

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL ACȚIUNII UNOR COMPUȘI CITOTOXICI PE CELULE
TUMORALE PRIN UTILIZAREA DE MODELE MATEMATICE**

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. univ. dr. DRICU Anica

STUDENT-DOCTORAND:

BRÎNDUȘA Corina

CRAIOVA

2016

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

1. ABORDĂRI ACTUALE PRIVIND ACȚIUNEA UNOR MEDICAMENTE ÎN GLIOBLASTOM

- 1.1. Gliomul malign: generalități
- 1.2. Raporturile dintre medicamentul oncologic și celulele tumorale
- 1.3. Liniile directoare în asocierea agenților citostatici
- 1.4. Principalii compuși preconizați a se utiliza în cercetare

2. MODELAREA MATEMATICĂ ȘI ANALIZA ACȚIUNII UNOR SUBSTANȚE CITOTOXICE ASUPRA CELULELOR TUMORALE *IN VITRO*

- 2.1. Considerații generale. Utilitarul **MATLAB** cu extensia **Simulink** pentru construcția de modele de simulare numerică
- 2.2. Poziționarea unor modele analitice ce descriu evoluția ratei de proliferare respectiv a timpului de dublare în procesul de proliferare celulară tumorală
- 2.3. Poziționarea unui model analitic în cuantificarea acțiunii de tip doză – răspuns a unei substanțe citotoxice pe celule tumorale
- 2.4. Poziționarea unui model analitic în cuantificarea acțiunii sinergice a două sau mai multe substanțe citotoxice pe celule tumorale

CONTRIBUȚII PERSONALE (STUDIUL EXPERIMENTAL)

3. OBIECTIVELE STUDIULUI

4. MATERIALE ȘI METODE

- 4.1. Materiale
- 4.2. Celule și culturile celulare. Tratarea celulelor
- 4.3. Determinarea viabilității celulare
 - 4.3.1. Hemocitometrie
 - 4.3.2. Testul MTT
 - 4.3.3. Numărare de celule în arii delimitate
- 4.4. Determinarea IC_{50}

- 4.5. Construcția de modele matematice ce descriu evoluția ratei de proliferare respectiv a timpului de dublare în procesul de proliferare celulară tumorală
- 4.6. Construcția modelului matematic pe baza funcției de transfer specific acțiunii de tip doză – răspuns a unui medicament pe celule tumorale *in vitro*
- 4.7. Construcția modelului matematic pe baza funcției de transfer de ordinul I specific acțiunii sinergice a două medicamente pe celule tumorale
- 4.8. Studiul de metaanaliză a câștigului de supraviețuire la pacienții cu gliom malign recurent supuși unui tratament cu agenți citotoxici față de un tratament imunoterapeutic

5. REZULTATE

- 5.1. Evoluția ratei de proliferare și a timpului de dublare a celulelor de glioblastom pe baza modelului de simulare **MS: DT / PR**
- 5.2. Investigarea acțiunii individuale de tip doză – răspuns *in vitro* a unui agent citotoxic asupra celulelor de glioblastom pe baza modelului de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$**
- 5.2.1. Investigarea acțiunii de tip doză – răspuns a inhibitorilor SU 1498 și AG 1433 pe linia de celule **GB10B** prin modelul de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$**
- 5.2.2. Investigarea acțiunii de tip doză – răspuns a inhibitorului imatinib pe linia de celule **GB10B** prin modelul de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$**
- 5.2.3. Investigarea acțiunii de tip doză – răspuns a agentului alchilant temozolomida pe linia de celule **GB10B** prin modelul de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$**
- 5.3. Investigarea acțiunii sinergice de tip doză - răspuns *in vitro* a temozolomidei în asociere cu imatinibil asupra celulelor de glioblastom pe baza modelului de simulare numerică **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** cu stabilirea unui optim calculat de dozare al medicamentelor
- 5.4. Analiza câștigului de supraviețuire a pacienților cu gliom malign recurent în urma tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice comparativ cu tratamentul combinat cu bevacizumab și irinotecan. Studiu de metaanaliză.

6. DISCUȚII

7. CONCLUZII

8. BIBLIOGRAFIE

Cuvinte cheie: model matematic, MATLAB Simulink, acțiune sinergică; compuși citotoxici, glioblastom;

STADIUL CUNOASTERII

Pentru creșterea eficacității tratamentului chimioterapeutic, pe baza asocierii de compuși citostatici, un rol important îl are experimentul medicament / celule tumorale, în condiții stricte de laborator. Estimarea unor rapoarte de tip doză – efect la acțiunea unui medicament oncologic pe celulele tumorale conduce la concluzii pertinente în stabilirea unei medicații optime specifice actului chimioterapeutic. Este importantă identificarea unei asocieri optime de agenți citotoxici, pe baza unor experimente pe linii de celule tumorale prin aplicarea principiilor cineticii celulare.

În studiul actual, modelarea matematică și analiza acțiunii unor compuși citotoxici asupra celulelor tumorale cerebrale *in vitro* pune accentul pe:

- poziționarea unor modele analitice ce descriu evoluția ratei de proliferare (PR) respectiv a timpului de dublare (DT) în procesul de proliferare celulară tumorală; Studiile de specialitate subliniază că expunerea celulelor tumorale la un medicament citostatic ar trebui să fie efectuată în faza de creștere exponențială, (cererea nu este îndeplinită în totalitate în practica medicală);

- poziționarea unui model analitic în cuantificarea acțiunii sinergice a două sau mai multe substanțe citotoxice pe celule tumorale. Este importantă stabilirea de modele matematice ce descriu acțiunea de tip doză - răspuns a unei asocieri de două sau mai multe substanțe citotoxice pe celule tumorale, *in vitro*. În analiza teoretică a acțiunii sinergice este importantă identificarea și utilizarea indicatorului de combinație (CI).

- rolul utilitarului **MATLAB** cu extensia **Simulink** în construcția de modele de simulare numerică.

CONTRIBUȚII PERSONALE (STUDIUL EXPERIMENTAL)

Studiul a atins următoarele obiective:

- **Obiectivul nr. 1** - Studiul PR respectiv a DT pe liniile celulare de GB și simularea numerică pe modele matematice ce descriu evoluția acestor parametrii în procesul de proliferare celulară.

Simularea numerică pe modele matematice ce descriu evoluția PR respectiv a DT în procesul de proliferare celulară, pe liniile celulare GB3B, GB4B, GB5B, GB9B și GB10B constituie un avantaj important în stabilirea unei scheme de tratament pe baza unui medicament citostatic. Modelul de simulare numerică generează grafice specifice și oferă acces la seturi de date cu semnificație statistică.

- **Obiectivul nr. 2** - Investigarea acțiunii individuale a inhibitorilor tirozinkinazici (**SU 1498**, **AG 1433**, **Imatinib (IMT)**) și a agentului alchilant Temozolomida (**TMZ**) asupra celulelor de GB *in vitro* printr-un model de simulare numerică. Linia celulară pe care s-a studiat acțiunea individuală a inhibitorilor tirozinkinazici și a TMZ este GB10B.

Experimentul biomedical ce reflectă evoluția dinamică a fracției celulare tumorale în funcție de raportul D/IC_{50} (doza unui compus citotoxic / doza care produce efectul median pe celule de GB), poate conduce la elaborarea unui model matematic, pe baza funcției de transfer.

- **Obiectivul nr. 3** – Evaluarea acțiunii sinergice *in vitro* a combinației dintre TMZ și IMT cu stabilirea unui optim de dozare (OP) al medicamentelor pe baza unui model de simulare numerică.

Combinația celor doi agenți terapeutici (TMZ + IMT) poate permite utilizarea de doze mai mici din substanțele respective, care să inducă un efect citotoxic cumulat asupra celulelor tumorale.

Construcția unui model de simulare numerică permite evaluarea acțiunii sinergice a acestor compuși pe baza raportului D/IC_{50} cu determinarea unui OP al medicamentelor.

Obiectivele menționate anterior au fost atinse pe baza modelelor de simulare numerică construite cu utilitarul specializat **MATLAB** cu extensia **Simulink**.

- **Obiectivul nr. 4** – Studiu de metaanaliză privind câștigul de supraviețuire al pacienților cu gliom malign recurent în urma tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice, comparativ cu tratamentul combinat cu bevacizumab și irinotecan.

S-a efectuat o analiză a datelor publicate pe PubMed, Cochrane Library, Web of Science, ScienceDirect și EMBASE în scopul de a identifica studii cu pacienți care au primit bevacizumab plus irinotecan sau terapie cu celule dendritice pentru gliome maligne recurente.

MATERIALE ȘI METODE prezintă materialele utilizate în cercetare și proveniențele lor pentru implementarea *Obiectivelor 1, 2, 3, 4*. Astfel, se face referire la mediul de cultură celulară, la kitul de determinare a creșterii celulare MTT, la serul fetal bovin (FBS), la antibiotice, tripsina, tamponul fosfat salin (PBS) utilizate. De asemenea, s-au utilizat inhibitorii SU 1498, AG 1433, IMT și agentul alchilant TMZ.

Pentru implementarea *Obiectivului nr. 1* au fost utilizate liniile celulare derivate din GB: GB3B, GB4B, GB5B, GB9B și GB10B. Linia celulară GB10B a fost utilizată pentru implementarea *Obiectivului nr. 2* și *Obiectivului nr. 3*.

În acest capitol se prezintă:

- Construcția de modele matematice ce descriu evoluția PR și DT în procesul de proliferare celulară tumorală;
- Construcția modelului matematic pe baza funcției de transfer specific acțiunii de tip doză – răspuns a unui compus citotoxic pe celule tumorale *in vitro*;
- Construcția modelului matematic pe baza funcției de transfer specific acțiunii de tip doză – răspuns a două substanțe citotoxice pe celule tumorale *in vitro*;

- *Metodele de cercetare, Criteriile de eligibilitate, Prelucrarea statistică* aplicate în studiul de metaanaliză ce evaluează pacienții cu gliom malign recurent supuși unui tratament cu agenți citotoxici comparativ cu pacienții supuși tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

- *Evoluția PR și a DT pe liniile GB pe baza modelului de simulare MS: DT / PR*

Modelul matematic ce descrie DT pe baza a n perechi de date, $(t_1, N_1); (t_2, N_2), \dots, (t_n, N_n)$ este dat de relația: $DT = \sum_{i=1}^{n-1} DT_i(N_{i+1} - N_i) / \sum_{i=1}^{n-1} (N_{i+1} - N_i)$. Modelul matematic ce descrie PR pe baza a n

perechi de date, $(t_1, N_1); (t_2, N_2), \dots, (t_n, N_n)$ este: $PR = \ln 2 \cdot \left[\sum_{i=1}^{n-1} (N_{i+1} - N_i) \right] / \left[\sum_{i=1}^{n-1} DT_i(N_{i+1} - N_i) \right]$

Modelul de simulare numerică **MS: DT/PR** are la bază modelul matematic ce descrie DT și modelul matematic ce descrie PR. **MS: DT/PR** conține: blocuri Math Function; blocuri de operații aritmetice; blocul **Scope DT(N/N₁)**; blocul **Scope PR(N/N₁)**, etc.. Simulările numerice s-au efectuat pe un PC tip ACER Aspire S3 dotat cu un processor Intel Core i3, 1,8 GHz.

Pentru liniile celulare GB3B, GB4B, GB5B, GB9B și GB10B au fost calculate valorile medii pentru DT și PR determinate pe baza modelului de simulare **MS: DT / PR** respectiv pe baza algoritmului online: <http://www.doubling-time.com>.

Determinarea valorilor DT mediu respectiv PR medie este importantă pentru implementarea unei scheme de tratament care are la bază acțiunea unui medicament citostatic: $\underline{DT}_{GB9B} = 2.281 < \underline{DT}_{GB3B} = 2.3953 < \underline{DT}_{GB4B} = 2.4820 < \underline{DT}_{GB5B} = 2.6993 < \underline{DT}_{GB10B} = 3.573$. Celulele aparținând liniei GB9B proliferază cu un DT de 2.281 zile; celulele GB10B proliferază cu un DT de 3.573 zile; celulele GB3B proliferază cu un DT de 2.3953 zile; celulele GB4B proliferază cu un DT de 2.482 zile; celulele aparținând liniei GB5B proliferază cu un DT de 2.6993 zile. DT determinat pentru celulele GB10B este cu 21 ore mai mare decât DT determinat pentru celulele GB5B, cu 26.1 ore mai mare decât DT determinat pentru celulele GB4B, cu 28.3 ore mai mare decât DT determinat pentru celulele GB3B și cu 31 ore mai mare decât DT determinat pentru celulele GB9B.

Studiul evidențiază valorile medii a PR pentru liniile celulare GB3B, GB4B, GB5B, GB9B și GB10B.

Valori mici pentru DT respectiv valori mari pentru PR indică o activitate proliferativă celulară intensă. Valorii medii pentru DT respectiv pentru PR indică o activitate proliferativă celulară moderată. Valori mari pentru DT respectiv valori mici pentru PR indică o activitate proliferativă celulară redusă.

Metoda de determinare a DT respectiv a PR pe baza modelului de simulare **MS: DT / PR** este rapidă și nu necesită o tehnică de laborator complexă. Această metodă implică o tehnică de calcul pe **PC** ce dispune de resurse hard medii și soft specializat în simulări numerice pe bază de modele matematice. Metoda se adresează investigațiilor biomedicale ce monitorizează cinetica celulară.

- *Investigarea acțiunii individuale de tip doză – răspuns in vitro a unor compuși citotoxici asupra GB10B pe baza modelului de simulare MS: $f_n(D/IC_{50})$*

Acțiunea de tip doză – răspuns, $f_n(D/IC_{50})$, a unor substanțe citotoxice pe o linie celulară tumorală poate fi descrisă pe baza modelului matematic reformulat în câmp real:

$$f_n = L^{-1} \left[(K_1 - K_2) \cdot \frac{W}{W \cdot s + 1} \right] + L^{-1} \left[K_2 \cdot \frac{1}{s} \right] \text{ cu argumentul } (D/IC_{50} - D_0/IC_{50}), (D \geq D_0).$$

Pe baza **MATLAB Simulink** a fost construit modelul de simulare numerică **MS: $f_n(D/IC_{50})$** . Acțiunea de tip doză – răspuns a SU 1498, AG 1433, IMT și a agentului alchilant TMZ pe GB10B poate fi simulată numeric cu **MS: $f_n(D/IC_{50})$** , cu implementarea *Obiectivului nr. 2*. Simulările numerice s-au efectuat pe un PC tip ACER Aspire S3.

Un exemplu semnificativ de aplicare a modelului de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$** este acțiunea de tip doză – răspuns a IMT pe linia celulară GB10B. Valorile principale rezultate în urma simulării pe **MS: $f_n(D/IC_{50})$** sunt prezentate în **Tabelele** de mai jos.

Tabel. Valorile de tip D- f_n rezultate prin simulare numerică pe MS; $D/IC_{50} \in [0.7, 1.5]$

MS: $f_n(D/IC_{50})$	Valorile tip D – f_n									
(D/IC_{50})	0.7	0.8	0.826	0.9	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
$(D)_{IMT} (\mu M)^*$	8.48	9.69	10	10.9	12.11	13.32	14.53	15.74	16.96	18.16
$(f_n)_{IMT}$	66.88	60.58	59.06	54.98	50	45.56	41.63	38.12	35.01	32.24

* valorile comune procesului de simulare / experiment sunt subliniate

Tabel. Valorile de tip D- f_n rezultate prin simulare numerică pe MS; $D/IC_{50} \in [1.6, 2.4]$

MS: $f_n(D/IC_{50})$	Valorile tip D – f_n									
(D/IC_{50})	1.6	1.652	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.2	2.3	2.4
$(D)_{IMT} (\mu M)^*$	19.38	20	20.59	21.8	23.01	24.22	25.43	26.64	27.85	29.06
$(f_n)_{IMT}$	29.78	28.61	27.59	25.64	23.91	22.37	21	19.78	18.7	17.73

* valorile comune procesului de simulare / experiment sunt subliniate

Seria de valori ale f_n generată de simularea numerică pe modelul **MS: $f_n(D/IC_{50})$** este relativ diferită față de seria de valori ale f_n rezultată pe baza experimentului de tip doză – răspuns, *in vitro*, a substanței citotoxice asupra celulelor GB10B. Această observație impune necesitatea validării modelului de simulare numerică **MS: $f_n(D/IC_{50})$** pe baza distribuției reziduurilor, (erorilor) și pe baza corelației între seriile de date.

- *Investigarea acțiunii sinergice de tip doză - răspuns in vitro a TMZ în asociere cu IMT pe GB10B pe baza modelului de simulare numerică MSS: $f_n(D/IC_{50})$* .

Investigarea acțiunii de tip doză – răspuns a asocierii TMZ și IMT pe GB10B cu implementarea *Obiectivului nr. 3*, se poate realiza pe modelul de simulare numerică **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** construit cu softul specializat **MATLAB Simulink**.

Modelul de simulare **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** furnizează datele semnificative pentru procesul de simulare numerică specific acțiunii sinergice a TMZ + IMT pe celulele tumorale derivate din linia GB10B. Valorile rezultate sunt prezentate în **Tabelul** de mai jos.

Tabel. Valorile de tip D- f_n rezultate prin simulare numerică pe MSS; D/ IC₅₀ € [1; 1.9]

MSS: $f_n(D/IC_{50})$	Valorile tip Df_n										
(D/ IC ₅₀)	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.608	1.7	1.8	1.9
(D) _{IMT} (μM)	12.11	13.32	14.53	15.74	16.95	18.16	19.38	19.48	20.59	21.8	23.01
(D) _{TMZ} (μM)	141.58	155.7	169.9	184.1	198.2	212.4	226.5	227.7	240.7	254.8	269
(f_n) _{IMT}	0.5	0.456	0.416	0.381	0.35	0.322	0.298	0.296	0.276	0.256	0.239
(f_n) _{TMZ}	0.5	0.445	0.398	0.358	0.322	0.292	0.266	0.264	0.243	0.223	0.207
(f_n) _c	0.5	0.384	0.295	0.226	0.174	0.133	0.102	0.1	0.078	0.06	0.046

Studiul confirmă, pe baza modelului **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** , prin valorile **CI**, tipul de acțiune *sinergică*. În cazul efectului sinergic **CI** are valorile **CI** = 0.94; 0.83; 0.64, (**CI** < 1) pentru valori ale **f_n** = 0.12; 0.11; 0.1. Se consideră că (**f_n** = 0.1, **CI**=0.64) indică un puternic sinergism pentru TMZ + IMT pe linia **GB10B**.

Utilizarea **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** permite reducerea dozei de medicament *prin acțiunea sinergică* a două medicamente pe o linie de celule tumorale. Se cunoaște că o substanță devine toxică pentru organism dacă se depășește doza critică specifică acesteia. Pentru că (D*)_{IMT} << (D)_{IMT} respectiv (D*)_{TMZ} << (D)_{TMZ} există o probabilitate relativ mare de inducere a unor efecte toxice mult diminuate în organism și deci reacții adverse cu o incidență redusă la acțiunea sinergică a TMZ în asociere cu inhibitorul IMT.

Se cunoaște că tratamentul standard în cancerul avansat este dat de terapia asociată a mai multor medicamente citotoxice din clase diferite. Importantă este determinarea optimului de dozare al medicamentelor, optim ce are la bază fie practica medicală fie algoritmi de calcul furnizați de clinici medicale de specialitate.

Concluziile reflectă importanța ce trebuie acordată pe de o parte determinării valorilor de dozare ale medicamentelor ce induc efectul median (IC₅₀) iar pe de altă parte reflectă necesitatea construcției de modele de simulare numerică de tip MSS: $f_n(D/IC_{50})$, care permit stabilirea unei scheme de tratament cu identificarea unui optim calculat de dozare.

- *Analiza câștigului de supraviețuire a pacienților cu gliom malign recurent în urma tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice comparativ cu tratamentul combinat cu bevacizumab și irinotecan. Studiu de metaanaliză.*

Referitor la pacienții cu GBM supuși tratamentului cu bevacizumab plus irinotecan s-au identificat șapte studii clinice. Numărul de pacienți total a fost 302 cu vârste cuprinse între 18 și 79 ani. În urma tratamentului valorile mOS s-au încadrat între 7 și 16.25 luni. Valorile mOS prezisă s-au încadrat între 4.44 și 13.74 luni.

În cazul pacienților cu GBM supuși imunoterapiei cu celule dendritice s-au identificat șapte studii clinice. Numărul de pacienți total a fost 80 cu vârste cuprinse între 24 și 74 ani. În urma tratamentului valorile mOS s-au încadrat între 7.5 și 34 luni. Valorile mOS prezisă s-au încadrat între 11.39 și 35.12 luni.

CONCLUZII.

Studiul 1. Construcția modelului de simulare numerică **MS: DT / PR** pe baza softului specializat **MATLAB** cu extensia **Simulink** permite simularea evoluției a PR și a DT pe liniile de celule tumorale GB3B, GB4B, GB5B, GB9B, GB10B derivate din GB.

Stabilirea seturilor de valori specifice DT și a PR care să aparțină fazei de creștere exponențială celulară este importantă în stabilirea unei scheme de tratament ce permite testarea sensibilității tumorilor *in vitro* la diferiți compuși citostatici.

Studiul 2; 3; 4. Acțiunea de tip doză – răspuns *in vitro* a unui compus citotoxic asupra celulelor de GB se poate studia pe un model de simulare numerică construit cu softul specializat **MATLAB Simulink**.

Modelul de simulare **MS: $f_n(D/IC_{50})$** permite simularea numerică a evoluției f_n la acțiunea de tip doză – răspuns la mai multe concentrații de SU 1498, AG 1433, IMT și TMZ asupra liniei celulare GB10B.

Modelul **MS: $f_n(D/IC_{50})$** permite generarea de grafice $f_n(D/IC_{50})$ și afișarea de date numerice în funcție de raportul D/IC_{50} în cazul inhibitorilor SU 1498, AG 1433, IMT sau în cazul agentului alchilant TMZ prin intermediul blocurilor specializate **Scope $f_n(D/IC_{50})$, Dy: f_n , Dy: D/IC_{50}** .

Studiul 5. Acțiunea sinergică de tip doză – răspuns *in vitro* a combinației a două medicamente TMZ + IMT se poate studia pe baza modelului de simulare numerică **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** construit cu utilitarul **MATLAB Simulink**.

Modelul **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** devine un instrument de lucru în laborator ce permite generarea de grafice specifice f_n în funcție de raportul D/IC_{50} specific agentului alchilant TMZ, inhibitorului IMT, respectiv asocierii TMZ + IMT. **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** permite determinarea indicatorului **CI**.

Formula analitică a **CI** conduce la observația că există o acțiune sinergică pentru un agent **i** dacă doza (**D_i**)*, care în combinație induce în sistem valoarea **f_n**, este cel mult jumătate din doza (**D_i**) care individual induce în sistem aceeași valoare a **f_n**.

În cazul modelului matematic utilizat, trebuie acordată importanță pe de o parte determinării valorilor de doze de compuși citotoxici ce induc efectul median de tipul (IC_{50}) și pe de altă parte necesității construcției de modele de simulare numerică de tip **MSS: $f_n(D/IC_{50})$** , modele ce permit stabilirea unei scheme de tratament de tip doză – răspuns pe baza identificării prin simulare a unui optim calculat de dozare **OP[D/IC₅₀; (f_n)_m]**.

Studiul 6. Studiul de metaanaliză a permis formularea concluziei: la pacienții cu gliome maligne recurente, tratamentul imunoterapeutic cu celule dendritice nu are un efect semnificativ diferit în comparație cu tratamentul combinat dintre bevacizumab și irinotecan, demonstrând încă o dată că tratamentul combinat este eficient pentru pacienții cu boli maligne.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Aghi M, Kramm MC, Chou CT, et al. Synergistic Anticancer Effects of Ganciclovir / Thymidine Kinase and 5-Fluorocytosine/Cytosine Deaminase Gene Therapies. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 370-380.

Artene ȘA, Turcu-Știolică A, Hartley R, Ciurea ME, Daianu O, Brîndușa C, Alexandru O, Tătăranu LG, Purcaru ȘO, Dricu A. Dendritic cell immunotherapy vs bevacizumab plus irinotecan in recurrent malignant glioma patients: a survival gain analysis. *OncoTargets and Therapy* 2016; 9: 6669–6677.

Bokstein F, Shpigel S, Blumenthal DT. Treatment with bevacizumab and irinotecan for recurrent high-grade glial tumors. *Cancer*, 2008; 112(10): 2267-2273.

Brîndușa C, Șerban F, Alexandru O, Georgescu MA, Ene L, Tătăranu GL, Purcaru ȘO. Angiogenic receptor tyrosine kinase inactivation induced apoptosis in glioblastoma cells in vitro. *The Revue of Aeronautical Medicine and Psychology* 2015; 19: 25-32.

Carapancea M, Alexandru O, Fetea AS, Dragutescu L, Castro J, Georgescu A, Popa-Wagner A, Bäcklund ML, Lewensohn R, Dricu A. Growth factor receptors signaling in glioblastoma cells: therapeutic implications. *J Neurooncol.* 2009; 92(2): 137-147.

Chou JH. Quantitation of synergism and antagonism of two or more drugs by computerized analysis, in *Synergism and Antagonism in Chemotherapy* (Chou TC and Rideout DC), Academic Press New York 1991; 223-244.

Chou TC. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res* 2010; 70: 440-446.

Chou TC, Tan HQ, Sirotnak MF. Quantitation of the synergistic interaction of edatrexate and cisplatin in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1993; 31: 259-264.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22: 27-55.

Desjardins A, Reardon DA, Herndon JE, 2nd, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent WHO grade 3 malignant gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008; 14(21): 7068-7073.

Friedman H, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2585-2597.

Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009; 27(28): 4733-4740.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation* 2004; 11: 448-457.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD and Cavenee WK. The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97-109.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 2007; 170: 1445-1453.

Pinto AC, Moreira J, Simões S. Combination Chemotherapy in Cancer: Principles, Evaluation and Drug Delivery Strategies. *Current Cancer Treatment* 2011; 29: 693-714.

Popescu MA, Alexandru O, Brîndușa C, Purcaru ȘO, Tache ED, Tătăranu GL, Taisescu C, Dricu A. Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015; 8: 7825-7837.

Reile H, Birnbock H, Bernhardt G, et al. Computerized Determination of Growth Kinetic Curves and Doubling Times from Cells in Microculture. *Analytical Biochemistry* 1990; 187: 262-267.

Sakai K, Shimodaira S, Maejima S, et al. Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of neurosurgery* 2015; 123(4): 989-997.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289: 1938-1942.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007; 25(30): 4722-4729.

Zinner RG, Barrett BL, Popova E, Damien P, et al. Algorithmic guided screening of drug combinations of arbitrary size for activity against cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 521-532.