celulele tumorale care ar putea fi

lăsate în urmă după operație. Exemple de medicamentele aprobate pentru monoterapia cancerului ovarian sunt: Cisplatina (CPT), Doxorubicina (DOX), Taxol (PTX), Carboplatina, Avastin (Bevacizumab), Alkeran (Melphalan), Lynparza (Olaparib), Cyclophosphamida, Gemzar, Rubraca etc. Combinațiile de medicamente utilizate în terapia cancerului ovarian sunt: Carboplatina-Taxol, Gemcitabina-Cisplatina etc. (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/ovarian>).

Cisplatina (cis-diaminodichlor platină (II)), este un agent de reticulare a ADN care este unul dintre puținele medicamente utilizate în mod obișnuit în tratarea carcinomului ovarian. Mecanismul de acțiune al cisplatinei a fost asociat cu capacitatea de a se lega la bazele de urină din cadrul ADN pentru a forma aducți ADN, prevenind repararea acestuia. Cu toate acestea, medicamentul prezintă un anumit nivel de rezistență, inclusiv repararea crescută a ADN deteriorat, reducerea acumulării medicamentului intracelular și inactivarea citosolică a cisplatinei (Zhu et al., 2016).

Doxorubicina acționează asupra celulei canceroase prin două mecanisme: (a) intercalația în ADN și întreruperea reparării ADN mediată de topoizomeraza II și (b) generarea de radicali liberi și deteriorarea membranelor celulare, ADN și proteinelor (Gewirtz, 1999). Pe scurt, doxorubicina este oxidată în semiquinonă, un metabolit instabil, care este transformat înapoi în doxorubicină într-un proces care eliberează specii reactive de oxigen. Speciile reactive de oxigen pot duce la lipidperoxidare și deteriorarea membranelor, deteriorarea ADN, stresul oxidativ și declanșează căi apoptotice de moarte celulară (Doroshov, 1986). Alternativ, doxorubicina poate pătrunde în nucleu și altera topoizomeraza-II, având ca rezultat deteriorarea ADN și moartea celulară (Tewey, Rowe, Yang, Halligan, & Liu, 1984).

Paclitaxelul (cunoscut și ca taxol) este un agent chimioterapeutic taxoid utilizat ca terapie de primă linie și ulterioară pentru tratamentul carcinomului avansat al ovarului și a altor tipuri de cancer, inclusiv cancer de sân și pulmonar. Paclitaxelul este un agent antimicrotubular care promovează asamblarea microtubulilor din dimerii tubulinei și stabilizează microtubulii prin prevenirea depolimerizării. Această stabilitate are ca rezultat inhibarea reorganizării dinamice normale a rețelei de microtubuli care este esențială pentru interfazele și funcțiile celulare mitotice (Cheung et al., 2009). În plus, paclitaxelul induce matrici anormale sau „pachete” de microtubuli de-a lungul ciclului celular și mai mulți asteri ai microtubulilor în timpul mitozei. Acest lucru distruge capacitatea celulei de a-și folosi citoscheletul într-un mod flexibil. Mai precis,

paclitaxelul se leagă de subunitatea β -tubulinei. Tubulina este „blocul de construcție” al mictotubulilor, iar legarea paclitaxelului blochează aceste blocuri de construcție. Complexul de microtubuli / paclitaxel nu are capacitatea de a dezambla. Acest lucru afectează negativ funcția celulei, deoarece scurtarea și prelungirea microtubulilor (denumită instabilitate dinamică) este necesară pentru funcția lor ca o „autostradă” de transport pentru celulă. Cromozomii, de exemplu, se bazează pe această proprietate a microtubulilor în timpul mitozei. Cercetările ulterioare au indicat faptul că paclitaxelul induce moartea celulară programată (apoptoza) în celulele canceroase prin legarea la proteina numită Bcl-2 (*B Cell Lymphoma*) care oprește apoptoza și astfel arestează funcția sa (Kovacs, Csaba, Pallinger, & Czaker, 2007).

A patra etapă a metodei conform invenției cuprinde analiza nivelului citotoxicității diferiților compuși chimioterapeutici asupra celulelor tumorale izolate și cultivate așa cum este descris mai sus, pentru identificarea tratamentului optim pentru pacienta care are nevoie de acesta. Există o diversitate de metode pentru analizarea citotoxicității cunoscute în domeniu care cuprind, dar nu sunt limitate la: metoda MTT, supraviețuirea clonală, măsurarea apoptozei, evaluarea curbelor de creștere sub tratament, etc. Specialistul în domeniu va înțelege că pentru analizarea nivelului citotoxicității în metoda conform invenției poate fi utilizată oricare dintre aceste metode și că această utilizare este în întinderea invenției.

Într-o formă de realizare conform invenției pentru a testa nivelul citotoxicității unui agent terapeutic poate fi utilizată metoda MTT. Metoda colorimetrică MTT este bine cunoscută specialiștilor în domeniu și se bazează pe reducerea compusului tetrazoliu MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromură) de culoare galbenă, la cristale de formazan violet, de către enzimele (succinat dehidrogenaze mitocondriale – NAD(P)H dependente) celulelor active metabolic. Enzimele oxidoreductazei celulare dependente de NAD (P) H pot, în condiții definite, să reflecte numărul de celule viabile prezente. Densitatea optică a formazanului solubilizat în dimetilsulfoxid (DMSO) este evaluată spectrofotometric, obținându-se o funcție absorbantă-concentrație colorant-număr de celule active metabolic din cultura celulară analizată. Metoda este adaptabilă determinării unui număr mare de probe utilizând microplăci cu 96 de godeuri și un spectrofotometru TECAN.

Într-o altă formă de realizare conform invenției pentru a testa nivelul citotoxicității unui agent terapeutic pot fi utilizate metode alternative: testul LDH, testul rosu neutru etc.

Testul estimării activității lactat dehidrogenazei citoplasmatică (LDH) constă în determinarea spectrofotometrică a activității exprimate de enzima eliberată în mediul de cultură de către celulele care au pierdut integritatea membranelor. Metoda se bazează pe reducerea NAD^+ la NADH , H^+ de către LDH. NADH^+ , H^+ convertește o sare de tetrazoliu la un derivat colorat, solubil – formazan. Acest compus este determinat spectrofotometric la lungimea de undă de 490 nm. O diminuare a viabilității celulare este asociată cu liza membranei plasmatică, eliberarea LDH în mediul de cultură și implicit creșterea valorii densității optice înregistrată la 490 nm. Testul Roșu neutru (RN) utilizează un colorant vital, slab cationic, ce penetrează ușor prin membranele celulare, prin difuzie și se acumulează intracelular în lisosomi, unde se leagă la situsuri anionice din matricea lisosomală. Alterări în suprafața celulei sau a membranei lisosomale conduc la fragilitatea lisosomală și la alte modificări care devin gradat ireversibile. Astfel de modificări datorate acțiunii unui agent străin au ca rezultat o scădere în preluarea și legarea RN, astfel fiind posibilă determinarea viabilității celulare. Testul clonogen sau testul formării coloniilor este un test de supraviețuire a celulelor *in vitro* bazat pe capacitatea unei singure celule de a forma o colonie. Colonia este definită ca fiind formată din cel puțin 50 de celule. Testul analizează în esență fiecare celulă din populație pentru capacitatea sa de a suferi o diviziune „nelimitată”. Testul clonogen este o metodă pentru determinarea ratei de proliferare celulară după tratamentul cu radiații ionizante, dar poate fi utilizată și pentru determinarea eficacității altor agenți citotoxici. Doar o fracțiune din celulele însămânțate își păstrează capacitatea de a produce colonii. Înainte sau după tratament, celulele sunt însămânțate în diluții adecvate pentru a forma colonii în 1-3 săptămâni. Coloniile sunt fixate cu glutaraldehidă (6,0% v / v), colorate cu cristal violet (0,5% g / v) și numărate folosind un microscop.

A cincea etapă a metodei conform invenției constă în utilizarea valorilor EC_{50} pentru stabilirea tratamentului pacientei de la care a fost derivat materialul biologic. Răspunsurile biologice la concentrațiile de ligand (agent chimioterapeutic) urmează de obicei o funcție sigmoidală. Punctul de inflexiune la care creșterea răspunsului odată cu creșterea concentrației de ligand începe să încetinească este reprezentat de EC_{50} , care poate fi determinat matematic prin derivarea liniei cu cea mai bună potrivire „*best-fit line*”. Efectul E depinde atât de legarea medicamentului, cât și de receptorul legat de medicament. Agonistul care se leagă de receptor și inițiază răspunsul este de obicei

prescurtat A . La concentrații mici de agonist A răspunsul, E este nemăsurabil de scăzut, dar la A mai mare, E devine măsurabilă. Efectul E crește cu A până la A suficient de mare, când platourile E tind către un răspuns maxim asimptotic realizabil, E_{max} . A la care E este 50% din E_{max} este denumită concentrația efectivă maximă pe jumătate și este abreviată EC_{50} (Beck et al., 2004). Termenul „potență” se referă la valoarea EC_{50} . Cu cât EC_{50} este mai mică, cu atât este mai mică concentrația unui medicament pentru a produce 50% din efectul maxim și cu atât este mai mare potența. Concentrațiile EC_{25} și EC_{75} pentru a induce răspunsuri maxime de 25% și 75% sunt definite în mod similar. Există o gamă largă de valori EC_{50} ale medicamentelor; acestea sunt de obicei de la nM la mM. Prin urmare, este adesea mai practic să ne referim la valorile EC_{50} transformate logaritmic în loc de EC_{50} , unde: formula $pEC_{50} = -\log_{10}(EC_{50})$

A șasea etapă conform invenției constă în testarea nivelului de expresie a proteinelor specifice procesului de apoptoză în urma tratamentului cu un agent terapeutic asupra celulelor tumorale izolate și cultivate, pentru identificarea tratamentului optim pentru pacienta care are nevoie de acesta. Există o diversitate de metode pentru analiza nivelului de expresie a proteinelor implicate în apoptoză, cunoscute în domeniu care nu sunt limitate la metoda utilizată: tehnologia luminex xMAP. Analiza cantitativă poate fi realizată folosind kituri de tip multiplex conținând proteine implicate în apoptoză (ProcartaPlex Multiplex Immunoassay) în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Principiul metodei cu Imunotestele ProcartaPlex permit analiza simultană a mai multor proteine dintr-o singură probă dintr-o gamă largă de probe biologice. Acestea combină eficiența multiplexării cu precizia, sensibilitatea, reproductibilitatea și simplitatea metodei. Principiul metodei implică detergenții pe bază de acid bicinconic (BCA) pentru detectarea colorimetrică și cuantificarea proteinelor totale. Această metodă combină reducerea Cu^{2+} la Cu^{1+} de către proteine într-un mediu alcalin (reacția biuret) cu detectarea colorimetrică extrem de sensibilă și selectivă a cationului cupros (Cu^{1+}) folosind un reactiv unic care conține acid bicinconic. Exemple de proteine implicate în apoptoză sunt: caspazele (CASP-2, -3, -6,-7,-8,-9), peptida amiloid-B (Abeta), familia de proteine Bcl-2 care cuprinde atât proteine anti-apoptotice (Bcl-2, Bcl-xl, ș.a) cât și proteine pro-apoptotice (Bid, Bad, Puma, Bax, Bak ș.a) , proteina supresoare tumorală p53 și proteinele de șoc termic (Hsp70, Hsp90,Hsp27).

Proteina Bcl-2 (B Cell Lymphoma) este un membru anti-apoptotic al familiei Bcl-2. Aceasta reglează proliferarea și moartea celulară prin interacțiuni inter și intra-familiale (Verma et al., 2006). Bcl-2 are potențialul de a suprima moartea celulelor apoptotice în condiții de stres variate prin modularea potențialului transmembranar mitocondrial. Cu toate acestea, prevalența activității celulare Bcl-2 activate constitutiv nu este întotdeauna necesară în celule (Wong & Puthalakath, 2008).

Caspaza 3 este implicată în activarea căilor de semnalizare a caspazelor ce sunt responsabile pentru execuția procesului de apoptoză (Nicholson et al., 1995). Caspaza 3 este în mod frecvent o protează activată ce catalizează clivajul specific a mai multor proteine celulare cheie. Activarea caspazelor în celule expuse la stres citotoxic este de obicei considerată un proces ireversibil care duce la eliminarea celulelor gazdă.

Proteina p53 este o proteină supresoare tumorală localizată în nucleul celulelor, unde se leagă direct de molecula de ADN. Când ADN dintr-o celulă este deteriorat de agenți chimici toxici această proteină joacă un rol critic în a determina dacă molecula de ADN va fi reparată sau celula deteriorată va intra în procesul de apoptoză. Prin oprirea procesului de diviziune a celulelor cu ADN mutant, p53 ajută la prevenirea dezvoltării tumorilor. În cancerile umane, orice deranjament în funcția proteinei în cauză este direct corelată cu blocarea acesteia în citoplasmă, cu imposibilitatea de a fi transportată în nucleu.

VI. Exemple

Exemplul 1. Obținerea culturii primare de celule derivate din ascita pacientei cu cancer ovarian seros

Aspectele citologice maligne ale celulelor din ascită au fost diagnosticate prin examinare microscopică în laboratorul de Anatomie Patologică din cadrul Institutului Clinic Fundeni. Astfel a fost observat un sediment celular bogat reprezentat de hematii, frecvente elemente celulare inflamatorii și celule mărite izolate și grupate, unele cu aspect tridimensional, inegale, cu nucleii măriți, ușor inegali, situați de multe ori excentric, tahicromici, citoplasmă bazofilă cu vacuolizări. Culturile primare de celule epiteliale canceroase au fost generate din 15 ml de ascită proaspăt însămânțată în raport de 1: 1 în mediu de cultură DMEM-Dulbecco Modified Eagle Medium-GlutaMax (Gibco) conținând 4.5g / L glucoză, suplimentat cu 20% FBS și 1% P/S în flask de cultură cu o suprafață de 75cm², urmată de o incubare la 37 ° C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂ în aer. După 3-4 zile, mediul a fost aspirat, celulele au fost spălate cu soluție salină HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) pentru a îndepărta majoritatea eritrocitelor aflate în suspensie și au fost adăugați 14 ml de mediu proaspăt. Mediul a fost înlocuit la fiecare 2 zile până când celulele au ajuns la confluență. Celulele au fost recoltate în pasaje timpurii (până în pasajul 3) și crioprezervate în mediu de congelare conținând 10% DMSO, inițial într-un recipient pentru congelare (Nalgene Mr. Frosty) pentru o rată lentă de răcire de ~ 1 ° C / min - etapă esențială care crește viabilitatea celulelor. După 24 ore criotuburile cu celule au fost transferate în azot lichid pentru aplicații ulterioare.

Exemplul 2. Analiza dinamicii și morfologiei celulelor primare derivate din lichidul de ascită

La câteva ore după izolare, celulele derivate din ascită au dezvăluit o heterogenitate largă, incluzând atât celule aderente cât și agregate celulare aflate în suspensie denumite sferoizi. După 24 de ore, prezența sferoizilor în suspensie a fost încă detectabilă însă celulele aderente au devenit predominante, prezentând morfologia caracteristică a celulelor epiteliale, așa cum se observă în (Figura 1. A, B). Monostratul confluent de celule tumorale ilustrează o morfologie de tip "cobblestone" (Figura 1. C, D). Tiparul de analiză a proliferării *in vitro* prezintă variații, celulele tumorale epiteliale derivate din ascită ajungând la confluență în 6-10 zile, în funcție de variabilitatea biologică a fiecărei paciente.

Exemplul 3. Analiza nivelului citotoxicității doxorubicinei asupra celulelor tumorale utilizând tehnica MTT

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de 1×10^4 celule / godeu în 100 μ l mediu de cultură, în plăci de cultură cu 96 de godeuri cu fund plat. După 24 de ore acestea au fost tratate cu doze cuprinse între 40nM și 50 μ M DOX timp de 48 de ore la 37°C în atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Celulele au fost apoi incubate timp de 4 ore cu 0,5 mg / ml reactiv de marcarea MTT în atmosferă umidificată cu 5% CO₂. După această perioadă de incubare, cristalele de sare de formazan purpuriu formate au fost solubilizate prin adăugarea a 90 μ l de DMSO și ulterior plăcile au fost incubate timp de 15 min la temperatura camerei pe agitator. Sărurile de formazan au fost cuantificate spectrofotometric prin scăderea din absorbanta măsurată la lungimea de undă de 570 nm a absorbantei citite la 620 nm, utilizând cititorul de plăci Sunrise-Basic Tecan și software-ul Magellan, V 6.5. Măsurătorile obținute pentru probele tratate au fost normalizate la cele obținute pentru probele martor, tratate doar cu DMSO. Formula de calcul pentru aflarea % inhibării creșterii a fost următoarea:

$$100 - \frac{(A_{\text{celule tratate}} - A_{\text{celule netratate}})}{(A_{\text{celule cu vehicul}} - A_{\text{celule netratate}})} * 100$$

A = Absorbanța 570nm

Rezultatele au arătat că există diferențe de răspuns în urma tratamentului cu doxorubicină la pacientele analizate. Astfel intervalul valorilor EC₅₀ obținut pe lotul de paciente analizate este: 95,2-818,2nM. Datele obținute sunt detaliate în tabelul de mai jos.

Doxorubicină	AS 083	AS 086	AS 088	AS 089	AS 090
LogEC50	1,979	2,856	2,63	2,913	2,678
HillSlope	0,8331	1,211	1,585	1,227	0,772
EC50	95,20	717,9	426,8	818,2	476,7
R squared	0,9123	0,9422	0,9679	0,9355	0,9662

Exemplul 4. Analiza nivelului citotoxicității cisplatinei asupra celulelor tumorale utilizând tehnica MTT

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de 1×10^4 celule / godeu în 100 μ l mediu de cultură, în plăci de cultură cu 96 de godeuri cu fund plat. După 24 de ore acestea au fost tratate cu doze cuprinse între 6.25 μ M și 800 μ M CPT timp de 48 de ore

la 37°C în atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Procentul inhibării creșterii celulare sub tratamentul cu cisplatină a fost măsurat și calculat așa cum este descris mai sus, în Exemplul 3.

Rezultatele au arătat că, la fel ca în cazul doxorubicinei, există o variabilitate de răspuns a pacienților la cisplatină. Astfel intervalul valorilor EC₅₀ obținut pe lotul de pacienți analizate este: 23,84 -115,9 μM. Datele obținute sunt detaliate în tabelul de mai jos.

Cisplatină	AS 083	AS 086	AS 088	AS 089	AS 090
LogEC ₅₀	1,493	2,064	1,805	2,02	1,377
HillSlope	2,642	2,832	5,321	4,78	2,479
EC ₅₀	31,15	115,9	63,76	104,7	23,84
R squared	0,9702	0,9069	0,9828	0,9575	0,9913

Exemplul 5. Analiza nivelului citotoxicității paclitaxelului asupra celulelor tumorale utilizând tehnica MTT

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de 1x10⁴ celule / godeu în 100 μl mediu de cultură, în plăci de cultură cu 96 de godeuri cu fund plat. După 24 de ore acestea au fost tratate cu, concentrații cuprinse între 1.56 nM și 800 nM PTX timp de 48 de ore la 37°C în atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Procentul inhibării creșterii celulare sub tratamentul cu paclitaxel a fost măsurat și calculat așa cum este descris mai sus, în Exemplul 3.

În aceste experimente, nu a fost obținută o inhibare a viabilității/proliferării cu mai mult de 50% în urma tratamentului cu oricare dintre dozele de paclitaxel aplicate, și astfel nu a putut fi calculată valoarea EC₅₀. Aceasta sugerează o eficiență redusă a agentului chimioterapeutic la dozele aplicate asupra celulelor tumorale de la cele 5 pacienți analizate aici. Datele obținute sunt detaliate în tabelul de mai jos.

Paclitaxel	AS 083	AS 086	AS 088	AS 089	AS 090
LogEC ₅₀	3,408	3,666	3,619	4,511	21,66
HillSlope	0,3001	0,2414	0,2034	0,1928	0,03425
EC ₅₀	2559	4631	4163	32397	4.53E+21
R squared	0,8666	0,9004	0,6015	0,7736	0,04489

Exemplul 6. Analiza cantitativă a proteinelor implicate în apoptoză Caspaza 3, p53, Bcl-2

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de 1×10^5 /godeu în 1mL mediu de cultură, în plăci de cultură cu 12 godeuri. După 24 de ore acestea au fost tratate cu două doze de medicament, respectiv EC25 și EC50, așa cum au fost obținute în exemplele de mai sus, și incubate timp de 24 de ore la 37°C în atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Celulele au fost colectate, lizate cu tamponul Milliplex Map Lysis Buffer 1x (Merck) suplimentat cu inhibitori de proteaze și ulterior au fost izolate proteinele totale. Determinarea concentrației proteice a fost realizată prin metoda Bradford cu kitul Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Absorbanța a fost citită la o lungime de undă de 570nm cu sistemul Tecan Sunrise. Analiza cantitativă a proteinelor implicate în apoptoză a fost realizată folosind kitul multiplex conținând proteine implicate în apoptoză (ProcartaPlex Multiplex Immunoassay, ThermoFisher Scientific) în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Pe scurt, peste microsferice magnetice acoperite cu anticorp pentru biomarkerului selectat au fost adăugați 25 μ l de soluție standard sau lizat celular și apoi probele au fost incubate pe agitator la 500 rpm timp de 2 ore la temperatura camerei, la întuneric. După un ciclu de spălare, s-a adăugat anticorpul de detectare și probele au fost incubate suplimentar timp de 30 de minute la temperatura camerei pe agitator la 500 rpm, la întuneric. Apoi s-a efectuat un al doilea ciclu de spălare, după care s-a adăugat streptavidină-ficoeritrină (SA-PE, colorantul raportor), urmate de incubarea timp de 5 minute la temperatura camerei și realizarea unui al treilea ciclu de spălare. După îndepărtarea excesului de conjugat, amestecul de microsferice magnetice a fost analizat folosind sistemul de detectare Luminex. Toate probele au fost măsurate în duplicat. Datele au fost inițial măsurate ca intensitate medie a fluorescenței (MIF) și a fost calculat apoi raportul fluorescenței la microsferice magnetice standard. O serie de calibratori au fost analizați, iar curbele și concentrațiile standard au fost calculate utilizând software-ul Bioplex Manager.

Reprezentarea grafică individuală a expresiei proteinelor implicate în procesul de apoptoză (BCL-2, p53, CASP-3) în urma tratamentelor cu CPT și DOX, indică aceeași tendință a răspunsului pentru cele 3 paciente analizate (Figura 6. A-F).

Rezultatele obținute pe media răspunsului celulelor de la pacientele analizate arată că există diferențe semnificative de exprimare a proteinelor apoptotice CASP-3 și p53 între celulele netratate (CONTROL) și celulele tratate cu dozele EC25 și respectiv

EC50 de CPT și DOX (Figura 7. A-F). Astfel, pentru celulele tratate cu CPT se observă că nivelul de expresie al CASP-3 este semnificativ crescut pentru dozele EC25 ($p=0.0058$) și EC50 ($p=0.0186$) în urma comparațiilor statistice cu probele netratate (control) (Figura 7. B). Nivelul de expresie al p53 este semnificativ crescut pentru EC25 ($p=0.0495$) comparativ cu controlul (Figura 7.C). Celulele tratate cu DOX prezintă un nivel de expresie al proteinelor CASP-3 și p53 semnificativ crescut pentru doza EC50 ($p=0.0036$, respectiv $p=0.0039$) comparativ cu celulele netratate (control) (Figura 7. E,F). Datele arată că nu există diferențe semnificative statistic ale nivelului de expresie BCL-2 între control și dozele de CPT și DOX aplicate (Figura 7. A,D). În concluzie, rezultatele indică faptul că tratamentele cu DOX și CPT induc creșterea nivelului de expresie a proteinelor apoptotice CASP-3 și p53, conducând la activarea proceselor de moarte celulară programată.

VIII. Avantaje rezultate din aplicarea invenției

Aplicarea invenției oferă avantaje multiple, atât în domeniul medicinei personalizate, cât și specifice procedurii în discuție.

Implementarea unui protocol de lucru în această direcție permite reproductibilitatea procedurii. Aceasta constituie fără îndoială o etapă esențială în integrarea testelor de chemosenzitivitate în managementul terapeutic al pacientei cu cancer de ovar selectată pentru HIPEC (Figura 8.).

Mai mult decât atât invenția poate avea un impact semnificativ în decizia chirurgicală deoarece lichidul de ascită poate fi recoltat anterior operației chirurgicale prin procedura de paracenteză, iar rezultatele metodei sunt obținute caracteristic în mai puțin de două săptămâni de la obținerea probei biologice.

Abrevieri utilizate

Nr. crt.	Abreviere	Semnificație
1.	HIPEC	chimioterapie hipertermică intraabdominală
2.	ATP-TCA	metodă de chemosensibilitate care evaluează viabilitatea celulelor tumorale prin măsurarea nivelurilor de adenzin trifosfat intracelular
3.	EC50	valoarea concentrației eficiente la jumătate din maxim
4.	BCL-2	proteina <i>B Cell Lymphoma</i>
5.	p53	proteina p53
6.	CASP-3	caspaza 3
7.	CPT	cisplatină
8.	DOX	doxorubicină
9.	EC25	valoarea concentrației eficiente la 25% din maxim
10.	SEM	eroarea standard a mediei
11.	AS	ascită
12.	DMEM	mediu de cultură modificat (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
13.	FBS	ser fetal bovin (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
14.	P/S	penicilină-streptomicină
15.	PTX	paclitaxel sau taxol
16.	ADN	acid dezoxiribonucleic
17.	MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromură)
18.	DMSO	dimetilsulfoxid
19.	LDH	lactat dehidrogenază
20.	NAD	nicotinamid adenin dinucleotid
21.	RN	roșu neutru
22.	E	efect
23.	A	agonist
24.	nM	nanomoli
25.	mM	milimoli
26.	BCA	acid bicononic
27.	Cu	cupru

28.	Abeta	peptida amiloid-B
29.	Bcl-xl	proteina <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
30.	Bid	proteina <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
31.	Bad	proteina <i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
32.	Puma	proteina <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
33.	Bax	proteina <i>Bcl-2-associated X</i>
34.	Bak	proteina <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
35.	HSP	proteina de șoc termic
36.	HBSS	soluție salină <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
37.	SA-PE	streptavidină-ficoeritrină
38.	MIF	intensitate medie a fluorescenței

Bibliografie

1. Ahmed, N., & Stenvers, K. L. (2013). Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol*, 3, 256. doi:10.3389/fonc.2013.00256
2. Beck, B., Chen, Y. F., Dere, W., Devanarayan, V., Eastwood, B. J., Farmen, M. W., . . . Weidner, J. (2004). Assay Operations for SAR Support. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).
3. Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, 351(24), 2519-2529. doi:10.1056/NEJMra041842
4. Cheung, C. H., Chen, H. H., Kuo, C. C., Chang, C. Y., Coumar, M. S., Hsieh, H. P., & Chang, J. Y. (2009). Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers. *Mol Cancer*, 8, 43. doi:10.1186/1476-4598-8-43
5. Doroshow, J. H. (1986). Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(12), 4514-4518. doi:10.1073/pnas.83.12.4514
6. Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer*, 123(1), 9-16. doi:10.1038/s41416-020-0875-x
7. Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57(7), 727-741. doi:10.1016/s0006-2952(98)00307-4
8. Huang, H., Li, Y. J., Lan, C. Y., Huang, Q. D., Feng, Y. L., Huang, Y. W., & Liu, J. H. (2013). Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma*, 60(5), 546-552. doi:10.4149/neo_2013_071

9. Kerr, E. H., Frederick, P. J., Egger, M. E., Stockard, C. R., Sellers, J., DellaManna, D., . . . McNally, L. R. (2013). Lung resistance-related protein (LRP) expression in malignant ascitic cells as a prognostic marker for advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 20(9), 3059-3065. doi:10.1245/s10434-013-2878-9
10. Kipps, E., Tan, D. S., & Kaye, S. B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*, 13(4), 273-282. doi:10.1038/nrc3432
11. Konecny, G., Crohns, C., Pegram, M., Felber, M., Lude, S., Kurbacher, C., . . . Untch, M. (2000). Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 77(2), 258-263. doi:10.1006/gyno.2000.5728
12. Kovacs, P., Csaba, G., Pallinger, E., & Czaker, R. (2007). Effects of taxol treatment on the microtubular system and mitochondria of *Tetrahymena*. *Cell Biol Int*, 31(7), 724-732. doi:10.1016/j.cellbi.2007.01.004
13. Lane, D., Matte, I., Garde-Granger, P., Laplante, C., Carignan, A., Rancourt, C., & Piche, A. (2015). Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer*, 15, 492. doi:10.1186/s12885-015-1511-7
14. Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*, 177(3), 1053-1064. doi:10.2353/ajpath.2010.100105
15. Naora, H., & Montell, D. J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer*, 5(5), 355-366. doi:10.1038/nrc1611
16. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., . . . et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535), 37-43. doi:10.1038/376037a0
17. RL, O. D., McCormick, A., Mukhopadhyay, A., Woodhouse, L. C., Moat, M., Grundy, A., . . . Edmondson, R. J. (2014). The use of ovarian cancer cells from patients undergoing surgery to generate primary cultures capable of undergoing functional analysis. *PLoS One*, 9(6), e90604. doi:10.1371/journal.pone.0090604

18. Sevin, B. U., Perras, J. P., Averette, H. E., Donato, D. M., & Penalver, M. (1993). Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer*, *71*(4 Suppl), 1613-1620. doi:10.1002/cncr.2820710428
19. Shield, K., Ackland, M. L., Ahmed, N., & Rice, G. E. (2009). Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*, *113*(1), 143-148. doi:10.1016/j.ygyno.2008.11.032
20. Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, *226*(4673), 466-468. doi:10.1126/science.6093249
21. Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., . . . Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, *68*(4), 284-296. doi:10.3322/caac.21456
22. Verma, Y. K., Gangenahalli, G. U., Singh, V. K., Gupta, P., Chandra, R., Sharma, R. K., & Raj, H. G. (2006). Cell death regulation by B-cell lymphoma protein. *Apoptosis*, *11*(4), 459-471. doi:10.1007/s10495-006-5702-1
23. Wong, W. W., & Puthalakath, H. (2008). Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life*, *60*(6), 390-397. doi:10.1002/iub.51
24. Zavesky, L., Jandakova, E., Weinberger, V., Minar, L., Hanzikova, V., Duskova, D., . . . Horinek, A. (2019). Ascites-Derived Extracellular microRNAs as Potential Biomarkers for Ovarian Cancer. *Reprod Sci*, *26*(4), 510-522. doi:10.1177/1933719118776808
25. Zhang, B., Chen, F., Xu, Q., Han, L., Xu, J., Gao, L., . . . Sun, Y. (2018). Revisiting ovarian cancer microenvironment: a friend or a foe? *Protein Cell*, *9*(8), 674-692. doi:10.1007/s13238-017-0466-7
26. Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X., & Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*, *10*, 1885-1895. doi:10.2147/DDDT.S106412

VII. Revendicări

1. Metodă de chemosenzitivitate pentru prognosticul *in vitro* al răspunsului personalizat la terapie a unei paciente cu carcinom ovarian seros selectată pentru chimioterapie hipertermică intraperitoneală (HIPEC) și chimioterapie sistemică, care cuprinde următoarele etape
 - Obținerea probei de lichid de ascită de la pacientă
 - Cultivarea în condiții care să permită creșterea și proliferarea celulelor derivate din ascită.
 - Punerea în contact a celulelor cu mai multe doze dintr-un interval de concentrații ale unor compuși chimioterapeutici pentru o perioadă de timp de la 24 la 72 ore
 - Măsurarea citotoxicității induse de tratamente și calcularea valorii concentrației eficiente la jumătate din maxim (EC_{50}) pentru agenții terapeutici utilizați.
 - Determinarea gradului de apoptoză indusă de tratamente.
 - Utilizarea informațiilor obținute pentru stabilirea tratamentului subiectului de la care a fost derivat materialul biologic
2. Metoda conform revendicării 1 în care compușii chimioterapeutici utilizați sunt selectați dintre paclitaxel, doxorubicină și cisplatină.
3. Metoda conform revendicării 1 în care metoda de determinare a nivelului citotoxicității este selectată dintre metoda MTT, supraviețuirea clonală, măsurarea apoptozei și evaluarea curbelor de creștere sub tratament.

IX. Figuri

Figura 1. Schema de cultivare în condiții care să permită creșterea și proliferarea celulelor tumorale derivate din ascită.

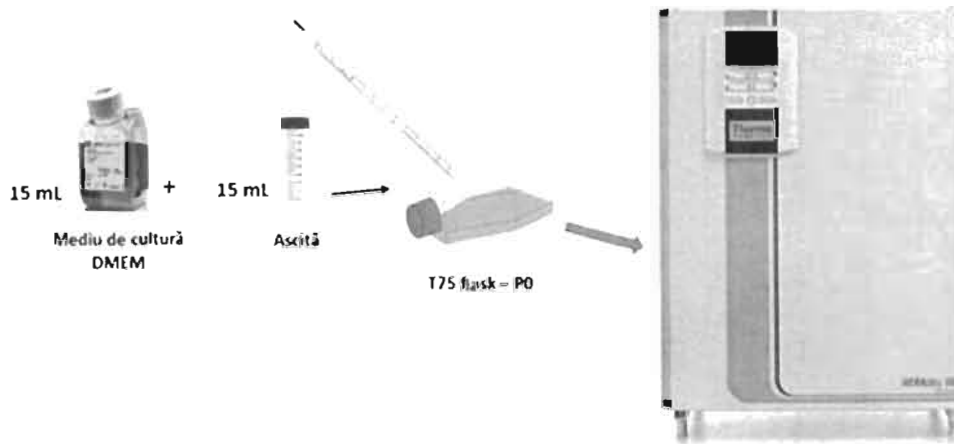


Figura 2. Morfologia celulelor epiteliale tumorale obținute din ascita pacientei cu carcinom ovarian seros

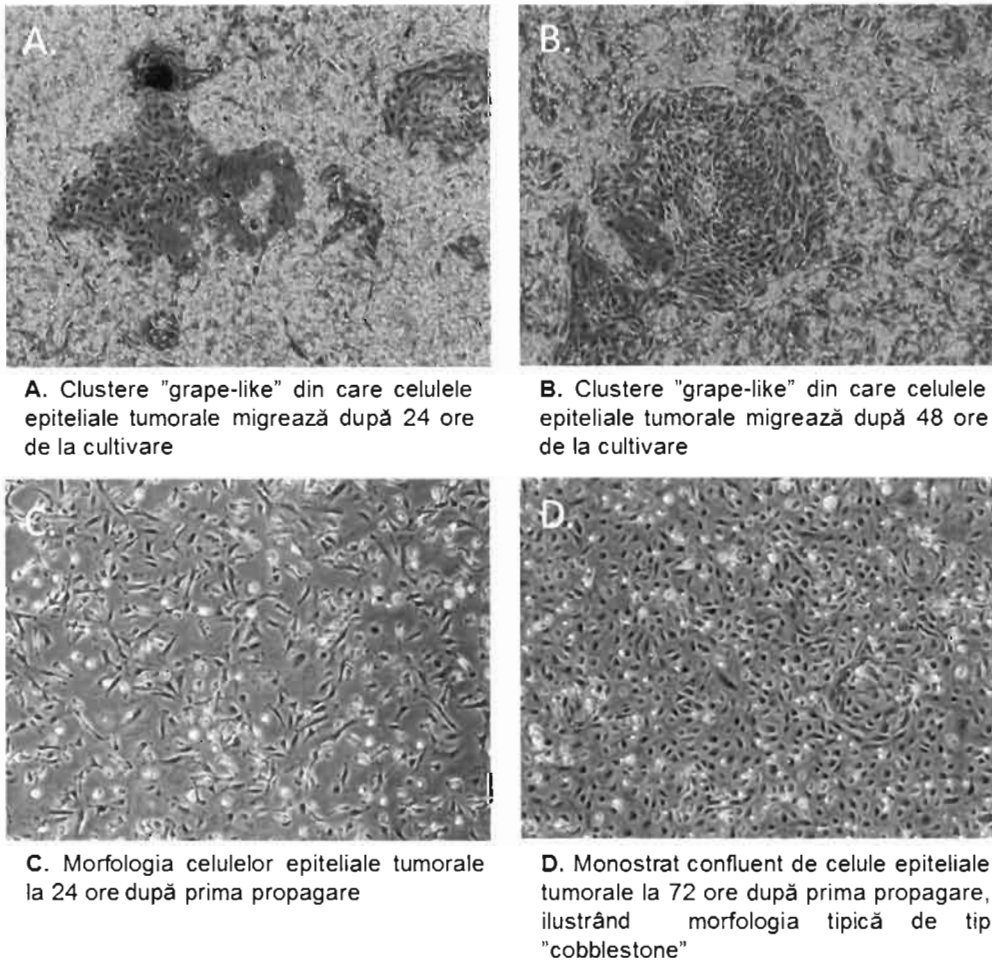


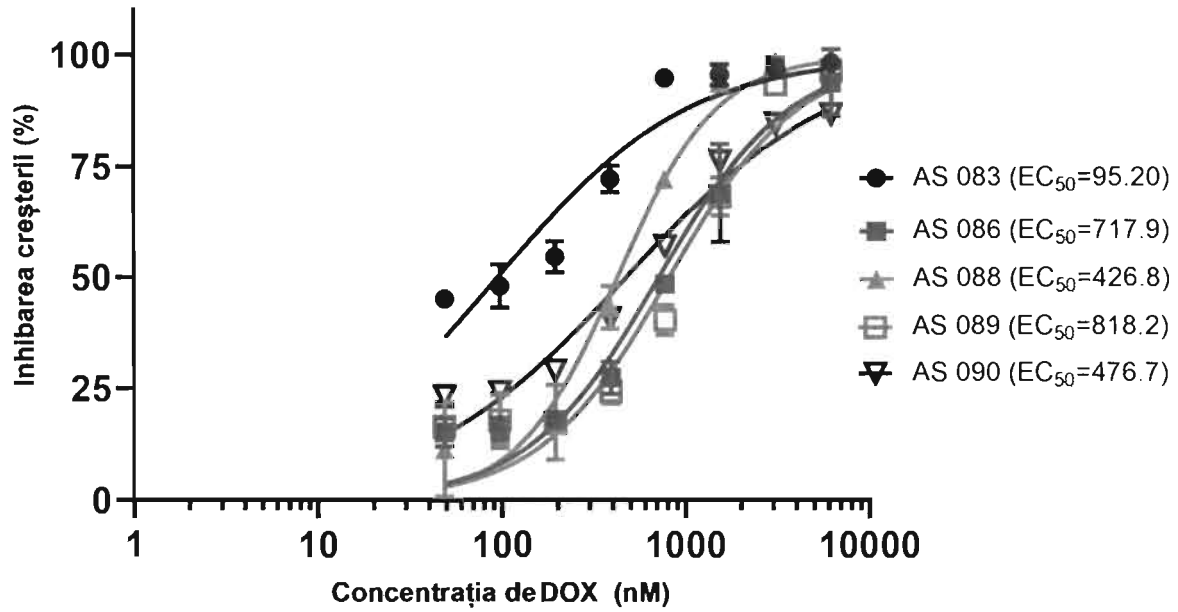
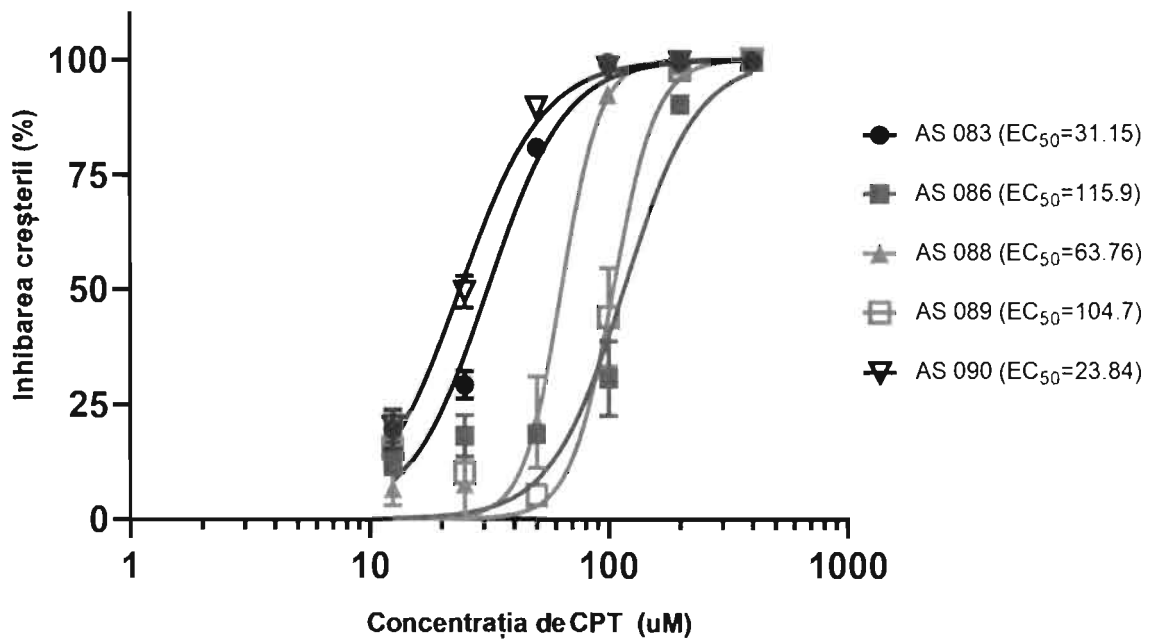
Figura 3. Valorile EC₅₀ obținute în urma tratamentelor cu doxorubicinăFigura 4. Valorile EC₅₀ obținute în urma tratamentelor cu cisplatină

Figura 5. Reprezentarea grafică a inhibiției de creștere obținută în urma tratamentelor cu paclitaxel

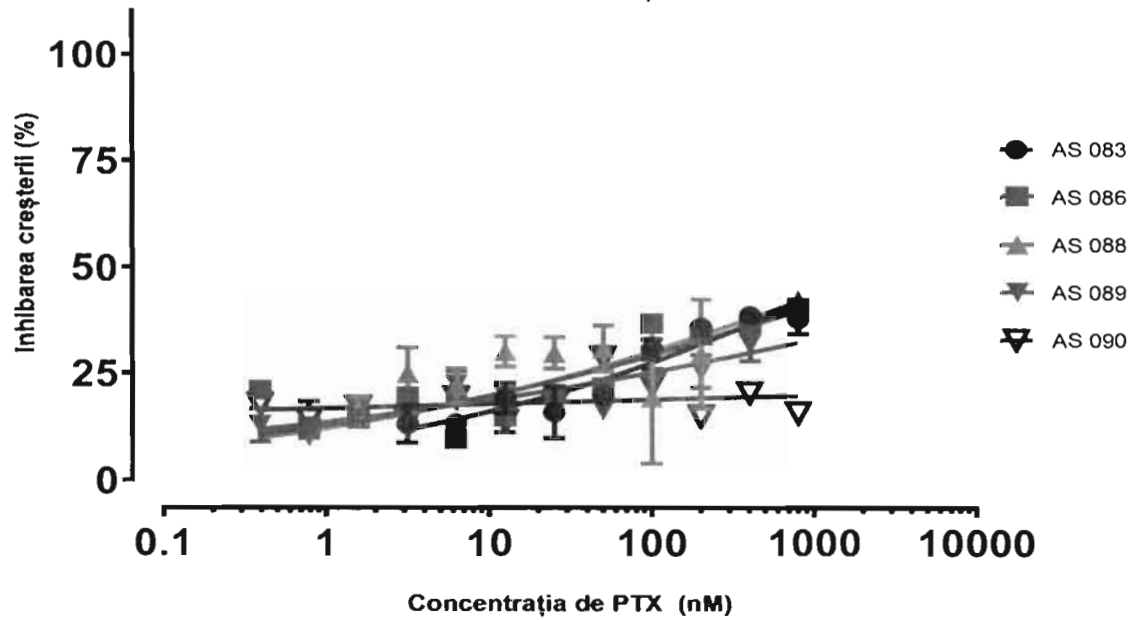


Figura 6. Reprezentarea grafică a expresiei proteinelor (BCL-2, p53, CASP-3) implicate în procesul de apoptoză în urma tratamentelor cu CPT și DOX (A-F)

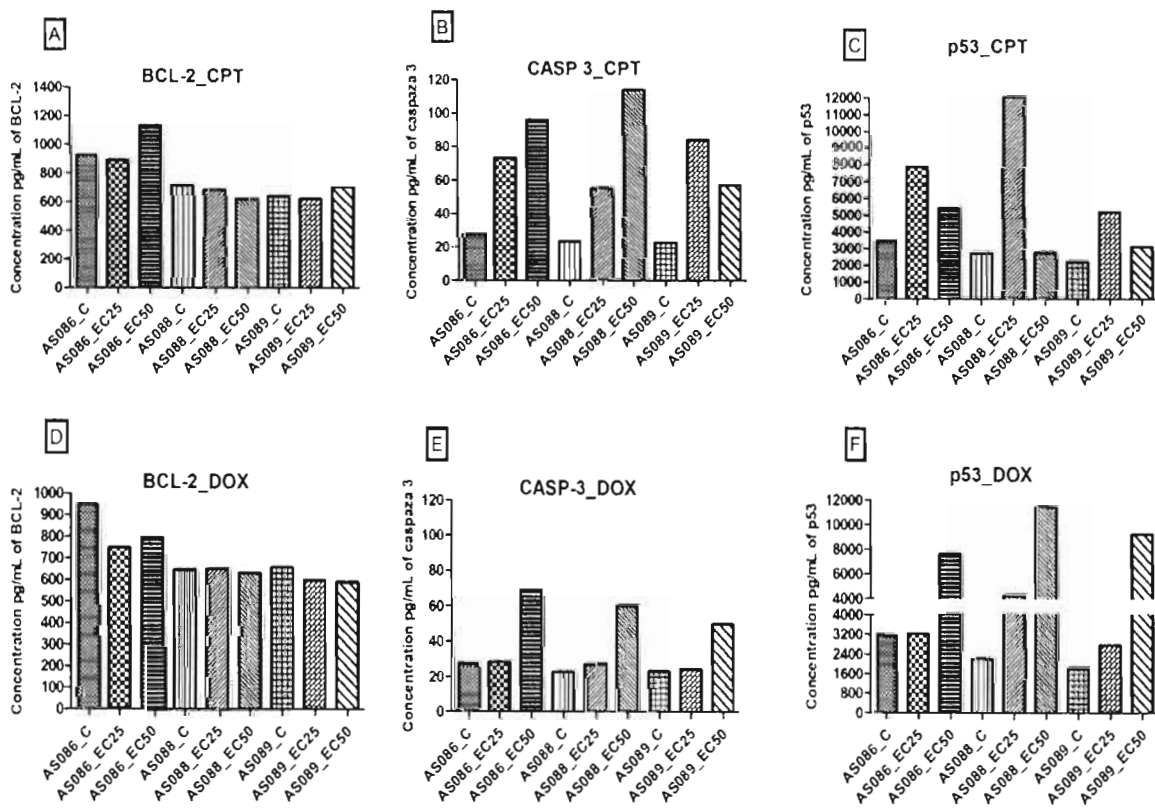


Figura 7. Compararea nivelului de expresie a proteinelor (BCL-2, p53, CASP-3) implicate în procesul de apoptoză între CONTROL (celule netratate) și dozele EC50 și EC25 pentru CPT și DOX. Linia indică eroarea standard a mediei (\pm SEM); valorile statistice au fost calculate cu testul Student t test , unpaired, astfel * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). (A- F)

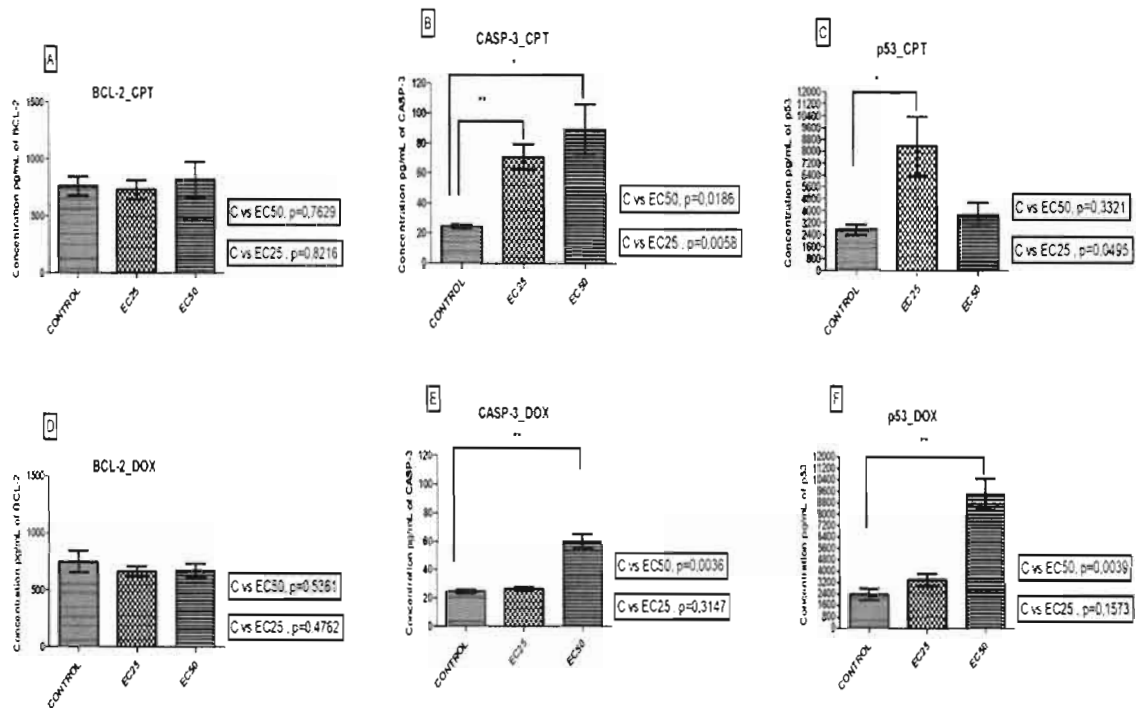


Figura 8. Reprezentarea unui model conceptual de integrare a testelor de chemosenzitivitate în managementul terapeutic a pacientei cu cancer de ovar selectată pentru HIPEC.

