

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



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

***ELECTROCHIMIOTERAPIA TUMORILOR
GLANDULARE***

***- metode de optimizare a culturilor celulare 3D pentru
evaluarea efectului imunogen al ECT prin IHC -***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ZĂGREAN LEON

Student-doctorand:

MATEI MIRCEA BOGDAN

2024

CUPRINS

Introducere.....	3
I. PARTE GENERALĂ.....	4
1. Culturi celulare 3D	4
2. Electroporare și electrochimioterapie (EP și ECT)	5
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	7
1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	7
2. Metodologie generală: Protocoale personalizate pentru generarea sferoizilor, analiza imaginilor și procesarea IHC.....	9
3. Obținerea protocoalelor personalizate pentru creșterea sferoizilor și stabilirea parametrilor morfologici pentru evaluarea creșterii acestora.....	10
4. Producția de sferoizi MCF7 pentru monitorizare de lungă durată, în vederea electroporării lor și a co-culturii cu monocite.....	12
5. Electrochimioterapia sferoizilor de SHSY-5Y și U87 co-cultivați cu monocite	13
6. Evaluarea TNF – α și a interleukinei 10 pe sferoizi U87 co-cultivați cu monocite după aplicarea ECT	15
7. Metodă optimizată de procesare a culturilor celulare 3D de tip sferoizi în matrice de microgodeuri pentru analiza imunohistochimică.....	17
8. Concluzii.....	19
9. Contribuții personale	20
10. Perspective.....	22

Introducere

Electrochimioterapia (ECT) reprezintă o abordare inovatoare în terapia oncologică ce combină medicamentele chimioterapice și impulsurile electrice pentru a le îmbunătăți livrarea și citotoxicitatea. Pentru a optimiza aplicarea electrochimioterapiei (ECT), este esențial să se obțină o înțelegere profundă a mecanismelor subiacente la nivelul micromediului tumoral, cum ar fi gradientele de hipoxie, prezența celulelor stem canceroase sau activitatea sistemului imun. Deși există diverse modele experimentale, aspecte legate de implicarea sistemului imun celular în ECT sunt încă limitate, în special în ceea ce privește țesuturile glandulare. Prin adaptarea electrochimioterapiei (ECT) în tratamentul culturilor de sferoizi 3D modelați pentru răspunsul celular imun, se creează premisele pentru o înțelegere mai profundă a morții celulare imunogenice induse prin electroporare. Imuno-electrochimioterapia (*i*-ECT) reprezintă în prezent un domeniu important de cercetare științifică oncologică și a generat studii clinice aflate în desfășurare.

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea și caracterizarea sferoizilor derivați din diferite linii celulare utilizând tehnici optimizate, precum metoda hanging drop sau suprafețele ultra-adherente din agaroză. Introducerea monocitelor, a electroporării (EP) și a electrochimioterapiei (ECT) în acești sferoizi ne-a permis să investigăm impactul acestora asupra comportamentului și viabilității sferoizilor. Prin aplicarea de impulsuri electrice împreună cu agenți chimioterapeutici, am urmărit să evaluăm eficiența absorbției medicamentelor și efectele citotoxice induse de celulele imune. S-a putut optimiza o metodă de analiză morfometrică semiautomatizată, prin imagini de microscopie optică, și s-a realizat o metodă de creșterii a randamentului evaluării culturilor celulare 3D în cadrul tehnicilor de analiză moleculară, precum imunohistochimia (IHC), propunând o procedură de încorporare a sferoizilor în matrice de microgodeuri din agaroză, permițând procesarea simultană și multiplă a probelor de sferoizi. De asemenea, teza abordează aspecte cheie ale microfiziologiei și structurii microambientului tumoral. Fezabilitatea acestei metode a fost testată utilizând celule de glioblastom U87, adenocarcinom de colon CaCo2 și adenocarcinom MCF7, cu mai multe teste IHC efectuate pe modelele 3D, menținând totodată trasabilitatea la nivel de godeu. Această cercetare a avut ca scop oferirea de perspective noi asupra integrării ECT în studiile pe sferoizi 3D și reducerea decalajului dintre experimentele *in vitro* și aplicațiile clinice, fiind de asemenea motivată de noua politică adoptată de FDA privind cele 3

"R" în cercetarea științifică (Înlocuire, Reducere, Rafinare). Astfel, aceasta ar putea deschide calea atât pentru cercetări eficiente în domeniul cancerului, cât și pentru strategii de tratament.

I. PARTE GENERALĂ

1. Culturi celulare 3D

Modelele biologice 3D actuale includ animale intacte, organe și culturi celulare 3D in vitro încorporate în geluri funcționalitate cu matrice extracelulară. Aceste modele oferă informații specifice țesuturilor la diferite niveluri de complexitate, fiind esențiale metode fiabile de cultivare și analiză a acestor probe, împreună cu tehnicile avansate de imagistică, capabile să analizeze probe de sute de micrometri grosime. Modelele 3D in vitro promovează niveluri mai ridicate de diferențiere celulară, organizare tisulară și răspuns la medicamente sau stimuli, depășind limitările culturilor 2D. Introducerea tehnicilor 3D a îmbunătățit capacitatea noastră de a imita mai bine condițiile fizice și biochimice ale țesuturilor, contribuind la o mai bună înțelegere a dezvoltării cancerului, a rezistenței la medicamente și a răspunsurilor terapeutice.

Culturile celulare 3D creează structuri care imită îndeaproape condițiile găsite in vivo, permițând interacțiuni celulare complexe și răspunsuri la stimulii din mediul înconjurător. Aceste culturi se caracterizează prin agregate celulare care duc la difuzia neomogenă a oxigenului și a nutrienților, creând subpopulații de celule proliferative, dormante și necrotice. Această complexitate a condus la utilizarea lor pe scară largă în studiile privind metastazele, invazia celulară, rezistența la terapie și ingineria tisulară[1].

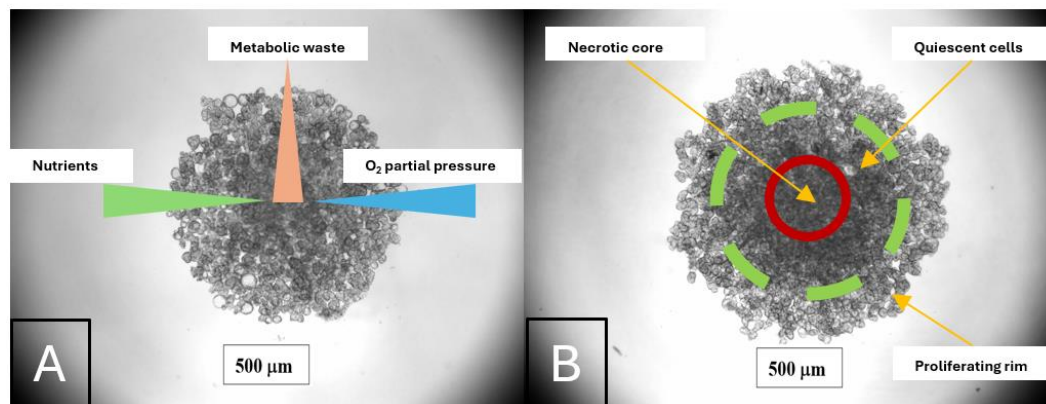


Fig. 1.1 Sferoizi MCF7 și reprezentarea grafică a unor gradiente chimice relevante (A) și a unor proprietăți particulare de creștere (B) (obiectiv 4×, scala 500 μm)(adaptat după [2], cu acordul Mary Ann Liebert, Inc. nr. 5862260517385).

Există mai multe categorii de modele de cultură 3D, inclusiv sferoizi derivați din tumori, assembloide și sisteme tumor-on-a-chip. Explantele tisulare ex-vivo, modelele sferoidale și tumorozii oferă grade variate de complexitate și perspective asupra comportamentului tumorilor. Tehnici precum bioprintarea 3D și platformele body-on-a-chip permit o replicare mai precisă a microambientului tisular și a interacțiunilor acestuia. Aceste tehnici sunt deosebit de utile pentru medicina personalizată, testarea medicamentelor și studiile preclinice, oferind o acuratețe predictivă îmbunătățită și reducând rata de eșec a medicamentelor în studiile clinice.

Există diferite metode de creare a culturilor 3D, clasificate în tehnici bazate pe suport, fără suport și pe bioprintare. Abordările bazate pe suport folosesc materiale biocompatibile pentru a susține creșterea celulară, în timp ce metodele fără suport promovează autoatașarea celulelor fără biomateriale de sprijin. Bioprintarea 3D permite depunerea precisă a celulelor pentru a construi structuri asemănătoare țesuturilor, oferind o platformă eficientă pentru testarea medicamentelor și modelarea bolilor. Aceste modele sunt aliniate cu eforturile de reglementare și de a reduce testarea pe animale și de a îmbunătăți dezvoltarea preclinică a medicamentelor.

Evaluarea morfometrică pe baza imaginilor de microscopie a culturilor 3D sunt esențiale pentru înțelegerea proceselor biologice și a proprietăților de micromediu. Tehnici precum microscopia confocală sau imagistica prin rezonanță magnetică sunt utilizate pentru a analiza sferoizii 3D. Analiza automată a imaginilor a devenit esențială pentru a transforma datele calitative în perspective cuantificabile, îmbunătățind reproducibilitatea și eficiența. Pe măsură ce tehnicile de imagistică avansează, ele permit o analiză mai precisă și detaliată a culturilor 3D, mai ales a zonelor profunde ceea ce este crucial pentru cercetarea biomedicală.

Sistemele de cultură 3D sunt integrate din ce în ce mai mult în testarea avansată a terapiilor, inclusiv electroporarea și electrochimioterapie. În ciuda progreselor, persistă provocări, cum ar fi necesitatea unor sisteme îmbunătățite care să poată produce rapid și stoca un număr mare de sferoizi pentru analiză. Automatizarea acestor procese este esențială pentru a îmbunătăți reproductibilitatea și a reduce variabilitatea în cadrul experimentelor [3].

2. Electroporare și electrochimioterapie (EP și ECT)

Electroporarea este procesul prin care câmpurile electrice pulsate (PEF) induc modificări structurale în membrana celulară, creând căi pentru ca moleculele să intre în celule [4]. Membrana plasmatică acționează ca un strat izolator care permite selectiv trecerea moleculelor

polare. Interacțiunea dintre câmpurile electrice și structurile biologice are aplicații în tratamentul cancerului, terapia genică, vindecarea rănilor și dezinfectarea bacteriană. Modelarea matematică a ajutat la definirea parametrilor cheie ai PEF, cum ar fi amplitudinea, durata, forma și frecvența de repetare, care permit permeabilizarea reversibilă sau ireversibilă a membranei celulare. Electroporarea ireversibilă (IRE) provoacă moartea celulară și este utilizată în tehnicile de ablație non-termică, în special pentru tratarea leziunilor din apropierea structurilor critice.

În aplicațiile biomedicale, electroporarea permite introducerea și extracția moleculelor. Electroporarea reversibilă, utilizată în mod obișnuit în electrochimioterapie (ECT), permite permeabilizarea membranelor celulare, permițând medicamentelor anticancerogene precum bleomicina să pătrundă și să lizeze celulele tumorale. Electrotransferul genetic (GET) folosește impulsuri lungi pentru a introduce în celule molecule încărcate electric, utile pentru terapia genică. Electroporarea ireversibilă este aplicată în terapiile de ablație pentru cancer, păstrând structurile esențiale ale țesuturilor în timp ce distruge celulele vizate. Aplicarea PEF în ECT combină impulsurile electrice cu medicamentele chimioterapeutice pentru a crește eficacitatea acestora permițând pătrunderea medicamentului în celulele tumorale.

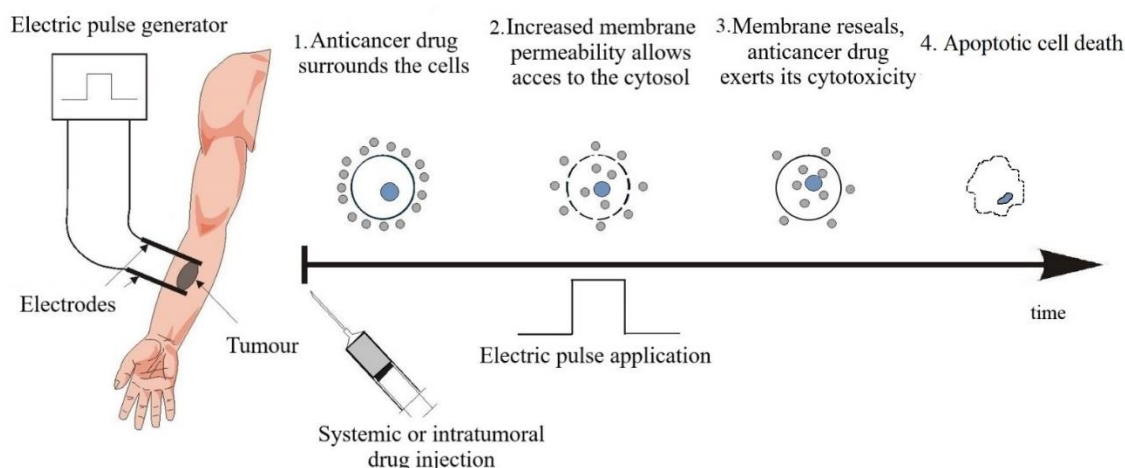


Fig. 2.1 Principalele etape ale unei proceduri ECT sunt: i/administrarea prin injecție intravenoasă sau locală a medicamentului anticanceros, ii/aplicarea de impulsuri electrice specifice care facilitează pătrunderea medicamentului în citoplasma celulară, iii/resigilarea membranei celulare, iv/moartea celulelor mitotice a celulelor canceroase (Published by G.Sersa, 2007[5], modificat cu permisiunea Elsevier, licență nr 5862110778627)

Electrochimioterapia (ECT) este un tratament care combină chimioterapie în doze mici și impulsuri electrice pentru a crește absorbția medicamentelor în celulele canceroase. Tehnica se

bazează pe electroporarea reversibilă pentru a permite medicamentelor să pătrundă în membranele celulare, ducând la moartea țintită a celulelor canceroase. ECT este din ce în ce mai utilizat pentru tratarea tumorilor inoperabile și a metastazelor, peste 150 de spitale din întreaga lume implementându-l în practica clinică. Oferă beneficii precum doze reduse de chimioterapie și efecte secundare minime.

ECT a fost, de asemenea, propusă ca o metodă de "vaccinare in-situ" datorită capacității sale de a induce moartea celulară imunogenă (ICD). Acest lucru stimulează un răspuns imun sistemic, oferind potențial pentru terapii combinate cu imunoterapii, cum ar fi inhibitorii punctului de control imunitar (ICI). Combinarea ECT cu imunoterapia (denumită i-ECT) este un domeniu emergent de cercetare, care are ca scop îmbunătățirea răspunsurilor antitumorale locale și sistemice.

Perspectivile pentru EP, ECT și i-ECT în îmbunătățirea imunoterapiei și a medicinei personalizate sunt promițătoare. Standardizarea procedurilor pentru ECT continuă să evolueze, cu accent pe minimizarea invazivității și optimizarea parametrilor de tratament. Investigarea caracteristicilor tumorale și a micromediului tumoral poate îmbunătăți și mai mult practica ECT prin identificarea biomarkerilor predictivi pentru tratament. Cercetarea în curs de desfășurare este crucială pentru îmbunătățirea eficacității ECT și a combinației sale cu imunoterapia, cu potențialul de a revoluționa tratamentul cancerului. Progresele în înțelegerea biologiei tumorilor și a răspunsurilor imune vor sprijini dezvoltarea de tratamente oncologice personalizate.

În concluzie, explorarea în continuare a biomarkerilor, a micromediului tumoral și a răspunsurilor imune împreună cu ECT și imunoterapie va îmbunătăți rezultatele tratamentului, oferind noi căi pentru tratamentul personalizat al cancerului și avansarea oncologiei clinice [6].

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Studiile doctorale au constatat în cinci părți, cu o evoluție progresivă după cum urmează:

Studiul 1: Obținerea sferoizilor monotipici și heterotipici viabile din mai multe linii celulare pentru cultivarea cu monocite umane proaspete și testarea protocolului EP (Cap. 5)

Studiul 2: Obținerea sferoizilor MCF7 și testarea protocolului EP (Cap. 6)

Studiul 3: Sferoidele SHSY-5Y și U87 pentru protocolul EP și ECT (Cap. 7)

Studiul 4: Evaluări TNF-a și IL-10 de la sferoidele U87 post-ECT (Cap. 8)

Studiul 5: Obținerea unei metodologii optimizate cu costuri reduse pentru procesarea și testarea sferoizilor din liniile celulare MCF7 și U87 (Cap. 9)

Scopul principal al acestei teze a fost acela de a dezvolta o abordare optimizată pentru producerea sferoizilor în medii cu atașament ultra-scăzut. Această metodă a implicat testarea mediilor specifice de creștere pentru obținerea unor tipuri specifice de cultură 3D din mai multe linii celulare și evaluarea impactului prezenței monocitelor în culturi 3D heterotipice, după expunerea la electroporare (EP) și electrochimioterapie (ECT, - așa cum este aplicat în condiții clinice). Evaluarea a fost efectuată prin analiza morfometrică semiautomată a imaginilor de microscopie optică și prin evaluări imunohistochimice (IHC). Densitatea celulară, producția de matrice extracelulară, efectele citotoxice au variat în funcție de durata creșterii și tipul de expunere la EP și ECT, astfel încât aceste efecte au putut fi cuantificate în timp și răspunsurile la tratament au putut fi definite.

Știind că există un răspuns al sistemului imunitar celular în timpul ECT încă din cercetarea preclinică, am dorit să evaluăm efectul asupra creșterii sferoizilor în condiția de co-cultură a acestora cu monocite, așa cum a fost determinat de evaluările IL 10 și TNF-alfa. În plus, am dorit să oferim un protocol optimizat și cu costuri reduse pentru procesarea simultană a unui lot a 48 de probe în IHC, oferind astfel un instrument important în procesarea probelor derivate din pacienți și a altor culturi celulare 3D mai mici de 1 mm.

În primul rând, am stabilit mai multe protocoale personalizate de cultură 3D, cum ar fi hanging-drop sau pe strat ne-aderent de agaroză, pentru mai multe linii celulare, cum ar fi MCF7, U87, SHSY-5Y, A375, NIH 3T3, DC3F, CaCo2. Lucrarea este prezentată în Studiul 1: (Cap. 5)

Ulterior, am definit condițiile adecvate de creștere, cum ar fi suprafețele de creștere, tipurile de mediu de creștere, timpul de creștere și evaluările morfometrice pe imagini de microscopie optică testând diferite condiții de electroporare și electrochimioterapie cunoscute pentru facilitarea unui răspuns imun celular prin activarea monocitelor. Activarea monocitelor a fost evaluată prin testarea pe bază ELISA a IL-10 și TNF-a. În cele din urmă, am dezvoltat o metodologie pentru procesarea loturilor de sferoizi multipli în imunohistochimie.

2. Metodologie generală: Protocoale personalizate pentru generarea sferoizilor, analiza imaginilor și procesarea IHC

Studiul a fost realizat la Centrul de Excelență în Biofizică și Biotehnologie Celulară, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București. Toate procedurile experimentale au urmat protocoale stricte de risc biologic sub supraveghere, fără a fi necesară aprobarea etică, deoarece cercetarea a folosit linii celulare stabilite de la bănci de celule recunoscute precum ATCC.

Linii celulare

Au fost utilizate mai multe linii celulare, fiecare cu caracteristici specifice și condiții de creștere. Acestea au inclus linii celulare non-maligne precum NIH3T3 (fibroblaste de șoarece), DC3F (fibroblaste pulmonare de hamster) și Hs27 (fibroblaste ale pielii umane). Liniile maligne au inclus B16F10 (melanom de șoarece), A375 (melanom uman), CaCo-2 (adenocarcinom de colon uman), MCF7 (adenocarcinom de sân uman), SHSY-5Y (neuroblastom uman) și U87 MG (glioblastom uman). Pentru formarea sferoizilor 3D, au fost utilizate două protocoale: metoda picăturii suspendate și creșterea pe suprafețe ne-aderente acoperite cu agaroză.

Condiții de creștere celulară a sferoizilor

Pentru tehnica picăturii suspendate, celulele din culturile 2D au fost recoltate, numărate și însămânțate în picături pe fața internă a capacului unei plăci Petri pentru incubare de până la 10 zile. În metoda de cultură pe suprafețe acoperite cu agaroză, plăcile cu 96 de godeuri au fost acoperite cu o soluție sterilă de agaroză 1% pentru a crea o suprafață neaderentă pentru cultura 3D. Celulele au fost însămânțate în plăci de 96 de godeuri cu fund rotund, iar culturile au fost monitorizate. În ceea ce privește evaluarea activității metabolice a sferoizilor, s-a testat posibilitatea aplicării testelor de tip fragmentarea ADN-ului, testul metabolic LDH și dozarea proteinelor totale. Acestea au fost adaptate pentru evaluarea unui tip de cultură sferoidală. La sfârșitul experimentului, sferoizii au fost fixați cu paraformaldehidă.

Imaginile sferoizilor au fost capturate folosind microscop vertical și inversat, în funcție de metoda de cultură. Software-ul ImageJ a fost folosit pentru analiza preliminară, dar OrganoSeg, un plugin software specializat mATLAB, a fost folosit pentru segmentarea și analiza mai precisă a sferoizilor în timp. Au fost calculați diverși parametri morfologici și statistici, iar datele din imaginile segmentate au fost exportate pentru analize ulterioare.

Pentru izolarea monocitelor s-a preluat sânge colectat în vacutainere, iar zona de buffy-coat a fost izolată și procesată folosind centrifugarea în gradient (Histopaque) și un kit de separare

imunomagnetică MojoSort™. Monocitele au fost utilizate proaspete în protocoale dedicate de co-cultură 3D cu sferoizi.

Electroporarea a fost efectuată folosind un Cliniporator® B-Tech cu setări specifice, inclusiv o amplitudine a impulsului de 400V și o frecvență de repetare de 1 Hz. Sferoizii au fost preluați în PBS, apoi transferați în cuve de electroporare și supuși la 8 impulsuri bipolare dreptunghiulare. După procedură, sferoizii au fost readuși în plăcile de cultură pentru monitorizare.

A fost proiectată o matriță personalizată și imprimată 3D pentru a crea o matrice de microgodeuri din agaroză. Această matrice a fost utilizată pentru a încorpora sferoizi pentru evaluare imunohistochimică simultană a unui întreg lot experimental. Rețeaua de microgodeuri a fost umplută cu sferoizi, iar paraformaldehida a fost înlocuită cu agaroză cu topire scăzută pentru a sigila sferoizii înainte de depozitare în vederea IHC.

Toate datele au fost organizate folosind Microsoft Excel, cu analize statistice efectuate în Origin 8.0. Imaginile și graficele au fost procesate și în PowerPoint pentru prezentare și analiză.

3. Obținerea protocoalelor personalizate pentru creșterea sferoizilor și stabilirea parametrilor morfologici pentru evaluarea creșterii acestora

Cultivarea sferoizilor pentru diverse studii de screening sau pilot se bazează de obicei pe metoda picăturii suspendate sau pe suprafețele de atașare neaderente create prin depozitarea unui strat subțire de agaroză. Aceste două tehnici sunt rentabile și ușor de implementat, promovând interacțiuni esențiale celulă la celulă și celulă-matrice. Diferența cheie dintre metode constă în viabilitatea sferoizilor: tehnica picăturii suspendate limitează creșterea la 4-6 zile, în timp ce suprafața neaderentă agaroză oferă o viabilitate mai lungă.

Obiectivele studiului au fost:

- Testarea și optimizarea tehnicilor de acoperire cu agaroză pentru formarea sferoizilor
- Generarea protocoalelor pentru sferoizi homotipici și heterotipici din diferite tipuri histologice și validarea lor în vederea electroporării
- Monitorizarea integrității și a creșterii sferoizilor folosind imagini de microscopie optică și analiza morfometrică semi-automată

Testarea posibilității de aplicare pentru sferoizi a testelor metabolice și de viabilitate standardizate utilizate în culturile 2D

Formarea sferoizilor folosind metoda picăturii suspendate a fost testată pe linii celulare de fibroblaste NIH3T3 și DC3F, în timp ce metoda suprafețelor de atașare neaderente cu agaroză a fost testată pe celule de melanom NIH3T3, B16F10 și A375. Electroporarea a fost aplicată sferoizilor formați prin picătură suspendată ale celulelor NIH3T3 și DC3F folosind un protocol modificat, iar eficacitatea a fost verificată prin absorbția intracelulară și autofluorecența iodurii de propidiu (PI). Au fost efectuate mai multe studii pentru a compara formarea sferoizilor și condițiile de creștere, iar activitatea metabolică a fost evaluată folosind teste LDH.

Au fost efectuate nouă studii preliminare:

- Formarea sferoizilor prin picături suspendate, din celulele NIH3T3 și DC3F cu volume și concentrații celulare diferite.
- Comparație a godeurilor acoperite cu agaroză de 2% și 3% pentru sferoizii NIH3T3 și B16F10.
- Testarea formării sferoizilor A375 în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu agaroză.
- Testarea formării sferoizilor A375 pe suprafețe neaderente cu colagen și în mediu care conține colagen.
- Co-cultivarea celulelor NIH3T3 și A375 în diferite rapoarte pentru a forma sferoizi heterotipici.
- Electroporare aplicată sferoizilor DC3F cultivați în godeuri acoperite cu agaroză.
- Electroporarea aplicată sferoizilor MCF7 cultivați în godeuri acoperite cu agaroză.
- Testele de viabilitate: testul de analiza fragmentării ADN(Comet Assay), LDH și determinarea proteinelor totale, adaptate pentru culturi de sferoizi.
- Testarea diferitelor materiale pentru producția unei matrice de microgodeuri.

Metoda picăturii suspendate a produs sferoizi dincolo de perioada de creștere așteptată de 6 zile, dar au fost observate corpuri apoptotice clare în ziua 10. Metoda de acoperire cu agaroză cu 2% agaroză a avut rezultate mai bune decât cea cu 3% în producerea de sferoizi care au putut fi analizați mai ușor, deoarece agaroză 3% a creat fisuri și bule de aer. Sferoizii NIH3T3 au format structuri robuste, în timp ce B16F10 a dezvoltat agregate mai libere. Sferoizii A375 au necesitat co-cultivare cu fibroblastele NIH3T3 pentru a forma sferoizi heterotipici stabili din cauza incapacității liniei melanomului de a forma matrice extracelulară în medii cu aderență scăzută.

Electroporarea nu a afectat semnificativ creșterea sferoizilor, iar absorbția PI a confirmat permeabilizarea parțială. Testele de viabilitate adaptate din protocoalele 2D au necesitat ajustări pentru mediul sferoid 3D din cauza diferențelor în difuzia nutrienților și absorbția reactivilor.

Metoda picăturii suspendate a permis formarea sferoizilor, dar a oferit o fereastră de timp limitată pentru creștere și un proces laborios de observare. În schimb, metoda de acoperire cu agaroză a extins

perioada de creștere, permițând experimente ulterioare. Suprafețele de colagen au furnizat sferoizi compacți, dar au necesitat mai mult timp pentru a fi pregătite. Un raport minim de 5% de fibroblaste NIH3T3 a fost determinat necesar pentru a forma sferoizi A375 robusti. Protocoalele de electroporare au fost optimizate pentru culturile de sferoizi, iar software-ul OrganoSeg a fost preferat pentru analiza imaginii datorită capacității sale superioare de a delimita sferoizii din zgomotul de fundal în comparație cu ImageJ. Viabilitatea celulară prin evaluarea LDH a evidențiat structura neomogenă a sferoizilor și prezența unei zone necrotice, doar 54% din populația celulară testată fiind viabilă, fapt evidențiat și prin imaginile de fragmentare ADN.

4. Producția de sferoizi MCF7 pentru monitorizare de lungă durată, în vederea electroporării lor și a co-culturii cu monocite

Scopul acestui studiu a fost de a evalua impactul co-culturii de monocite asupra sferoidelor electroporate formate din linia celulară de adenocarcinom MCF7. Obiectivele specifice au fost:

- Formarea sferoizilor MCF7 în conformitate cu protocoalele stabilite în capitolul 5.
- Co-cultura sferoizilor MCF7 cu monocite și analiza morfologică a interacțiunilor acestora.
- Dezvoltarea unui protocol pentru electroporarea sferoizilor și evaluarea impactului EP asupra creșterii sferoizilor heterotipici monocite-MCF7.

Monocitele au fost izolate conform procedurii descrise în capitolul 4.4 și menținute în mediu steril de creștere RPMI până la însămânțare. Sferoizii MCF7 au fost formați folosind acoperirea plăcilor de 96 de godeuri în formă de U cu non-aderente prin acoperirea cu agaroză topită 1%. Celulele MCF7 și monocitele au fost însămânțate într-un raport de 2:1 în 100 μ L de mediu de cultură, iar mediul a fost reîmprospătat după 24 de ore și la fiecare 5 zile după aceea.

Placa a fost împărțită în patru grupuri experimentale pe baza momentului de adăugare a monocitelor: Sferoizi MCF7 ca și lot de control.

Sferoizi MCF7 cu monocite adăugate simultan în momentul însămânțării.

Sferoizi MCF7 cu monocite adăugate ulterior la 24 de ore.

Sferoizi MCF7 cu monocite adăugate ulterior la 48 de ore.

Pentru experimentele de electroporare, celulele MCF7 au fost însămânțate cu monocite în același raport, iar electroporarea a fost efectuată în ziua 21 de creștere urmând protocolul din capitolul 4.4. După electroporare, sferoizii au fost transferați în plăci noi și monitorizați.

Au fost stabilite cu succes protocoale pentru formarea sferoizilor heterotipici cu viață scurtă (14 zile) sau lungă (30 de zile) din celulele MCF7. Monocitele și-au păstrat caracteristicile pe tot parcursul

experimentului, fără modificări morfologice semnificative. Creșterea sferoizilor heterotipici (MCF7+monocite) a prezentat variații în funcție de momentul adăugării monocitelor, cel mai pronunțat efect inhibitor fiind observat atunci când monocitele au fost adăugate simultan cu celulele MCF7 la momentul însămânțării culturii 3D.

Când monocitele au fost introduse în diferite momente de timp, dinamica creșterii sferoizilor a fost diferită. Adăugarea simultană de monocite a dus la o stabilizare inițială a dimensiunii sferoizilor în primele patru zile, urmată de o creștere constantă. Introducerea monocitelor la 24 și 48 de ore a dus la o creștere a sferoizilor similară cu grupul de control până în ziua a patra, după care s-a observat o creștere mai lentă a dimensiunii.

O cultură pe termen lung (30 de zile) a sferoizilor MCF7 cu monocite a fost menținută cu succes, iar electroporarea aplicată în ziua 21 a cauzat o scădere tranzitorie a suprafeței și volumului lor. Cu toate acestea, cinetica de creștere post-EP a fost similară cu grupurile de control, sugerând că EP singură nu modifică semnificativ creșterea pe termen lung în absența chimioterapiei.

Co-cultura monocitelor a influențat dinamica de creștere a sferoizilor MCF7, momentul introducerii monocitelor jucând un rol crucial. Monocitele au părut să inhibe proliferarea celulelor MCF7, cel mai pronunțat efect observat atunci când monocitele au fost adăugate la începutul formării culturii 3D. Electroporarea a determinat o scădere temporară a dimensiunii sferoizilor, probabil din cauza stresului mecanic și a permeabilizării membranei induse de impulsurile electrice. În ciuda acestui efect tranzitoriu, creșterea sferoizilor a fost reluată în mod similar cu grupul de control după EP. Studiile viitoare vor explora impactul EP în prezența agenților chimioterapeutici pentru a înțelege mai bine interacțiunile tumoră-sistem imunitar și pentru a spori eficacitatea ECT.

Acest studiu a dezvoltat cu succes protocoale pentru izolarea monocitelor, formarea sferoizilor MCF7 heterotipice și aplicarea electroporării fără chimioterapie concomitentă. Rezultatele au arătat că prezența monocitelor influențează creșterea sferoizilor, iar EP induce o inhibare temporară a dimensiunii sferoizilor.

5. Electrochimioterapia sferoizilor de SHSY-5Y și U87 co-cultivați cu monocite

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta și valida un model 3D de co-cultură sferoizi/monocite pentru a evalua efectele ECT asupra liniilor celulare de neuroblastom (SHSY-

5Y) și glioblastom (U87) și pentru a explora dacă ECT induce polarizarea monocitelor într-un fenotip M1 antitumoral.

Sferoizi SHSY-5Y s-au format în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu agaroză și au fost electroporate în ziua 15. ECT a fost efectuată cu 8 impulsuri dreptunghiulare bipolare, folosind bleomicină, cisplatină sau temozolomidă ca agenți citotoxici (protocol descries în Cap 4.5). Monocitele au fost adăugate după electroporare și creșterea sferoizilor a fost monitorizată prin microscopie optică. Analiza morfometrică a imaginilor s-a realizat cu ajutorul software-ului OrganoSeg. Același proces a fost urmat și pentru sferoizii U87, electroporați în ziua 9.

Creșterea sferoizilor a fost monitorizată în 10 zile diferite timp de 16 zile. Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar analiza volumetrică a fost efectuată pentru a evalua ratele de creștere post-EP și ECT.

A fost stabilit un model fiabil de co-cultură, iar creșterea sferoizilor a fost afectată semnificativ de ECT. Bleomicina singură nu a inhibat sferoizii SHSY-5Y, dar efectul acesteia a fost potențat semnificativ prin aplicarea EP. Temozolomida și cisplatină au avut efecte inhibitorii mai puternice. Prezența monocitelor a sporit ușor efectul citotoxic al bleomicinei, dar nu a avut un efect semnificativ asupra tratamentului cu cisplatină sau temozolomidă.

Electroporarea a crescut eficacitatea bleomicinei prin permeabilizarea membranei celulare, confirmând că EP îmbunătățește eficacitatea chimioterapicelor cu permeabilitate scăzută. Monocitele nu au avut un impact semnificativ asupra creșterii sferoizilor după ECT cu niciunul dintre cele trei medicamente, dar a existat o tendință consistentă de creștere redusă în prezența monocitelor.

Sferoizii U87 au răspuns similar cu sferoizii SHSY-5Y. EP singură a avut un efect redus asupra viabilității acestora, confirmând că impulsurile electrice aplicate singular au doar efect transitor și nu au atins pragul pentru electroporarea ireversibilă. Co-cultivarea sferoizilor cu monocitele a avut, de asemenea, un impact minim asupra creșterii. Cu toate acestea, în categoria combinării aplicării EP și continuarea creșterii sferoizilor în prezența monocitelor, dimensiunea sferoizilor a scăzut semnificativ, indicând efecte citotoxice.

Pentru sferoizii expuși numai la chimioterapie, cisplatină a avut cel mai mare efect citotoxic, urmată de bleomicină și temozolomidă. Când chimioterapia a fost combinată cu monocite, s-a observat o ușoară îmbunătățire a efectului citotoxic pentru cisplatină și bleomicină, dar nu și pentru temozolomidă. Adăugarea de monocite nu a avut niciun efect semnificativ atunci când a fost combinată cu ECT.

În general, EP combinată cu bleomicină sau cisplatină a dus la o moarte celulară mai pronunțată, monocitele sporind ușor acest efect. Temozolomida, totuși, a rămas neafectată de prezența monocitelor.

Acest studiu a demonstrat că EP ar putea spori citotoxicitatea chimioterapicelor, în special a celor cu permeabilitate scăzută, cum ar fi bleomicina. Monocitele au crescut ușor efectele citotoxice ale ECT, dar impactul lor a fost mai evident atunci când au fost combinate cu EP singur. Aceste rezultate sugerează că EP poate declanșa polarizarea monocitelor într-un fenotip antitumoral (M1), crescând răspunsul imunogen.

Acest studiu a dezvoltat și validat cu succes două modele de co-cultură pentru studierea interacțiunilor ECT și celule imune în sferoizii SHSY-5Y și U87. EP a sporit citotoxicitatea medicamentelor cu permeabilitate scăzută, cum ar fi bleomicina, iar monocitele au crescut ușor efectul citotoxic al acestora. Cu toate acestea, atunci când EP a fost combinată doar cu monocite, s-a potrivit cu eficacitatea protoalelor ECT, sugerând un posibil rol pentru EP în polarizarea monocitelor într-un fenotip antitumoral.

În cazul sferoizilor U87, EP combinată cu monocitele au dus la moarte celulară semnificativă, confirmând eficacitatea protoalelor ECT. Acest lucru sugerează că monocitele pot contribui la un răspuns imun îmbunătățit post-EP, probabil din cauza eliberării induse de EP a moleculelor asociate leziunilor (DAMPs).

6. Evaluarea TNF – α și a interleukinei 10 pe sferoizi U87 co-cultivați cu monocite după aplicarea ECT

Există un interes crescut în evaluarea implicării răspunsului imun în efectul clinic al ECT [46]. În studiul de față sferoizii de U87 au fost obținuți, tratați cu ECT și ulterior co-cultivați cu monocite umane proaspete. Am evaluat nivelurile de IL-10 și TNF-alfa ca răspuns al monocitelor rezidente naive la expunerea sferoizilor tratați prin ECT fie cu temozolomidă (TMZ), fie cu cisplatină (CIS).

Sferoizii de glioblastom uman U87 au fost realizați pe plăci cu 96 de godeuri cu aderență scăzută acoperite cu agaroză (vezi Cap. 4.2). Sferoizii au fost electroporați în ziua 7 de la însămânțare, cu protocol ECT standard (vezi Cap. 4.5). Post electroporare sferoizii au fost pipetați pe godeuri noi, conținând monocite umane proaspete (vezi Cap.4.4).

Sferoizii au fost expuși fie la CIS, fie la TMZ după cum urmează: i) sferoizi U87 în mediu de cultură; ii) sferoizi U87 cu monocite; iii) sferoizi U87 expuși numai la EP; iv) sferoizi U87 expuși la EP apoi cultivați pe stratul de monocite.

TNF- α a fost evaluat din mediul de creștere în co-cultură la 5 ore după ECT și din nou la 7 zile după tratament folosind ELISA sandwich cantitativ (TNF alfa Abcam 181421).

Rata de creștere a sferoizilor a fost calculată ca un indice bazat pe suprafață (Aria) folosind software-ul Organoseg(4).

A fost obținut un protocol optimizat de evaluare a creșterii pentru sferoizii de glioblastom U87 expuși la ECT și monocite (Fig. 8.1).

În cazul grupului tratat cu temozolomidă (TMZ), nivelul TNF- α la 5 ore (Fig. 8.2) a fost similar în toate probele expuse numai la TMZ, în cele expuse la TMZ care au crescut ulterior cu monocite și în probele expuse la EP cu TMZ. Cu toate acestea, valorile TNF- α la 5 ore au crescut semnificativ în cazul sferoizilor U87 expuși la combinația TMZ + EP + Monocite. TNF- α la 7 zile a fost, de asemenea, crescut pentru probele care conțineau monocite (cu și fără EP). Combinația EP + monocite nu a crescut și mai mult nivelurile de TNF- α , în ceea ce privește doar impactul monocitelor.

În cazul probelor tratate cu cisplatină (CIS), și EP, și monocitele au crescut nivelurile de TNF- α atât timp de 5 ore, cât și timp de 7 zile. Când sferoizii tratați cu EP au crescut ulterior în prezența monocitelor, nivelurile de TNF- α au crescut abia la 7 zile (Fig. 8.2).

Evaluarea interleukinei-10 nu a evidențiat valori semnificative ale producției în categoriile experimentale (date prezentate în Anexa 7).

Rolul TNF- α în progresia cancerului este încă sub evaluare, deoarece nivelurile fiziologice intratumorale ale TNF- α sunt insuficiente pentru a induce regresia cancerului (așa cum se știe din tratamentele tumorale cu doze mari de TNF- α). Există dovezi din ce în ce mai mari că TNF- α poate crește șansele de imunoeditare genică (selecție clonală a șușelor tumorale rezistente) și de angiogeneză tumorală, promovând astfel progresia cancerului. Combinațiile de blocante TNF- α cu imunoterapii actuale ar putea îmbunătăți rezultatul antitumoral general [85].

Comportamentul creșterii TNF- α a fost ușor diferit față de medicamentul utilizat pentru ECT: mai pronunțat pentru CIS la ambele măsurători de timp și prezent doar la 7 zile pentru TMZ.

Lipsa detectării IL-10 permite să se propună în mod rezonabil faptul că, în condițiile experimentale aplicate, monocitele naive inițiale au virat către o stare pro-inflamatorie (M1,

caracterizată prin producție de TNF- α) și nu către o stare antiinflamatorie/tolerantă la tumori (M2, caracterizată prin producția de IL-10). Aceste rezultate ar putea explica parțial rezultatele prezentate în Cap. 7, Fig. 7.11 privind citotoxicitatea declanșată de EP a monocitelor asupra sferoizilor U87.

Adăugarea de monocite în mediul sferoizilor U87, după expunerea acestora la EP și chimioterapie, a determinat o creștere semnificativ statistică a nivelurilor de TNF- α în ziua 7 în ambele grupuri de tratament, cele mai ridicate valori ale TNF- α în ziua 7 fiind pentru cazul sferoizilor U87 expuși atât la tratamentul cu CIS, cât și la co-cultura de monocite după EP.

7. Metodă optimizată de procesare a culturilor celulare 3D de tip sferoizi în matrice de microgodeuri pentru analizarea imunohistochimică

În contextul actualizărilor de către FDA a reglementărilor cu privire la cercetarea preclinică, în conformitate cu cei 3R ai experimentelor pe animale (înlocuire, reducere și rafinare), modelele celulare 3D și completarea evaluărilor prin modelare in silico sunt prioritizate ca alternative la testarea pe animale de laborator, în cazul experimentelor de tip screening, evaluarea siguranței și a eficacității medicamentelor.

În cadrul evaluării sferoizilor, IHC rămâne standardul de aur pentru evaluarea histologică, în special atunci când se analizează zone specifice din profunzime. Cu toate acestea, există provocări, cum ar fi penetrarea anticorpilor și suprapunerea spectrului de fluorofori, în obținerea unei imagini precise. Acest studiu propune o procedură optimizată pentru încorporarea sferoizilor în matrice de microgodeuri de agaroză pentru analiza IHC, testată pe sferoizi de glioblastom U87, adenocarcinom mamar MCF7 și adenocarcinom de colon CaCo2. Procesul permite analiza eficientă a loturilor de sferoizi din cultură 3D, menținând în același timp trasabilitatea probelor. Sferoizii din liniile celulare U87, MCF7 și CaCo2 au fost cultivate conform protocoalelor descrise anterior. După cultivare, aceștia au fost încorporați în matrice de microgodeuri și supuși procesării histologice folosind mașini de prelucrare a țesuturilor și tăiate în secțiuni de 3 μ m pentru colorarea IHC. Procedurile standard de colorare au fost utilizate pentru diverși markeri, inclusiv EMA, p53, Ki-67, IDH și ARID1A pentru sferoizii U87 și ER, PR, HER2 și Ki-67 pentru sferoizii MCF7. Colorarea cu hematoxilină și eozină (H&E) a confirmat prezența și integritatea sferoizilor. Colorarea IHC a fost automatizată folosind BenchMark GX IHC/ISH.

Fluxul de lucru pentru procesarea sferoizilor pentru analiza IHC este descris în Fig. 9.1, unde sunt prezentați pașii de la cultura celulară 2D la analiza IHC. Ratele de creștere, compactarea și stabilitatea sferoizilor au variat în funcție de tipul histologic celular. Monitorizarea cu OrganoSeg a permis o sincronizare precisă pentru colectarea sferoizilor pentru prelucrarea IHC.

Sferoizii U87 au fost compacti și stabili, în timp ce sferoizii MCF7 au fost mai puțin stabili și au necesitat adăugarea de fibroblaste Hs27 pentru a îmbunătăți integritatea structurală. Analiza volumetrică a sferoizilor U87 a arătat o creștere constantă, sferoizii rămânând stabili și după pipetare. În schimb, sferoizii MCF7 au fost mai fragili, dar au devenit mai compacti atunci când au fost co-cultivați heterotipic cu fibroblaste, așa cum se arată în Fig. 9.3.

Colorarea H&E a sferoizilor U87 a dezvăluit celule anaplastice cu nuclee pleomorfe și aspecte mitotice rare. Necroza a fost observată la sferoizi cu diametre mai mari de 400 μm. Analiza IHC a arătat că sferoizii U87 au fost testați negativ pentru EMA și IDH wild-type, dar pozitiv pentru Ki-67 și ARID1A, confirmând rate ridicate de proliferare și zone apoptotice. Sferoizii MCF7 co-cultivați cu fibroblastele Hs27 au prezentat o integritate structurală robustă, cu o expresie puternică a ER și PR și pozitivitate Ki-67, confirmând clasificarea luminală a tumorii Her2-negative de tip B. Sferoizii CaCo2 au fost procesați cu succes pentru IHC, cu colorare Ki-67 pozitivă, dar rezultate negative pentru p53.

Acest studiu a stabilit cu succes o metodă de încorporare a sferoizilor 3D în matrice de microgodeuri de agaroză pentru analiza IHC. Sferoizii U87 și CaCo2 au fost compacti și stabili mecanic, permițând a fi procesați în format homotipic. Sferoizii de MCF7 au necesitat adăugarea de fibroblaste pentru stabilitate structurală în timpul procesării.

Avantajele metodei includ capacitatea de a procesa eficient loturi mari de sferoizi, asigurând trasabilitatea în timpul analizei IHC. Sferoidele mai mari de 400 μm au dezvoltat miezuri necrotice, o limitare bine cunoscută din cauza constrângerilor de difuzie a oxigenului.

Matricele de microgodeuri de agaroză au oferit o metodă convenabilă pentru încorporarea și procesarea sferoizilor, permițând analiza cu randament ridicat. Cu toate acestea, rămân provocări, inclusiv nevoia de automatizare pentru a eficientiza transferul de sferoizi și analiza imaginilor.

Metoda oferă un instrument valoros pentru cercetarea cancerului și screeningul medicamentelor, în special pentru studiile histologice legate de micromediul tumoral.

8. Concluzii

În timpul studiilor doctorale, s-au optimizat metode pentru generarea mai multor tipuri de culturi celulare 3D pe suprafețe cu aderență ultra-scăzută. Acest lucru a permis testarea efectelor expunerii sferoizilor la condiții de electrochimioterapie și recultivarea lor în prezența monocitelor. Rezultatele obținute au fost evaluate prin microscopie optică și procesare morfometrică semi-automată, folosind metode optimizate de viabilitate metabolică adaptate condițiilor specifice de micromediu ale culturilor celulare 3D, precum și prin evaluarea imunohistochimică. A fost propusă o metodă inovatoare pentru evaluarea IHC simultană a 48 de probe. Experimentele efectuate folosind metodele descrise în capitolul 3 au condus la următoarele rezultate:

Studiul unu (cap. 5.5):

- au fost optimizate protocoalele pentru formarea sferoizilor homotipici și heterotipici (NIH3T3, A375, B16F10, DC3F, MCF7).
- godeurile preparate cu strat de agaroză 1% au oferit condițiile cele mai bune pentru cultivarea sferoizilor
- protocoalele de electroporare au fost optimizate pentru sferoizi, iar software-ul OrganoSeg a fost ales pentru o analiză superioară a imaginii față de ImageJ.
- a fost adaptat cu succes un protocol pentru încorporarea sferoizilor în microgodeuri de agaroză pentru sectionare și colorarea H&E

2. Studiul doi (cap. 6.5):

- au fost realizate protocoalele pentru izolarea monocitelor și co-cultura lor cu sferoizi MCF7
- electroporarea a dus la o inhibare temporară a creșterii în co-culturi.
- cercetările viitoare se vor concentra asupra modului în care polarizarea monocitelor (M1/M2) afectează creșterea tumorii și eficacitatea electrochimioterapiei (ECT).

3. În **studiul trei (cap. 7.4)**, pentru a caracteriza efectul electrochimioterapiei și al adăugării de monocite în mediul de cultură, asupra ratei generale de creștere, a fost posibil să se demonstreze că:

- aplicarea ect împreună cu trei chimioterapice: bleomicină, cisplatină și temozolamidă a redus semnificativ viabilitatea sferoizilor.
- monocitele au avut un efect sinergic cu ect bleomicina, dar nu și cu cisplatina sau temozolomida.
- electroporarea poate induce polarizarea monocitelor într-o stare antitumorală (M1)

- două modele de co-cultură pentru studierea interacțiunilor celulelor imune în ECT au fost optimizate cu succes, fiind necesare cercetări suplimentare asupra mecanismelor din spatele acestor efecte.

Studiul patru (cap. 8.5):

- monocitele adăugate la sferoizii U87 după electroporare și chimioterapie au crescut semnificativ nivelurile de TNF- α până în ziua 7, în special în grupul tratat cu cisplatină.

Studiul cinci (cap. 9.5) a propus o metodă optimizată și rentabilă pentru analiza simultană imunohistochimică(IHC) a sferoizilor, care scade atât timpul, cât și costurile asociate cu aceste evaluări:

- un flux de lucru bine definit a fost optimizat pentru generarea de sferoizi homotipici și heterotipici pentru evaluare IHC
- sferoizii au fost încorporați simultan într-o matrice de microgodeuri de agaroză și analizați folosind software semi-automat, menținând trasabilitatea probei în timpul colorării și analizei IHC.

Tot în acest studiu, a fost dezvoltat un protocol semi-automat pentru generarea unui profil morfometric al sferoizilor, pe baza imaginilor obținute prin microscopie optică. Acest protocol poate fi utilizat cu orice set de imagini de intrare. Îmbunătățirile viitoare ar putea permite calcularea directă a parametrilor relevanți ai sferoizilor studiați.

9. Contribuții personale

Articole publicate:

- **Mircea Bogdan Matei**, et. al., FOCUSED REVIEW OF ELECTROCHEMOTHERAPY. Fiziologia - Physiology, 2024. 1(106): p. 63-70.
- **Mircea Bogdan Matei** et. al., PROSPECTS ON USING MONOCYTES ENRICHED MCF7 SPHEROIDS FOR ELECTROPORATION. Fiziologia - Physiology, 2024. 2(107).(accepted)
- **Mircea Bogdan Matei** et. al., Cost-effective optimized method to process 3D tumoral spheroids in microwell arrays for immunohistochemistry analysis. Journal of Medicine and Life, 2024. (accepted)
- Cucu, C. I.; **Matei, B. M.**; Giurcaneanu, C.; Popa, L. G.; Orzan, O. A.; Beiu, C.; Holban, A. M. Grumezescu, A. M.; Popescu, M. N.; Caruntu, C.; Mihai, M. M. - Electrochemotherapy and Other Clinical Applications of Electroporation for the Targeted Therapy of Metastatic Melanoma. Materials, 2021. 14(14).

Comunicări orale:

- 3D Cellular Model for Evaluation of Electrochemotherapy Immune System Interactions: An Experimental Approach. **Mircea Bogdan Matei**, Christien Oktaviani Matei, Sibel Ali, Artsiom Klimko, Mihaela-Georgeta Moisescu, la 16th National Conference of Biophysics(CNB 2020);T5P5, 14 - 16 June 2020, Brasov, Romania
- Evaluation of Electrochemotherapy Efficacy on a 3D Spheroid Neuroblastoma/Monocyte Co-Culture Model. Artsiom Klimko, **Mircea Bogdan Matei**, Christien Oktaviani Matei, Tudor Savopol, Mihaela G. Moisescu. XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society 10-15th of May 2021, Cluj-Napoca, Romania [abs210118].

Postere (international):

- 2022, 3rd World Congress on Electroporation– ISEBTT (International Society for Electroporation-Based Technologies and Treatments) 9-13 October 2022, Copenhagen, Denmark
 - Evaluation of TNF- α production due to electrochemotherapy applied on glioblastoma spheroids co-cultured with monocytes, **Mircea Bogdan Matei**, Mihaela G. Moisescu, Christien Oktaviani Matei, PO 18, page 18, ISBN 978-961-243-444-1
- 2019, 3rd World Congress on Electroporation– ISEBTT (International Society for Electroporation-Based Technologies and Treatments) 3-6 September 2019, Toulouse, France
- Case report: First patient with skin melanoma metastases treated by bleomycin electrochemotherapy in Romania. Valentin Popescu, **Bogdan M. Matei**, Bogdan S. Mastalier, Dan Andras, Alexandru Radulian, Valeriu Botea, Mihaela G. Moisescu, PO 059, page 204, ISBN 978-2-913923-38-6 Teaching activity of subjects within the doctoral thesis: since 2021
- predarea unui seminar în cadrul Masteratului Biofizică și Biotehnologie Celulară: "Selecția celulelor imunomagnetice", în D3- Metode de separare (Anul 1, sem II)
- Coordonator a 2 teze în Medicină:
 - 2021, "In vitro evaluation of electrochemotherapy on a three-dimensional multicellular spheroid glioblastoma/monocyte co-culture model", absolvent Artsiom Klimko
 - 2020, "Evaluation of the interaction of monocytes with 3D tumor structures - in vitro study", absolvent Sibel Ali
- Coordonator a 3 teze de teză în cadrul Masteratului Biofizică și Biotehnologie Celulară:

- 2024, IHC Evaluation of 3D Caco2 and NIH3T3 Cell Cultures, absolvent Vâlcu Claudia-Adelina
- 2022, Feasibility of the immunohistochemistry method in the characterization of three-dimensional cultures of U87 MG and MCF-7, absolvent Marinescu Carmen Letitia
- 2022, Morphological and immunophenotypic changes in 3D glioblastoma cell cultures U87 MG, absolvent Andreea-Cristina RĂDULESCU
- Aplicații de proiect în calitate de coordonator de proiect:
- EANS RESEARCH FUND 2020 -In vitro evaluation of electroporation-based techniques effects on a three-dimensional spheroid glioblastoma/monocyte co-culture model (EP-3D-GM) (not funded)
- EUROMEDEX 2022 - Interleukin evaluation of electrochemotherapy-induced response on a 3D culture of U87 glioblastoma-monocyte model (not funded)

Aplicații de proiecte PED (UEFISCDI) ca membru al echipei de cercetare:

- Immune status evaluation by circulating tumor cells count in oncological patients under electrochemotherapy (IMUNECT 2021, rejected)
- Immune status of oncological patients under electrochemotherapy: integrating the immunotherapy for a personalized strategy (IMMUNECT 2024, pending results)

10. Perspective

1. Dezvoltarea metodelor de electroporare pentru culturi 3D:

- crearea unei metode de electroporare in-situ (well-based) prin imprimarea unui sistem de electrozi și godeuri și automatizarea generării de rezultate parametrice obținute din achizițiile de imagini

2. Dezvoltarea sistemului de co-cultură pentru sferoizi cu celule imune și evaluarea unui posibil efect abscopal:

- evaluarea IL-10, TNF- α și a altor citokine în condiții specifice pentru generarea tipurilor de monocite M1 sau M2, precum și investigarea efectului direct al electroporării asupra sferoizilor de glioblastom în prezența monocitelor.

3. Extinderea domeniului ECT în România:

-publicarea unui manuscris în calitate de prim autor al primului pacient tratat cu electrochimioterapie (ECT) în România și crearea unui registru național al pacienților tratați cu ECT (ca obiectiv al unui proiect depus la UEFISCDI – "IMUNECT", în curs de evaluare).

Bibliografie selectivă

1. Barbosa, M.A.G., et al., *3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs*. *Cancers (Basel)*, 2021. **14**(1).
2. Ware, M.J., et al., *Generation of Homogenous Three-Dimensional Pancreatic Cancer Cell Spheroids Using an Improved Hanging Drop Technique*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016. **22**(4): p. 312-21.
3. Mircea Bogdan Matei, C.L.M., Christien Oktaviani Matei, Alex-Sebastian Pînzariu, Leon Zăgrean, Mihaela Georgeta Moisescu, *Cost-effective optimized method to process 3D tumoral spheroids in microwell arrays for immunohistochemistry analysis*. *J Med Life*, 2024(6 (Accepted)).
4. Mircea Bogdan Matei, C.O.M., Ali Sibel, Leon Zăgrean, Mihaela Georgeta Moisescu, *FOCUSED REVIEW OF ELECTROCHEMOTHERAPY*. *Fiziologia - Physiology*, 2024. **1**(106): p. 63-70.
5. Sersa, G., et al., *Electrochemotherapy in treatment of tumours*. *Eur J Surg Oncol*, 2008. **34**(2): p. 232-40.
6. **Mircea Bogdan Matei**, C.O.M., Ali Sibel, Leon Zăgrean, Mihaela Georgeta Moisescu, *PROSPECTS ON USING MONOCYTES ENRICHED MCF-7 SPHEROIDS FOR ELECTROPORATION*. *Fiziologia - Physiology*, 2024. **2**(107).