

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ -NAPOCA

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TESTE *IN VITRO* DE PREDICȚIE A RĂSPUNSULUI TUMORAL LA  
TERAPIE

---

Doctorand **Olga Sorițau**

---

Conducător de doctorat **Prof.Dr.Aurel Andercou**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Principiile chimioterapiei antitumorale	21
1.1. Introducere. Istoric	21
1.2. Aplicațiile clinice ale chimioterapiei în oncologie	21
1.3. Clasificarea chimioterapicelor antitumorale	23
1.3.1. lezarea ADN sau interferența cu replicarea ADN	23
1.3.2. arest în una din fazele ciclului celular	24
1.3.3. interferența cu sinteza proteinelor	25
1.3.4. terapiile moleculare țintite	25
1.3.5. modulatori de răspuns biologic	25
2. Mecanismele de acțiune ale chimioterapicelor anti-tumorale clasice.	25
2.1. Introducere	25
2.2. Tipuri de moarte celulară	27
2.2.1. Apoptoza	27
2.2.2. Autofagia	29
2.2.3. Catastrofa mitotică	30
2.2.4. Necroza	31
2.2.5. Senescenta	32
2.3. Mecanisme de instalare a chimiorezistenței	33
2.3.1. Introducere. Istoric	33
2.3.2. Mecanisme generale de instalare a rezistenței multiple la citostatice	36
2.3.2.1. Acumulare scăzută de citostatic	36
2.3.2.2. Alterarea căilor de metabolizare a citostaticelor	37
2.3.2.3. Mecanisme eficiente de reparare a leziunilor induse de citostatic/toleranța crescută a celulelor față de leziunile induse de citostatic	37
2.3.2.4. Ținte celulare alterate	37
2.3.2.5. Expresie genică alterată	37
2.3.3. Celulele stem tumorale	37
2.3.3.1. Celulele stem normale și tumorale	37
2.3.3.2. Activarea celulelor stem	39
2.3.3.3. Terapii care țintesc celulele stem tumorale	40
3. Teste de predicție a răspunsului tumoral la chimioterapie	41
3.1. Introducere. Istoric	41
3.2. Clasificarea testelor de chimiosensibilitate și chimiorezistență	42
3.3. Rolul testelor chimiosensibilitate/rezistență în predicția răspunsului la terapie și ghidarea terapiei	45

---

3.4	Limitele testelor de predicție a chimiosensibilității/rezistenței	45
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ		
1.	Ipoteza de lucru/obiective	51
2.	<b>Studiul 1.</b> Model <i>in vitro</i> de inducere a rezistenței multiple la citostatice a unei linii stabilizate de cancer ovarian	53
2.1.	Introducere. Rezistența crescută la citostatice-motiv de recidivă. Transportorii ABC	53
2.2.	Ipoteza de lucru/obiective	54
2.3.	Material și metodă	55
2.3.1	Linii celulare	55
2.3.2	Cultivarea în condiții standard a celulelor	55
2.3.3	Inducerea rezistenței la citostatice	56
2.3.4	Testul de eflux a l rodaminei 123	56
2.3.5	Testul MTT	56
2.3.6	Analiza statistică	57
2.4.	Rezultate	57
2.4.1	Creșterea celulară a celulelor MLS în medii serum-free și obținerea de structuri 3D (sferoizi)	57
2.4.2	Selecția clonelor rezistente la chimioterapie și identificarea acestora prin testul de eflux a rodaminei 123	58
2.4.3	Achiziția fenotipului de rezistență la terapia convențională a celulelor selectate prin expunere la doze maxime de citostatice evaluată cu testul de citotoxicitate MTT	59
2.5.	Discuții	60
2.6.	Concluzii	61
3.	<b>Studiul 2.</b> Determinarea chimiosensibilității <i>in vitro</i> prin tehnologia Cellscan a celulelor tumorale izolate de la pacienți cu cancer ovarian	63
3.1.	Introducere	63
3.2.	Ipoteza de lucru/obiective	64
3.3.	Material și metode	64
3.3.1	Caracteristicile pacienților și schemele de tratament administrate	64
3.3.2	Izolarea și cultivarea pe termen scurt a celulelor	65
3.3.3	Tratamentul culturilor de celule cu citostatice	66
3.3.4	Determinarea chimiosensibilității <i>in vitro</i>	66
3.3.4.1	colorarea celulelor cu FDA și rodamina 123	66
3.3.4.2	captura celulelor pe cell-carrier și scanarea cu aparatul CellScan	67
3.3.4.3	analiza statistică	68
3.3.4.4	interpretarea personalizată a rezultatelor	68
3.3.4.5	corelația rezultatelor CellScan cu evoluția clinică a pacienților	69
3.4.	Rezultate	70
3.4.1	Date clinico-patologice ale pacienților intrate în studiu	70

3.4.2 Analiza corelației între rezultatele CellScan și răspunsul clinic la terapiile administrate	71
3.4.3 Analiza statistică a rezultatelor CellScan.	80
3.5. Discuții	86
3.6. Concluzii	88
4. <b>Studiul 3.</b> Testarea chimiosensibilității la temozolomidă (TMZ) și relația neoangiogenezei cu celulele stem tumorale și rezistența la terapie în glioblastomul multiform. Metode de conversie a chimiorezistenței	89
4.1. Introducere	90
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	91
4.3. Material și metodă	91
4.3.1 Recoltarea biopsiilor	91
4.3.2. Protocolul de izolare și cultivare a celulelor tumorale- cultura primară	91
4.3.3 Protocolul de subcultivare	91
4.3.4 Protocolul de înghețare a celulelor cultivate	91
4.3.5 Protocolul de dezghețare a celulelor	92
4.3.6 Protocolul de izolare și caracterizare a celulelor stem tumorale din biopsiile de glioblastom- metoda picăturii de ser fetal :	92
4.3.6.1 Caracterizarea fenotipică	92
4.3.6 .2 Izolarea ARN și analiza RT-PCR	92
4.3.7. Modelul 3D de angiogeneza tumorală in gel de fibrina	93
4.3.7.1 Prepararea mediilor	93
4.3.7.2 Prepararea substratului de fibrină	93
4.3.7.3 Recoltarea și prepararea fragmentelor tumorale. Asamblarea pe substratul de fibrina	93
4.3.7.4 Adaugarea de factori proangiogenici și antiangiogenici în mediul de cultură.	94
4.3.8 Testul MTT	94
4.3.9 Testul de apoptoză cu V-Annexin/PI	94
4.3.10 Testul de autofagie	94
4.3.11 Model in vitro de formare a tubilor capilari în Matrigel.	95
4.3.11.1 Protocol de preparare a Matrigel-ului.	95
4.3.11.2 Mediul de cultura	95
4.3.11.3 Insamânțarea celulelor	95
4.3.11.4 Colorații imunocitochimice	96
4.4. Rezultate	96
4.4.1 Evaluarea <i>in vitro</i> a chimiosensibilității la TMZ a celulelor tumorale izolate de la pacienții diagnosticați cu GBM și metode de conversie a rezistenței la terapie	96
4.4.1.1 Izolarea celulelor din biopsiile de GBM și stabilizarea ca linii celulare	96

4.4.1.2	Caracterizarea celulelor stem tumorale	97
4.4.1.3	Testarea răspunsului la terapia cu TMZ <i>in vitro</i> prin testul MTT. Metode de conversie a rezistenței la citostatic cu metformin și 2 methoxi-estradiol	98
4.4.1.3	Efectul temozolomidei legate cu nanoparticule de aur asupra celulelor stem tumorale izolate din glioblastom	102
4.4.2	Potențialul neoangiogenetic și chimiorezistența la TMZ	104
4.4.2.1	Modelul 3D de angiogeneza tumorală în gel de fibrină	104
4.4.2.2	Modelul <i>in vitro</i> de formare a tubilor capilari în Matrigel pe linii celulare derivate din glioblastoame	106
4.5.	Discuții	108
4.6.	Concluzii	112
5.	Concluzii generale (sinteză)	113
6.	Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
REFERINȚE		116

## **CUVINTE CHEIE : teste *in vitro*, chimiosensibilitate, rezistență multiplă la terapie, chimiosensibilizatori**

### **INTRODUCERE**

Disertația de față abordează tehnici accesibile pentru un laborator, de testare a răspunsului la chimioterapie a celulelor tumorale. ***Oncobiograma*** a fost visul a numeroși oncologi, dintre care și Prof.I.Chiricuță, dar care se dovedește a fi greu de atins. Numeroase teste de predicție au fost elaborate în ultimii 50 ani, dar niciunul nu a fost încă implementat în practica clinică, majoritatea testelor rămânând la stadiul de cercetare clinică. Unul din motive este heterogenitatea probelor care nu permit o standardizare a metodelor. Un alt obstacol este diferența de comportament a celulelor cultivate *in vitro* față de cele aflate *in vivo*. Testarea *in vitro* nu poate reproduce perfect miocromediul tumoral și influența factorilor externi cum sunt celulele sistemului imun sau circulația sanguină care influențează farmacodistribuția medicamentului. Cu toate acestea, pot veni în completarea unui puzzle, format din toate informațiile utile care pot apoi ajuta clinicianul în luarea deciziei terapeutice.

Tipurile de moarte celulară induse de citostatice (apoptoza, fagocitoza, catastrofa mitotică, necroza și senescenta) și modul de reparare a leziunilor induse aduc informații ce stau la baza testelor de predicție a chimiosensibilității și pot explica mecanismele extrem de complexe de instalare a rezistenței la terapie. Mecanismul clasic al proteinelor transportori membranari (ATP-binding cassette) este unul din punctele cheie al rezistenței intrinseci sau dobândite, mecanism caracteristic celulelor stem în general și al celor tumorale în special. Dar pe lângă acest mod de rezistență la terapie au fost identificate numeroase alte căi de evitare a morții celulare la acțiunea citostaticelor, cum sunt alterarea căilor de metabolizare a medicamentelor, o eficiență crescută în repararea leziunilor induse de terapie sau ținte celulare sau moleculare alterate.

Celulele stem tumorale prin plasticitatea lor și prin capacitatea crescută de adaptare dinamică la factorii de micromediu, sunt din ce în ce mai mult incriminate ca motiv de recidivă al tumorilor maligne, fiind celule cu o durată de viață lungă, deci susceptibile la mutații și care sunt protejate de acțiunea medicamentelor citostatice mai ales datorită prezenței pompei de eflux ABC.

Luând în considerare aceste aspecte, am abordat două din cele mai temute localizări oncologice, cancerul ovarian și glioblastomul multiform, urmărind izolarea celulelor stem tumorale, caracterizarea fenotipică și funcțională a acestora, răspunsul lor la terapiile convenționale dar și metode de reversie a chemorezistenței prin metode mai puțin convenționale.

Aplicabilitatea testelor de predicție în practica clinică a fost de asemenea un scop al tezei, care s-a materializat într-un studiu ce a folosit tehnologia CellScan în evaluarea răspunsului tumoral *in vitro* a celulelor tumorale izolate din biopsiile de cancer ovarian.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Obiectivele tezei

- Stabilirea unui model *in vitro* de inducere a rezistenței multiple la citostatice (MDR) a unei linii celulare stabilizate derivate dintr-un carcinom ovarian și testarea chimiosensibilității/chimiorezistenței clonelor izolate.
- Testarea *in vitro* a răspunsului tumoral la citostatice, a celulelor izolate de la paciente cu cancer de ovar folosind tehnologia CellScan.
- Testarea chimiosensibilității la temozolomida (TMZ) și relația neoangiogenezei cu celulele stem tumorale și rezistența la terapie în glioblastomul multiform.
- Metode de conversie a chimiorezistenței la temozolomida în glioblastomul multiform

### **Studiul 1: Model *in vitro* de inducere a rezistenței multiple la citostatice (MDR) a unei linii stabilizate de cancer ovarian**

**Ipoteză de lucru:** S-a recunoscut importanța micromediului tumoral, care include hipoxia, citokinele, componenții matricei extracelulare și imunosupresia indusă de celulele tumorale, ca factori ce pot induce MDR. **Sferoizii**, formațiuni multicelulare, reprezintă un model 3D *in vitro*, care încearcă să reproducă spațialitatea și condițiile locale a unei tumori solide *in vivo*, reprezentând una din cele mai bune modalități de testare a unei terapii anti-tumorale. Celulele din componența sferoizilor prezintă modificări ale expresiei unor molecule de adeziune cu rol în progresia tumorală : CD44, ICAM-1 și LFA3. În cancerul ovarian se dezvoltă astfel de formațiuni sferice ca determinări secundare peritoneale, ce variază ca mărime între 50-750 μm. Unul din motivele pentru care cancerul ovarian de tip epitelial este greu de tratat este mecanismul de diseminare, cu invazia locală a organelor pelvice și abdominale.

**Metodă :** În acest studiu am abordat metoda de cultivare a celulelor tumorale derivate dintr-un carcinom ovarian (o linie stabilizată, MLS) sub presiunea unor factori din micromediul de cultură (deprivarea de ser fetal ca furnizor de proteine și folosirea

---

unor factori de creștere). Prin combinația acestui protocol cu expunerea acestor celule la doze maximale de citostatice am urmărit obținerea unor sferoizi tumorali, încercând astfel să elaborăm un model *in vitro* care să reproducă o parte din condițiile procesului de micrometastazare peritoneală. Inducerea rezistenței multiple la citostatice a celulelor MLS, a fost evidențiată prin evaluarea activității pompei de eflux asociate transportorilor ABC cu testul cu rodamina 123, precum și prin determinarea răspunsului la citostatice cu ajutorul testului MTT a clonelor izolate.

**Rezultate și discuții:** Celulele tumorale ovariene MLS au avut capacitatea de a-și păstra proprietățile proliferative într-un sistem de cultură serum-free și au prezentat modificări morfologice sugerând o tranziție de tip epitelial-mezenchimală. Celulele s-au rotunjit și treptat și-au pierdut capacitatea de adeziune la substratul de plastic, iar apariția sferelor tumorale (sferoizi) a fost observată după 7 zile de la inițierea culturii în mediu serum-free. S-a observat formarea unor agregate de celule în suspensie, care apoi prin proliferare celulară au ajuns la dimensiuni mai mari. Pentru selecția clonelor rezistente s-a utilizat o metodă combinată a cultivării în mediu serum-free cu expunere la doze maximale de citostatic (în total 3 administrări): doxorubicină și carboplatin (3 μg/ml respectiv 5 μg/ml) pentru 24 de ore. Evaluarea activității pompei de eflux (ca indicator al MDR) s-a efectuat cu testul rodaminei 123 (Rh123) și s-a observat o scădere semnificativă a captării Rh123 a celulelor MLS cultivate în condițiile menționate mai sus față de rezultatele obținute pentru o linie de fibroblasti umani HFL și față de celulele MLS netratate. Acest fenotip de rezistență a fost apoi confirmat cu testul de viabilitate MTT, care a arătat că celulele obținute prin metoda selecției cu citostatice, au avut o rată de proliferare mult mai crescută, de până la 3 ori mai mare decât celulele MLS fără preterapie, cu creșterea populației celulare și la teste după 48 ore.

**Concluzii:** Acest model *in vitro* poate fi folositor ca un model experimental pentru a mima metastazarea peritoneală a cancerului ovarian precum și ca model de inducere a MDR, situație întâlnită mai ales în stadiile mai avansate ale bolii dar și în stadiul post-chimioterapie. Tumorisferelor formate au achiziționat fenotipul de rezistență la citostatice prin activarea pompei de flux, fapt demonstrat cu testul de eflux pentru rodamina. Modelul *in vitro* permite studiul unor mecanisme și terapii care să reverseze această rezistență multiplă. Poate servi de asemenea pentru testarea a noi alternative terapeutice.

## **Studiul 2: Determinarea chimiosensibilității *in vitro* prin tehnologia Cellscan a celulelor tumorale izolate de la pacienți cu cancer ovarian**

**Ipoteză de lucru și metodologie:** Terapia personalizată este una din temele cele mai studiate în ultimul timp, urmărind obținerea unui efect maxim al tratamentului cu toxicitate minimă. În acest studiu s-a urmărit testarea răspunsului *in vitro* la citostatice a celulelor izolate din biopsii de cancer ovarian, prin folosirea tehnologiei CellScan și corelarea rezultatelor cu evoluția clinică a pacienților. Studiul a fost de tip "dublu orb", iar corelațiile finale s-au efectuat după 5 ani, considerând că este un interval de timp ce poate da informații reale despre evoluția clinică a pacienților intrate în studiu. Testarea *in vitro* s-a realizat prin tehnica CellScan, folosind un aparat ce investighează anumiți parametrii celulari, cum sunt viabilitatea celulară sau apoptoza, pe baza

transformărilor survenite la nivelul membranei celulare și în citoplasma celulelor expuse la diferiți agenți citotoxici. Aparatul CellScan este un citometru static ce măsoară individual celulele marcate fluorescent. Aspectul practic al acestui studiu a fost implementarea unei metode de laborator menite să “prezică” răspunsul tumoral la citostaticele cel mai frecvent utilizate în clinica cancerului ovarian, venind astfel în ajutorul clinicianului oncolog.

În studiu au fost incluse 36 de paciente cu tumori ovariene la care s-a determinat răspunsul tumoral la chimioterapie *in vitro*. Trei paciente au prezentat afecțiuni benigne (2 cu tuberculoză peritoneală, 1 cu aspect histologic de tumoră ovariană benignă), 1 caz cu teratom ovarian, 1 caz cu tumoră ovariană borderline. Celulele tumorale au fost izolate din fragmentele tisulare recoltate din tumora primara sau din metastaze, în timpul intervențiilor chirurgicale. S-au izolat celule și din lichidul ascitic la două paciente. Celulele izolate au fost cultivate în placi cu 6 godeuri în mediu DMEM cu 4.5 g glucoza/L, 10 % ser fetal bovin (FCS), 2mM-glutațina, 1% NEA, 100 U/mL penicilina și 100 μg/mL streptomicina. După 16-24 ore, după aderarea celulelor la placă, s-a aplicat tratamentul cu citostatice: carboplatin (CB) la o concentrație finală de 1μg/ml, topotecan (Topo), la o concentrație de 0.001 μg/ml, taxotere (Tax) 1μg/ml, doxorubicină (Doxo) 0.5 μg/ml și gemcitabină (Gemz) 0.2 μg/ml. După 20-24 ore, celulele au fost recoltate și resuspendate în mediu DMEM fără fenol red și colorate cu fluorescein diacetat (FDA-ca indicator de viabilitate celulară) și rodamina 123 (RH123-ca indicator al pompei de eflux). Celulele au fost apoi capturate pe un dispozitiv cell-carrier și scanate cu aparatul CellScan, care dă informații despre intensitatea fluorescenței și valoarea de polarizare a luminii fluorescente.

**Rezultate și discuții:** Rezultatele probelor tratate cu citostatice au fost comparate cu probele de control în ceea ce privește intensitatea fluorescenței (FI) și polarizarea luminii fluorescente (FP). Datele individuale ale probelor tratate, au fost exprimate în procente de creștere sau scădere a intensității fluorescenței și de polarizare a fluorescenței coloranților (FDA și RH123) comparativ cu probele de control. Pentru a observa dacă exista o corelație între rezultatele CellScan și răspunsul clinic la terapie, pacientele au fost împărțite în 3 grupe: *grupul I* cu răspuns complet cu 2 subgrupe – la subgrupul pacientelor în stadii incipiente ale bolii (stadiul I și II FIGO) și la subgrupul cu boala în stadiu avansat (stadiul III și stadiul IV FIGO) ; *grupul II* cu evoluție de la răspuns complet spre boală progresivă; *grupul III* cu evoluție de la răspuns parțial sau boală staționară spre boala progresivă. Corelația între testele CellScan și răspunsul clinic la terapie a fost de 97.2%. Răspunsul global la citostatice a fost: ► pentru CB de 45.9% la testul FDA P2 și 48.6% la testul RH P2, ► pentru taxotere 56.7% la FDA P2 și 48.6% la RH P2, ► pentru doxorubicina de 72.7% la FDA P2 și 60.6% la RH P2 ► pentru topotecan 48.6% la FDA P2 și 48.6% la RH P2 iar ► pentru gemcitabina de 52% la FDA P2 și 56% la RH P2. Acesta evaluare a fost însă diferită în funcție de stadiul bolii, astfel ca în stadiile FIGO I și II sensibilitatea pentru CB a fost de 100% la testarea FDA . În schimb la testul cu rodamina doar 50% din celulele tumorale au prezentat sensibilitate la CB, iar un caz în stadiul Ic a dezvoltat chiar o rezistență multiplă (MDR) la citostatice, indicând faptul că această rezistență poate să fie întâlnită chiar și în stadiile incipiente. O terapie cito-reductivă chirurgicală și medicamentoasă bine condusă în acest stadiu poate eradica boala. Am constatat în experimentul nostru,



---

că sensibilitatea la CB și la alte citostatice a fost prezentă și în stadiile avansate, III și IV, explicând răspunsul complet inițial la terapie la paciențele din grupul II. Testul CellScan a constatat rezistența multiplă la citostatice la 17 din cele 23 de probe recoltate de la paciențele din aceste stadii (tumori primare și metastaze). S-a observat la un caz la care s-a efectuat testarea și după terapie, achiziționarea fenotipului de rezistență, explicând evoluția nefavorabilă ulterioară a pacientei. Rezistența multiplă a fost identificată atât de testul cu FDA (MDR FDA)(5 cazuri) cât și de testul cu RH (MDR RH)(7 cazuri), sau de ambele teste (MDR FDA+MDR RH)(5 cazuri). Comparând curbele de supraviețuire a paciențelor la care s-a evidențiat rezistența multiplă, s-a observat o scurtare a supraviețuirii la paciențele care prezentau rezistența multiplă la testul FDA. Este cunoscut faptul că tumorile ovariene sunt sensibile într-o primă fază la tratamentul cu platine, dar că în timp dezvoltă o rezistență ce conduce la recăderea bolii. Factorii moleculari incriminați sunt modificările efluxului citostaticelor în celulă, o supraexprimare a proteinelor din clasa ABC (puse în evidență de testul RH în experimentul nostru), de creșterea nivelului de glutation și o reparare mai eficientă a leziunilor ADN induse de terapie.

**Concluzii:** Acest studiu a scos în evidență cât de frecvent este fenomenul de rezistență multiplă la citostatice, mai ales în cazurile avansate ale cancerului ovarian. Corelația foarte bună între testele CellScan și răspunsul clinic al paciențelor este explicată și prin faptul că s-au folosit două metode diferite de analiză a celulelor care vizau atât viabilitatea celulară cât și evidențierea pompei de eflux a medicamentelor.

### **Studiul 3: Testarea chimiosensibilității la temozolomidă (TMZ) și relația neoangiogenezei cu celulele stem tumorale și rezistența la terapie în glioblastomul multiform. Metode de conversie a chimiorezistenței**

**Ipoteză de lucru și metodologie:** Glioblastomul multiform (GBM) este o localizare oncologică extrem de studiată, în ciuda unei incidențe generale scăzute față de alte tipuri de cancer datorită agresivității crescute și a rezistenței la terapie. Mecanismele principale implicate în chimiorezistența GBM, sunt date de factori extrinseci cum este micromediul tumoral și factori intrinseci cum este proteina de detoxifiere O6-methylguanine-ADN-metiltransferaza (MGMT), ce este frecvent supraexprimată în celulele stem tumorale (CSC). Acest studiu are mai multe obiective: ► evaluarea *in vitro* a chimiosensibilității la TMZ a celulelor tumorale izolate de la pacienții diagnosticați cu GBM și relația cu potențialul neoangiogenetic folosind mai multe teste: testul MTT, testul de apoptoză cu V-Annexin, testul de autofagie și modelul 3D de angiogeneză tumorală a explantelor tumorale (explante tumorale în gel de fibrină) ► izolarea celulelor stem tumorale: caracterizarea fenotipică și funcțională a acestora, precum și relația acestor celule cu inducerea rezistenței la terapie și neoangiogeneză (testul tubilor capilari în Matrigel) ► metode de conversie a rezistenței la terapie folosind fie TMZ conjugată cu nanoparticule de aur (TMZ-GNP), precum și substanțe cu acțiune posibilă asupra CSC: metformin (MTF) și 2-methoxiestradiol (2ME) în condiții de normoxie și hipoxie.

**Rezultate și discuții:** Din totalul de 20 de biopsii de la pacienții la care s-a intervenit operator s-au izolat 15 linii celulare primare. După însămânțare, celulele izolate au

aderat rapid în primele 24 ore și au prezentat o rată de proliferare mare la primele pasaje. Două biopsii au fost subiectul izolării celulelor stem tumorale prin metoda de cultură a explantelor în picătura de ser fetal. Principala caracteristică a acestor celule stem-like a fost o rată foarte mare de proliferare începând de la pasajul 3, cu un timp de dublare a populației celulare la 4-6 ore. La pasajul 4 aceste celule au prezentat o schimbare drastică a morfologiei, devenind cu o talie mult mai mică și cu formă cuboidală. Aceste celule stem au fost caracterizate prin colorații imunocitochimice pentru markeri de celule stem: Oct 3/4, Nanog, CD 29, CD 105 dar și pentru markeri de progenitori gliali: CD 133, NF (neurofilamente) și GFAP. Analiza expresiei genice prin PCR-RT au demonstrat expresia CXCR4, a Oct3/4 și GADPH dar și prezența concomitentă de nestin și GFAP.

Testarea celulelor tumorale pentru răspunsul la temozolomida (TMZ) și MTF: s-a efectuat prin testul MTT folosind 2 concentrații de TMZ: 50 μM și 100 μM. În paralel s-a aplicat un protocol de inducere a diferențierii și astfel și o sensibilizare a celulelor de glioblastom la terapia cu TMZ, prin expunere concomitentă MTF la o concentrație de 5 μM. Răspunsul la TMZ a fost investigat pentru 9 din tumorile intrate în studiu, din care 4 au fost rezistente la terapia cu TMZ. Celulele stem tumorale au prezentat o oarecare sensibilitate la TMZ, dar MTF singur sau asocierea TMZ+MTF au indus un răspuns citotoxic mult mai puternic. La testul MTT s-a observat o citotoxicitate crescută pentru metformin singur, care poate fi interpretată și ca o reducere a ratei de proliferare probabil datorită unui proces de inducere a diferențierii celulelor stem tumorale spre celule mai mature. Asocierea cu temozolomida a potențat această acțiune. Aceasta observație a fost confirmată și la analiza imunocitochimică pentru autofagie, unde atât MTF cât și TMZ au determinat formarea fagozomilor, proces care a fost mult potențat de combinația cu Sorafenib. În studiul de față, 60% dintre celulele izolate din glioblastoame au fost responsive în diferite grade la testarea *in vitro* pentru TMZ, printre care și celulele stem-like. În general, celulele stem tumorale (CSC) sunt etichetate ca și chimiorezistente, și sunt considerate o parte importantă a fenomenului de rezistență la terapie precum și a procesului de neoangiogeneză tumorală. O explicație a faptului că celulele stem izolate și caracterizate în acest studiu au fost parțial sensibile la TMZ, ar fi că testele uzuale care evaluează viabilitatea (testul MTT) sau apoptoza pot să nu detecteze efectele specifice care le declanșează tratamentul cu citostatic, de exemplu mecanismele de reparare care nu pot fi surprinse într-o cultură celulară de scurtă durată. MTF intervine ca un activator al protein kinazei AMP (AMP-activated protein kinase-AMPK), care la rândul ei va inhiba calea mTOR. Metformin are și o acțiune de a induce arestul celulelor în anumite faze ale ciclului celular, inhibă efectul mitogenic al insulinei și induce apoptoza și un alt tip de moarte celulară, autofagia. De asemenea MTF determină celulele stem tumorale să folosească altă cale de obținere a energiei, fosforilarea oxidativă, determinând o criză energetică a acestor celule.

Răspunsul celular la tratamentul cu 2 ME și TMZ a fost testat pe 4 linii celulare: celulele stem tumorale, linia de celule endoteliale HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) și două linii celulare izolate din GBM. Testele s-au efectuat în condiții de normoxie sau hipoxie. Celulele au fost împărțite în două loturi: neiradiate și iradiate cu o doză de 2 Gy. Viabilitatea celulară s-a determinat cu testul MTT. S-a observat un

---

răspuns diferențiat la 2ME, în funcție de tipul de celule, de doza de 2 ME, și condițiile de normoxie sau hipoxie. Astfel, celulele stem tumorale și celulele endoteliale au prezentat o sensibilitate crescută la 2 ME în condiții de normoxie. Iradierea celulelor stem cultivate în normoxie nu a modificat sensibilitatea celulelor la drog. Răspunsul la TMZ a acestor celule a fost diferit în condiții de hipoxie, unde s-a observat o rezistență la combinația de TMZ cu 2 ME (10 $\mu$ M și 25 $\mu$ M), atât a celulelor iradiate cât și neiradiate. În normoxie însă celulele au fost sensibile la asociere, mai puțin în cazul celulelor iradiate. Celulele endoteliale au răspuns la toate dozele de 2ME, atât în normoxie cât și în hipoxie, mai puțin la asocierea TMZ cu 2 ME în hipoxie. 2 ME a fost propus mai ales ca terapie antiangiogenică, dar acesta acționează și și ca un agent anti-microtubuli, ce induce arestul mitotic, apoptoza și autofagia celulelor tumorale. Un alt mecanism propus este creșterea intracelulară a radicalilor liberi de oxigen (ROS) și scăderea potențialului de membrană mitocondrial.

Efectul temozolomidei legate cu nanoparticule de aur asupra celulelor stem tumorale izolate din glioblastom. Terapia țintită este una din alternativele din ce în ce mai abordate în ultimii ani. Nanoparticulele de aur (GNP), au proprietăți chimice și fizice care permit legarea și transportul agenților terapeutici. În acest studiu TMZ a fost legată la suprafața nanoparticulelor de aur și s-a evaluat răspunsul celulelor stem tumorale comparativ cu TMZ singură. S-a evaluat sensibilitatea celulelor tumorale prin testul MTT și testul de apoptoză cu annexin V/propidium iodide (PI). Legarea medicamentelor de nanoparticule reprezintă o altă metodă de a crește răspunsul tumoral la citostatice în glioblastoame, cunoscut fiind faptul bariera hemato-encefalică nu permite trecerea decât a moleculelor de dimensiuni mici de până la 10nm. Dezavantajul administrării sistemice a citostaticelor cu molecule mici este că nu pot menține mai mult de câteva minute concentrații suficiente pentru a se acumula la nivelul tumorilor cerebrale. Testarea *in vitro* pe celulele stem tumorale tratate cu nanoparticule de aur (GNP) funcționalizate cu TMZ a arătat scăderea semnificativă a viabilității celulare la testul MTT și la testul de apoptoză cu AnnexinV, a celulelor tratate cu GNP-TMZ comparativ cu cele tratate numai cu TMZ. Nanoparticulele de aur au fost captate de celulele tumorale încă din primele ore de incubare.

Influența TMZ asupra angiogenezei în tumorile de glioblastom: A fost dezvoltat un model de angiogenză tumorală în gel fibrină, în care majoritatea explantelor recoltate din biopsiile tumorale au dezvoltat o rețea de capilare. Majoritatea tumorilor au dezvoltat angiogeneza în modelul 3D în probele de control. La 11 cazuri din 19 tratamentul cu TMZ a indus sau a augmentat procesul de angiogenză. Unele probe, au prezentat o chiar o intensificare a densității de vase de neoformație după administrarea de TMZ, chiar la doze mari de 30 $\mu$ M. Factorii de creștere proangiogenici, VEGF și PDGF au declanșat la unele cazuri un răspuns puternic. După cum se observă există o mare diversitate a modului în care procesului angiogenic a avut loc în explantele tumorale ca răspuns la diferitele terapii. Încercând să explicăm acest comportament neașteptat, prea puțin semnalat în literatură, am dezvoltat un alt model de angiogenză pe substrat de Matrigel, în care s-a urmărit formarea tubilor capilari într-un mediu proangiogenic, încercând într-o anumită măsură să mimăm nișa vasculară. Toate liniile celulare de glioblastom testate au format tubi capilari în diferite grade de intensitate, iar tratamentul cu TMZ a determinat o augmentare a acestui fenomen. O explicație ar putea fi răspunsul angiogenic puternic al glioblastoamelor la TMZ sau alți agenți terapeutici, prin selectarea într-o primă etapă a celulelor stem

tumorale (care sunt rezistente la terapie), iar într-o a doua etapă prin stimularea acestora de a se diferenția spre celule endoteliale sub acțiunea unor factori de creștere specifici proangiogenici, cum sunt VEGF sau PDGF.

## CONCLUZII GENERALE

Experimentele efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au evidențiat heterogenitatea de răspuns la terapia cu citostatice a celulelor izolate din cele două localizări luate în studiu, cancerul ovarian și glioblastomul multiform, precum și existența într-un procent mare, de aproximativ 50%, a cazurilor rezistente la terapie.

Pentru a investiga modul de instalare a acestei rezistențe la chimioterapie am elaborat un model *in vitro* de inducere a rezistenței a unei linii stabilizate de carcinom ovarian, care să reproducă în parte procesul de metastazare peritoneală. S-a indus o tranziție epitelio-mezenchimală sub presiunea unor factori de micromediu și selecție darwiniană a clonelor rezistente prin expunerea la doze repetate crescute de chimioterapice. Este o metodă ieftină de obținere a acestor celule ce pot fi folosite apoi în elaborarea unor strategii de reversie a rezistenței multiple la citostatice.

În aceeași idee s-au izolat printr-o metodă simplă celulele stem tumorale derivate din glioblastomul multiform, în vederea studierii comportamentului acestora atât în relație cu terapiile anti-neoplazice cât și cu neoangiogeneza tumorală.

Tehnologia CellScan folosită în testarea chimiosensibilității celulelor izolate din tumorile de cancer ovarian s-a corelat în procent de 97.2% cu răspunsul clinic al pacientelor. Semnalarea cazurilor rezistente la terapie este importantă pentru clinicieni pentru evitarea terapiilor inutile și toxice. Aceste teste funcționale pot fi utile doar într-o interpretare integrată a tuturor informațiilor existente despre pacient și boala acestuia.

Rezistența crescută la temozolomida a celulelor derivate din glioblastomul multiform a fost reversată cu medicamente chimiosensibilizatoare, metformin și 2-metoxi-estradiol. S-a constatat că există un răspuns diferențiat și la acest tip de medicamente, susținând necesitatea testării și personalizării terapiilor.

O altă metodă de îmbunătățire a captării celulare și acțiunii temozolomidei s-a dovedit legarea temozolomidei de nanoparticule de aur, crescând semnificativ răspunsul celulelor stem tumorale la terapie.

O concluzie finală este ca aceste teste *in vitro* de predicție a răspunsului tumoral își pot găsi un loc important atât în clinica oncologică cât și în dezvoltarea de noi strategii terapeutice.

---

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ -NAPOCA

---

THESIS ABSTRACT

***IN VITRO* PREDICTION TESTS OF TUMOR RESPONSE TO  
THERAPY**

PhD candidate **Olga Sorițău**

---

PhD coordinator **Prof.Dr.Aurel Andercou**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

## CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Principles of antitumor therapy	21
1.1. Introduction. Hystory	21
1.2. Clinical applications of chemotherapy in oncology	21
1.3. Classification of antitumor drugs	23
1.3.1 DNA lesions or interference with DNA replication	23
1.3.2 arrest in one of cell cycle phases	24
1.3.3 protein synthesis interference	25
1.3.4 targeted molecular therapies	25
1.3.5 biological response modulators	25
2. Mechanism of action of classic antitumor drugs	25
2.1. Introduction	25
2.2. Types of cell death	27
2.2.1. Apoptosis	27
2.2.2 Autophagy	29
2.2.3 Mitotic catastrophe	30
2.2.4 Necrosis	31
2.2.5 Senescence	32
2.3 Chemoresistance induction mechanisms	33
2.3.1 Introduction. Hystory	33
2.3.2 General mechanisms of multidrug resistance induction	36
2.3.2.1 Low levels of drug accumulation	36
2.3.2.2 Altered metabolic pathways	37
2.3.2.3 Efficient mechanisms of repair of induced lesions / increased cell tolerance to chemotherapy-induced injuries	37
2.3.2.4 Altered cellular targets	37
2.3.2.5 Altered gene expression	37
2.3.3 Cancer stem cells	37
2.3.3.1 Normal and tumor stem cells	37
2.3.3.2 Stem cells activation	39
2.3.3.3 Therapies targeting cancer stem cells	40
3. Prediction tests of tumor response to chemotherapy	41
3.1. Introduction. Hystory	41
3.2. Classification of chemosensibility and chemoresistance tests	42
3.3 Role of chemosensitivity/resistance tests in predicting response to therapy and therapy guidance	45
3.4 Limits of chemosensitivity/resistance prediction tests	45

---

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Hypothesis/ Objectives	51
2. <b>Study 1.</b> <i>In vitro</i> model of induction of multiple resistance to chemotherapy in an ovarian stabilized cell line	53
2.1. Introduction. Increased resistance to drugs-reason of relapse. ABC transporters	53
2.2. Hypothesis/ Objectives	54
2.3. Material and methods	55
2.3.1 Cell lines	55
2.3.2 Cell cultivation in standard conditions	55
2.3.3 Induction of resistance to cytostatic agents	56
2.3.4 Rhodamin 123 efflux test	56
2.3.5 MTT assay	56
2.3.6 Statistical analysis	57
2.4. Results	57
2.4.1 MLS cell culture in serum-free medium and obtaining 3D cell structures (spheroids)	57
2.4.2 Selection of resistant clones to chemotherapy and identification by rhodamin 123 efflux test	58
2.4.3 Acquisition of resistant phenotype to conventional therapy by exposure to maximal drugs levels. Evaluation by MTT assay	59
2.5. Discussions	60
2.6. Conclusions	61
3. <b>Study 2.</b> <i>In vitro</i> determination of chemosensitivity of tumor cells isolated from patients with ovarian cancer by Cellscan technology	63
3.1. Introduction	63
3.2. Hypothesis/ Objectives	64
3.3 Material and methods	64
3.3.1 Characteristics of patients and administrated treatment regimens	64
3.3.2 Isolation and short term cultivation of cells	65
3.3.3 Treatment of cell cultures with drugs	66
3.3.4 <i>In vitro</i> chemosensitivity detection	66
3.3.4.1 Cells staining with FDA and rhodamin 123	66
3.3.4.2 Cells capture on cell-carrier and scanning with CellScan	67
3.3.4.3 Statistical analysis	68
3.3.4.4 Personalized interpretation of results	68
3.3.4.5 CellScan results correlation with patients clinical evolution	69
3.4. Results	70
3.4.1 Clinical and pathological data of the patients entered in the study	70
3.4.2 Analysis of correlation between CellScan results and clinical response to given therapies	71

3.4.3 Statistical analysis of CellScan results	80
3.5. Discussions	86
3.6. Conclusions	88
4. <b>Study 3.</b> Testing the chemosensitivity to temozolomide (TMZ) and the relationship of cancer stem cells with angiogenesis and resistance to therapy in multiform glioblastoma. Methods of chemoresistance conversion	89
4.1. Introducere	90
4.2. Hypothesis/ Objectives	91
4.3. Materials and methods	91
4.3.1 Harvesting the biopsies	91
4.3.2. Isolation and cultivation protocol of cancer stem cells- primary culture.	91
4.3.3 Subcultivation protocol	91
4.3.4 Freezing cultivated cells	91
4.3.5 Defrosting cells	92
4.3.6 The isolation and characterisation protocol of cancer stem cells from glioblastoma biopsies- fetal calf serum drop method	92
4.3.6.1 Phenotyping	92
4.3.6 .2 RNA isolation and RT-PCR analysis	92
4.3.7. 3D model of tumor angiogenesis in fibrin gel	93
4.3.7.1 Medium preparation	93
4.3.7.2 Fibrin gel preparing	93
4.3.7.3 Harvesting and preparing tumor fragments. Assembly on fibrin substrate	93
4.3.7.4 Adding proangiogenic and antiangiogenic factors in culture medium	94
4.3.8 MTT assay	94
4.3.9 Apoptosis test with V-Annexin/PI	94
4.3.10 Autophagy test	94
4.3.11 In vitro model of capillary tube formation in Matrigel	95
4.3.11.1 Protocol for Matrigel preparation	95
4.3.11.2 Cell culture medium	95
4.3.11.3 Seeding the plates	95
4.3.11.4 Immunocytochemical staining	96
4.4. Results	96
4.4.1 <i>In vitro</i> evaluation of TMZ chemosensitivity of tumor cells isolated from patients with GMB. Conversion methods of resistance to therapy	96
4.4.1.1 Isolation of cells from GBM biopsies and cell lines stabilization	96
4.4.1.2 Characterization of cancer stem cells	97



---

4.4.1.3 In vitro testing of response to TMZ with MTT assay. Conversion methods of drug resistance with metformin and 2 methoxy-estradiol	98
4.4.1.3 Effects of gold nanoparticles conjugates with TMZ on GMB cancer stem cells	102
4.4.2 Neoangiogenic potential and chemoresistance to TMZ	104
4.4.2.1 3D model of tumor angiogenesis in fibrin gels	104
4.4.2.2 In vitro model of capillary tube formation in Matrigel using GMB derived cell lines	106
4.5. Discussions	108
4.6. Conclusions	112
5. General conclusions	113
6. Thesis originality and innovative contributions	115
 BIBLIOGRAPHY	 116

**KEY WORDS:** *in vitro* tests, chemosensitivity, multidrug resistance, chemosensibilizers

## INTRODUCTION

This dissertation thesis approaches laboratory techniques currently available for testing of tumor cell response to chemotherapy. ***Oncobiogram*** was the dream of many oncologists, among which was also Prof.I.Chiricuță, but that proves to be difficult to achieve. Numerous prediction tests have been developed in the last 50 years, but none have yet been implemented in clinical practice, most tests have remained at the stage of clinical research. One reason is the heterogeneity of the samples which do not allow a standardization of methods. Another obstacle is the difference in behavior of cells cultured *in vitro* to those found *in vivo*. *In vitro* tests can not perfectly reproduce the tumor microenvironment and external factors such as immune cells or blood circulation that are influencing the drugs pharmacodistribution. However, those tests can complete a puzzle consisting of all relevant information that can then assist the clinician in deciding the best option of therapy.

Types of chemotherapy-induced cell death (apoptosis, phagocytosis, mitotic catastrophe, necrosis and senescence) and how to repair the damage induced, are informations underlying predictive chemosensitivity tests and can explain the particularly complex inductive mechanisms of resistance to therapy. The classical mechanism of membrane transportor proteins (ATP-binding cassette) is one of the key points of intrinsic or acquired resistance mechanism characteristic of stem cells in general and especially of the tumor cells. But in addition to this kind of resistance mechanism were identified numerous other ways to avoid drug induced cell death such as altering the metabolic pathway of drugs, efficacy in the repair of damage or altered cellular and molecular targets.

Tumor stem cells through their high plasticity and dynamic adaptive capacity to the microenvironmental factors are becoming increasingly incriminated as a reason for relapse of malignant tumors, because those cells have a long lifespan, so they are susceptible to mutations and are protected against cytostatic drugs action especially by the presence ABC efflux pump. Considering these aspects, we approached two of the

most feared locations in oncology, ovarian cancer and glioblastoma multiforme with a main scope to isolate and characterize (phenotypic and functional) cancer stem cells, and to evaluate their response of conventional therapies and as well as methods of conversion the chemoresistance through less conventional methods .

The applicability of predictive tests in clinical practice was also an aim of the thesis, which had materialized into a study that used the CellScan technology in assessing *in vitro* response of tumor cells isolated from ovarian cancer biopsies.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### Objectives of the thesis

- Development of an *in vitro* model of inducing the multiple drug resistance (MDR) in an established cell line derived from ovarian carcinoma and testing the chemosensitivity/chemoresistance of isolated clones
- *In vitro* testing of tumor response to chemotherapy of cells isolated from patients with ovarian cancer using CellScan technology.
- Testing the chemosensitivity to temozolomide (TMZ) and the relationship of neoangiogenesis with cancer stem cells and resistance to therapy in glioblastoma multiforme.
- Methods for the conversion of chemoresistance to temozolomide in glioblastoma multiforme

### **Study 1: *In vitro* model of inducing multiple drug resistance (MDR) of a stabilized line of ovarian cancer**

**Working hypothesis:** Tumor microenvironment, including hypoxia, cytokines, extracellular matrix components and immunosuppression induced by tumor cells, are all important factors that can induce MDR. **Spheroids**, multicellular formations, represent a 3D *in vitro* model that attempts to reproduce the spatiality and local conditions of solid tumors *in vivo*, as one of the best ways to test anti-tumor therapies. The cells in the spheroids structure show changes in the expression of adhesion molecules implicated in tumor progression: CD44, ICAM-1 and LFA3. In ovarian cancer are developing such spherical formations as peritoneal metastases, varying in size from 50-750  $\mu\text{m}$ . One of the reasons why epithelial ovarian cancer is difficult to treat is the mechanism of dissemination by local invasion of pelvic and abdominal organs.

**Methods:** In this study we addressed the method of culturing tumor cells derived from an ovarian carcinoma (MLS stabilized line) under the pressure of microenvironment factors (fetal serum deprivation as protein provider and exposure to growth factors). Combining this protocol with treatment of these cells with maximal doses of cytostatic drugs we followed to obtain tumor spheroids, trying thereby, to develop an *in vitro* model that reproduce some of the conditions of the peritoneal micrometastasis. The induction of this multiple resistance in MLS cells, has been highlighted by evaluating the efflux pump activity of ABC transporters by rhodamine 123 assay and by determining the response of isolated clones to chemotherapy by MTT assay.

---

**Results and discussion:** MLS ovarian tumor cells have had the capacity to maintain their proliferative properties in a serum-free culture system and showed morphological changes suggesting an epithelial-mesenchymal transition. The cells became rounded and gradually lost their adhesion capacity to the plastic surface and the appearance of tumor spheres (spheroids) was observed after 7 days from the initiation of culture in the serum-free medium. Cell floating aggregates were observed in suspension, with a larger size reached by cell proliferation. For selection of resistant clones it was used a combined method of cultivation in serum-free medium and exposure to high doses of drugs (in total of 3 doses): doxorubicin and carboplatin (3 µg/ml respective 5 µg/ml) for 24 hours. Evaluation of efflux pump (as indicator of MDR) with rhodamine 123 (Rh123) showed a significant decrease in Rh123 uptake of MLS cells grown under conditions described above, compared to the results obtained for human fibroblasts (HFL) and untreated MLS cells. The resistance phenotype was confirmed then, with MTT viability test, which showed that the cells selected by means of drug selection had a much higher proliferation rate after 48 hours, up to 3 times higher than untreated MLS cells.

**Conclusions:** This *in vitro* model could be useful as an experimental model to mimic peritoneal metastasis of ovarian cancer and as a model of inducing MDR, a situation encountered especially in the advanced stages of the disease but also in post-chemotherapy stage. The formed tumor spheroids acquired the resistance phenotype by activating the efflux pump, demonstrated by rhodamine efflux assay. This model allows the study of some mechanisms and therapies able to reverse the multiple drug resistance. It can also serve to test new therapeutic alternatives.

## **Study 2: Determination of *in vitro* chemosensitivity of tumor cells isolated from patients with ovarian cancer with Cellscan technology**

**Working hypothesis and methodology:** personalized therapy is one of the most studied topics in recent years, seeking the maximum effect of treatment with minimal toxicity. This study aimed to test the *in vitro* response to drugs of cells isolated from ovarian cancer biopsies, using CellScan technology and the correlation of results with the clinical course of patients. The study was "double blind" and the final correlations were performed after 5 years, considering that it is a period of time giving a real information about the clinical course of patients entered into the study. *In vitro* testing was performed by CellScan technique using a device that investigate certain cellular parameters, such as cell viability and apoptosis, based on cell membrane and cytoplasm changes that occurred by exposure to various antitumor agents. CellScan device is a static cytometer that measures individually fluorescently labeled cells. The practical aspect of this study was the implementation of a laboratory method designed to "predict" tumor response to anticancer drugs most frequently used in ovarian cancer therapy and thus providing to help the clinician oncologist.

The study included 36 patients with ovarian tumors, to which was determined *in vitro* tumor response to chemotherapy. Three patients had benign disease (2 with peritoneal tuberculosis, one benign ovarian tumor), 1 case of ovarian teratoma, 1 case of borderline ovarian tumor. Tumor cells were isolated from tissue fragments collected from the primary tumor or metastases, during surgery. Cells were also isolated from

ascitic fluid in the case of two patients. Isolated cells were cultured in 6-well plates in DMEM 4.5 g of glucose/L, 10% fetal calf serum (FCS), 2mM L-glutamin 1% NEA, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. After 16-24 hours, the cells adhered to the plates and therapy has been applied: carboplatin (CB) to a final concentration of 1µg/ml, topotecan (TOPO) at a concentration of 0.001 µg/ml, taxotere (Tax) 1µg / ml, doxorubicin (doxorubicin)0.5 µg/ml and gemcitabine (Gemz)0.2 µg/ml. After 20-24 hours, cells were harvested and resuspended in DMEM medium without phenol red, and stained with fluorescein diacetate (FDA-as an indicator of cell viability) and with rhodamine 123 (RH123, as an indicator of efflux pump). Cells were then captured on a cell-carrier and scanned with CellScan device which gives information about the fluorescence intensity and the amount of polarization of the fluorescent light.

**Results and Discussion:** The results of samples treated with drugs were compared to the controls in terms of fluorescence intensity (FI) and of the polarization of fluorescent light (FP). Individual data of the treated samples were expressed as the percentage of increase or decrease in intensity and polarization of fluorescent dyes (FDA and RH123) compared with control samples. To see if there is a correlation between the tests results and clinical response to therapy CellScan, patients were divided into 3 groups: *group I* with a complete response, with 2 subgroups: Ia subgroup of patients, in the early stages of the disease (FIGO stage I and II) and Ib subgroup, with advanced disease (FIGO stage III and stage IV); *group II* with evolution from complete response to progressive disease; *group III* with evolution from partial response or stationary disease to progressive disease. Correlation between CellScan tests and clinical response to therapy was 97.2%. The overall response to chemotherapy was: ► for CB test 45.9% and 48.6% FDA P2 P2 RH test, ► for taxotere 56.7% to 48.6% FDA RH P2 and P2, ► for doxorubicin to 72.7% in P2 and FDA RH 60.6% to 48.6% P2 ► topotecan to FDA P2 and P2 RH and 48.6% for gemcitabine ► 52% to 56% FDA P2 and P2 RH. This assessment, however, was different depending on the stage of the disease, such as FIGO stages I and II and the sensitivity for CB was 100% for FDA testing. In contrast, only 50% of rhodamine stained tumor cells showed sensitivity to CB; a Ic stage case developed MDR phenotype, indicating that this resistance could be found even in the early stages. A cyto-reductive therapy and a right conducted chemotherapy, can eradicate the disease at this stage. We found in our experiment, that the sensitivity to CB and other drugs has been present also in advanced stages III and IV, explaining the initial complete response to therapy of the patients enrolled in group II. CellScan tests found multiple resistance to chemotherapy in 17 of the 23 samples taken from patients in these stages (primary tumors and metastases). It was observed the acquisition of resistance phenotype in one case who underwent testing after therapy also, explaining the further unfavorable evolution of the patient. Multiple resistance was identified in 5 cases with FDA tests (FDA MDR) and in 7 cases with RH tests (RH MDR), or both tests (FDA + MDR MDR RH)(5 cases). Comparing the survival curves of patients who showed MDR phenotype, a shortening survival was observed in patients who had multiple resistance for FDA tests. It is known that ovarian tumors are sensitive to platins in a first phase of treatment, but a resistance develops over time leading to relapse of the disease. Molecular factors that are incriminated are the efflux changes of drugs because the overexpression of

---

protein ABC class (highlighted by RH test in our experiment), increased levels of glutathione and efficiently repair of DNA damage induced by therapy.

**Conclusions:** This study revealed how frequently is the phenomenon of multiple resistance to chemotherapy, especially in advanced cases of ovarian cancer. The very good correlation between CellScan tests and clinical response of patients is explained by the fact that we used two different methods of cell analysis, which showed both cell viability and drug efflux pump function.

### **Study 3: Testing the chemosensitivity to temozolomide (TMZ) and the neoangiogenesis relationship with tumor stem cells and resistance to therapy in glioblastoma multiforme. Conversion methods of chemoresistance**

**Working hypothesis and methodology:** Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly studied oncological localization. Despite of a low overall incidence compared to other cancers, GBM is characterized by increased aggressiveness and resistance to therapy. The main mechanisms involved in chemoresistance of GBM are given by extrinsic factors such as tumor microenvironment and intrinsic factors such as protein O6-methylguanine-detox-DNA methyltransferase (MGMT), frequently overexpressed in cancer stem cells (CSC). This study has several purposes: ► *in vitro* evaluation of chemosensitivity to TMZ of tumor cells isolated from patients diagnosed with GBM and the potential relationship between neoangiogenetic potential using a number of tests: MTT test, Annexin V/PI apoptosis assay, autophagy assay and the 3D model of tumor angiogenesis (tumor explants in fibrin gel) ► isolation of cancer stem cells: phenotypic and functional characterization, as well as the relationship of these cells with induction of neoangiogenesis and resistance to therapy (capillary tube test in Matrigel) ► conversion of resistance to therapy by using conjugated gold nanoparticles with TMZ (GNP-TMZ), and also substances with possible action on CSC: metformin (MTF) and 2-methoxyestradiol (2ME) under normoxia and hypoxia conditions.

**Results and Discussion:** From the total of 20 biopsies harvested from surgically treated patients, we established 15 primary cell lines. After seeding, isolated cells adhered rapidly within the first 24 hours and have a high proliferation rate at the first passages. Two biopsies were subject for isolating cancer stem cells by the method of explants culture in fetal serum drop. The main feature of these stem-like cells was a very high rate of proliferation from passage 3 with a cell population doubling time of 4-6 hours. At passage 4 these cells showed a drastic change in morphology, with a smaller size and cuboid shape. These stem cells were characterized by immunocytochemical staining for stem cell markers: Oct 3/4, Nanog, CD 29, CD 105 and for glial progenitor markers CD 133, NF (neurofilament) and GFAP. Gene expression analysis by RT-PCR showed expression of CXCR4, the Oct3 / 4 and GADPH and the simultaneous presence of nestin and GFAP.

Testing the response of tumor cells to temozolomide (TMZ) and MTF : MTT assay was performed using two concentrations of TMZ: 50µM and 100 µM. At the same time we induced differentiation and thereby sensibilisation of glioblastoma cells to TMZ by co-exposure with MTF at a concentration of 5 µM. Response to TMZ was investigated for 9 tumors entered the study from which 4 were resistant to TMZ. Cancer stem cells

exhibit some sensitivity to TMZ, but MTF alone or the combination of TMZ + MTF induced a much stronger response. The MTT assay showed an increased cytotoxicity for MTF alone, which can be interpreted as a decrease in proliferation rate probably due to a process of inducing differentiation of tumor stem cells to a more mature phenotype. Combination with TMZ potentiate MTF action. This observation was confirmed by immunocytochemical analysis for autophagy, where both MTF and TMZ caused phagosome formation, a process that was greatly enhanced by the combination with sorafenib. In this study, 60% of glioblastoma cells were responsive in varying degrees to TMZ, including stem-like cells. In general, tumor stem cells (CSC) are considered as chemoresistant, and represent an important part of the resistance phenomenon to therapy and tumor neoangiogenesis process. An explanation of the fact that stem cells isolated and characterized in this study was partially sensitive to TMZ, is that the usual tests assessing the cell viability (MTT assay) and apoptosis may not detect other specific effects produced by cytotoxic drugs, such as repair mechanisms that can not be observed in a short-term cell culture. MTF acts as an AMP-activated protein kinase (protein kinase, AMP-activated AMPK), which in turn will inhibit the mTOR pathway. MTF can induce cells arrest in specific phases of the cell cycle, inhibits the mitogenic effect of insulin and induce apoptosis and autophagy. MTF determines tumor stem cells to use another way for energy production (oxidative phosphorylation), causing an energy crisis of these cells.

Cells response to 2 ME and TMZ was tested in four cell lines: cancer stem cells, endothelial cell line HUVEC (Human Umbilical Vein cells endothelial) and two cell lines isolated from GBM. The tests were carried out under conditions of normoxia or hypoxia. Cells were divided into two groups: non-irradiated and irradiated with a dose of 2 Gy. Cell viability was determined by MTT assay. There was a differential response to 2ME, depending on the cell type, the dose of 2 ME, and conditions of normoxia or hipoxia. Thus, stem cells and tumor endothelial cells showed increased sensitivity to 2 ME under normoxia. Irradiation of stem cells cultured in normoxia did not alter the sensitivity of cells to the drug. The response of these cells to TMZ was different in hypoxic conditions, where the combination of TMZ with 2 ME (10 $\mu$ M and 25 $\mu$ M) showed resistance, both in irradiated and non-irradiated cells. In normoxia, the cells were sensitive to the drug association, except in the case of irradiated cells. Endothelial cells responded to all doses of 2ME, both in normoxia and in hypoxia, less to the association TMZ with 2 ME in hypoxia. 2ME has been proposed especially as antiangiogenic agent, but it also acts as an anti-microtubule agent that induces mitotic arrest, apoptosis and autophagy in tumor cells. Another proposed mechanism is the increase in the intracellular oxygen free radicals (ROS) and decreased mitochondrial membrane potential.

Effects of gold nanoparticles conjugated with TMZ on tumor stem cells isolated from glioblastoma. Targeted therapy is one of the increasingly addressed alternatives in recent years. Gold nanoparticles (GNP), have chemical and physical properties which allow the binding and transport of therapeutic agents. In this study, TMZ was bound to the surface of gold nanoparticles and we evaluated the response of cancer stem cells compared with TMZ alone. The sensitivity of tumor cells was evaluated by MTT assay and apoptosis assay with annexin V/propidium iodide (PI). The binding of the nanoparticles to drugs, is another method to increase the glioblastoma tumor response

---

to chemotherapy, knowing that the blood-brain barrier prevents the passage of small molecules only up to 10 nm. The disadvantage of systemic administration of cytostatics with small molecules is that they can not be kept more than few minutes at sufficient concentrations and to accumulate in brain tumors. *In vitro* testing of tumor stem cells treated with gold nanoparticles (GNP) functionalized with TMZ showed a significant decrease in cell viability in MTT assay and apoptosis assay with AnnexinV, of GNP-TMZ treated cells compared with those treated only with TMZ. Gold nanoparticles have been captured by tumor cells in the first hours of incubation.

Influence of TMZ on angiogenesis in glioblastoma tumors: A model in fibrin gel was developed for study tumor angiogenesis. The majority of explants harvested from tumor biopsies have developed a network of capillaries. Most tumors developed angiogenesis in the 3D model in control samples. 11 of 19 cases treated with TMZ induced or augmented the angiogenesis process. Some samples showed an increase in density vessels neoformation following administration of TMZ, even at high doses of 30 $\mu$ M. Proangiogenic growth factors, VEGF and PDGF, in some cases, triggered a strong response. As can be seen, there is a great diversity in the manner that occurred in developing the angiogenic process of tumor explants in response to the various therapies. Trying to explain this unexpected behavior, too little reported in the literature, another model of angiogenesis was used, in Matrigel substrate, for capillary tube formation monitored in proangiogenic conditions, trying in some extent to mimic the vascular niche. All glioblastoma cell lines tested, formed capillary tubes in different degrees of intensity, and treatment with TMZ resulted in augmentation of this phenomenon. One explanation could be a strong angiogenic response to TMZ of glioblastomas or to other therapeutic agents, by selection in a first stage of cancer stem cells (which are resistant to therapy), and in a second step by stimulating them to differentiate into endothelial cells by the action of specific proangiogenic growth factors such as VEGF or PDGF.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

Experiments described in this thesis revealed the heterogeneity of response to therapy with cytostatic agents, of the cells isolated from the two localizations studied, ovarian cancer and glioblastoma multiforme, and the existence of resistance to therapy in a large percentage, about 50% of cases. In order to investigate how this resistance to chemotherapy have installed, an *in vitro* model for induction of resistance have developed, in a stabilized ovarian carcinoma line, which reproduces in part the peritoneal metastases. It was induced an epithelial-mesenchymal transition under pressure of microenvironmental factors and by darwinian selection of resistant clones by exposure to repeated doses of chemotherapeutic agents. It is a cheap method of obtaining these cells, that can then be used in developing strategies to reverse multiple resistance to chemotherapy.

In the same idea, tumor-derived stem cells from glioblastoma multiforme were isolated in a simple way, in order to study their behavior, both in relation to anti-neoplastic therapy and with the tumor neovascularization.

CellScan technology used for testing chemosensitivity of cells isolated from ovarian cancer tumors, showed that the tests results correlated in a proportion of

97.2% with the clinical response of patients. Reporting of therapy resistant cases is important for clinicians, to avoid unnecessary and toxic therapies. These functional tests may be useful only in an integrated interpretation of all the information existing about the patient and his disease.

Resistance to temozolomide in glioblastoma multiforme-derived cells was reversed by chemosensibilizers drugs, such as metformin and 2-methoxy estradiol. It was found that there exist also a differential tumor response to this type of drugs, arguing the need for testing and personalization of therapies.

Another way to improve the cellular uptake of of temozolomide has proved by binding TMZ to gold nanoparticles, that significantly increased tumor stem cell response to therapy.

A final conclusion is that the *in vitro* predicting tests for tumor response may find an important place both in clinical oncology and in development of new therapeutic strategies.