

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**ROLUL FACTORULUI DE CREȘTERE AL ENDOTELIULUI
VASCULAR ȘI AL SPECIILOR REACTIVE DE OXIGEN ÎN
CANCERUL OVARIAN ȘI IMPLICAȚII TERAPEUTICE LA
PACIENȚI CU FACTORI DE PROGNOSTIC NEGATIV**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

PROF. UNIV. DR. ANGHEL RODICA MARICELA

Student Doctorand:

TRIFĂNESCU OANA GABRIELA

2019

Cuprins

Introducere.....	1
I. PARTEA GENERALĂ.....	1
CAP. 1. DATE EPIDEMIOLOGICE, PATOGENEZĂ ȘI IMPLICAȚII TERAPEUTICE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI OVARIAN.....	2
CAP. 2. FACTORUL DE CREȘTERE AL ENDOTELIULUI VASCULAR ȘI IMPLICAȚII ÎN ANGIOGENEZA.....	2
CAP. 3. ROLUL SPECIILOR REACTIVE DE OXIGEN ȘI STRESULUI OXIDATIV ÎN CANCERUL OVARIAN.....	3
CAP. 4. IMPLICAȚII TERAPEUTICE PRACTICE ALE CĂILOR DE SEMNALIZARE ÎN CANCERUL OVARIAN.....	3
II. PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE.....	3
Ipoteza de lucru și obiective principale.....	3
Metode de cercetare.....	4
CAP.5. EVALUAREA FACTORILOR DE PROGNOSTIC LA PACIENTELE CU NEOPLASM OVARIAN.....	6
5.1 Introducere	6
5.2.Pacienți și metode.....	6
5.3.Rezultate.....	6
5.3.1 Caracteristicile lotului de pacienți.....	6
5.3.2. Timpul până la progresia bolii și supraviețuirea generală în lotul de paciente cu neoplasm ovarian.....	7
5.3.3 Identificarea factorilor de prognostic negativ la pacientele cu neoplasm ovarian.....	9
5.3.4 Elaborarea unui scor prognostic.....	15

5.4. Discuții.....	16
CAP. 6. DETERMINAREA VEGF ȘI A STRESULUI OXIDATIV LA LOTUL DE PACIENȚII CU NEOPLASM OVARIAN	17
6.1. Pacienți și metode.....	17
6.2. Rezultate	18
6.2.1. Caracteristicile lotului.....	18
6.2.2 Determinarea VEGF.....	18
6.2.2.1 Determinarea VEGF în dinamică.....	18
6.2.2.2 Valorile VEGF în funcție de prezența a tumorii macroscopice.....	19
6.2.2.3. Studierea interrelației între ROS și VEGF.....	20
6.2.2.4. Studierea rolului prognostic al VEGF.....	20
6.2.2.5. Estimarea răspunsului la săruri de platină prin măsurarea VEGF...22	
6.2.3.Determinarea parametrilor de stres oxidativ la pacientele cu neoplasm ovarian	
6.2.3.1.Evoluția parametrilor de stres oxidativ în dinamică.....	23
6.2.3.2. Relația dintre diferiți parametri ai stresului oxidativ.....	23
6.2.3.4.Studierea relației dintre markerii stresului oxidativ și boala reziduală macroscopică.....	24
6.2.3.5. Rolul speciilor reactive de oxigen în estimarea prognosticului pacientului.....	25
6.2.3.6.Interrelația dintre valorile malondialdehidei și sensibilitatea la chimioterapie cu platină.....	26
6.3. Discuții.....	27
CAP. 7. STUDIUL PROCESELOR DE SEMNALIZARE A ANGIOGENEZEI ȘI AL ROS PE MODELE EXPERIMENTALE IN VIVO ȘI IN VITRO ȘI IMPLICAȚIILE LOR TERAPEUTICE.....	28

7.1.Obținerea modelului experimental.....	29
7.1.1.Alegerea modelului experimental în oncologie util în cercetarea stresului oxidativ și angiogenezei.....	29
7.1.2. Evoluția tumorilor după transplantare.....	29
7.2. Determinarea biochimică a parametrilor de stres oxidativ în modele experimentale și interrelația cu angiogeneza.....	29
7.2.1. Motivația studiului.....	29
7.2.2. Materiale și metode.....	29
7.2.3 Rezultate.....	30
7.2.3.1 Urmărirea creșterii tumorale.....	30
7.2.3.2 Măsurarea parametrilor de stres oxidativ în ser și țesut tumoral.....	30
7.2.3.3 Studiul interrelației dintre parametrii serici ai stresului oxidativ și răspunsul la tratamentul anti-angiogenic cu anticorpi monoclonali anti VEGF, folosind modelul experimental murin.....	31
7.2.3.4 Studiul interrelației dintre parametrii stresului oxidativ din țesutul tumoral și răspunsul la tratamentul anti-angiogenic cu anticorpi monoclonali anti VEGF, folosind modelul experimental murin.....	32
7.3 Studiul parametrilor de stres oxidativ pe culturi celulare și noi implicații terapeutice	
7.3.1. Studiul efectelor agenților chimioterapici asupra parametrilor stresului oxidativ pe culturi celulare.....	33
7.3.2. Studiul parametrilor de stres oxidativ în dinamica administrării quercetinei	
7.4.Studiul complexelor imune circulante.....	34
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	35
Bibliografie selectivă.....	39

INTRODUCERE

Cancerul ovarian este, la nivel global, o problemă majoră de sănătate, fiind a treia cauză de neoplazie ca incidență și a doua cauză de mortalitate prin tumori ale sferei genitale conform ultimelor estimări GLOBOCAN 2018 [1]. În țările cu un nivel de trai ridicat în care datorită modalităților de screening, cancerul de col uterin este rar întâlnit, (Europa și America de Nord) cancerul ovarian este principala cauză de deces prin tumori ginecologice [2,3].

Din cauza faptului că până în momentul de față nu există modalități eficiente de screening și detecție în stadii incipiente, majoritatea pacientelor sunt diagnosticate în stadii avansate de boală. În ciuda progreselor însemnate realizate în ultimii ani în oncologie, prognosticul pacienților cu adenocarcinom ovarian s-a ameliorat puțin în ultimii ani, supraviețuirea la 5 ani pentru toate stadiile de boală fiind de 36% în 1977, 39% în 1986, și 45% în 2002 [4]. Aceste mici creșteri ale supraviețuirii se datorează progreselor realizate în domeniul chimioterapiei (introducerii de citostatice noi cum ar fi taxanii, administrării diferite a unor regimuri de chimioterapie clasică cum ar fi administrarea intra-peritoneală sau administrarea dose-dense), înțelegerii mai extinse a mecanismelor implicate în apariția și progresia neoplaziei și utilizarea moleculelor țintite care vizează endoteliul vascular (agenții anti-angiogenici), celula tumorală (inhibitorii PARP) sau micromediul tumoral (imunoterapia) precum și progreselor realizate în domeniul chirurgical [5].

Motivația realizării acestei lucrări care să caracterizeze prospectiv carcinoamele ovariene din punct de vedere al evoluției clinice, factorilor prognostici și al mecanismelor de semnalizare provine din faptul că datele concrete privind caracteristicile și supraviețuirea pacienților cu neoplasm ovarian în România lipsesc, informațiile fiind extrapolate din raportările GLOBOCAN și studiile efectuate în alte țări.

I. PARTEA GENERALĂ

Prima parte a tezei de doctorat, alcătuită din patru capitole, reprezintă o trecere în revistă a literaturii de specialitate referitor la subiectele controversate legate de patogenia și tratamentul cancerului ovarian și implicarea angiogenezei și speciilor reactive de oxigen în apariția și progresia acestei neoplazii.

1. DATE EPIDEMIOLOGICE, PATOGENEZĂ ȘI IMPLICAȚII TERAPEUTICE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI OVARIAN

În primul capitol sunt prezentate ultimele date epidemiologice, mecanismele moleculare implicate în apariția cancerului ovarian și principii de tratament. Cancerul ovarian reprezintă a opta cauză de neoplazie (3,4%) și a opta cauză de mortalitate prin cancer în rândul femeilor (4,4%) [1], ultimele estimări din 2018 arătând că anual sunt diagnosticate peste 295.414 cazuri noi și se înregistrează peste 184.799 decese. Aceasta prevalență crescută evidențiază importanța subiectului abordat în teză nu numai pentru oncologi, radioterapeuți, ginecologi și chirurghi ci și pentru sănătatea publică.

Adenocarcinoamele ovariene sunt un grup heterogen de subtipuri histopatologice (carcinom seros de grad înalt, carcinom seros de grad scăzut, carcinom endometrioid, carcinom cu celule clare, carcinom mucinos), distincte în ceea ce privește evoluția, pattern-ul de metastazare și răspunsul la chimioterapie. Identificarea căilor moleculare distincte care duc la apariția și propagarea fiecărui subtip histopatologic reprezintă un progres remarcabil în înțelegerea patogenezei cancerului ovarian și a deschis calea dezvoltărilor terapiilor țintite în această localizare [6]. În continuare sunt prezentate principiile de tratament, indicațiile terapeutice, obiectivele și controversalele care planează asupra tratamentului cancerului ovarian.

2. FACTORUL DE CREȘTERE AL ENDOTELIULUI VASCULAR ȘI IMPLICAȚII ÎN ANGIOGENEZA

Al doilea capitol tratează pe larg angiogeneza care este un proces esențial pentru supraviețuirea celulelor canceroase și reprezintă procesul de formare de vase noi din vase preexistente. Formarea vaselor de neo-formație este crucială pentru a asigura aportul nutrițional și de oxigen al unui țesut care crește rapid [7].

Cel mai important mediator al angiogenezei este factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF). Celule tumorale produc VEGF, iar celule endoteliale implicate în angieneză supra-exprimă numeroși receptori VEGFR, acțiunea VEGF fiind reglată așadar printr-un mecanism paracrin [8]. Principala cale de semnalizare implicată în angieneză este reprezentată de legarea ligandului VEGF-A de receptorii VEGFR-2 (în principal) și VEGFR-1 și activarea acestora. Principale efecte ale VEGF sunt inducerea angiogenezei, stimularea creșterii și proliferării celulelor endoteliale și inhibarea apoptozei acestora, activarea enzimelor implicate în degradarea matricei extracelulare, mobilizarea celulelor precursorare endoteliale de la nivelul măduvei osoase, precum și reglarea permeabilității

vasculare [9]. Reglarea transcripției VEGF-A este indusă în principal de hipoxie și este mediată de factorul inductibil al hipoxiei HIF-1 [10]. Rolul VEGF și al tratamentului cu inhibitori ai VEGFR în cancerul renal a fost studiat și de noi și publicat [11].

În cancerul ovarian, angiogeneza contribuie la evoluția locală a cancerului și diseminarea la nivelul peritoneului precum și la formarea lichidului de ascită ceea ce conduce la calitatea scăzută a vieții pacienților. Principalele căi de semnalizare implicate în angieneză în cancerul ovarian sunt reprezentate de calea VEGF, calea PDGF, calea FGF, calea angiopoietinei și receptorului Tie2. Expresia VEGF pare a fi reglată în cancerul ovarian de factori ca IGF-1 și IL-6 precum și de mutații ale genelor p53, ras, src și VHL [12].

3. ROLUL SPECIILOR REACTIVE DE OXIGEN ȘI STRESULUI OXIDATIV ÎN CANCERUL OVARIAN

Capitolul al treilea face o incursiune în ceea ce privește mecanismele de producere, principalele tipuri de specii reactive de oxigen și mecanismele de semnalizare în celula neoplazică. ROS au efecte oncogenice, activând cascada de semnalizare pro-tumorigenică prin creșterea capacității tumorii de proliferare și supraviețuire, prin inducerea de mutații care conduc la leziuni celulare și instabilitate genică, prin activarea unor factori de transcripție și translație iar în final prin lezarea ADN-ului, lipidelor și proteinelor.

Rolul ROS în patogenia, propagarea, metastazarea și dobândirea rezistenței la chimioterapice în cancerul ovarian nu este pe deplin elucidat. S-au trecut în revistă datele actuale privind asocierea dintre speciile reactive de oxigen și VEGF, punându-se accent pe reglarea ROS și HIF în condiții de normoxie și hipoxie în celulele neoplazice.

4. IMPLICAȚII TERAPEUTICE PRACTICE ALE CĂILOR DE SEMNALIZARE ÎN CANCERUL OVARIAN

Capitolul 4 se axează pe prezentarea datelor din literatură privind implicațiile practice ale terapiei anti-angiogenice și ale imunoterapiei în cancerul ovarian.

II. PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVE PRINCIPALE

Premize: Înțelegerea heterogeneității și a factorilor prognostici implicați în patogenia cancerului ovarian este importantă pentru a îmbunătăți modalitățile de prevenție, detecția precoce, și pentru a particulariza tratamentul pacientelor care suferă de această neoplazie.

Obiectivele principale ale studiului au fost identificarea unor factori noi de prognostic clinico-patologici și serologici de avangardă (VEGF și parametrii stresului

oxidativ) care să estimeze evoluția bolii, cuantificată prin intervalul până la progresia bolii și supraviețuirea generală, la pacientele cu adenocarcinom ovarian tratate în cadrul Institutului Oncologic București, precum și stabilirea unui scor prognostic care să ghideze clinicienii în estimarea riscului pacientelor și alegerea unei terapii oncologice personalizate în practica medicală curentă.

De asemenea, ca și obiectiv experimental, ne-am propus realizarea unui model murin de cancer la care să evaluăm parametrii stresului oxidativ și implicațiile acestuia asupra răspunsului la terapii complexe (chimioterapia, terapia anti-angiogenică și imunoterapia).

Obiectivele secundare au fost reprezentate de evaluarea rezultatelor tratamentului multimodal (intervenție chirurgicală, chimioterapie și radioterapie) la paciente cu neoplasm ovarian, de a determina dacă prezența tumorii crește producția de specii reactive de oxigen și cum poate fi integrată măsurarea stresului oxidativ în strategia de tratament. S-au stabilit corelații între valoarea VEGF și diferiții parametri de stres oxidativ.

Ipoteza de lucru de la care s-a pornit a fost că celula neoplazică este supusă unui stres oxidativ crescut, la care contribuie hipoxia, iar una din principalele căi de a contracara acest dezechilibru este să utilizăm agenți citotoxici și anti-angiogenici. Determinarea parametrilor de stres oxidativ (malondialdehida, ceruloplasmina, tiolii albuminici și antioxidanții totali) precum și dozarea VEGF a avut ca scop validarea acestora ca markeri prognostici precum și predictivi pentru instalarea rezistenței la diferiți agenți chimioterapici (cum ar fi sărurile de platină sau agenții anti-angiogenici).

Motivația principală a studiului pe modele experimentale a fost reprezentată de aprofundarea mecanismelor de semnalizare legate de stresul oxidativ și de angieneză, de găsirea unei interrelații între acestea și de identificarea unor posibile ținte noi terapeutice care să conducă la personalizarea tratamentului pacientelor cu neoplasm ovarian.

METODE DE CERCETARE

Pacienți: Am realizat un studiu ambispectiv care a inclus 160 paciente consecutive cu adenocarcinom ovarian tratate în Institutul Oncologic București “Alexandru Trestioreanu” în intervalul 2004-2017 (2004-2010 – date retrospective și 2011-2017 date prospective). Caracteristicile demografice, datele clinice despre pacient și tumoră, răspunsul la tratament și datele de supraviețuire au fost introduse într-o bază de date.

Metode: am determinat în lotul de pacienți valorile serice ale factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGF) și parametrii de stres oxidativ (malondialdehida, ceruloplasmina, tiolii albuminici și antioxidanții totali).

Au fost analizate următoarele obiective ale cercetării: timpul până la progresia bolii (PFS) care a fost definit ca intervalul de timp de la diagnostic până la progresia bolii sau decesul survenit din orice cauză și supraviețuirea generală (OS) definită ca intervalul de la diagnostic până la decesul survenit din orice cauză, pentru a studia relația dintre VEGF și parametrii stresului oxidativ și răspunsul la terapie și respectiv prognosticul pacientelor.

Prelucrare statistică: Baza de date și analiza statistică a datelor a fost efectuată utilizând programul SPSS versiunea 23 pentru Windows și Excel. S-a realizat o analiză descriptivă a datelor care a inclus medii, mediane, deviația standard, eroarea standard a mediei pentru variabilele continue.

Pentru a compara și a stabili dacă există diferențe semnificative statistic între diferitele variabile categoriale a fost utilizat testul Fisher exact, testul χ^2 aplicat variabilelor dihotomice, testul Student t pentru variabile continue cu distribuție normală și testele Mann Whitney U și Kruskal-Wallis pentru variabile continue cu distribuție alta decât cea normală. Pentru stabilirea corelațiilor între două variabile continue s-au utilizat testele Pearson și Spearman. Curbele de supraviețuire au fost generate folosind metoda Kaplan-Meier. Diferenți parametri au fost comparați în ceea ce privește influența lor asupra supraviețuirii și intervalului până la progresia bolii folosind analiza univariată prin testul log-rank. Modelul de regresie logistică multivariată COX de estimare a riscului (Cox proportional hazards model) a fost utilizat pentru a evalua asocierea dintre factorii de risc clinici și patologici și intervalul până la progresia bolii și supraviețuirea generală. Analiza multivariată a fost condusă pentru a identifica factori de prognostic independenți și de a estima efectul acestora asupra timpului până la progresia bolii și supraviețuirii ajustat la covariabile (ECOG, tipul histopatologic, prezența bolii reziduale după intervenția chirurgicală, trombocitoza). Intervalul de încredere CI-confidence interval considerat pentru variabilele cantitative calculate a fost de 95%, valoarea p considerată semnificativă statistic a fost mai mică de 0,05.

Pentru a măsura eficiența unui model și a estima sensibilitatea și specificitatea metodei am utilizat curbele ROC (Receiver Operating Characteristics). Cu cât aria de sub curbă (AUC) este mai apropiată de valoarea 1, cu atât modelul este mai bun. Valorile AUC peste 0,6 validează modelul din punct de vedere al corectitudinii.

5. EVALUAREA FACTORILOR DE PROGNOSTIC LA PACIENTELE CU NEOPLASM OVARIAN

5.1. Introducere

Scopul studiului a fost să se evalueze rezultatele tratamentului multimodal (intervenție chirurgicală, chimioterapie și radioterapie) la paciente cu neoplasm ovarian și de a evalua impactul factorilor de prognostic clinico-patologici asupra ratei de răspuns, intervalului până la progresia bolii și supraviețuirii generale la pacienți cu neoplasm ovarian, precum și de a stabili un scor prognostic care să ghideze clinicienii în estimarea riscului pacienților în practica medicală curentă.

5.2. Pacienți și metode

Criteriile de includere în studiu au fost:

- femei cu vârsta peste 18 ani
- diagnostic de carcinom ovarian stadiul II-IV la care s-a practicat intervenție chirurgicală cu intenție radicală (histerectomie totală și anexectomie bilaterală și excizia tuturor formațiunilor tumorale macroscopice din abdomen) sau biopsie
- Status de performanță ECOG 0,1 sau 2
- Valori adecvate ale hemogramei Valori adecvate ale parametrilor biochimici (Cl al creatininei ≥ 50 , Bilirubina totală ≤ 3 mg/ml, TGO; TGP, în limite normale)
- dispuși să urmeze chimioterapiei cel puțin 4 serii pe bază de săruri de platină și care au semnat consimțământul informat.

Criterii de excludere:

- Status de performanță ECOG > 3 , lipsa urmăririi pe termen lung

Aplicând criteriile de includere și excludere, am selectat 160 paciente consecutive cu adenocarcinom ovarian tratate în Institutul Oncologic București “Alexandru Trestioreanu” în intervalul 2004-2017, care au fost urmărite ambispectiv.

5.3. Rezultate

5.3.1 Caracteristicile lotului de pacienți

Datele demografice ale lotului inclus în studiu sunt prezentate în tabelul 1.

Strategia terapeutică a constat în intervenție chirurgicală ca prim gest terapeutic urmată de chimioterapie adjuvantă la 127 pacienți (79,4%), chimioterapie neo-adjuvantă urmată de intervenție chirurgicală la 27 (16,9%) și doar chimioterapie la 3,7% dintre pacienți din cauza stării generale mediocre sau a comorbidităților pacienților- **Figura 1.**

Recidiva bolii a fost diagnosticată la 96 dintre paciente. În momentul recidivei la 67 dintre paciente (13 în lotul neoadjuvant, 51 în lotul adjuvant și 3 dintre cele care au primit

doar chimioterapie în prima linie s-a administrat chimioterapie paliativă și 28 au beneficiat de tratament complex constând în chimioterapie și intervenție chirurgicală, iar un pacient nu a mai primit nici un tratament).

Tabelul 1. Caracteristicile pacienților cu neoplasm ovarian din lotul de studiu

Caracteristicile pacienților	n=160
Vârsta (medie ± deviație standard)	53,05 ± 10,4 ani
Distribuția bolii pe stadii	
IC	19 (11,9%)
IIA	21 (13,1%)
IIC	19 (11,9%)
IIIA	4 (2,5%)
IIIB	3 (1,9%)
IIIC	69 (43,1%)
IV	25 (15,6%)
ECOG	
0	100 (62,5)%
1	58 (36,2%)
2	1 (0,7%)
Subtipul histopatologic	
Seros	70,1%
Endometrioid	14,3%
Mucinous	14,9%
Celule clare	0,6%
G	
G1	11,9%
G2	43,7%
G3	44,4%
CA125 (U/ml) mediana	205
Dimensiunea tumorii (medie ± deviație standard), (mm)	90,3 ± 49,7
Prezența ascitei	35,8%

Regimul de chimioterapie în prima linie de tratament a constat din administrarea de paclitaxel 175 mg/m² și carboplatin AUC 5-6 i.v. administrat la 3 săptămâni.

5.3.2 Timpul până la progresia bolii și supraviețuirea generală în lotul de pacienți cu neoplasm ovarian

După o urmărire mediană de 78 de luni (intervalul 7-216), timpul median estimat până la progresia bolii (PFS) pentru toate stadiile a fost de 36 de luni (**Figura 2A**), iar supraviețuirea globală mediană a fost de 96 de luni (**Figura 2B**). La 12 luni de la diagnostic 77% dintre pacienți nu au prezentat progresia bolii, la 24 luni de diagnostic 63% dintre pacienți nu prezentau progresia bolii și la 36 luni procentul de pacienți care nu progresaseră era de 52% (**Figura 2A**).

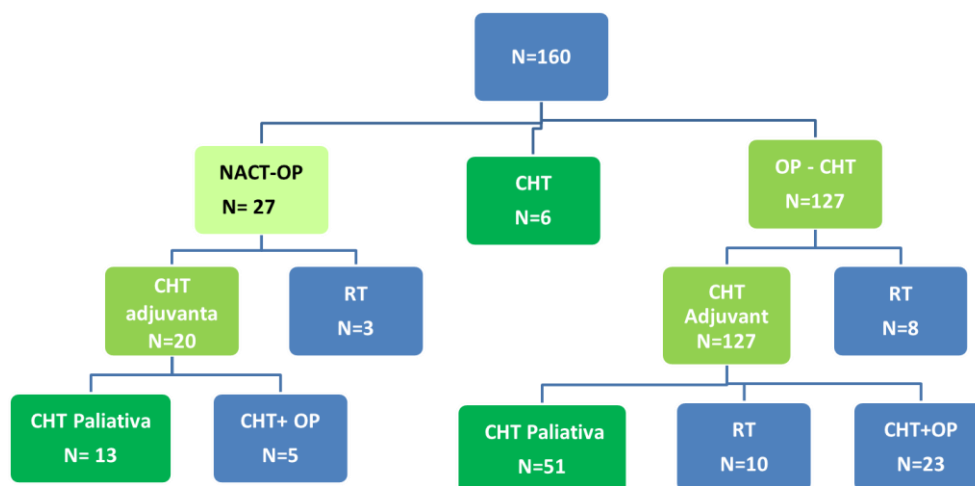


Figura 1. Strategia terapeutică în lotul de pacienți în prima linie de tratament și în momentul primei recidive (NACT – Chimioterapie neoadjuvantă, OP – operație, CHT – chimioterapie, RT – radioterapie)

În ceea ce privește supraviețuirea (OS) la un an, aceasta a fost de 97%, supraviețuirea la 2 ani a fost de 85%, supraviețuirea la 3 ani a fost de 73%, iar supraviețuirea la 5 ani a fost de 59% (Figura 2B).

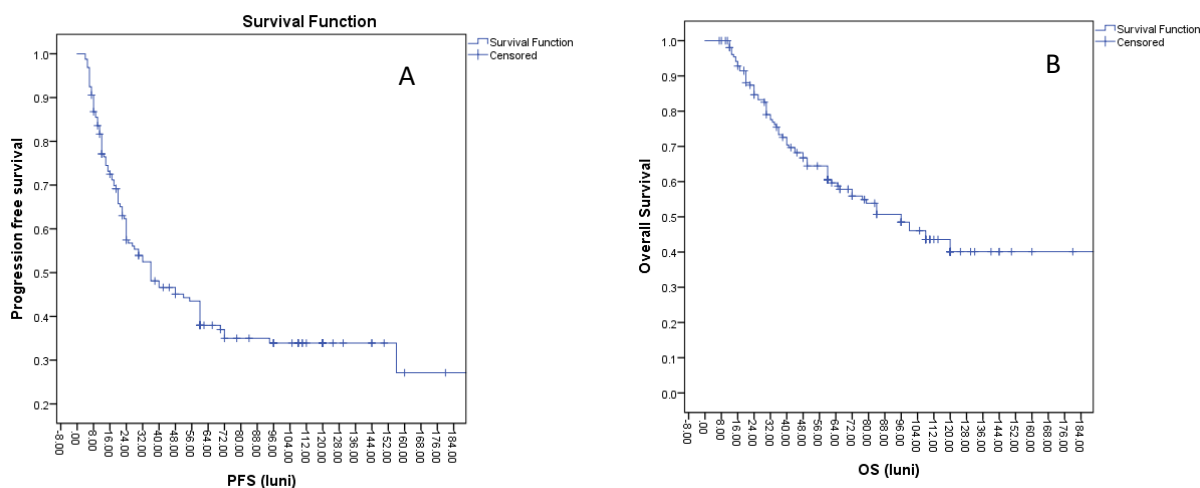


Figura 2. Reprezentarea curbelor Kaplan Meier privind intervalul până la progresia bolii (PFS exprimat în luni – 2A) și supraviețuirea generală (OS exprimată în luni – 2B) a întregului lot de pacienți

PFS și OS pentru pacienții care au suferit o intervenție chirurgicală urmată de chimioterapie adjuvantă în comparație cu cei care au primit tratament neo-adjuvant urmat de intervenția chirurgicală nu a diferit semnificativ statistic (40 vs. 36 de luni, $p = 0,39$, ns), dar existat un trend spre o supraviețuire generală mai bună la primul grup la care s-a practicat intervenția chirurgicală ca prim gest terapeutic (100 vs. 60 luni, $p = 0,154$).

Radioterapia a fost administrată la un număr mic de pacienți cu factori de prognostic negativ, dar rezultatele sunt promițătoare atunci când se utilizează tehnici moderne de iradiere (OS generală 86 luni) [13].

5.3.3. Identificarea factorilor de prognostic negativ la pacientele cu neoplasm ovarian

Având în vedere prognosticul infaust al bolii la pacientele cu cancer ovarian am încercat să identificăm anumiți factori de prognostic. Factorii prognostici clinici analizați au fost statutul de performanță (Figura 3), prezența ascitei (Figura 4), prezența trombocitozei (Figura 5), subtipurile histologice (Figura 6), stadiul bolii, tipul de tratament, boala reziduală după intervenția chirurgicală (Figura 7), statusul menopauzal (Figura 8).

a) În întreg lotul a existat un avantaj semnificativ în ceea ce privește timpul până la progresia bolii (PFS) pentru pacienții cu **ECOG** 0 față de 1 și 2 (70 vs. 24 vs. 20 luni, $p = 0,0001$ pentru ambele) - **Figura 3A**. În ceea ce privește supraviețuirea pacienților cu status de performanță 1 aceasta a fost de 40 luni, semnificativ statistic ($p=0,0002$) mai scăzută decât în cazul pacientelor cu status de performanță 0 la care mediana de supraviețuire nu a fost atinsă- **Figura 3B**.

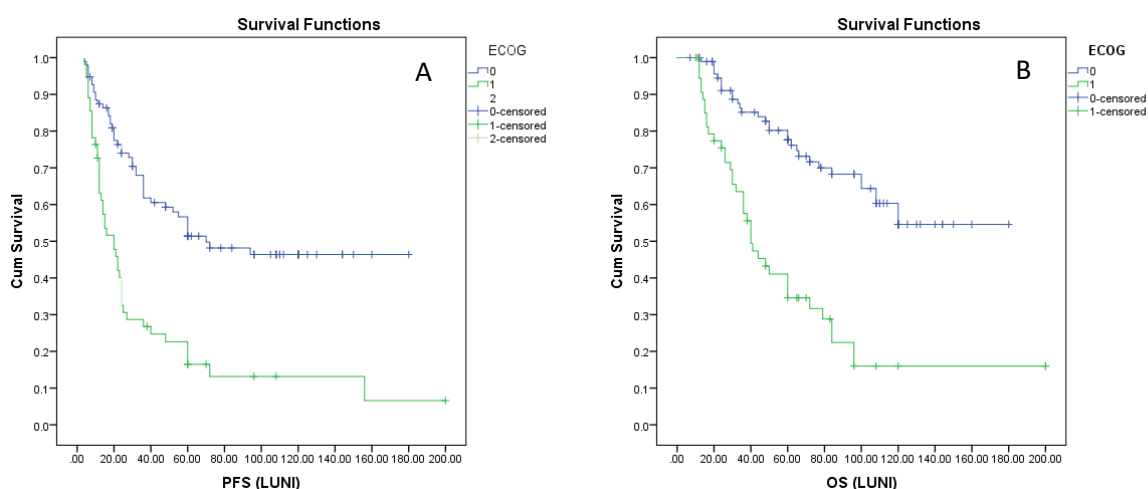


Figura 3. Timpul până la progresia bolii (3A) și supraviețuirea generală (3B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de statusul de performanță al pacientului.

b) Prezența **ascitei** a fost un factor de prognostic rezervat, timpul până la progresia bolii pentru pacienții cu ascită a fost de 23 vs. 36 luni ($p = 0,027$) – **Figura 4A** și supraviețuirea a fost de 60 vs. 108 luni în favoarea pacienților fără ascită la diagnostic ($p = 0,005$) – **Figura 4B**.

c) S-a constatat de asemenea o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește timpul până la progresia bolii și supraviețuirea între pacientele care au prezentat

trombocitoză în momentul diagnosticului și cele la care valoarea trombocitelor era în limite normale.

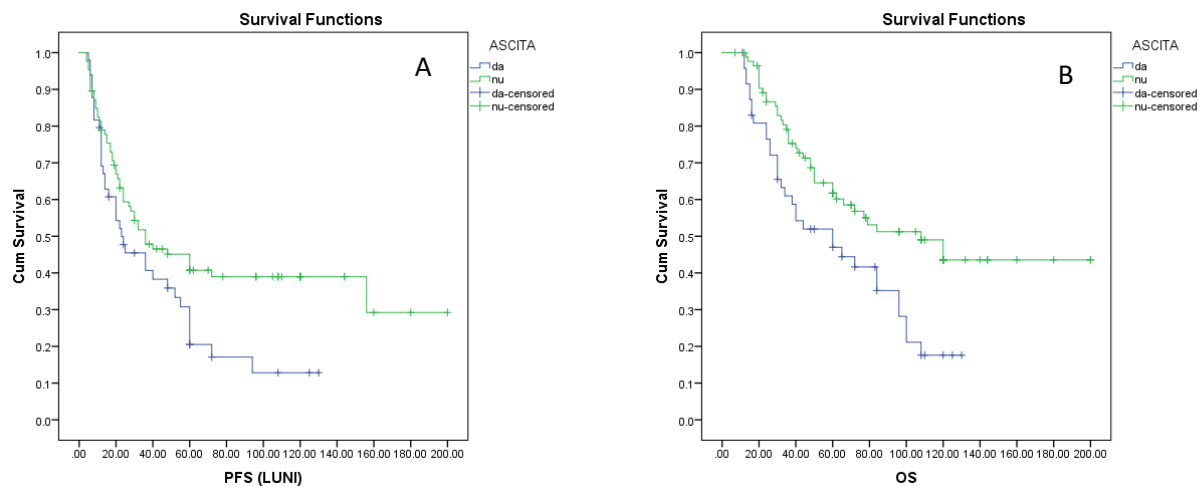


Figura 4. Timpul până la progresia bolii (4A) și supraviețuirea generală (4B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de prezența ascitei.

Astfel mediana estimată până la progresia bolii la pacientele cu valori normale ale trombocitelor a fost de 60 luni iar în lotul pacientelor cu trombocitoză a fost de doar 20 luni ($p=0,0001$) - **Figura 5A**. Supraviețuirea mediană estimată pentru pacientele cu trombocitoză fiind de 36 luni și nu a fost atinsă pentru cu valori normale ale trombocitelor ($p=0,0001$) - **Figura 5B**.

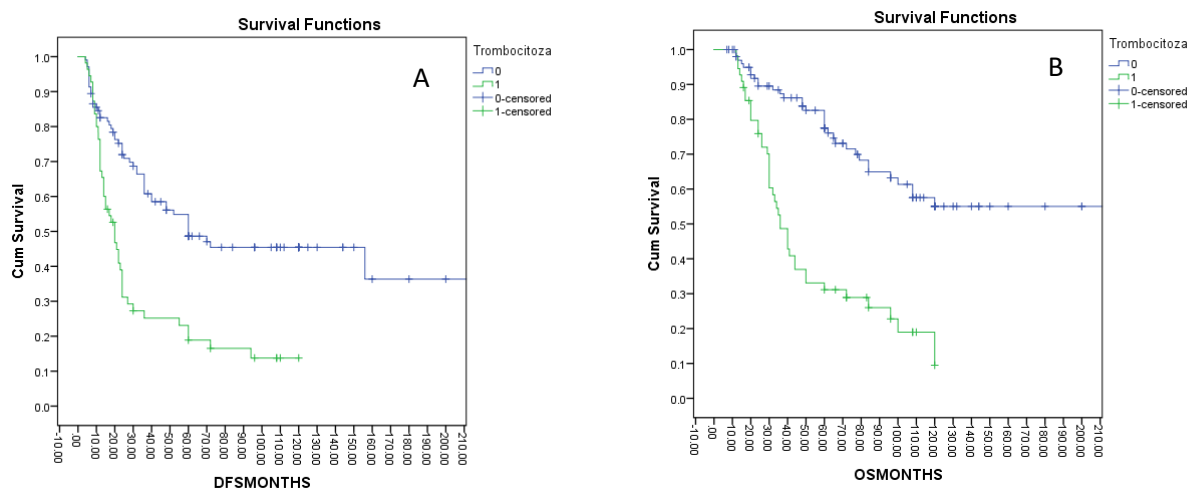


Figura 5. Timpul până la progresia bolii (5A) și supraviețuirea globală (5B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție prezența sau nu a trombocitozei.

d) Tipul histologic: În lotul nostru de studiu, a existat un avantaj clar în ceea ce privește intervalul până la progresia bolii pentru **carcinomul ovarian endometrioid** comparativ cu carcinomul mucinos și carcinomul seros (mediana PFS nu a fost atinsă pentru

subtipul endometrioid și a fost de 27 luni pentru carcinomul seros $p = 0,008$). Mediana supraviețuirii la pacienți cu adenocarcinom endometrioid nu a fost atinsă comparativ cu pacienții cu adenocarcinom papilar seros (84 luni) și cei cu adenocarcinom mucinos (62 luni) fără a se atinge însă pragul semnificației statistice.

e) Gradul de diferențiere al tumorii. Aproape jumătate dintre pacienți prezintă tumori slab diferențiate și acest lucru pare să fie asociat cu un prognostic rezervat. Supraviețuirea fără semne de boală în cazul tumorii G3 comparativ cu G2 a fost de 20 vs. 70 luni ($p = 0,0001$) – **Figura 6A** iar supraviețuirea globală a fost de 44 de luni comparativ cu 120 de luni ($p = 0,0001$)- **Figura 6B**.

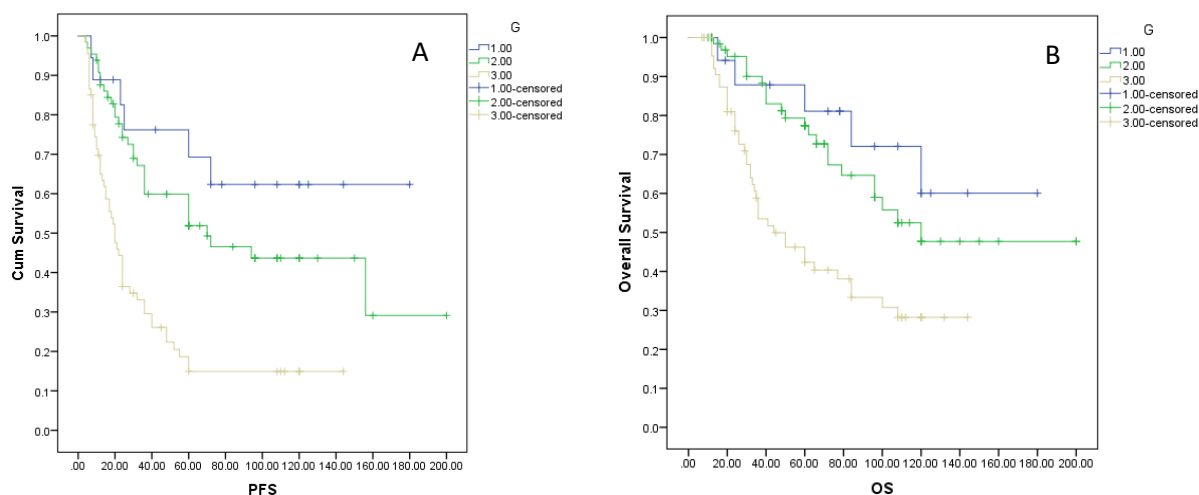


Figura 6. Timpul până la progresia bolii (6A) și supraviețuirea generală (6B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție gradul de diferențiere al tumorii.

f) Cel mai important factor de prognostic a fost **prezența bolii reziduale** după intervenția chirurgicală, obiectivată prin descrierea medicului chirurg sau prin evaluare imagistică (CT, RMN post-operator). Prezența bolii reziduale după intervenția chirurgicală a fost asociată cu un timp până la progresia bolii semnificativ mai scurt (15 luni vs. 156 luni $p = 0,0001$) și o mediană a supraviețuirii generale semnificativ statistic mai redusă (38 luni vs. mediana nu a fost atinsă $p = 0,0003$) - **Figura 7**. Mai mult decât atât, **boală reziduală estimată cantitativ** este un factor de prognostic. În lotul nostru de pacienți s-a constatat o diferență semnificativă în ceea ce privește PFS și OS la pacienții fără boală reziduală, la pacienții cu boală reziduală mai mică de 1 cm și la pacienții cu boală reziduală mai mare de 1 cm. Pentru pacienții fără boală reziduală, PFS estimată a fost de 156 luni, la pacienții cu boală reziduală mai mică de 1 cm, PFS a fost de 20 luni, iar la pacienții cu boală reziduală

mai mare de 1 cm, PFS estimată a fost de numai 13 luni. ($p < 0.0001$) Supraviețuirea globală mediană la pacienții fără boală reziduală nu a fost atinsă; la pacienții cu boală reziduală mai mică de 1 cm, supraviețuirea globală estimată a fost de 65 luni, iar la pacienții cu boală reziduală mai mare de 1 cm, supraviețuirea globală a fost de numai 32 de luni ($p = 0.0002$)

g) Din punct de vedere al **statusului menopauzal** în momentul diagnosticului, se constată că 63 paciente (39,4%) erau în premenopauză în momentul diagnosticului și 97 (56,6%) erau postmenopauzale. Timpul până la progresia bolii a fost semnificativ statistic mai mare la femeile aflate în premenopauza (72 vs. 24 luni, $p = 0,001$), și supraviețuirea mediană nu a fost atinsă, iar pentru femeile aflate în postmenopauza aceasta a fost de 60 luni, ($p = 0.005$). Analiza multivariată a confirmat faptul că statusul postmenopausal este un factor de prognostic rezervat, HR = 2.3, 95% CI (1.4-3.6).

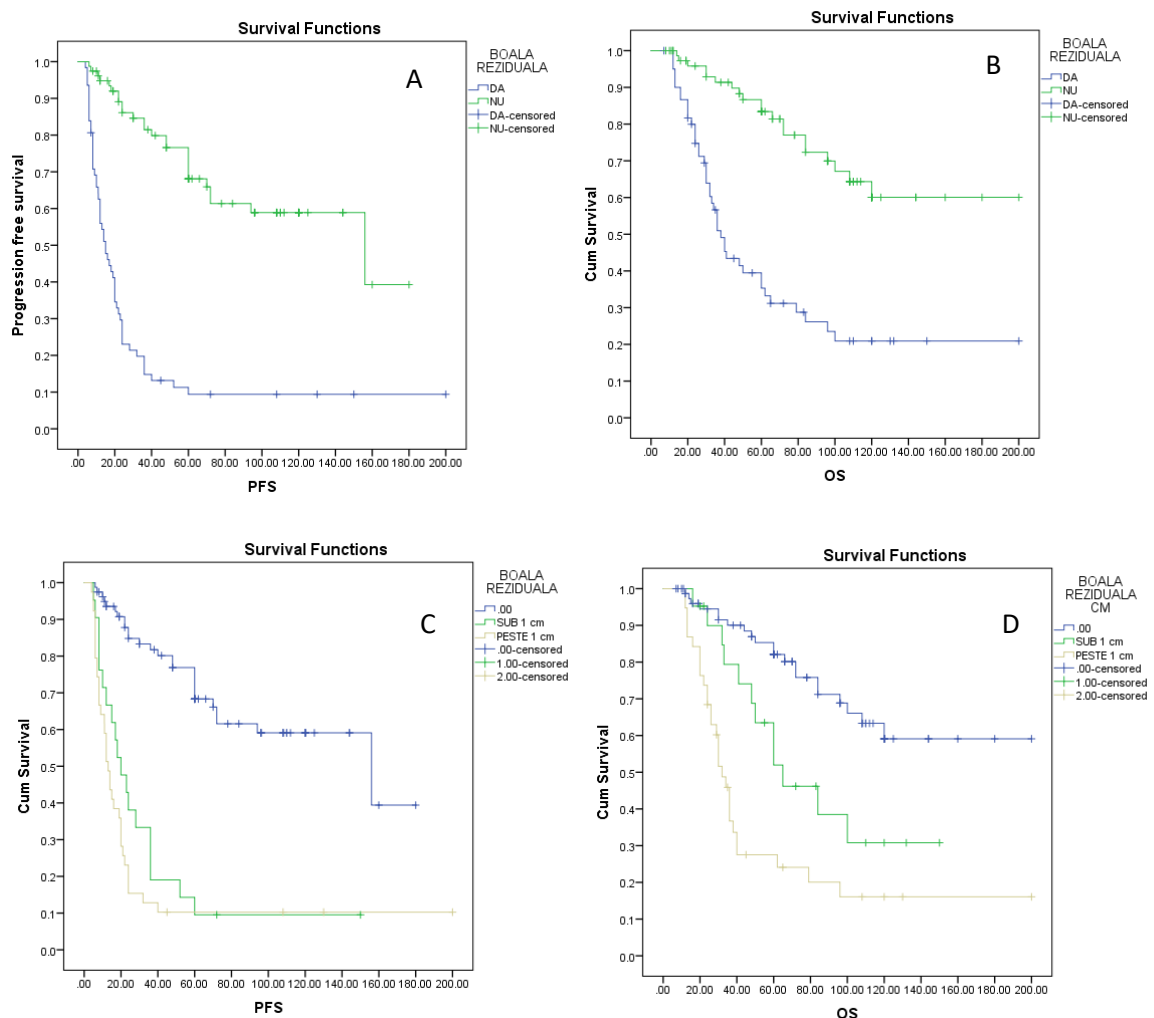


Figura 7. Timpul până la progresia bolii (7A) și supraviețuirea globală (7B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de prezența bolii reziduale și de dimensiunile acesteia (7C și 7D) (fără boală reziduală, între 0 și 1 cm, peste 1 cm).

Datele prezentate mai sus au fost publicate in extenso[14].

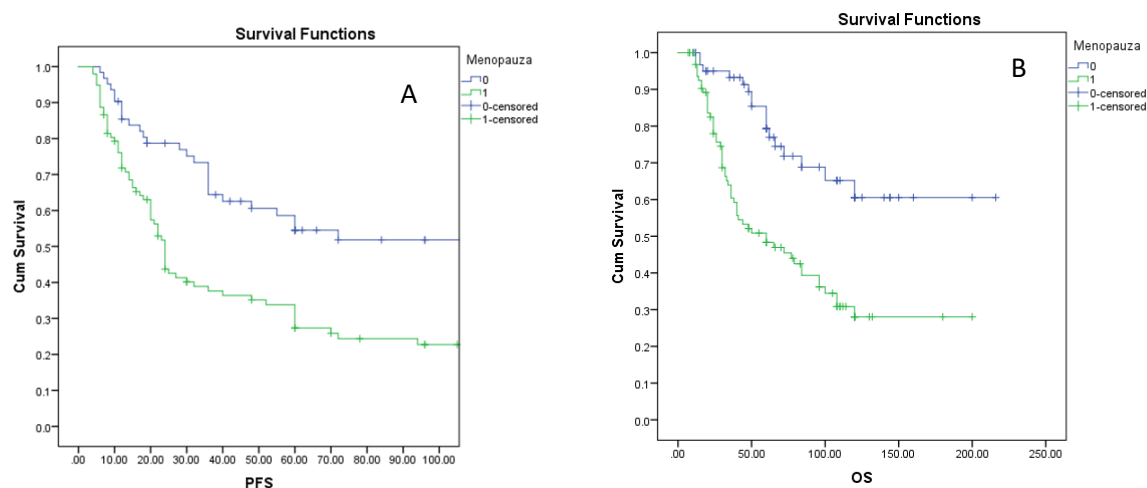


Figura 8. Timpul până la progresia bolii (8A) și supraviețuirea globală (8B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de statusul menopauzal.

Analiza univariată a timpului până la progresia bolii și a supraviețuirii generale în funcție de anumiți factori prognostici este prezentată în **Tabelul 2**.

Tabelul 2. Timpul până la progresia bolii și supraviețuirea generală după diferite caracteristici (analiza univariată)

	PFS		OS	
Caracteristica	PFS medie (luni)	p	OS medie (luni)	P
ECOG				
ECOG 0	70	0,0002	NR	0,0001
ECOG 1	24		40	
MENOPAUZA				
NU	72	0,0001	NR	0,005
DA	24		60	
R1				
DA	15	<0,0001	38	0,0003
NU	156		NR	
R1 cm				
0	156	<0,0001	NR	0,0002
0-1 cm	20		65	
Peste 1 cm	13		32	
G				

G2	70	<0,0001	44	0,0001
G3	20		120	
HP				
SEROS	27	0,008	84	0.46
ENDOMETRIOID	NR		NR	
ASCITA				
DA	23	0,027	60	0,005
NU	36		108	
TRATAMENT				
CHT-OP	40	0,27	100	0,154
OP-CHT	36		60	
RADIOTERAPIE				
DA	24	0.48	84	0.36
NU	40		96	
TROMBOCITOZA				
DA	19	0,0001	36	0,0001
NU	123		168	

Analiza multivariată a timpului până la progresia bolii și a supraviețuirii generale în funcție de anumiți factori prognostici este prezentată în **Tabelul 3**.

Tabelul 3. Analiza multivariată a diferiților factori de risc

Caracteristica	PFS			OS		
	HR	PFS 95% CI	p	HR	OS 95% CI	P
ECOG						
ECOG 0	1			1		
ECOG 1,2	2,82	1,85-4,27	0,001	3,632	2,24-5,88	0,001
TROMBOCITOZA						
Nu	1			1		
Da	4.92	3.19-7,55	0,0001	9,914	6.01-16.34	0,0001
MENOPAUZA						
Nu	1			1		
Da	2,32	1,48-3,63	0,001	2,906	1,68-5,00	0,001
R0						
Da	1			1		
Nu	6,03	3,72-9,78	0,0001	4.208	2,45-7,20	0,0001
R1 cm						
0	1			1		
0-1	2,54	1,54-3,54	0,001	2,30	1,73-3,07	0,0001
Peste1	3,16	1,82-4,16	0,0001	2,78	1,95-3,74	0,0001
G						
G2	1			1		

G3	2,379	1,66-3,388	0,001	2,088	1,403-3,107	0,001
HP						
SEROS	1			1		
ENDOMETROID	0,88	0,02-1,38	0,84	0,76	0,1-5,91	0,87
MUCINOS	0,90	0,38-1,12	0,09	1,18	0,16-8,50	0,39
TRATAMENT						
CHT-OP	1			1		
OP-CHT	1,24	0,74-2,09	0,403	1,505	0,85-2,66	0,161
ASCITA						
NU	1			1		
DA	1,59	1,04-2,441	0,031	1,90	1,19-3,03	0,007

5.3.4. Elaborarea unui scor prognostic

Un alt obiectiv al studiului a fost **elaborarea** unui scor prognostic original care să poată încadra pacienții într-o grupă de risc. Pe baza analizei amănunțite a factorilor de risc au fost luați în calcul următoarele variabile pentru alcătuirea unui scor care să estimeze evoluția ulterioară a pacienților și acesta să dicteze agresivitatea tratamentului și a urmăririi:

1. Statusul de performanță ECOG ≥ 1
2. Prezența ascitei
3. Statusul menopauzal
4. Boala reziduală macroscopică după intervenția chirurgicală
5. Prezența trombocitozei.

Se constată că fiecare factor de risc suplimentar adăugat scade semnificativ statistic ($p=0,001$) timpul până la progresia bolii (nu s-a atins, 55, 24, 20, 12 luni) și supraviețuirea generală (nu s-a atins, 120, 72, 60, 41,30) – **Figura 9**.

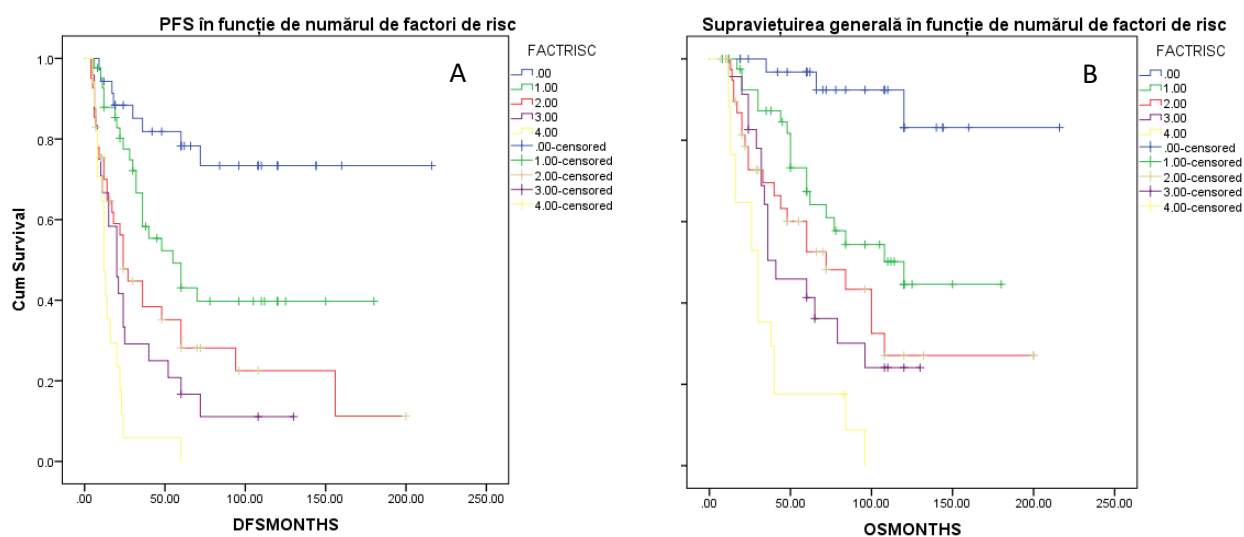


Figura 9. PFS (9A) și supraviețuirea globală (9B) exprimate prin curbe de supraviețuire Kaplan Meier în funcție de numărul de factori de risc

Aceste date susțin utilitatea scorului prognostic în evaluarea inițială a pacientului.

Pentru validarea scorului prognostic și caracterizarea sensibilității și specificității acestuia am utilizat curbele ROC. Acestea au arătat că scorul prognostic are o arie de sub curbă de 0,791, $p=0,0001$, 95%CI 0,721-0,86 pentru estimarea timpului până la progresia bolii și o arie de sub curbă de 0,78, $p=0,0001$, 95%CI 0,710-0,850 pentru estimarea supraviețuirii generale. Aceste rezultate arată că acest scor este util în practica medicală cu o sensibilitate și specificitate foarte bune.

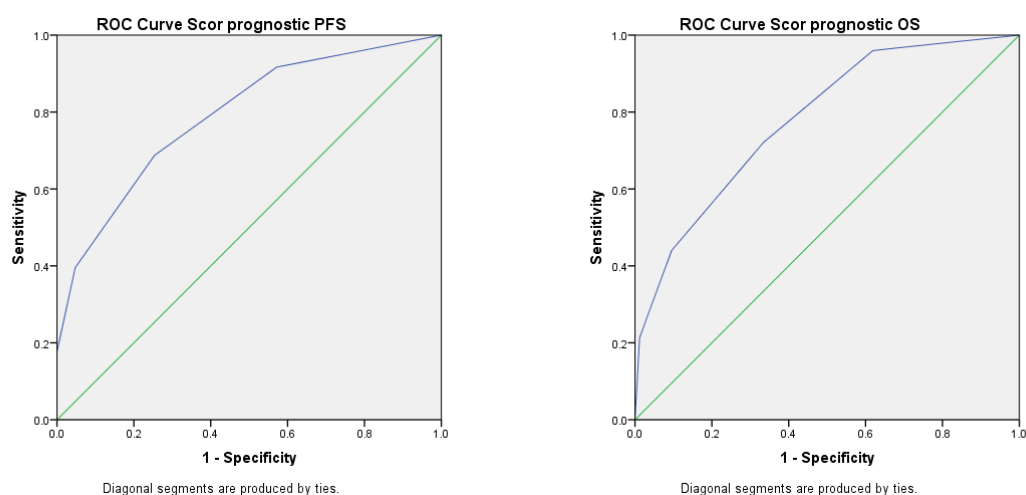


Figura 10. Reprezentarea curbelor ROC estimând sensibilitatea și specificitatea scorului prognostic

5.4 Discuții

Cele 160 de paciente cu neoplasm ovarian au avut o durată foarte lungă a urmăririi mediane (78 luni cu intervalul 7-216 luni), ceea ce a permis estimarea corectă a supraviețuirii și postularea mai multor factori de prognostic negativ.

O dilemă în tratamentul pacientelor cu neoplasm ovarian stadiul III și IV este dacă tratamentul acestora în prima linie ar trebuie să înceapă cu intervenția chirurgicală sau ar trebui să se administreze chimioterapie neoadjuvantă după care să se efectueze o citoreducție de interval. Mai multe studii și-au propus să dovedească non-inferioritatea chimioterapiei neoadjuvante în comparație cu secvența clasică, operație-chimioterapie, rezultatele fiind contradictorii [15,16]. În studiul nostru, nu au fost diferențe semnificativ statistice între cele două modalități terapeutice. Radioterapia adjuvantă administrată la pacienți cu factori de prognostic negativi a condus la o rată de supraviețuire bună și necesită validări ulterioare prin studii prospective [17]. Datele noastre confirmă importanța colaborării multidisciplinare pentru tratamentul optim al pacientelor cu neoplasm ovarian și au fost prezentate deja la nivel internațional [13].

Cele mai consistente date legate de factorii prognostici în cancerul ovarian provin de la studii retrospective și prospective care au dovedit că vârsta, statusul de performanță ECOG 2 față de ECOG 0, stadiul FIGO IIIC și IV în comparație cu tumorile cu stadiu IIIB sau mai incipiente, gradul G2 și G3 în comparație cu G1, subtipul histologic mucinos vs. seros, prezența ascitei peste 500 ml sunt factori prognostici independenți [18]. Datele sunt mai puțin robuste pentru stadiile incipiente de boală [19], dar pentru stadiul IV de boală a fost publicat un studiu care confirmă că prezența bolii reziduale este cel mai important factor prognostic negativ [20]. Studiul nostru a validat acești factori prognostici și a identificat și factori noi, mai puțin studiați, realizând, după cunoștința noastră, primul scor prognostic pentru estimarea riscului la pacientele cu neoplasm ovarian.

Statusul menopausal, nuliparitatea sunt cunoscuți factori de risc pentru apariția neoplasmului ovarian [21]. Studiul nostru a caracterizat evoluția pacientelor în pre și post menopauză, acesta fiind un studiu vast, care raportează evoluția oncologică pe termen lung a pacientelor tinere în pre-menopauză cu adenocarcinom ovarian. Aceste date au fost recent publicate, fiind importante nu numai pentru oncologi, chirurghi și ginecologi, dar și pentru endocrinologi [14]. Importanța identificării unui scor prognostic conduce la posibilitatea estimării riscului și particularizării tratamentului pacientelor cu neoplasm ovarian.

6. DETERMINAREA VEGF ȘI A STRESULUI OXIDATIV LA LOTUL DE PACIENȚII CU NEOPLASM OVARIAN

Scopul acestui studiu a fost determinarea VEGF și a parametrilor de stres oxidativ la pacienții cu cancer ovarian epitelial cu factori de prognostic negativ la care s-a practicat intervenție chirurgicală și chimioterapie (săruri de platină).

6.1. Pacienți și metode

Am realizat un studiu **prospectiv** care a inclus 48 paciente diagnosticate în centrul nostru cu carcinom ovarian epitelial între ianuarie 2014 și decembrie 2017. Criteriile de includere au fost similare cu cele de la lotul de 160 paciente.

Tratamentul chimioterapic administrat în prima linie de tratament a constat în chimioterapie pe bază de săruri de platină (paclitaxel 175 mg / m² și carboplatin AUC 5-6 la fiecare 3 săptămâni). Fiecărui pacient i-au fost recoltate patru probe de sânge (5 ml), în dinamică, înaintea fiecărui ciclu de chimioterapie. S-a putut astfel urmări în dinamică evoluția markerilor de stres oxidativ, valoarea VEGF și răspunsul la tratament. Serul a fost izolat prin centrifugare și s-au efectuat următoarele determinări: peroxidarea lipidică, ceruloplasmina, tiolii și antioxidanți totali.

Metode: Determinarea VEGF solubil s-a efectuat prin metoda de tip ELISA.

Peroxidarea lipidică a fost evaluată prin măsurarea concentrației serice a malondialdehidei (MDA) prin metoda Spectrofotometrică Carbonneau. Această metodă se bazează pe producerea unui aduct colorat (MDA-TBA2) cu o maximă absorbție la 532 nm în funcție de concentrație. Valorile normale sunt între 0-4 μmol / 100 ml ser.

Ceruloplasmina (CP) este o proteină de legare a cuprului de fază acută, sintetizată în principal la nivel hepatic, care este crescută în stări pro-inflamatorii, sarcină și în traumatisme. Ca enzime multifuncționale, ceruloplasmina prezintă activitate amino-oxidazică, superoxid dismutazică și activitate fero-oxidazică.

Activitatea oxidativă a ceruloplasminei a fost utilizând metoda Ravin. Este de asemenea o metodă spectrofotometrică, iar intensitatea culorii dezvoltată la 540 nm este direct proporțională cu concentrația ceruloplasminei. Valorile normale sunt: 80-120 UI.

Grupările SH-albumină tioli a fost măsurată prin reacția cu reactivul Ellman (5,5 ditio-bis nitrobenzoic) care a atins o intensitate maximă la 412 nm în concordanță cu grupările SH-. Nivelurile normale variază între 370 și 450 μmol / l.

Antioxidanții totali au fost mășurați pornind de la capacitatea serului de a reduce fierul (la un pH scăzut, complexul FeIII-tripiridil-s-triazina este redus la starea feroasă și se formează un complex albastru intens, iar intensitatea maximă a culorii este la lungimea de undă de 593 nm).

6.2.Rezultate

6.2.1.Caracteristicile lotului

Lotul a de pacienți a inclus 48 paciente cu adenocarcinom ovarian confirmat histopatologic. Vârsta medie a fost de $51,3 \pm 8,1$ ani (limite: 42-78 ani). Distribuția pe stadii a pacientelor a arătat că marea majoritate au fost încadrate în stadii avansate de boală (stadiul III 58% și IV 28,6%) și doar 20% din paciente în stadiul II de boală.

6.2.2.Determinarea VEGF

Determinarea factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGF solubil) s-a efectuat prin metoda de tip ELISA pe un lot de 32 paciente înaintea primelor trei cicluri de chimioterapie. Valorile normale ale VEGF în ser sunt: 50-750 pg/ml.

6.2.2.1 Determinarea VEGF în dinamică

Valorile VEGF serice în lotul investigat au fost global mai mari decât cele normale (media $1020,7 \pm 175$ pg/ml, limite: 719-1458 pg/ml, v.n. < 750 pg/ml). Evaluarea în

dinamică a VEGF înaintea fiecărui ciclu de chimioterapie a arătat că valorile VEGF cresc ușor, dar constant, dar nu au diferit din punct de vedere statistic.

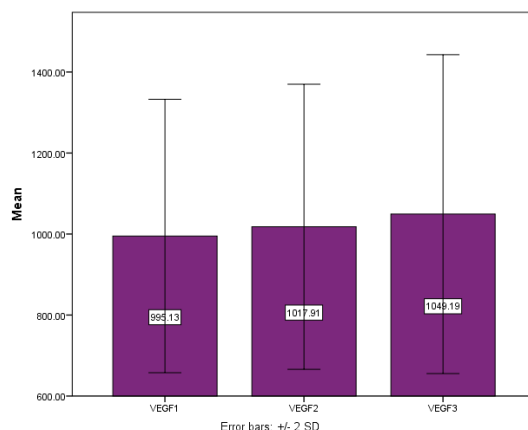


Figura 11. Determinarea în dinamică a valorilor VEGF înaintea fiecărui ciclu de chimioterapie

6.2.2.2 Valorile VEGF în funcție de prezența a tumorii macroscopice

Studiul și-a propus să evalueze dacă prezența tumorii măsurabile influențează valoarea VEGF și a parametrilor de stres oxidative. Lotul a fost împărțit în două subgrupuri: subgrupul A a inclus 21 pacienți aflați în stadiu II sau III de boală la care s-a practicat intervenția chirurgicală cu intenție curativă și la care evaluarea postoperatorie nu a mai depistat boală reziduală macroscopică și subgrupul B care a inclus 28 de pacienți cu neoplasm ovarian stadiul IV sau recidivat și paciențe cu stadiul III de boală la care după intervenția chirurgicală s-a decelat boală reziduală macroscopică. Pacienții cu tumoră reziduală au avut valori semnificativ statistic mai mari ale VEGF (medie VEGF= 1058 pg/ml) comparative cu pacienții fără tumoră (medie VEGF= 810 pg/ml), $p = 0,0036$ – așa cum este reprezentat în figura 12.

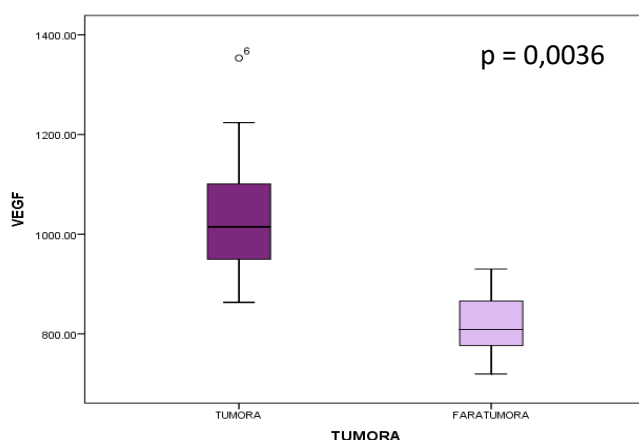


Figura 12. Valorile VEGF la pacienții cu tumora macroscopică vs. cei fără tumoră macroscopică $p = 0,0036$.

6.2.2.3. Studiarea interrelației între speciile reactive de oxigen (ROS) și VEGF

Pornindu-se de la modelele experimentale care arată o strânsă interrelație între semnalizarea indusă de speciile reactive de oxigen și angieneză, am studiat dacă există o corelație între valorile parametrilor stresului oxidativ și VEGF.

Astfel, în lotul nostru de pacienți se constată o creștere liniară a valorilor VEGF în corelație pozitivă cu markerii de peroxidare lipidică (valorile malondialdehidei), coeficientul de corelație Pearson $r = 0,386$ cu semnificație statistică, $p = 0,0313$ - **Figura 13A**. De asemenea există o corelație pozitivă și în cea ce privește VEGF și ceruloplasmina (coeficient Pearson $r = 0,356$, $p = 0,0388$) – **Figura 13B**.

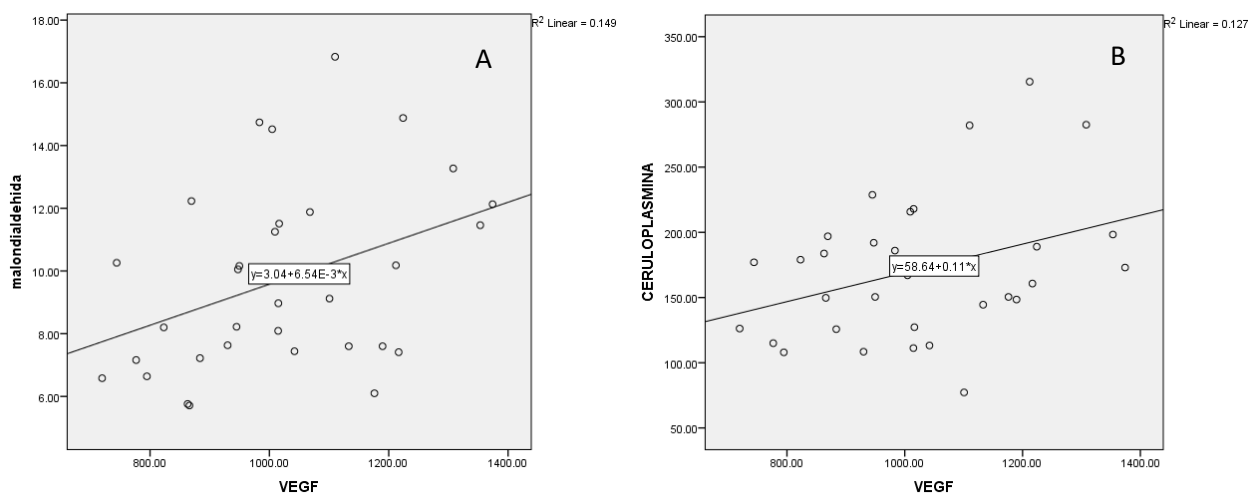


Figura 13. Corelația pozitivă între valorile VEGF și valorile malondialdehidei (13A) și ceruloplasminei (13B)

6.2.2.4. Studiarea rolului prognostic al VEGF

Studiul de față și-a propus să evalueze rolul prognostic al VEGF la pacientele cu neoplasm ovarian. Pacienții au fost împărțiți în 3 categorii: pacienți cu valori ale VEGF sub 750 pg/ml, pacienți cu valori cuprinse între 750 pg/ml și 1200 pg/ml și pacienți cu valori ale VEGF peste 1200 pg/ml. Intervalul mediu până la progresia bolii a fost de 12 luni în cazul pacientelor cu valori foarte mari ale VEGF (peste 1200 pg/ml), comparativ cu 32 de luni în cazul pacientelor cu valori ale VEGF cuprins între 750 și 1200 și mediana nu a fost atinsă deoarece nu s-au produs suficiente evenimente pentru cei cu valori normale ale VEGF (log rank $p = 0,0001$). Valorile crescute ale VEGF s-au asociat cu un risc de 2,6 ori mai mare de progresie a bolii față de valorile normale ($HR = 2,60$, 95% CI 1,69-3,99). Supraviețuirea pacientelor cu valori crescute ale VEGF a fost mult mai mică decât cea a pacientelor cu valori normale, deși datele sunt limitate de numărul mic de pacienți din fiecare subcategorie. Astfel, nu s-a înregistrat încă nici un deces în lotul cu valori normale ale VEGF, în timp ce în lotul cu valori crescute ale VEGF, nu au existat diferențe semnificative între valorile peste

1200 pg/ml și cele sub 1200 pg/ml astfel încât supraviețuirea mediană nu a fost atinsă în nici unul din grupuri, semnificând importanța unei urmăriri mai lungi a pacienților – **Figura 14.**

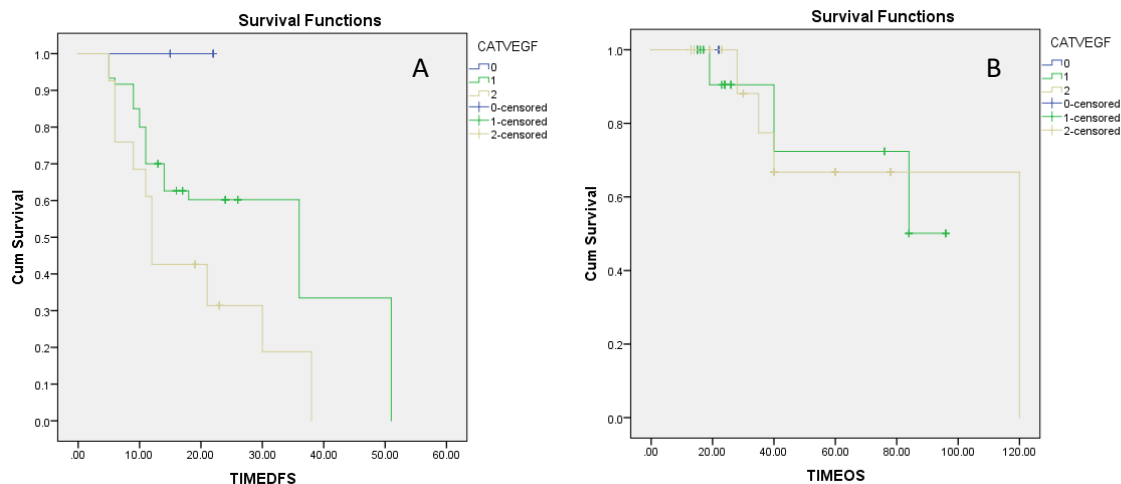


Figura 14. Intervalul mediu până la progresia bolii (14A) și supraviețuirea generală(14B) în funcție de diferitele categorii de valori ale VEGF.

Pentru a estima sensibilitatea și specificitatea dozării VEGF în cancer ovarian am utilizat analiza curbelor ROC. Astfel pentru estimarea corectă a timpului până la progresia bolii aria de sub curbă a VEGF a fost de 0,798, $p=0,005$, 95% CI 0,636- 0,959. Valoare cut-off a VEGF pentru estimarea PFS, cu sensibilitate 84% și specificitate 71% a fost de 948 pg/ml. În ceea ce privește supraviețuirea generală aria de sub curbă a fost de 0,691, $p=0,098$, 95% CI 0,49-0,89, cut-off pentru estimarea supraviețuirii fiind de 966 pg/ml, specificitatea de 77% și sensibilitatea de 52% (**Figura 15**).

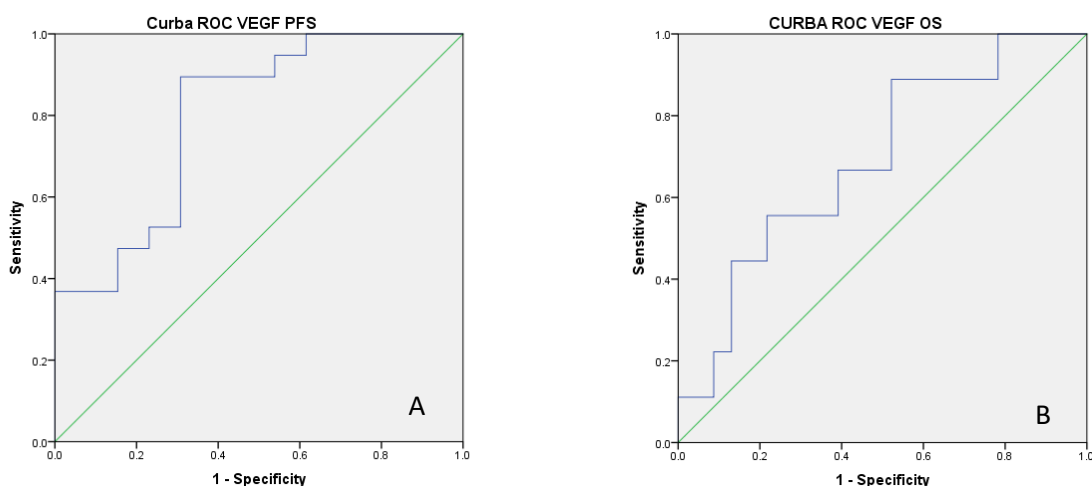


Figura 15. Reprezentarea prin curbe ROC a sensibilității și specificității VEGF în estimarea timpului până la progresia bolii (15A) și a supraviețuirii generale (15B).

6.2.2.5. Estimarea răspunsului la săruri de platină prin măsurarea VEGF

Am studiat dacă valorile VEGF pot estima răspunsul la tratamentul cu săruri de platină: pacientele cu tumori rezistente la platină au avut o valoare semnificativ statistic mai mare a VEGF decât cele cu tumori sensibile la platină sau decât cele cu sensibilitate intermediară ($p=0,003$) – **Figura 16**.

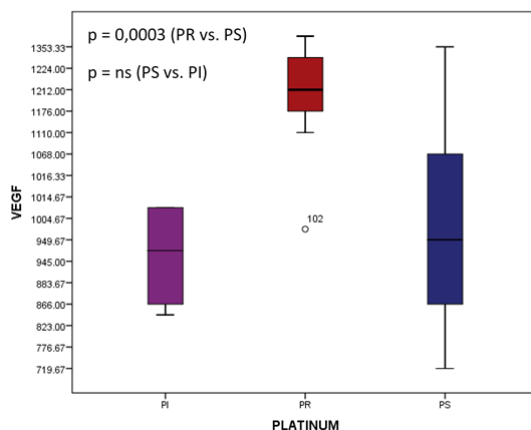


Figura 16. Valorile VEGF în funcție de sensibilitatea tumorii la săruri de platină.

Estimarea sensibilității și specificității VEGF pentru sensibilitatea la platină a fost de $AUC = 0,874$, $p=0,003$, 95% CI 0,734-1, valoarea cut-off (80% sensibilitate, 80% specificitate) fiind de 1085 pg/ml - **Figura 17**.

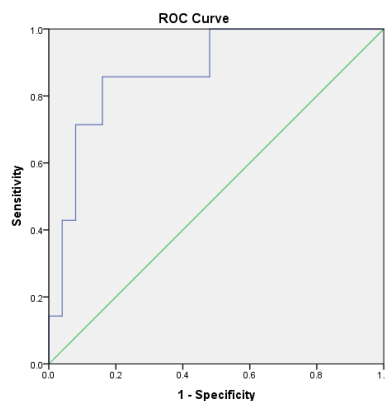


Figura 17. Reprezentarea prin curbe ROC a sensibilității și specificității VEGF pentru estimarea sensibilității la săruri de platină.

6.2.3. Determinarea parametrilor de stres oxidativ la pacientele cu neoplasm ovarian.

Stresul oxidativ a fost determinat prin măsurarea malondialdehidei, ceruloplaminei, tiolilor și antioxidanților totali. Analiza descriptivă a măsurătorilor parametrilor de stres oxidativ sunt prezentate în **Tabelul 4**. Așa cum se observă și malondialdehida și

ceruloplasmina au avut valori mai mari decât cele normale, iar tiolii albuminici și antioxidanții totali cvasi normale.

Tabelul 4. Analiza descriptivă a parametrilor de stres oxidativ studiați.

	Malondialdehidă ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$)	Ceruloplasmină (U.I.)	Tioli ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	Antioxidanți (unitate de masura)	VEGF pg/ml
Medie	7,84	174,51	343,04	1,36	1020,7
Deviație standard	2,94	72,84	142,01	0,49	175,08
Eroarea standard a mediei	0,20	5,1	9,89	0,03	30,95
Mediana	7,35	159	325	1,34	983,33
Minimum	2,16	50	100	0,06	719
Maximum	16,83	483	852	4,10	1458
Valoarea normală	0-4	80- 120	370- 450	0,9-1,4	750

6.2.3.1. Evoluția parametrilor de stres oxidativ în dinamică

Valorile malondialdehidei au scăzut semnificativ statistic ($p=0,003$) între prima și a patra administrare, în timp ca valorile ceruloplasminei, tiolilor și antioxidanților nu au diferit semnificativ statistic între cele patru determinări.

6.2.3.2. Relația dintre diferiți parametri ai stresului oxidativ

S-a constatat că există o corelație pozitivă, înalt semnificativă statistic între valorile peroxidării lipidice determinată prin măsurarea malondialdehidei și valorile ceruloplasminei, valorile coeficientului Pearson de corelație fiind $r=0,44$, $p=0,0017$. Corelație pozitivă există de asemenea și între valorile peroxidării malondialdehidei și tiolii plasmatici, valoarea coeficientului de corelație Pearson fiind $r=0,388$ $p<0,007$ – **Figura 18**. Nu au existat corelații semnificative statistic între valorile malondialdehidei și antioxidanți ($r=0,021$, $p=0,89$), între valorile ceruloplasminei și antioxidanți ($r=0,05$, $p=0,730$) și între valoarea tiolilor și a antioxidanților ($r=0,072$ și $p=0,63$).

Toate aceste determinări întăresc ideea producției în exces a speciilor reactive de oxigen și lipsa unui răspuns compensator eficient al organismului la acest dezechilibru al stresului oxidativ.

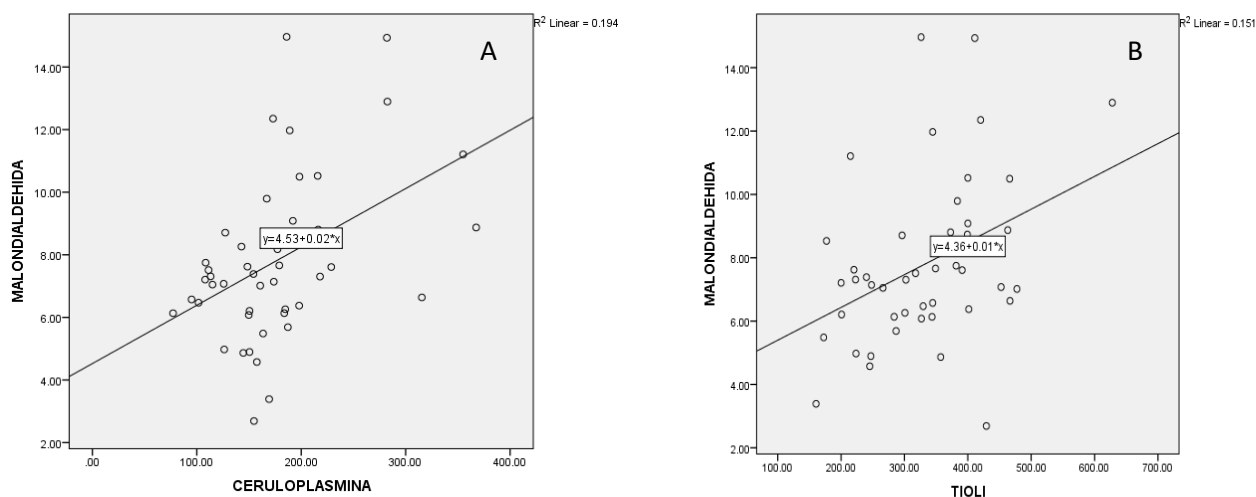


Figura 18. Corelația pozitivă între valoarea malondialdehidei și ceruloplasmină (18A, $r=0,44$, $p=0,0017$) și malondialdehidă și valoarea tiolilor (18B $r= 0,388$ $p<0,007$)

6.2.3.4.Studierea relației dintre markerii stresului oxidativ și boala reziduală macroscopică

Valorile medii ale malondialdehidei și ceruloplasminei au fost semnificativ statistic mai mari la pacienții din subgrupul B cu tumoră reziduală comparativ cu pacienții din subgrupul A fără tumoră reziduală ($p=0,0001$ pentru malondialdehida și respectiv $p= 0,0205$ pentru ceruloplasmina)- **Figura 19.**

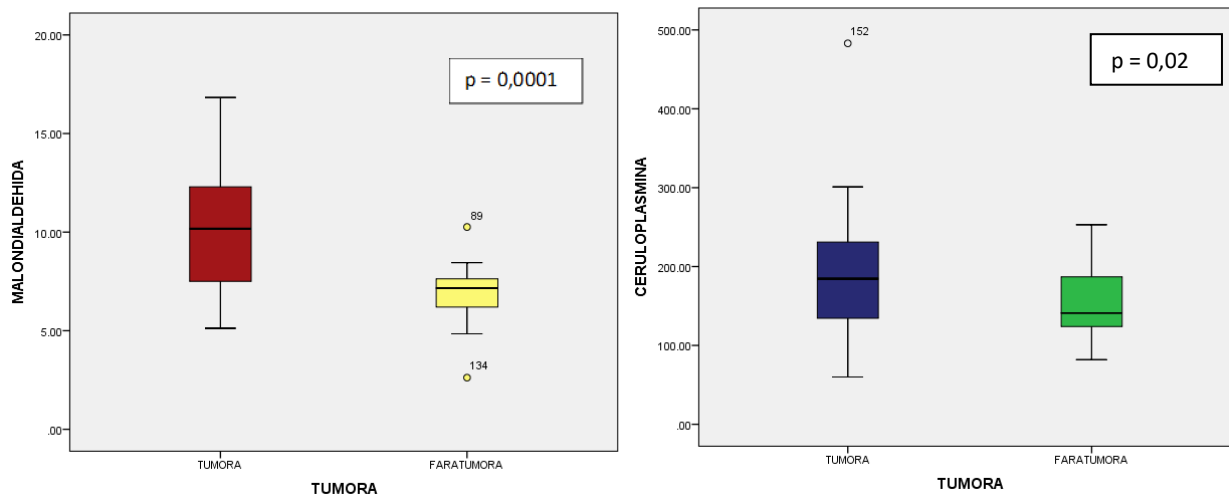


Figura 19. Valorile malondialdehidei (A) și ceruloplasminei (B) sunt semnificativ statistic mai mari la pacienții cu tumoră reziduală comparativ cu pacienții fără tumoră reziduală macroscopică

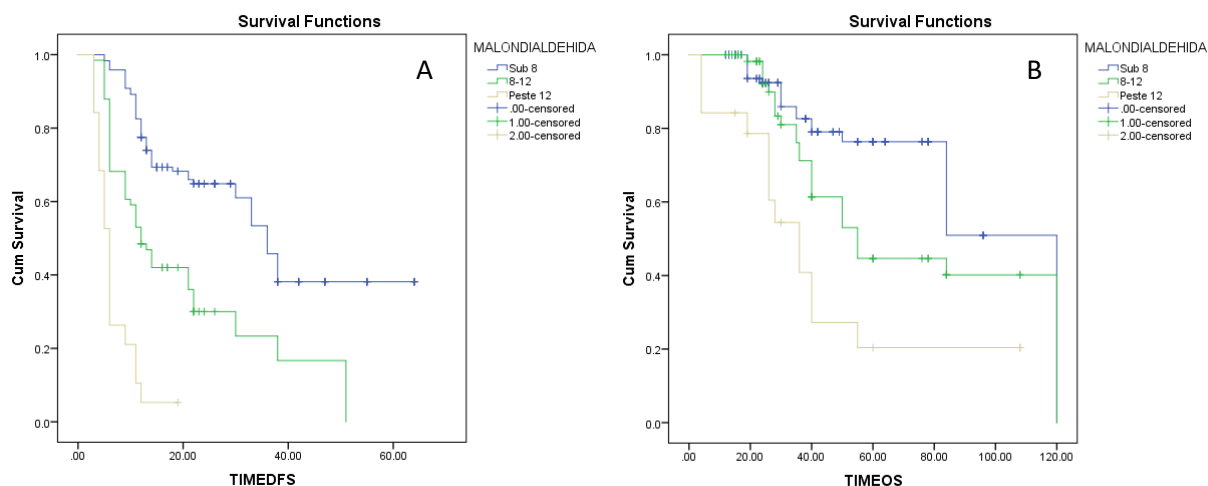


Figura 20. Timpul până la progresia bolii și Supraviețuirea generală în funcție de categoriile de valori ale malondialdehidei p =0,0001

În contrast cu aceste rezultate, valoarea tiolilor și a antioxidanților nu au diferit semnificativ statistic între cele două subgrupuri, $p=0,06$ pentru tioli și $p=0,71$ pentru antioxidant.

6.2.3.5. Rolul speciilor reactive de oxigen în estimarea prognosticului pacientului

Studiul și-a propus în continuare să evalueze rolul prognostic al diferitelor valori ale peroxidării lipidelor la pacientele cu neoplasm ovarian. A fost analizat intervalul până la progresia bolii și supraviețuirea mediană pentru pacientele cu valori ale malondialdehidei mai mici de 8 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$, cu valori între 8-12 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ și cu valori ale peroxidării lipidice peste 12 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$. Intervalul până la progresia bolii a fost înalt semnificativ statistic diferit ($p=0,0001$), cu un PFS mediu estimate de 36 luni în cazul pacientelor cu valoare a malondialdehidei sub 8 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$, care scade vertiginos la 12 luni în cazul pacientelor cu valoare a malondialdehidei între 8 și 12 și extrem de scăzut (6 luni) în cazul pacientelor cu valori ale malondialdehidei peste 12 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$. Valorile peste 8 cresc riscul de progresie de 2,9 ori ($\text{HR}= 2,904$, 95% CI 2,21-3,81, $p=0,0001$) – **Figura 20**

În ceea ce privesc datele de supraviețuire generală, se constată supraviețuirea cea mai mare la pacientele cu valori scăzute ale malondialdehidei, sub 8 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ la care OS estimat a fost de 120 luni, în lotul cu valori intermediare ale peroxidării lipidice OS mediană a fost de 55 luni iar în lotul pacientelor cu valori peste 12 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ale malondialdehidei, supraviețuirea mediană nu a depășit 36 luni, $\text{HR}=2,028$, 95% CI 1,42-2,883, $p<0,0001$.

Pentru a valida utilitatea malondialdehidei ca marker prognostic am calculat sensibilitatea și specificitatea acesteia pentru a prezice timpul până la progresia bolii și supraviețuirea generală. Aria de sub curbă pentru PFS de 0,739, $p=0,0001$, 95% CI 0,671-

0,807. Pentru estimarea OS, valoarea ariei de sub curbă a fost de 0,695, $p=0,001$, 95% CI 0,612-0,778. Valoarea cut-off cu sensibilitate 77% și specificitate 50% a fost de 6,5 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ (Figura 21).

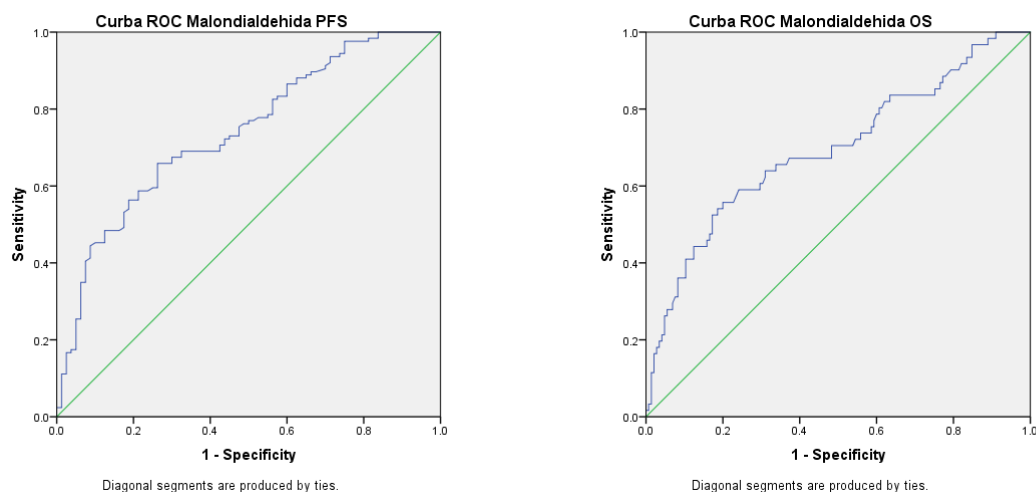


Figura 21. Reprezentarea prin curbe ROC a sensibilității și specificității Malondialdehidei pentru estimarea timpului până la progresia bolii (21A) și a supraviețuirii generale (21B).

6.2.3.6. Interrelația dintre valorile malondialdehidei și sensibilitatea la chimioterapia cu platină

Așa cum reiese din **Figura 22**, valorile malondialdehidei au fost semnificativ statistic mai mari în cazul pacienților rezistenți la terapia cu săruri de platina și asemănătoare pentru pacientele cu sensibilitate intermediară sau sensibile la sărurile de platină, $p=0,0001$.

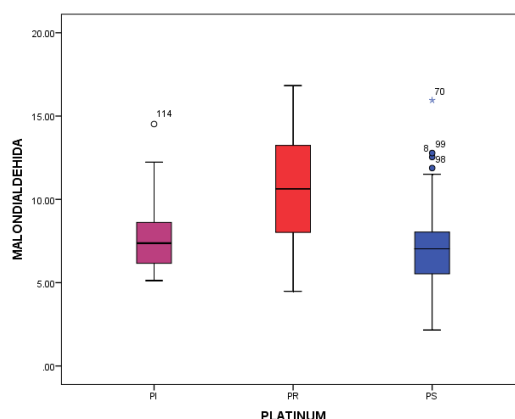


Figura 22. Valoarea malondialdehidei este semnificativ statistic mai crescută la pacientele cu boală rezistentă la sărurile de platină.

Analiza sensibilității și specificității malondialdehidei în estimarea rezistenței la tratamentul cu săruri de platină prin curbe ROC, a arătat o arie de sub curbă de 0,818, $p=0,0001$ și CI 95% 0,744-0,893, ceea ce dovedește că malondialdehida poate stima foarte bine o posibilă rezistență la tratament. S-a identificat un cut-off pentru valoarea malondialdehidei de 7,74 pentru estimarea sensibilității la săruri de platină, cu 81,3% sensibilitate și 64% specificitate – figura 23.

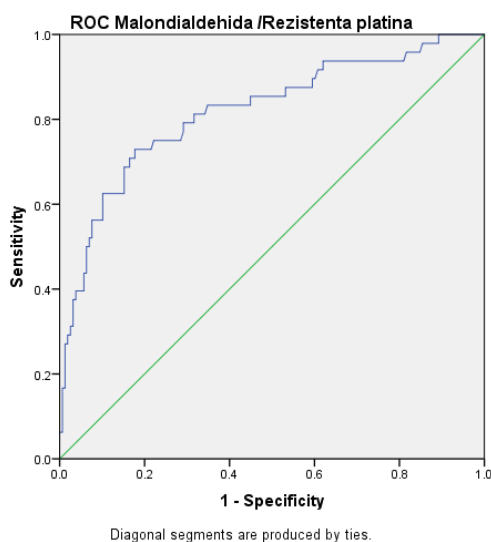


Figura 23. Reprezentarea prin curbe ROC a sensibilității și specificității malondialdehidei pentru estimarea rezistenței la săruri de platină

6.3. Discuții

Datele din literatură privind rolul VEGF (o citokină multifuncțională care crește permeabilitatea vasculară și stimulează creșterea celulelor endoteliale și angiogeneza) ca factor de prognostic la paciențele cu neoplasm ovarian sunt contradictorii. Există o asociere semnificativ statistică între nivelul de VEGF și stadiul FIGO, gradul tumorii, dimensiunea rezidului tumoral după intervenția chirurgicală, invazia limfoganglionilor și prezența lichidului de ascită, dar nu există consens între cercetători [22].

O meta-analiză a inclus 16 studii, 1111 pacienți (385 analizează serurile și 638 analizează specișenele de tumori ovariene). Studiile care au analizat serul pacienților cu neoplasm ovarian au inclus în medie 58 de pacienți (41-101). Valorile crescute ale VEGF s-au asociat cu un interval până la progresia bolii mai scurt ($HR=2,46$) și cu o supraviețuire mai scăzută ($HR=1,7$) [23].

Cea mai recentă meta-analiză publicată în 2018 a inclus 1145 paciente și a arătat că expresia crescută a VEGF tisular se asociază cu scăderea supraviețuirii și un PFS mai mic

(pentru supraviețuire, riscul este de 2,24 ori mai mare, 95% CI 1,36–3,70; $p=0,002$, iar pentru timpul până la progresia bolii (PFS) $HR= 1,60$, 95% CI 1,11–2.31; $P=0.01$) [24].

Datele studiului nostru sugerează faptul că balanța stresului oxidativ este înclinată mai mult în favoarea producției în exces de radicali liberi de oxigen în detrimentul captării acestora și că mecanismele de apărare reprezentate de antioxidanți nu pot compensa faptul că tumora este un inductor al stresului oxidativ. În celula neoplazică, instalarea dezechilibrului dintre producția de specii reactive de oxigen și eliminarea radicalilor liberi conduce la o stare de stres oxidativ și la distrugerea unor componente esențiale ale celulei [25]. Stresul oxidativ rezultat din acest dezechilibru, are un rol cauzator, dar este și o consecință a carcinogenezei, interferând cu toate fazele acestui proces, cum ar fi inițierea, promovarea, progresia, invazia și metastazarea, răspunsul la tratament [26]. Studiul nostru a identificat o creștere a valorilor malondialdehidei și activității oxidative a ceruloplasminei, și valori mai scăzute ale tiolilor albuminici și antioxidanților subliniind dezechilibrul stresului oxidativ. Date obținute la lotul nostru de paciente confirmă rolul prognostic al malondialdehidei în estimarea evoluției și prognosticului pacientelor cu neoplasm ovarian precum și sensibilitatea la tratamentul cu săruri de platină. Un studiu care a inclus 42 de pacienți cu cancer ovarian a raportat de asemenea niveluri crescute ale malondialdehidă și a găsit o diferență statistică semnificativă între grupul de pacienți cu cancer ovarian și grupul martor (8,7 vs. 6,7 nmol/L). Studiul nu a identificat însă și o valoare prognostică a determinării malondialdehidei [27]. În concluzie, tumora produce în exces specii reactive de oxigen, la pacienții cu carcinom ovarian epitelial, și aceasta poate juca un rol important în invazie și metastazare. Atât malondialdehida cât și VEGF au avut în lotul nostru valoare prognostică și au estimat sensibilitatea la tratamentul cu săruri de platină.

7. STUDIUL PROCESELOR DE SEMNALIZARE A ANGIOGENEZEI ȘI AL ROS PE MODELE EXPERIMENTALE IN VIVO ȘI IN VITRO ȘI IMPLICAȚIILE LOR TERAPEUTICE

A treia parte a studiului și-a propus realizarea unui model experimental murin care să servească pentru studierea interrelației dintre parametrii stresului oxidativ și angiogeneză precum și identificarea unor noi ținte terapeutice.

Ipoteza de lucru de la care s-a pornit este faptul că celula neoplazică este supusă unui stres oxidativ crescut continuu și una din principalele căi de a regla acest dezechilibru este să utilizăm agenți citotoxici și anti-angiogenici, anti-oxidanți sau imunologici.

7.1. Obținerea modelului experimental

7.1.1. Alegerea modelului experimental în oncologie util în cercetarea stresului oxidativ și angiogenezei.

Animalele de laborator folosite pe parcursul elaborării acestei lucrări experimentale au fost **șobolanii Wistar**, linii inbred aclimatizați și crescuți în Biobaza Institutului Oncologic « Prof. Dr. Al. Trestioreanu » din București.

Materialul tumoral utilizat a fost tumora experimentală **Walker 256**: celulele utilizate au fost multiplicare în cultură și apoi inoculate animalului în flancul drept cu un număr cuprins între $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ celule/ml, tumora dezvoltată fiind transplantabilă prin xenogrefe. Alegerea acestei tumori experimentale a ținut cont și de faptul că ea dezvoltă și o formă ascitică care se poate transforma în urma inoculării în forma solidă și deoarece are o dezvoltare rapidă, procentul de transplantare cu succes este de aproximativ 70-80%, perioada de latență a tumorii din momentul inoculării până la tumoră vizualizabilă fiind de aproximativ 7 zile, permițând repetarea experimentelor fără un inconvenient legat de timp și durată prelungită.

7.1.2. Evoluția tumorilor după transplantare

Modelul experimental a fost urmărit din punct de vedere al inducerii tumorii, al ratei de creștere a acesteia, dimensiunilor și comportamentului său precum și a răspunsului la diferiți agenți chimioterapici, anti-angiogenici, antioxidanți și imunoterapii.

7.2. Determinarea biochimică a parametrilor de stres oxidativ în modele experimentale și interrelația cu angiogeneza

7.2.1. Motivația studiului

Scopul lucrării în această etapă a cercetării a fost să identificăm pe un model experimental *in vivo*, rolul speciilor reactive de oxigen în cascada de semnalizare a procesului de angieneză și de a stabili mecanismele citotoxice induse de aceste specii în dinamica unor tratamente utilizate în cancerul ovarian.

7.2.2. Materiale și metode

A fost realizat un model experimental *in vivo* care a constatat în inducerea carcinomului Walker 256 la șobolanii Wistar albino, urmărindu-se parametrii biochimici de stres oxidativ în dinamica tratamentului. Datele obținute au fost comparate cu un lot martor

netratat la care aceeași parametrii au fost determinați în dinamica creșterii și evoluției tumorale.

S-a determinat **indicele de peroxidare lipidică**, evaluat prin măsurarea concentrației malondialdehidei serice [28]. Pentru măsurarea atacului oxidativ al speciilor reactive de oxigen asupra proteinelor s-au măsurat **tioli albuminici**. Grupările tiol-albuminice SH au fost determinate prin reacția cu acidul 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic) denumit și reactiv Ellman [29]. Măsurarea antioxidantilor non-enzimatici din probele recoltate de la animalele de experiență s-a realizat prin testul **FRAS** (ferric reducing ability of serum)[30].

7.2.3 Rezultate

7.2.3.1 Urmărirea creșterii tumorale

Prima etapă a fost reprezentată de urmărirea creșterii și dezvoltării tumorale, care implică în primul rând determinările metrologice macroscopice ale animalelor de laborator prin măsurarea periodică a greutatei corporale și a dimensiunilor tumorale. Greutatea animalelor de experiență a crescut de la 210 g înainte de inoculare la 223 la 21 zile post implantare, când dimensiunile medii ale tumorii au fost de 22 mm.

7.2.3.2 Măsurarea parametrilor de stres oxidativ în ser și țesut tumoral

Rezultatele obținute indică o creștere a reacțiilor de oxidare manifestată asupra lipidelor, prin creșterea valorilor malondialdehidei atât în ser cât și în țesutul tumoral mai ales deoarece lipidele au o distribuție mare în organism și în membrana celulară, primul atac al radicalilor liberi de oxigen fiind la acest nivel.

Tabelul 5. Valorile parametrilor de stres oxidativ determinate din ser și țesutul tumoral la modelul murin inoculat cu tumoră

Determinare		T0 înainte inoculare	7 zile post- implant	10 zile post- implant	14 zile post- implant	21 zile post- implant
Peroxidare Lipidica μmoli /100 ml	Ser	6,31	7,93	8,32	9,75	9,29
	Țesut tumoral	-	4,98	4,63	6,28	13,58
Tioli μmoli / l	Ser	301	235	297	345	398
	Țesut tumoral	-	564	589	481	346
Antioxidanți	Ser	0,85	0,75	0,85	0,93	1.19

μmoli / l	Țesut tumoral	-	1,86	2,55	3,09	3,24
-----------	----------------------	---	------	------	------	------

Am înregistrat valori crescute ale tiolilor albuminici doar la nivelul țesutului tumoral și acest lucru poate fi explicat prin faptul că tumora produce în exces proteine cu sulf pentru a reduce producerea de anti-oxidanți.

7.2.3.3 Studiul interrelației dintre parametrii serici ai stresului oxidativ și răspunsul la tratamentul anti-angiogenic cu anticorpi monoclonali anti VEGF, folosind modelul experimental murin

În vederea identificării mecanismelor care stau la baza neo-vascularizației și interrelația acestora cu stresul oxidativ, am folosit în continuare modelul experimental murin divizând 20 de șobolani Wistar albino inoculați cu tumoră, ajunși la maturitate în două loturi, un lot martor netratat și unul la care s-a aplicat un tratament cu anticorpi monoclonali anti VEGF (bevacizumab) timp de trei săptămâni, trei zile pe săptămână, administrându-se 15 mg/kg corp dizolvat în soluție salină 0,2 ml administrat intravenos (în vena cozii).

S-au măsurat aceiași parametri de stres oxidativ.

Se constată o creștere a peroxidării lipidice odată cu creșterea volumului tumoral cu 33,5%. Pentru lotul tratat există o modificare a profilului peroxidării lipidice. După instituirea tratamentului anti-angiogenic, peroxidarea lipidică înregistrează o creștere mult mai mică. Valorile spre sfârșitul tratamentului cresc doar cu 8,6 % față de valoarea inițială, spre deosebire de lotul martor unde creșterea este de 33,5%. Aceste valori sugerează pentru aceasta etapă a investigațiilor o eficiență a tratamentului instituit. Se identifică, asemănător profilului tiolilor serici, o creștere a atacului oxidativ asupra proteinelor în timpul creșterii și dezvoltării tumorale. Dacă la lotul martor creșterea maximă s-a înregistrat cu valori de până la 13,5%, pentru lotul tratat aceasta este de 8,9% sugerând eficiența tratamentului cu anticorpi monoclonali anti VEGF în diminuarea metabolismului oxigenului, a producerii radicalilor liberi și indirect a circulației oxigenului și a angiogenezei.

Tratamentul instaurat a fost eficient, a dus la diminuarea metabolizării oxigenului, ceea ce nu a necesitat activarea sistemelor de luptă antioxidante endogene. Dacă în timpul creșterii tumorale exista o activitate antioxidantă crescută de până la 83,7% înregistrată la lotul martor netratat, creșterea survenită la lotul tratat este de doar 17,9% - **Figura 24.**

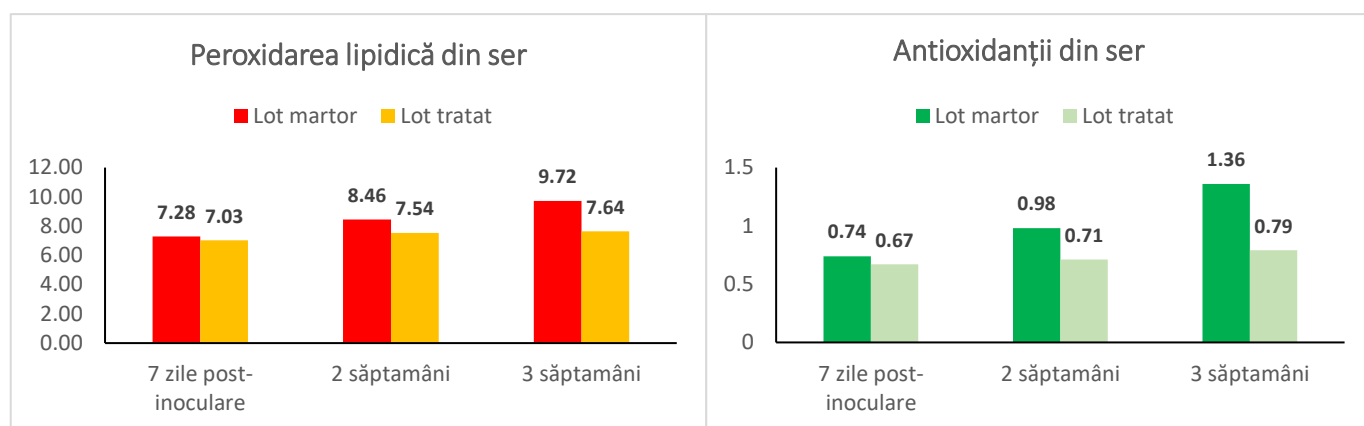


Figura 24. Variația peroxidizilor lipidici și a antioxidantilor totali din ser în dinamica creșterii tumorale și a tratamentului.

7.2.3.4 Studiul interrelației dintre parametrii stresului oxidativ din țesutul tumoral și răspunsul la tratamentul antiangiogenic cu anticorpi monoclonali anti VEGF, folosind modelul experimental murin

Pentru a limita factorii de confuzie externi care pot fi întâlniți în momentul dozării produșilor de stres oxidativ din ser, am continuat studiile pe material biologic provenit de la animalele purtătoare de carcinom experimental Walker 256. Din omogenatul tisular brut recoltat de la șobolanii incluși în lotul martor, s-au efectuat în dinamica tratamentului determinări ale peroxidizilor lipidici și valorile au fost comparate cu cele obținute din omogenatul indivizilor tratați cu anticorpu monoclonal anti VEGF- **Figura 25.**

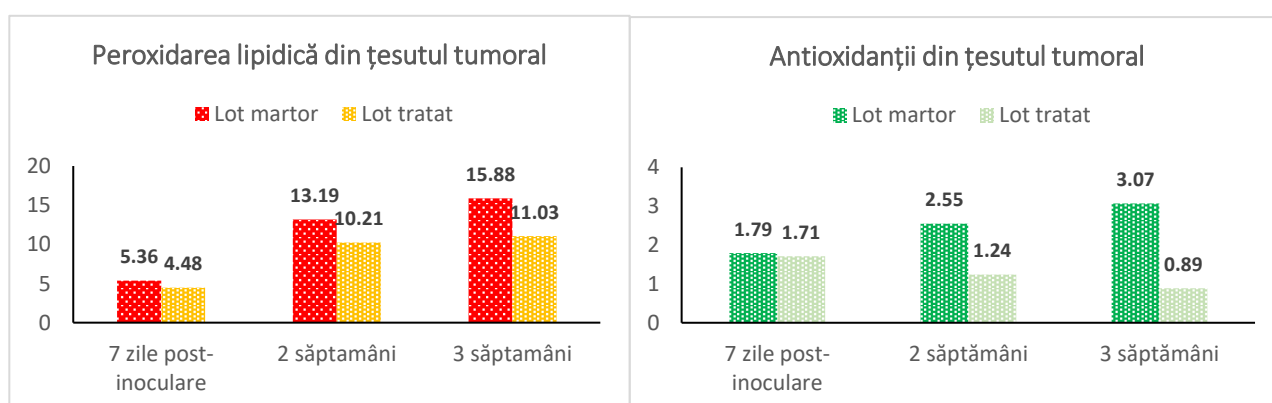


Figura 25. Peroxidarea lipidică și antioxidantii totali în țesutul tumoral în dinamica creșterii tumorale și a tratamentului

Din țesutul tumoral au fost măsurate și antioxidanții totali. Aceste sisteme endogene s-au activat ca mecanisme de protecție împotriva creșterii speciilor reactive de oxigen și am obținut în țesutul tumoral valori mai scăzute în lotul tratat față de cel martor – **Figura 25**.

7.3 Studiul parametrilor de stres oxidativ pe culturi celulare și noi implicații terapeutice

Cultura de celule reprezintă o metodă experimentală prin care celule izolate sau mici fragmente de țesut sub formă de suspensii celulare sunt transferate și cultivate *in vitro* într-un mediu artificial, controlat, în care își păstrează viabilitatea, caracteristicile și funcțiile specifice, în scopul multiplicării și caracterizării acestora și al testării diferitelor modalități terapeutice.

7.3.1. Studiul efectelor agenților chimioterapici asupra parametrilor stresului oxidativ pe culturi celulare

Ipoteza de lucru a fost reprezentată de posibilitatea de a contracara efectele produse de tumoră și de chimioterapice asupra dezechilibrului stresului oxidativ prin folosirea quercetinei.

Pornind de la faptul că paclitaxelul și carboplatinul sunt compuși cei mai utilizați în tratamentul cancerului ovarian, culturile celulare obținute din linia Walker 256 prin pasaje seriate au fost tratate cu o combinație din compușii paclitaxel, cisplatin și quercetina. Momentul la care celulele au fost expuse la quercetină este de asemenea important astfel încât valorile antioxidanților au fost măsurate după administrarea flavonoidului, înaintea citostaticelor sau după acestea.

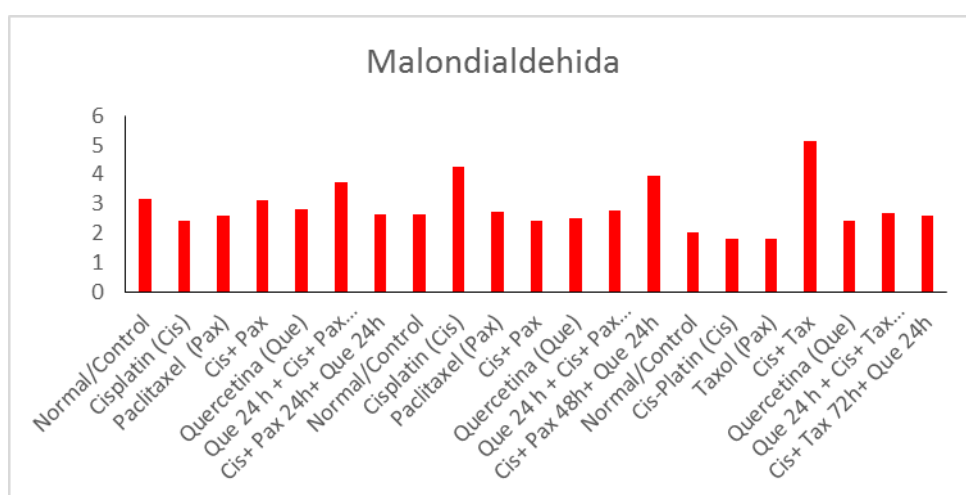


Figura 26. Determinarea parametrilor de stres oxidativ A - malondialdehida, pe linii celulare tratate cu combinația Paclitaxel + Cisplatin + Quercetină

7.3.2. Studiul parametrilor de stres oxidativ în dinamica administrării quercetinei

Valorile malondialdehidei au scăzut ceea ce semnifică o diminuare a atacului oxidativ exercitat asupra lipidelor. Tiolii cresc în prima etapă, urmând ca la sfârșitul perioadei de incubare valorile să se apropie de cele normale. Antioxidanții totali înregistrează o creștere a nivelurilor în prima parte a experimentului, sugându-se faptul ca quercetina are acțiune antioxidantă, dar acumularea în timp poate determina un profil oxidant. Putem concluziona că doza și timpul administrării unor compuși cu acțiune antioxidantă cunoscută poate influența profilul pro- sau antioxidant.

7.4. Studiul complexelor imune circulante

Alături de chimioterapia clasică și de tratamentul anti-angiogenic, în ultimii ani și-a făcut apariția în tratamentul cancerului ovarian și imunoterapia. Datele au fost destul de dezamăgitoare în sensul că rata de răspuns nu depășește 15% și este dificil de estimat care pacienți pot beneficia de acest tratament. Pentru a caracteriza imunogenicitatea tumorilor am măsurat complexe imune circulante după tratament cu cisplatin și după administrarea unui anticorp monoclonal anti PD-1. Complexele imune circulante au fost măsurate prin metoda Haskova modificată, urmărindu-se precipitarea cu polietilenglicol (PEG). În lotul investigat s-a constatat o relație direct proporțională între creșterea tumorală și nivelul complexelor imune circulante. Valoarea lor crește ușor după ce tumora ajunge la dimensiuni peste 25 mm și scade după ce o parte a țesuturilor intră în apoptoză și necroză. Prezența acestor complexe imune sugerează antigenicitatea tumorală și faptul că aceasta tumoră poate fi folosită în experimentele ulterioare în care se administrează imunoterapie. Tratamentul cu cisplatin a crescut imunogenicitatea tumorii și implicit și numărul de complexe imune circulante.

Există **limitări ale cercetării** noastre. Astfel, un dezavantaj major al tuturor modelelor tumorale descrise până acum în literatura este că tumorile sunt studiate în termen de câteva săptămâni după inocularea de celule tumorale, în timp ce cancerul uman se dezvoltă într-o perioadă de mai multe luni sau ani. O altă limitare poate fi reprezentată de utilizarea unor anticorpi monoclonali umanizati pe modele murine. Chiar dacă anticorpus monoclonal folosit este umanizat, în studii anterioare pe modele experimentale s-au obținut rezultate care ne-au demonstrat ca nu exista o diferențiere marcantă între receptorii VEGF murini sau umani. Datele din literatura menționează că acest compus poate fi utilizat și în modele murine [31].

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Lucrarea “**Rolul factorului de creștere al endoteliului vascular și al speciilor reactive de oxigen în cancerul ovarian și implicații terapeutice la pacienți cu factori de prognostic negativ**” abordează un subiect de mare interes clinic și teoretic, atât pentru oncologi cât și pentru ginecologi și chirurgi, deoarece carcinomul ovarian se poate asocia cu o morbiditate și o mortalitate importantă.

Studiul prezentat, printr-o documentare minuțioasă, o cazuistică numeroasă, prin evaluarea unor parametri inovatori (dozarea VEGF seric și a parametrilor stresului oxidativ la pacientele cu carcinom ovarian), prin realizarea unui model experimental murin valabil și o cercetare translațională și pluridisciplinară, a reușit să atingă obiectivele de cercetare pe care și le-a propus. La finele lui, se impun următoarele concluzii:

1. Cancerul ovarian în populația studiată (160 paciente urmărite ambispectiv o perioadă mediană de 78 luni, intervalul 7-216 luni) - se asociază cu un **prognostic** infaust, supraviețuirea generală la 5 ani a fost de 59% pentru toate stadiile, iar pentru stadiul IIIC supraviețuirea mediană a fost de 51 luni și pentru stadiul IV de 48 luni.

2. **Tratamentul multimodal** constând din chimioterapie, intervenție chirurgicală și radioterapie poate oferi pacientelor **cele mai bune șanse de supraviețuire**.

3. Studiul clinic a identificat mai mulți **factori de prognostic negativ**: statusul ≥ 1 de performanță la diagnostic al bolnavei, trombocitoza, prezența ascitei, gradul de diferențiere al tumorii, subtipul histopatologic seros sau mucinos față de cel endometrioid, statusul menopauzal, prezența și cantitatea bolii reziduale.

4. Mulți dintre acești **factori** cum ar fi **trombocitoza, statusul menopauzal** nu au fost studiați extensiv în literatura de specialitate și aduc noutate și originalitate tabloului factorilor prognostici în cancerul ovarian.

5. Identificarea acestor factori prognostici, ne-a permis realizarea unei **stratificări prognostice a pacientelor cu carcinom ovarian**. S-a elaborat un **scor prognostic original** care include cinci factori pentru care se acordă un punct:

- statusul de performanță ECOG ≥ 1 ,
- prezența ascitei,
- statusul menopauzal,
- prezența tumorii reziduale după intervenția chirurgicală,
- prezența trombocitozei.

Scorul prognostic propus de actuala teză de doctorat poate fi util în viitor în practica medicală prin identificarea pacienților cu factori de prognostic negativ la care tratamentul trebuie particularizat prin escaladarea modalităților terapeutice. Acest scor necesită validare ulterioară prin studii pe loturi și mai ample de pacienți urmăriți prospectiv. Identificarea unor factori de prognostic negativi clinici și elaborarea scorului prognostic pot avea în viitor și un impact economic, contribuind la o mai bună evaluare a prognosticului acestor pacienți, fără costuri suplimentare.

6. Studiul de față a evaluat **magnitudinea rolului VEGF și a stresul oxidativ** la pacienți cu cancer ovarian și este primul care raportează relația cu factorii clinici și paraclinici prognostici precum și relația cu factorii angiogenici și răspunsul la tratamentul cu săruri de platină. Valorile VEGF au fost mult crescute la pacienții cu carcinom ovarian. Valorile VEGF au fost semnificativ statistic mai mari la pacienți care au prezentat **tumora macroscopică reziduală** în comparație cu pacienții fără tumoră reziduală acesta dovedind că tumora secretă VEGF.

7. Am identificat o **corelație pozitivă, semnificativă statistic, între valorile VEGF ca marker de angieneză și ROS**, reprezentați de **peroxidarea lipidică** și respectiv **ceruloplasmină**.

8. În studiul de față am validat **VEGF ca factor prognostic**. Intervalul mediu până la progresia bolii a fost semnificativ statistic mai mic pentru pacienții cu valori ale VEGF între 750 și 1200 pg/ml și cu valori peste 1200 pg/ml comparativ cu cele cu valori normale ale VEGF. Valorile crescute ale VEGF s-au asociat cu un risc de 2,6 ori mai mare de progresie a bolii față de valorile normale (HR= 2,60, 95% CI 1,69-3,99).

9. Am identificat de asemenea o **valoare de cut-off a VEGF de 948 pg/ml**, cu sensibilitate 84% și specificitate 71% pentru estimarea timpului mediu până la progresia bolii, și un cut-off pentru supraviețuirea mediană de 966 pg/ml specificitatea de 77% și sensibilitatea de 52%, pe baza analizei prin curbele ROC.

10. Am identificat o **valoare cut-off a VEGF de 1085 pg/ml**, cu sensibilitate 86% și specificitate 80% pentru estimarea rezistenței la terapia cu săruri de platină ceea ce arată importanța studiului pentru terapia actuală a cancerului ovarian.

11. Analiza parametrilor de stres oxidativ la un grup de 48 pacienți urmăriți prospectiv a arătat că **malondialdehida și ceruloplasmina serice au avut valori mai mari decât normalul**, în schimb antioxidanții și tiolii albuminici au înregistrat valori mai scăzute decât normalul, ceea ce dovedește dezechilibrul dintre factorii pro-oxidanți (în exces) și antioxidanți.

12. Valorile medii ale **malondialdehidei și ceruloplasminei** serice au fost semnificativ statistic mai mari la pacienții **cu tumoră reziduală macroscopică** comparativ cu pacienții fără tumoră reziduală, studiul prezent dovedind că tumora este inductoare de stres oxidativ.

13. **Malondialdehida** poate fi utilizată ca **marker de prognostic** pentru estimarea evoluției pacientelor cu neoplasm ovarian. Pacientele cu valoarea malondialdehidei sub 8 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ au avut timpul până la progresia bolii și supraviețuirea generală semnificativ statistic mai bună decât cele cu valoarea între 8-12, sau peste 12 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$. Rolul malondialdehidei ca factor prognostic a fost validat și prin folosirea curbelor ROC.

14. Valorile **malondialdehidei** au fost semnificativ statistic mai mari în cazul pacientelor rezistente la terapia cu săruri de platină și asemănătoare pentru pacientele cu sensibilitate intermediară sau sensibile la sărurile de platină – evidențiind rolul malondialdehidei în predicția rezistenței la terapia cu sărurile de platină.

15. A fost obținut un **modelul experimental murin** în care s-a urmărit inducerea unei tumori, rata de creștere a acesteia, precum și răspunsul la diferiți agenți chimioterapici, anti-angiogenici, antioxidanți și imunoterapici.

16. **Determinarea în ser și în țesutul tumoral** a parametrilor de stres oxidativ după administrarea unui compus anti-angiogenic a relevat o scădere a valorilor malondialdehidei, și a antioxidanților, ce confirmă că ROS au valoare de molecule semnal în inducerea angiogenezei, iar eficiența tratamentului cu un agent anti-angiogenic poate fi monitorizată prin determinările parametrilor prezentați și investigați.

17. În culturi celulare, administrarea flavonoidului **quercetina** a redus stresul oxidativ. Caracterizarea balanței redox în culturi celulare după administrarea quercetinei a înregistrat o scădere a nivelului peroxizilor lipidici, sugerându-se faptul ca quercetina are acțiune antioxidantă inițial, dar acumularea în timp poate determina un profil oxidant.

18. Valoarea complexelor imune circulante, ca marker al imunogenității tumorilor, a crescut ușor până când tumora a ajuns la dimensiuni de 25 mm și a scăzut după ce o parte a țesuturilor a intrat în apoptoză și necroză.

19. Creșterea imunogenității prin administrarea de agenți chimioterapici cum ar fi Cisplatinul poate crește eficiența imunoterapiei.

Contribuțiile personale rezultate din prezenta cercetare doctorală sunt numeroase:

- Studiu de mare anvergură, cu urmărire pe termen lung a evoluției din punct de vedere oncologic a pacientelor cu carcinom ovarian din România;

- Identificarea unor noi factori de prognostic negativi pentru evoluția carcinomului ovarian, atât clinici cât și paraclinici inovativi (VEGF, ROS) [14]. Factorii de prognostic negativi identificați au fost prezentați în capitolul 5, iar influența statusului menopauzal asupra evoluției carcinomului ovarian a fost deja publicată într-o prestigioasă revistă românească cotate ISI [14];
- elaborarea unui scor prognostic original care include cinci factori de prognostic negativ pentru care se acordă un punct;
- cuantificarea în premieră a importanței radioterapiei în terapia multimodală a cancerului ovarian, rezultate prezentate la o prestigioasă manifestare internațională și publicate sub forma de abstract [13].
- studierea extensivă a rolului VEGF în oncologie în general și în special în cancerul ovarian [32] cu identificarea corelației între VEGF și tumora reziduală precum și identificarea VEGF ca marker de prognostic – Capitolul 6;
- identificarea unei valori de cut-off a VEGF cu bună sensibilitate și specificitate pentru estimarea timpului mediu până la progresia bolii și a rezistenței la terapia cu săruri de platină;
- identificarea rolului speciilor reactive de oxigen, în special al malondialdehidei, care corelează cu tumora reziduală, precum și identificarea malondialdehidei ca factor de prognostic negativ în cancerul ovarian și pentru estimarea rezistenței la săruri de platină.
- studierea răspunsului la inhibitorii de angiogeneză atât în clinica mai multor neoplazii [11] cât și în cancerul ovarian, [32-35] rezultate prezentate în Capitolul 7 și crearea unui model experimental murin pe care a fost studiat răspunsul la terapie și variația VEGF și ROS în funcție de răspunsul terapeutic.

Datele obținute au fost valorificate prin publicare *in extenso* în reviste cu peer review, atât reviste cotate ISI (2 articole), cât și în reviste indexate în baze de date internaționale (2 articole), precum și prezentate la prestigioase manifestări internaționale și publicate sub formă de abstract.

Îmi propun pentru viitor să continui actuala cercetare prin înrolarea unui număr și mai mare de pacienți urmărită prospectiv și cărora să le evaluăm valorile VEGF ca marker de angiogeneză și ROS, în vederea validării atât a scorului prognostic elaborat actual, cât și a utilității VEGF și malondialdehidei ca factori de prognostic negativ și predictivi ai rezistenței la terapia cu săruri de platină și imunoterapie.

În concluzie, evaluarea VEGF și a speciilor reactive de oxigen (în special malondialdehida), pot deveni instrumente utile în stratificarea prognosticului pacienților cu

carcinom ovarian și în decizia terapeutică la aceste paciente cu mortalitate ridicată. Scorul prognostic clinic (bazat pe statusul de performanță ECOG ≥ 1 , prezența ascitei, statusul menopauzal, prezența tumorii reziduale după intervenția chirurgicală, prezența trombocitozei) și evaluarea VEGF și respectiv a malondialdehidei, vor permite oncologilor ginecologilor și chirurgilor identificarea mai precoce a pacientelor cu factori de prognostic negativ, la care tratamentul trebuie particularizat prin escaladarea modalităților terapeutice, cu reducerea în viitor a morbidității și mortalității acestor paciente.

Bibliografie selectivă

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7-30.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7-34.
4. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351: 2519-29.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11-30.
6. Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 961-8.
7. Loizzi V, Del V, V, Gargano G et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
8. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-49.
9. Yadav L, Puri N, Rastogi V et al. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: XE01-XE05.
10. West JB. Physiological Effects of Chronic Hypoxia. *N Engl J Med* 2017; 376:1965-71.
11. Trifanescu RA, **Trifanescu OG**, Goldstein A et al. Sunitinib, A Vegfr Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor and Its Thyroid Effects. *Farmacia* 2018; 66: 331-6.
12. Burger RA. Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 230-8.
13. Anghel R, Bacinschi X, Gales L, **Trifanescu O** et al. To Irradiate or Not to Irradiate in Ovarian Cancer? *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2018; 102: E657.
14. **Trifanescu OG**, Gales LN, Trifanescu RA et al. Clinical Prognostic Factors in Pre- and Post-Menopausal Women with Ovarian Carcinoma. *Acta Endocrinologica-Bucharest* 2018; 14: 353-9.
15. Vergote I, Trope CG, Amant F et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 943-53.
16. Kehoe S, Hook J, Nankivell M et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2015; 386: 249-57.

17. Arians N, Kieser M, Benner L et al. Adjuvant Intensity Modulated Whole-Abdominal Radiation Therapy for High-Risk Patients With Ovarian Cancer Stage III FIGO): First Results of a Prospective Phase 2 Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017; 99: 912-20.
18. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E et al. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009; 115: 1234-44.
19. Chan JK, Tian C, Monk BJ et al. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2008; 112: 2202-10.
20. Ataseven B, Grimm C, Harter P et al. Prognostic impact of debulking surgery and residual tumor in patients with epithelial ovarian cancer FIGO stage IV. *Gynecol Oncol* 2016; 140: 215-20.
21. Jung EJ, Eom HM, Byun JM et al. Different features of the histopathological subtypes of ovarian tumors in pre- and postmenopausal women. *Menopause* 2017; 24: 1028-32.
22. Bandiera E, Franceschini R, Specchia C et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor serum determination in women with ovarian cancer. *ISRN Obstet Gynecol* 2012; 2012: 245756.
23. Komatsu H, Oishi T, Itamochi H et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-A as a Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27: 1325-32.
24. Guo BQ, Lu WQ. The prognostic significance of high/positive expression of tissue VEGF in ovarian cancer. *Oncotarget* 2018; 9: 30552-60.
25. Saed GM, Diamond MP, Fletcher NM. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2017; 145: 595-602.
26. Egea J, Fabregat I, Frapart YM et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol* 2017; 13: 94-162.
27. Didziapetriene J, Bublevic J, Smailyte G et al. Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. *Medicina (Kaunas)* 2014; 50: 204-8.
28. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-40.
29. Romero FJ, Ordonez I, Arduini A et al. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thiyl radical intermediates. *J Biol Chem* 1992; 267: 1680-8.
30. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1309-15.
31. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65: 671-680.
32. **Trifanescu OG**, Anghel R. Antiangiogenic Treatment in Ovarian Cancer in the Era of Evidenced-Based Medicine. *Maedica (Buchar)* 2015; 10: 376-81.
33. **Trifanescu O**, Gruia MI, Gales L et al. Tumor is an Oxidative Stress Factor in Ovarian Cancer Patients. *Chirurgia (Bucur)* 2018; 113: 687-94.

34. Gales LM, Maricela AR, **Trifanescu O** et al. Results obtained from the association of boron neutron capture therapy with bevacizumab. Journal of Clinical Oncology 2016;
35. Anghel R, Gales L, Gruia MI, **Trifanescu O** et al. Reactive oxygen species in patients with ovarian adenocarcinoma treated with platinum based chemotherapy. Journal of Clinical Oncology 2017; 35.

Articole publicate *in extenso* în reviste cotate ISI și BDI

1. **Trifanescu OG**, Galeș LN, Trifanescu RA, Anghel RM. Clinical Prognostic Factors in pre-and Post-Menopausal Women with Ovarian Carcinoma. Acta Endocrinologica (Buc), 2018; 14:353-359, ISSN: 1841 – 0987, IP= 0.411, ISI.
2. **Trifanescu O**, Gruia MI, Gales L, Trifanescu R, Anghel R. Tumor is an Oxidative Stress Factor in Ovarian Cancer Patients. Chirurgia (Bucur). 2018 Sept-Oct; 113(5):687-694, ISSN: 1221-9118, CNCSIS B+.
3. Trifanescu RA, **Trifanescu OG**, Goldstein A, Purice M, Anghel R, Poiana C, Sunitinib, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor and its thyroid effects. Farmacia 2018, Vol. 66, 2:331-332, ISSN: 0014-8237, IP= 1.507, ISI
4. Bacinschi XE, Ilie SM, **Trifanescu OG**, Serbanescu GL, Botnariuc I, Curea F, Orlov C, Anghel RM. Rare Pelvic Malignant Tumors in Adults: Treatment Features and Clinical Outcome in Nonmetastatic Disease (Single Institution Experience). Cancer Biother Radiopharm. 2018 Nov 28, ISSN: 1084-9785, IP= 1.682, ISI.
5. **Trifanescu OG**, Anghel R. Antiangiogenic Treatment in Ovarian Cancer in the Era of Evidenced-Based Medicine. Maedica (Buchar). 2015 Sep;10(4):376-381. ISSN: 1841-9038, CNCSIS B+.