



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : ИСПИТИВАЊЕ НЕЖЕЉЕНИХ ДЕЈСТАВА НОВОСИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА ПЛАТИНЕ НА АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ ИН ВИВО: ФУНКЦИОНАЛНИ И МОРФОЛОШКИ АСПЕКТИ НЕУРОТОКСИЧНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ДРУГИХ ТКИВА И ОРГАНА

Кључне речи : цисплатин, моторна функција, неуротоксичност, анимални модел, антиоксидативна терапија

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Испитивање неуротоксичног ефекта деривата платине је истраживачко поље које, нарочито с обзиром на значај ових деривата у лечењу разних врста тумора привлачи огромну пажњу. Ови молекули су прва линија третмана за већину солидних и хематолошких неоплазми, укључујући карцином плућа, карцином дојке, колоректални карцином итд. Цисплатина, као дериват платине, је антинеопластични агенс који има најширу употребу у лечењу малигнитета. Она свој ефекат постиже углавном кроз формирање ковалентних веза са молекулом ДНК, индуковањем оксидативног стреса и окидањем апоптозе туморских ћелија. Међутим, деривати платине су уједно и врло токсична једињења кој могу да узрокују оштећења различитих врста ткива. Деривати платине имају озбиљна нежељена дејства као што су: нефротоксичност, неуротоксичност, ототоксичност итд. Хемотерапија се све више повезује са неурокогнитивним дефицитом који може да укључује блаже и озбиљније поремећаје функције памћења и пажње. Ове когнитивне дисфункције називају се „хемобрејн“ или „хемофог“. Такви поремећаји су дугорочна нежељена дејства хемотерапије и могу се јавити унутар неколико месеци након третмана и трају и до неколико година. Овакве дисфункције у највећој мери су до сада описане код пацијената са раком дојке, али и у све већој мери код осталих врста канцера, као и код деце лечене хемотерапијом. Осим когнитивних дисфункција описане су и дисфункције периферног нервног система као последица неуротоксичног ефекта на периферни нервни систем. У ову групу спадају атаксија, интенциони тремор, поремећај координације покрета и сл. Један од начина за који се мисли да може ублажити токсичност хемотерапије јесте суплементарна терапија антиоксидансима. Више студија је у скорије време имало за циљ карактеризацију неуролошких дисфункција код пацијената третираних хемотерапијом. Међутим, главни недостатак испитивања овог проблема на хуманој популацији представља могућност утицаја одређених фактора на валидност резултата. Наиме, постоји могућност да когнитивне или моторне дисфункције буду последица самог малигнитета, радиотерапије, терапије опиоидима или кортикостероидима. Управо због овог недостатка неопходно је развијати анималне моделе за истраживање неуродисфункција узрокованих хемотерапијом.



Циљ истраживања:

Циљ истраживања би био да испита ефекте деривата платине на нервни систем, и то на основу хистолошке анализе ткива и одређивања параметара оксидативног стреса. Такође ће бити упоређени резултати добијени бихејвиоралним испитивањем експерименталних животиња у смислу степена функционалног оштећења централног и периферног нервног система са резултатима добијеним хистолошким анализом. Биће процењени и евентуални утицаји суплементне антиоксидативне терапије, како у фази третирања дериватима платине тако и у фази опоравка. Основне хипотезе студије су да хистолошке промене корелирају са функционалним испадима у понашању и кретању, да неуротоксични ефекти деривата платине повећавају ниво оксидативног стреса да се они могу могу умањити антиоксидативном терапијом.

Актуелност истраживања:

Испитивање неуротоксичног ефекта деривата платине је истраживачко поље које, нарочито с обзиром на значај ових деривата у лечењу разних врста тумора привлачи огромну пажњу. Ови молекули су прва линија третмана за већину солидних и хематолошких неоплазми, укључујући карцином плућа, карцином дојке, колоректални карцином итд. Цисплатина, као дериват платине, је антинеопластични агенс који има најширу употребу у лечењу малигнитета. Она свој ефекат постиже углавном кроз формирање ковалентних веза са молекулом ДНК, индуковањем оксидативног стреса и окидањем апоптозе туморских ћелија. Међутим, деривати платине су уједно и врло токсична једињења кој могу да узрокују оштећења различитих врста ткива. Деривати платине имају озбиљна нежељена дејства као што су: нефротоксичност, неуротоксичност, ототоксичност итд. Хемотерапија се све више повезује са неурокогнитивним дефицитом који може да укључује блаже и озбиљније поремећаје функције памћења и пажње. Ове когнитивне дисфункције називају се „хемобрејн“ или „хемофог“. Такви поремећаји су дугорочна нежељена дејства хемотерапије и могу се јавити унутар неколико месеци након третмана и трају и до неколико година. Овакве дисфункције у највећој мери су до сада описане код пацијената са раком дојке, али и у све већој мери код осталих врста канцера, као и код деце лечене хемотерапијом.

Осим когнитивних дисфункција описане су и дисфункције периферног нервног система као последица неуротоксичног ефекта на периферни нервни систем. У ову групу спадају атаксија, интенциони тремор, поремећај координације покрета и сл. Један од начина за који се мисли да може ублажити токсичност хемотерапије јесте суплементарна терапија антиоксидансима. Више студија је у скороје време имало за циљ карактеризацију неуролошких дисфункција код пацијената третираних хемотерапијом. Међутим, главни недостатак испитивања овог проблема на хуманој популацији представља могућност утицаја одређених фактора на валидност резултата. Наиме, постоји могућност да когнитивне или моторне дисфункције буду последица самог малигнитета, радиотерапије, терапије опиоидима или кортикостероидима.

Управо због овог недостатка неопходно је развијати анималне моделе за истраживање неуродисфункција узрокованих хемотерапијом. Деривати платине су лек избора у хемотерапији највећег броја карцинома. Многа актуелна истраживања баве се проценом степена оштећења нервног система код пацијената након хемотерапије овим агенсима. Истраживање у овом правцу значајно је из разлога развоја превентивне и терапеутске интервенције за умањивање нежељених дејстава хемотерапије на пацијентима. Анимални модел истраживања је од есенцијалног значаја јер своди на минимум утицај фактора који се не могу искључити у студијама на хуманој популацији.



Предмет и опис истраживања:

Задаци, методологија, очекивани резултати

Студија је експерименталног карактера. Планирано је да истраживање обухвата 140 пацова, Wistar соја, мушког и женског пола, старости 3 недеље, просечне телесне масе од 200g. Експерименталним животињама ће бити доступна вода и храна у довољној количини да би се обезбедило да могу да их узимају према својим потребама (ad libitum). Пратиће се ефекат деривата платине и антиоксидативне суплементне терапије на понашање експерименталних животиња, на структуру ћелија малог мозга, кортекса, срца, бубрега, плућа и крви, као и одређивање параметара оксидативног стреса у поменутих ткивима и концентрације апликованих деривата платине у истим ткивима. Пацови ће бити подељени у седам експерименталних група (сваку групу сачињава по двадесет пацова различитог пола).

Експерименталне групе би биле:

1. контролна група,
2. група којој се даје Cis-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + физиолошки раствор
3. група којој се даје Cis-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + витамин Е + витамин С
4. група којој се даје en-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + физиолошки раствор
5. група којој се даје en-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + витамин Е + витамин С
6. група којој се даје dach-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + физиолошки раствор
7. група којој се даје dach-Pt (5mg/kg, интраперитонеално) + витамин Е + витамин С

Експерименталним животињама ће бити праћени следећи параметри: тежина, број еритроцита, број леукоцита. У првој недљи истраживања урадиће се бихејвиорални експерименти на контролној групи од 5 животиња. Биће урађени тестови у опен филду (користиће се софтвер ЕТНО Vision и хардевер који је компатибилан са овим софтвером), тестови инхибиторног избегавања, тестови меморије у Т-лабиринту, ротациони тест, као и тестови анксиозности на уздигнутом плус лабиринту. Након ових тестова животиње ће бити жртвоване и биће издвојена ткива из следећих органа: мозак, срце, плућа, бубрези, крв и коштана срж. Биће направљени препарати из наведених ткива који ће бити хистолошки анализирани и то морфометријском анализом и имунохистохемијском анализом. Специјалан хистолошки преглед са морфометријским мерењем биће урађен на сагиталним пресецима малог, као и посебним регијама великог мозга (хипокампус, моторна и сензорна кора).

Морфометријска анализа посебну пажњу ће посветити бројању неурона по јединици површине (mm²), мерењу њихове величине и величине једра, као и опису нуклеолуса. За детекцију глијалних елемената, пролиферационог и апоптотског индекса биће коришћена моноклонска антитела (GFAP, Ki-67 и caspase 3) и високо сензитивна, специфична стрептавидин-биотин имунохистохемијска метода (LSAB/HRP), у којој је стрептавидин обележен пероксидазом, а као хромоген биће коришћен 3,3-диаминобензидин. У току бојења, истовремено ће се тестирати и познати негативни и позитивни ткивни узорци, а један ткивни пресек тестираће се реагенсом који замењује примарна антитела. Процедура подразумева и поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања и пропирања препарата. На узорцима из истих ткива урадиће се мерење параметара оксидативног стреса.

Групе 2-7 биће третиране као што је претходно наведено, почевши од прве недеље, једном недељно у трајању од пет недеља. Након истека прве недеље из сваке групе 2-7 биће узето по пет животиња на које ће се применити исти протокол као за контролну групу, као што је претходно описано. Након завршетка пете недеље животиње из групе 2-7 биће без терапије дериватима платине, а уз давање антиоксидативне суплементне терапије, у периоду опоравка



до девете недеље. По истеку девете недеље примениће се стандардни протокол на преосталих пет животиња из група 2-7.

Прорачун величине укупног узорка заснован је на резултатима претходно публикованих истраживања у којима је процењиван неуротоксични ефекат деривата платине и позитиван утицај антиоксидативне терапије на животиње третиране поменути агенсима. За статистичку обраду података била би коришћена двофакторска анализа варијансе са поновљеним мерењима, као и Студентов Т-тест за везане узорке. Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од $p < 0.05$.

Значај истраживања:

Истраживање неуротоксичног ефекта деривата платине би допринело дубљем познавању механизма негативног дејства ових агенаса на ткива, као и могућност интервенције и превенције ових негативних последица. Централно питање којим ће се бавити истраживање јесте однос и корелација функционалних и морфолошких оштећења нервног система након третмана са дериватима платине.

Временски оквир:

Планирано је да истраживање траје две године.

Литература:

1. Abou-Elghait A, El-Gamal D, Abdel-Sameea A et al. Effects of Cisplatin on the Cerebellar Cortex and Spinal Cord of Adult Male Albino Rat and the Possible Role of Vitamin E; Light and Electron Microscopic Study. *Egypt J Histol* 2010; 33: 202-212
2. Al Moundhri MS, Al-Salam S, Alo Mahrouqee A et al. The Effect of Curcumin on Oxalplatin and Cisplatin Neurotoxicity in Rats: Some Behavioral, Biochemical, and Histopathological Studies. *J Med Toxicol* 2012; DOI:10.1007/s13181-012-0239-x
3. Cerri S, Piccolini V, Santin G et al. The developmental Neurotoxicity Study of Platinum Compounds. Effects of Cisplatin versus a Novel Pt(II) Complex on Rat Cerebellum. *Neurotox and Teratology* 2010; 33: 273-281
4. Jacobs S, McCully CL, Murphy R et al. Extracellular Fluid Concentrations of Cisplatin, Carboplatin, and Oxalplatin, Muscle, and Blood measured Using Microdialysis in Nonhuman Primates. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65:617-24
5. Karadeniz A, Sismsek N, Karakus E et al. Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. *Ox Med And Cell Longevity* 2011; Article ID: 981793
6. Khasabova IA, Khasabov S, Paz J et al. Cannabinoid Type-1 Receptor Reduces Pain and Neurotoxicity Produced by Chemotherapy. *J Neurosci* 2012; 32 (20): 7091-7101
7. Marcus L, Murphy R, Fox E et al. The Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetics of the Platinum Analog Satraplatin after Intravenous Administration in Non-human Primates. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69:247-52
8. Shabani M, Nazeri M, Parsania S et al. Walnut Consumption Protects Rats Against Cisplatin-induced Neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2012; 33: 1314-1321
9. Shabani M, Larizadeh MH, Parsania S et al. Evaluation of Destructive Effects of Exposure to Cisplatin During Developmental Stage: No Profound Evidence for Sex Differences in Impaired Motor and Memory Performance. *Int J Neurosci* 2012; 122: 439-448.



10. Shojaei A, Shabani M, Pilevarian A et al. Effects of Acute Administration of Cisplatin on Memory, Motor Learning, Balance and Explorative Behaviours in Rats. *Physiol Pharmacol* 2012; 16: 121-135