

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Radioterapeutická a onkologická klinika



Lukáš Hrzán

**Využití experimentálních zvířecích modelů
v problematice polékové periferní
neuropatie, možnosti terapie a prevence**

*Use of experimental animal models in
chemotherapy induced peripheral neuropathy,
possibilities for prevention and treatment*

Diplomová práce

Praha, srpen 2010

Autor práce: Lukáš Hrzán

Studijní program: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce: **MUDr. Martina Kubecová, PhD**

Pracoviště vedoucího práce: **Radioterapeutická a
onkologická klinika, 3. LF UK,
Fakultní nemocnice Královské Vinohrady**

Datum a rok obhajoby: 17.9.2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracoval samostatně a použil výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby má diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému – SIS 3. LF UK jsou totožné.

V Praze dne 28.srpna

Lukáš Hrzán

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval školitelce MUDr. Kubecové za její podnětné připomínky a vstřícný přístup při vedení této práce. Zároveň patří poděkování prof. Cavalettimu a jeho skupině, zejména dr. Cantě a dr. Carozzi za výuku k tématu a praktické rady. V neposlední řadě vděčím nadaci Fondazione Cariplo za finanční podporu.

Obsah

ÚVOD.....	6
1. PERIFERNÍ NEUROPATIE - DEFINICE.....	8
1.1 EPIDEMIOLOGIE	8
1.2 ETIOLOGIE.....	8
1.3 PATOLOGICKÁ KLASIFIKACE.....	10
1.4 SYMPTOMY.....	10
1.5 PATOGENEZE	11
1.6 DIAGNOSTIKA.....	11
1.6.1 KLINICKÉ ŠKÁLOVACÍ SYSTÉMY.	11
1.6.2 NEUROFYZIOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ.....	12
2. CHEMOTERAPEUTIKA –PŘEHLED NEJČ. INDUKTORŮ CIPN.....	14
2.1. CISPLATINA.....	14
2.2 PACLITAXEL.....	15
2.3 BORTEZOMIB.....	15
2.4 VINKA ALKALOIDY.....	16
2.5 DALŠÍ LÁTKY.....	16
3. METODY VÝZKUMU CIPN	17
3.1 IN VIVO MODELY.....	17
3.2 IN VITRO MODELY.....	18
4. PRAKTICKÁ ČÁST.....	19
4.1 CÍL PRÁCE.....	19
4.2 METODIKA.....	20
4.2.1 SOUBOR.....	20
4.2.2 DESIGN STUDIE.....	21
4.3 MĚŘENÍ.....	21
4.4 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	25
4.5 VÝSLEDKY.....	25
4.6 DISKUZE A ZÁVĚR.....	30
5. MOŽNOSTI KONTROLY PERIFERNÍ NEUROPATIE.....	31
5.1 PREVENCE CIPN.....	32
5.2 LÉČBA CIPN.....	34
6. ZÁVĚR.....	36
SOUHRN.....	38
SUMMARY.....	39
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	40
SEZNAM ZKRATEK.....	42

Úvod

Myšlenka napsat diplomovou práci na výše uvedené téma vznikla během mé dvouměsíční stáže na oddělení Neurověd a biomedicíny university Milano-Bicocca, kde jsem měl příležitost aktivně se podílet na realizaci experimentálního myšního modelu ilustrujícího detrimentalní účinky chemoterapeutik na funkci periferního nervového systému.

Periferní neuropatie je vážné onemocnění, vznikající z řady příčin a mající významný vliv na kvalitu života pacientů, které může navíc přímo i nepřímo ovlivnit jejich prognózu a dobu přežití. Chci tedy nejdříve přehledně tuto klinickou jednotku definovat a poté se zaměřit na její roli v souvislosti s onkologickou protinádorovou chemoterapií, kde působí jako vážný komplikující faktor. Významným úkolem je zhodnotit současný stav týkající se možností léčby a prevence tohoto problému.

Současná medicína má obrovskou výhodu, ale zároveň i úskalí v tom, že přemíra dat a faktů nás nutí k neustálé subspecializaci a během naší profese se obvykle stáváme odborníky na několik málo úzkých témat. Přestáváme občas určitá témata vnímat komplexně, a jednotliví experti si dokonce mezi sebou přestávají rozumět. Tvoříme tedy multidisciplinární týmy, abychom tento trend zvrátili a naše úsilí stále vedlo zejména k prospěchu pacienta.

Doufám, že se mi v této práci podaří provázat pohled na téma polékové periferní neuropatie z pohledu zástupců vybraných participujících oborů, tedy neurologů, onkologů a badatelů na poli biomedicíny.

U laické a mnohdy i u části odborné veřejnosti se setkáváme s nepochopením významu a přínosu experimentálních zvířecích modelů, kdy jsou tyto často *a priori* zavrhovány jako zbytečné a nepřijatelné. Doufám, že tato práce také nastíní, proč jsou zvířata v současném výzkumu stále ještě obtížně nahraditelná.

Jsem také rád, že mohu toto téma vztáhnout na ukázkou výzkumu v praxi a alespoň v zjednodušené formě prezentovat výsledky provedené studie, která snad svojí trochou přispěje do arzenálu vědomostí a poznatků potřebných pro náš boj s touto klinickou jednotkou.

1. Periferní neuropatie

Periferní neuropatie je definována jako postižení jakékoliv části periferního nervového systému. Je to problematika spadající do péče neurologů.(2) Tato práce se zabývá přesněji periferní polyneuropatií. Jedná se o onemocnění více periferních nervů způsobené systémovou příčinou, charakterizované symetrickou distribucí na distálních tělesných partiích s progredující symptomatikou. Mononeuropatie, tedy například jednotlivé léze n. ulnaris, n. facialis atd. způsobené jinými příčinami (trauma, prochlazení aj.) tvoří odlišnou skupinu. Podobně fenomény jako je mononeuritis multiplex, tedy se symptomatikou asymetrickou a etiologií zejména vaskulárně - zánětlivou, nejsou v této práci předmětem zájmu.

1.1 Epidemiologie

Prevalence periferních polyneuropatií v ČR se udává jako 2.4%, závisí však značně na regionálních rozdílech, věkovém spektru pacientů a zřejmě i způsobu klasifikace podle etiopatogeneze a hodnocení symptomatiky.(3)

1.2 Etiologie

V Evropě a vyspělých zemích způsobuje více než třetinu případů polyneuropatií diabetes mellitus. Na druhém místě je konzumace alkoholu.(2) Není třeba komentovat, že zdravotní a ekonomická zátěž „moderního“ stylu života a civilizačních onemocnění je alarmující. V zemích třetího světa je naopak nejčastější příčinou malnutrice a lepra.

Méně častých příčin je s odstupem daleko více a lze je charakterizovat takto: 5% neuropatií představují komplikace infekčních nemocí. Vznikají na základě zánětlivého procesu, buď přímým působením patogenu, jeho toxinu nebo sekundárním poškozením imunitním procesem. Nejčastějšími původci jsou borelióza, botulismus, difterie, syfilis,

dále toxoplazmóza, leptospiróza, rickettsie a mnohá další. Zapomenout nelze na virová agens, neuropatie vzniká často při infekci HIV (a také v důsledku HAART), CMV, influenze, herpesvirech a dalších. Podobné symptomy má i idiopatická polyradikoneuritis (syndrom Guillan Barré), který je vzácnou komplikací očkování proti infekčním nemocem.

Další skupinou jsou neuropatie na základě toxické etiologie či nutričních deficitů. Jejich seznam je velmi dlouhý, řadíme sem otravu těžkými kovy (např. olovo, thallium, arsen, kadmium) a deficit vitamínů skupiny B (konkrétně thiaminu, riboflavinu, pyridoxinu, kobalaminu, folátu, kyseliny nikotinové a tokoferolu)(2). Tyto poznatky vedly k tomu, že některé z těchto látek také byly zkoumány jako potencionální neuroprotektiva, čemuž se věnuje kapitola o prevenci.

Kromě diabetu mohou neuropatii způsobit i jiná endokrinologická onemocnění, například syndromy nadprodukce růstového hormonu, poruchy funkce štítné žlázy a příštítných tělísek, insuficience jater, ledvin a nadledvin.

Z onkologického hlediska jsou významné paraneoplastické projevy nádorů a paraproteinémie ať už původu hematologického nebo hromadění bílkovin při systémových amyloidózách.(3)

Významně k fondu neuropatických příčin přispívají i jiná farmaka, než protinádorová chemoterapeutika. Obezřetnost je třeba při léčbě amidaronem, amytriptylinem, lithiem a antituberkulotiky. Spektrum léků potencionálně neurotoxických je nesmírně široké. Spadají sem i nejrozšířenější preparáty jako jsou antibiotika, thyreostatika a antidepresiva. Rovněž mnohá léčiva ze skupiny antirevmatik mají v tomto ohledu nepříznivý profil. Pozor je třeba dávat zvláště při dlouhodobé farmakoterapii, avšak je třeba brát i v úvahu možnost výskytu relativně vzácných idiosynkratických reakcí, které nejsou přímo závislé na podané dávce.

Mezi vzácné příčiny, na které bychom měli také myslet, patří intermitentní akutní porfyrie a hereditární motoricko-sensorické (nebo čistě sensorické) neuropatie typu I.-IV. Nežádka zaznamenáme neuropatie

také jako část symptomů u rozličných vaskulitid, kolagenóz a autoimunitních onemocnění revmatického charakteru.(2)

CIPN, tedy periferní neuropatie klasifikovaná jako následek onkologické léčby vzniká dle různých zdrojů u 20-40% pacientů léčených chemoterapií. Odhaduje se, že jen ve Spojených státech tímto problémem trpí kolem 1.5 milionu obyvatel. Rozvoj závisí na věku, výši dávek, kumulativní dávce, trvání léčby a terénu dalších rizikových faktorů. Symptomy, často velmi podobné diabetické neuropatii někdy odezní úplně, někdy jsou částečně reverzibilní nebo ireverzibilní.(5)

1.3 Patologická klasifikace

Neuropatie můžeme charakterizovat na neuronopatie (postižení těla neuronů, dle typu buď sensorické – gangliopatie, či motorické). Druhou skupinu tvoří poruchy neuronálních výběžků, pro tuto variantu patologové také používají termín periferní neuropatie, což může vést k zmatení. Tyto poruchy výběžků se dělí dále na axono a myelinopatie, dle místa poškození. Jsou zpravidla sensorimotorického charakteru.

1.4 Symptomy

Příznaky se dělí dle typu postižených nervových vláken na sensitivní, autonomní a motorické – ty které obvykle nastupují jako poslední.

Nejčastěji se vyskytují sensitivní symptomy. Postižení slabých nemyelinizovaných vláken působí parestezie, hyper a hypestezie, allodynie, neuropatickou bolest. Začínají typickou distribucí „ponožek a rukavic“ , obvykle nejdříve na dolních končetinách a postupují proximálně. Při postižení silných vláken vzniká naopak necitlivost, deficit polohocitu, vibrací, snížení reflexů a vede až k slabosti a ataxii.

Autonomní příznaky se často projevují jako akrohypohidrosa, zácpa až s ileozními stavy, retencí moči, sexuální dysfunkcí a kardiálními příznaky (dysrytmie, poruchy tvorby a šíření vzruchů, hypotenze).

Mezi motorické symptomy řadíme slabost, neobratnost a nakonec atrofie svalů a vznikající deformity.(2)

1.5 Patogeneze

Nejčastějším mechanismem je axonální dystrofie, provázená Waleriánskou degenerací. Proto jsou nejdříve postiženy oblasti s nejdelším průběhem vláken. Pokud je poškození mírné, vlákna mohou regenerovat. Poškození sensorických neuronů v dorzálních míšních gangliích s jejich následnou nekrózou či apoptózou však znamená ireverzibilní zhoršení neurologických funkcí.(2)

1.6 Diagnostika a hodnocení

Kromě anamnézy zaměřené na symptomy patří k základním postupům klinické neurologické vyšetření. Motorické výpadky ozřejmí vyšetření reflexů, svalové síly, atrofií a fascikulací. Poruchy cití zjistíme ladičkou, špendlíkem a jiným tupým předmětem a termickými pokusy, pátráme po ataxii.

1.6.1 Klinické škálovací systémy

Pro účely klinických studií se většinou pro hodnocení neuropatie používají různé škály (CTC). Všem skorovacím systémům je společné, že klasifikují periferní neuropatii do pěti tříd, od nuly do čtyř. Nula znamená normu, 1. stupeň lehké asymptomatické postižení, 2. stupeň středně těžké symptomatické postižení, 3. stupeň popisuje postižení těžké ovlivňující běžné denní aktivity. Stupeň 4 definuje invalidizující postižení.

Škála vytvořená WHO roku 1979, která hodnotí míru parestezií, změn šlachových reflexů a motorické deficity, se nedočkala masivního rozšíření.

Škála ECOG z roku 1982 ji rozšířila o několik položek, a byla využívána daleko více.

Přesnější a komplikovanější skórovací systém CTC představil NCI o rok později s poslední revizí v roce 2003.

Dále bylo vytvořeno množství dotazníkových systémů a funkčních hodnocení, zaměřených také na kvalitu života a denní aktivity, popisujících obtěžující symptomy nebo aktivity, které jsou omezeny (např. zapnutí knoflíků u košile).

Další vyvinutý skorovací systém TNS z roku 1994 sloužil zejména potřebám neurologů, neboť díky svému uspořádání a komplexnosti usnadňoval evaluaci topického a anatomického postižení nervů. Je to kompozitní škála, která slučuje hodnocení symptomatiky, klinického vyšetření u lůžka i výsledky objektivních ENG vyšetření. Lze dosáhnout skóre 0-44, každá položka je hodnocena 0-4. Onkologové jej však často vnímali jako příliš komplikovaný a časově náročný, proto byla vytvořena redukovaná verze hodnotící jen klinické parametry, u které bylo ověřeno, že rovněž poskytuje validní výsledky.(7)

Všechny zmíněné škály ale disponují určitými problémy. Hodnocení ovlivňuje individuální přístup hodnotitele a škálované kategorie si ne vždy úplně přesně odpovídají. To ztěžuje interpretaci výsledků a může ovlivnit výsledky studií. Zajímavý je efekt Likertovy teorie o centrálním biasu těchto škál. Tazatelé i pacienti podle tohoto fenoménu mají tendenci vyhýbat se extrémním položkám v každé kategorii. V současnosti probíhá velká multicentrická studie CI-Perinoms, na jejímž konci by měl stát nový škálovací systém, který by tyto potíže adresoval.(7)

1.6.2 Neurofyziologická vyšetření

Kvantitativní metody hodnocení jako elektromyografie a neurografie jsou primárně určeny pro diferenciální diagnostiku nemocí neuromuskulárního aparátu. Obvykle totiž selhávají včasné detekci periferní neuropatie a jsou průkazné často až v stádiích, kdy pacienti trpí

výraznou symptomatikou. Přesto mohou být významné v objektivizaci potíží a jako indikátor míry postižení jsou využitelné u zvířecích modelů.(20)

Elektroneurografie je vlastně komplex neurofyziologických metod měření, které dokáží rozlišit mezi myopatiemi a různými typy neuropatií. Významný podíl mají měření rychlosti vedení (NCS), které bezpečně identifikují léze nervů i periferní neuropatie. Principem je, že elektrickou stimulací vytvoříme složený akční potenciál, který se šíří příslušnými nervy. Při zaznamenání na registrační elektrodě měříme latenci a změny amplitudy tohoto akčního potenciálu. Existují tři typy měření NCV. Sensorické jsou měřeny na nervech zprostředkovávajících pouze cití (detekce SNAP), smíšené jsou měřeny na nervech, které vedou jak motorickou tak i sensitivní složku (MNAP) a konečně vedení nervy motorickými se určuje nepřímo z měření ve svalových vláknech (CMAP).(2) NCV je vypočítána jako vzdálenost stimulovaného nervu dělená rozdílem proximální a distální latence. Nutná je supramaximální stimulace, tedy intenzita proudu, při které jsou depolarizovány všechny axony v příslušném vlákne a získaný potenciál je tedy nejvyšší. Jehlové elektrody mají výhodu, že jsou méně ovlivněny rušením z okolí. Je však obtížnější získat při opakovaných měřeních konsistentní výsledky.

V praxi u CIPN je využitelnost těchto metod limitována. Například cisplatina primárně poškozuje neurony DRG, zatímco bortezomib především nemyelinizovaná a tence myelinizovaná vlákna. (19) ENG totiž detekuje hlavně poškození velkých myelinizovaných vláken. EMG je bolestivé vyšetření a jeho výtěžnost pro převážně sensorické patologie je malá.

2. Chemoterapeutika - přehled nejčastějších induktorů periferní neuropatie

Chemoterapie zaznamenala v posledních dvou stoletích značný rozvoj. Přinesla efektivní léčbu mnoha nádorových onemocnění, kdy umožnila prodloužení přežití a v některých případech i vyléčení. Za to však platíme cenu množstvím nežádoucích účinků. Periferní neuropatie patří mezi jeden z nejzávažnějších.

2.1 Cisplatina

Chemoterapeutický potenciál cisplatiny, přesněji cis-diaminodichlor platnatý komplex (CDDP) byl objeven roku 1965. Je to alkylační činidlo, které tvorbou kovalentní vazby na řetězec DNA brání separaci řetězců DNA při její replikaci. Ukazuje se však, že mechanismus působení platinových derivátů je poněkud komplexnější. Například, aktivaci stresových kináz dochází k zvýšené expresi FAS ligandů, tím je fakticky autoaktivována zevní apoptotická dráha. Rovněž se zdá, že cisplatina hraje roli i v preferenční inhibici telomer, což může být další faktor vedoucí k eliminaci postižených buněk. Důležitá může být i aktivace apoptózy na základě aktivace genotoxického stresu a zvýšená tvorba volných radikálů jako produktů oxidace.(1)

Mezi výrazné nežádoucí účinky patří nefrotoxicita, kterou lze kontrolovat předaplikační hyperhydratací a následnou forsírovanou diurézou. Za zmínku stojí též značné nebezpečí anafylaktických reakcí a silný emetogenní potenciál. Vzácněji vzniká pankreatitis a problémem může být i kardiotoxicita.

Uplatnění nachází u nádorů ovaríí a testes ve stádiu s metastázami a také u pokročilých nádorů močového měchýře. (4) V kombinaci je používána také u dalších malignit, jak je uvedeno níže.

2.2 Paklitaxel (Taxol)

Paklitaxel patří do skupiny taxanů, jedná se o derivát původně izolovaný z kůry pacifického tisu. Jeho použití dříve limitovala dostupnost a rozpustnost, vyřešená až s vývojem technologie polosyntetické výroby. Mechanismus účinku spočívá v inhibici depolymerizace mikrotubulů. Mikrotubuly hrají komplexní roli ve funkci buněk, jsou nezbytné jak pro tvorbu mitotického vřeténka, tak pro motilitu a vnitřní strukturu buněk. Inhibicí depolymerace dochází tedy k narušení funkce cytoskeletu a zástavě buněčného cyklu ve fázi G₂/M přechodu. Následuje spuštění apoptózy současnou aktivací kaspázy-10 a FAS receptoru. Déle se uplatňuje omezení intracelulární signalizace, invazivity a metastatického potenciálu. V roce 2007 byl popsán další možný mechanismus účinku: zvýšení aktivity NADPH oxidázy generuje nadbytek kyslíkových radikálů (ROS) což působí nekrózu okolních buněk.(1)

Avšak ovlivnění mikrotubulárních funkcí se zdá být rozhodujícím důvodem proč působí taxany silně neurotoxicky. Mezi vzácnější nežádoucí účinky patří i inflamatorní intersticiální pneumonitida, popsána byla i neutropenická enterokolitis, alopecie, pankreatitis a hepatotoxicita.

Taxol nachází uplatnění u řady malignit. V kombinaci s cisplatinou se využívá u nekurativních režimů NSCLC a metastatického ovariálního karcinomu. Dále je indikován u pokročilého nádoru prsu a u Kaposiho sarkomu ve spojení s onemocněním HIV.(1)

2.3 Bortezomib

Tento derivát kyseliny boronové reprezentuje látky reverzibilně inhibující 26S proteasom. Tím dochází k narušení ubikvitin-proteasomového systému degradace proteinů. Následné hromadění aberantních produktů proteosyntézy ovlivňuje průchod buněčným cyklem a zastaví buněčné dělení. Vedlejším efektem je inhibice transkripčních faktorů NFκB vedoucí k alteraci proliferace a apoptotické kaskády.

Bortezomib je v současnosti indikován k terapii různých stádií mnohočetného myelomu a u lymfomu z plášťových buněk. Dále probíhají stovky studií ověřujících efektivitu u dalších hematologických malignit i solidních tumorů. (16) Dá se tedy očekávat, že jeho indikační spektrum se v budoucnosti rozšíří.

Kromě myelotoxicity je nejzávažnějším nežádoucím účinkem periferní, převážně senzorická neuropatie. Ta se projevuje zejména paresteziemi, hyperesteziemi a neuropatickou bolestí, což může vést až k diskontinuaci léčby. Naštěstí se většinou symptomatika zlepší či ustoupí v průběhu několika týdnů.

V budoucnu možná půjde využít látky, nyní intenzivně zkoumané, např. Carfilzomib, působící ireverzibilní inhibici proteasomů, které mají menší spektrum nežádoucích účinků.

Co se týče nežádoucích účinků, při závažné trombocytopenii a periferní neuropatii se doporučuje snížit dávku o 30% nebo ji úplně vynechat. To dle některých studií může významně kompromitovat účinnost chemoterapeutického efektu. (1)

2.4 Vinka alkaloidy

Mezi nejznámější látky této skupiny patří vinkristin a vinblastin, užívané jsou v léčbě jak solidních tumorů, tak u hematologických malignit. Jelikož inhibují polymerizaci mikrotubulů, jejich mechanismus účinku je jakýmsi protipólem taxanů a nepřekvapuje, že mají rovněž značný potenciál působit neurotoxicky.

Často bývá pozorována autonomní neuropatie manifestující se jako ileus či synkopy a hypotenze z autonomní dysregulace. (11)

2.5 Další látky

Existuje seznam dalších chemoterapeutik u kterých hrozí riziko rozvoje periferní neuropatie. Za zmínku stojí imunomodulátor a antiangiogenní faktor, dříve nechvalně proslulý Thalidomid, v současnosti

indikovaný u léčby mnohotného myelomu. Probíhající klinické studie ověřují jeho použití u kvanta dalších nádorových onemocnění. Velká pozornost z hlediska rozvoje neuropatie by se dle mého názoru měla věnovat obzvláště režimům kombinujících thalidomid s bortezomibem.

Některé práce zmiňují také periferní neurotoxicitu suraminu. Jedná se o lék indikovaný k léčbě trypanozomiázy a onchocerkiázy, byla však také zkoumána jeho role protinádorová, poněvadž inhibuje mnoho růstových a angiogenních faktorů. (11) Pokud by našel svoje místo v onkologii, jeho neurotoxický profil by také měl být brán v úvahu.

3. Metody výzkumu CIPN

3.1. In vivo modely

Za účelem zkoumání patogeneze a léčby byly uskutečněny četné experimenty na potkanech a nověji i na myších. Zpravidla je snahou dosáhnout co největší podobnosti s průběhem postižení u lidí. Pro různé kmeny zvířat je nutné najít vhodný dávkovací režim.

Skupina kolem Cavalettiho ve svých recentních studiích prokázala, že chronické podávání vybraných chemoterapeutik potkanům Wistar a myším BALB-C a HSD může sloužit jako dobrý model CIPN. U zvířat léčených CDDP, BTZ a TAX došlo k signifikantnímu poklesu NCV. U CDDP lze prokázat akumulaci platinových metabolitů v dorzálních gangliích a následné dystrofické změny tamních neuronů. BTZ a PAC také prokazatelně působí úbytek myelinu v sensorických vláknech. Ukázalo se, že BTZ také poškozuje satelitní buňky v sensorických gangliích.(17) V poslední době se objevily zprávy, že PAC způsobuje nejen periferní axonopatie, ale může se podílet i na toxicitě v gangliích.(14)

Jiné skupiny testovaly neurotoxicitu na potkanech kmene Sprague Dawley a prokázaly rozvoj termické a mechanické hyperalgesie a allodynie po podání různých chemoterapeutik, avšak především jako modely akutní neurotoxicity.(13)

Na potkaních a myších modelech neuropatie je objektem zájmu n. Ischiadicus jako model postižení silných, převážně sensorických vláken. Díky své snadné dostupnosti se NCV měří na ocasním nervu, u potkanů externími kruhovými elektrodami, u myši jehlovými.

Zvířecí modely mohou sloužit i k dalším účelům. Zjistilo se například, že poměr protinádorového efektu a profilu nežádoucích účinků se může lišit v závislosti na farmakokinetice léku. (15) To znamená, že testováním různých dávkovacích schémat a infuzních časů můžeme nežádoucí toxicitu léků často omezit. Dobře to lze ilustrovat na případě paklitaxelu, kdy zkrácení z 24 hodinové infuze na tříhodinovou vedlo k významnému poklesu výskytu těžkých neutropenií. Další studie ukázaly, že zkrácení infuze na 1 hodinu může být ještě výhodnější pro omezení výskytu periferní neuropatie, pokud se podávají častěji menší dávky při zachování shodné kumulativní dávky. (12) Pro získání tohoto typu informací jsou zvířecí modely velmi výhodné a často nezastupitelné. Tyto informace, pokud se ověří studiemi na lidech mohou nabídnout další prospěch pacientům.

3.2 *In vitro* modely

Buněčné *in vitro* modely jsou používány k odhalení molekulárních mechanismů neurotoxicity a k primárnímu testování potencionálních neuroprotektivních látek. Kultivovat lze různé druhy buněk, které lze diferencovat pomocí NGF, retinové kyseliny nebo TPA do stádia buněk velmi podobných neuronům – začnou tvořit neurity. K dispozici jsou linie odvozené z lidských neuroblastomů a myších PC12 buněk (feochromocytomové neuroendokrinní buňky). Výhodou je relativně snadno dostupný zdroj, snadná kultivace a ekonomický rozměr. Nevýhodou je, že buňky vlastně nejsou opravdové neurony - připomínají spíše neuroblasty. Netvoří stejný systém organizace jako *in vivo* a netvoří jasně definovatelný axon, nýbrž spoustu neuritů. Každopádně lze hodnotit míru postižení růstu nebo degenerace neuritů pomocí mikroskopického měření.

Taktéž lze zkoumat například aktivaci apoptotických kaskád s použitím technologií molekulárně biologických či imunohistochemických.

Pro přesnější zkoumání neurotoxicity jsou výhodnější kultury embryonálních nebo dospělých neuronů z míšních ganglií myši a potkanů, buď jako primární buněčné nebo organotypické kultury. Takto se například zjistilo, že v průběhu poškození paklitaxelem uniká z neuronů substance P, podmíněná aktivací Ca^{2+} kanálů. Podobná zjištění vedla k testování Ca^{2+} a Mg^{2+} solí jako potencionálních neuroprotektiv.

Zkoumá se také, jaký efekt mají neurotoxické látky na podpůrné buňky PNS. Schwannovy satelitní buňky hrají velkou roli v regeneraci, architektuře a homeostáze neuronů. Různé in vitro studie ukázaly například disorganizaci lamininu, mikrotubulů, chromatinu, Golgiho aparátu a lysosomů po expozici paklitaxelu těmto buňkách. (10)

4. Praktická část

4.1 Cíl práce

Cílem je zjistit, zdali myši kmene ICR:CD1, mohou sloužit jako validní zvířecí model chronické polékové periferní neuropatie. Jelikož se jedná o kmen outbrední, jeho výhodou je robustnost, vysoká produktivita, ekonomická výhodnost, dobrá dostupnost a snadná manipulace. Smyslem je zjistit, zdali tento typ myši poskytne srovnatelně funkční model neuropatie jako krysí modely či modely myši inbredních a hybridních.

Cílem je určit, jak chronické podávání vybraných antineoplastických chemoterapeutik v určitém schématu způsobí projevy periferní neuropatie a obecné toxicity.

Hodnotit se bude vztah mezi druhem chemoterapeutika a časovým průběhem a závažností periferní neuropatie jako nežádoucího účinku pomocí metod neurobehaviorálních a patologicko – morfologických.

Chceme prokázat snížení rychlosti nervového vedení a vznik allodynie a termické hyperalgesie pomocí metod neurobehaviorálních. Dále chceme zachytit morfologický korelát ve smyslu indukce neuronální dystrofie či axonopatie pomocí světelné mikroskopie.

Hypotéza je, že chronické podávání cisplatin, paklitaxelu a bortezomibu v níže popsaných režimech bude působit toxicky a způsobí neuropatické projevy. Pravděpodobně dojde k snížení hmotnosti myši, poklesu NCV, zvýšené citlivosti na teplo a tlak. Morfologicky dojde k dystrofickým změnám axonů na n. Ischiadicus a těl neuronů v dorzálních míšních gangliích.

4.2 Metodika

4.2.1 Soubor

Do studie bylo zařazeno 64 samiččích myši kmene CD1, 6 týdnů starých typu albino (dodavatel firma Harlan Italy, Corezzana, Itálie) o váze 25 +/- 5g. Péče o zvířata probíhala dle směrnic instituce, v souladu s národními (D.L. n. 116, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, suppl. 40, Feb 18, 1992) a mezinárodními zákony a nařízeními (ECC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, Dec 12, 1987; Guide for the care and use of laboratory animals, US National Research Council, 1996). Studie byla schválena etickou komisí University Milano-Bicocca.

V chovném zařízení bariérového typu s omezeným přístupem se udržoval denní cyklus 12ti hodin tmy a světla při teplotě 22° +/- 2° Celsia a relativní vlhkosti vzduchu 55% +/- 10%. Zvířata byla randomizována na základě tělesné hmotnosti a umístěna do schválených klecí v počtu maximálně 6 myši / klec. Každodenně byl kontrolován stav zvířat, tělesná hmotnost byla kontrolována dvakrát týdně. Voda a krmení bylo k dispozici ad libitum.

4.2.2 Design studie

Na začátku studie byly myši rozděleny do čtyř skupin (A,B,C,D) o shodném počtu subjektů.

Skupina A (n=16) byly kontrolní, ničím neléčené myši.

Skupina B (n=16) byla léčena Cisplatinou v dávce 2mg/kg, podávané 2x týdně po dobu 4 týdnů, s následným obdobím sledování 2 týdny (follow-up).

Skupina C (n=16) byla léčena přípravkem Taxol (Paclitaxel) v dávce 80mg/kg podávaným 1x týdně po období 6ti týdnů.

Skupina D (n=16) byla léčena přípravkem Bortezomib, dávkou 0.8 mg/kg, podáváno 2x týdně po dobu 6ti týdnů.

Podávání léků

Cisplatina byla podávána běžným způsobem injekčně do peritoneální dutiny. Paclitaxel a Bortezomib byly podávány intravenózně do ocasní žíly. Dřívější pokusy totiž ukázaly, že intraperitoneální aplikace indukuje dystrofické změny na peritoneu a tím interferuje s řádnou absorpcí.

Bortezomib (LC Laboratories, Woburn, MA), stejně jako Paclitaxel (Taxol, LC Laboratories, Woburn, MA), byl rozpuštěn ve směsi připravené dle následujícího klíče: 5% Tween 80%, 5% koncentrovaného etanolu a 90% fyziologického roztoku.

Cisplatina, vzhledem k svému výhodnému farmakosolubilnímu profilu byla aplikována ve sterilním fyziologickém roztoku.

Koncentrace roztoků byly vždy z praktických důvodů přizpůsobeny tak, aby injekční množství oscilovalo kolem hodnoty 0.2ml.

4.3 Měření

4.3.1 Obecná toxicita

Denně se vizuálně hodnotily významné změny v chování či vzhledu myši. Tělesná hmotnost se měřila 2x týdně přístrojem Mettler Toledo PG-

2002S jako průměr z desetivteřinového vážení, jak k zachycení toxicity léků, tak k přesnému výpočtu množství podávané látky, upravené na aktuální hmotnost myši.

Na konci terapeutického schématu se z utracených myší shromažďoval biologický materiál. Punkcí ocasní, případně dolní duté žíly se získala krev pro automatizovaný kompletní diferenciální krevní rozpočet, ze séra se hodnotila funkce jater a ledvin pomocí stanovení ALT, AST, urey a kreatininu. Výsledky byly srovnány s normálními hodnotami dodanými firmou Harlan. Krev byla myším odebrána také na konci 4. týdne z ocasní žíly. Vzorky sternální kostní dřeně, ledvin a jater byly fixovány v 10% formaldehydu, inkorporovány do parafinu a vyhodnoceny certifikovaným veterinárním patologem ke zjištění potencionální hepato, nefro a myelotoxicity.

4.3.2 Měření rychlosti nervového vedení (NCV)

Nervově kondukční studie byly provedeny na konci 4. a 6. týdne s použitím přístroje E3 Neuro Myto II+, Firenze, Italy, kdy série jehlových elektrod byla umístěna na dorzálním ocasním nervu. Druhá varianta měření spočívala v záznamu vedení na II. digitálním nervu pravé zadní končetiny.

Technika měření odpovídala ortodromnímu vedení vzruchu. Před započítím byly myši uvedeny do anestezie intraperitoneální aplikací ketamin-xylazinu. Celkem bylo použito 5 elektrod: 2 stimulační, 2 registrační a jedna uzemňovací, zapíchnuté v průběhu nervu. Tenké jehlové elektrody byly zapojeny v následující sekvenci: při registraci na ocasním nervu byla dvojice (s pozitivním a negativním pólem) registračních elektrod umístěna přibližně 1 cm od proximálního konce ocasu. Jako první se inzertuje + jehla, 0,5cm distálněji registrační sonda s - polaritou. S odstupem 1 cm následuje uzemňující pól. Dalších 2.5cm distálněji od této jsou umístěny stimulační elektrody, - nejdříve a s dalším odstupem 0.5cm poslední + stimulační elektroda.

Ve srovnávacím měření na II. digitálním nervu levé končetiny byla sekvence zapojení jehel obdobná. + stimulační elektroda na nejdistálnější části II prstu, - v oblasti proximálního falangu. Uzemnění (ground) bylo v oblasti hlezna, negativní registrační sonda 1.3cm proximálně od - stimulační sondy, tedy v oblasti kolenního kloubu a poslední + registrační sonda byla umístěna přibližně v polovině stehna.

Vždy se změří s přesností na mm vzdálenost mezi negativními póly příslušných elektrod. U ocasního nervu je to defaultně 35mm, u digitálního nervu 13mm. Tato vzdálenost je kritická pro výpočet NCV.

NCV je pak spočítána na základě registrované latence mezi stimuly (peak to peak). Impulsy jsou generovány o intenzitách 3, 6, 10, 15, a 20 mA. K hodnocení se využívá impuls, který generuje nejvyšší amplitudu, měřenou ve μV , tedy nejvýhodnější signál. Lze hodnotit i případný pokles voltáže impulsu na registrující sondě ve srovnání se stimulační amplitudou.

Všechna měření probíhala za standardních podmínek v příslušně klimatizované místnosti.

4.3.3 Neurobehaviorální testy

Model periferní neuropatie byl testován pomocí tří metod, kdy každá byla zaměřená na jiný fenomén, resp. měla by korespondovat s postižením určitých druhů nervových vláken, dle teorie vzniku různé patogeneze a symptomatiky neuropatií. Tyto testy byly provedeny před začátkem léčby, na konci 4. a 6. týdne na všech myších k dispozici před jejich plánovaným usmrcením. Hot plate test byl navíc proveden ještě na konci druhého týdne. U všech testů je určitá cut-off hodnota kdy se pokus přeruší, aby zvíře nebylo zraněno. Jednotlivé experimenty vždy prováděl stejný zkušený pracovník.

4.3.3.1 Dynamický test

Tento test slouží jako model mechanické allodynies. Byl proveden pomocí přístroje Dynamic Plantar Anesthesiometer 37450, Ugo Basile Biological Instruments Italy. Myši se umístí do průhledné plastové komůrky s drátěnou podlahou. Experimentátor manipuluje přístrojem tak, aby nastavil vysunovací kovovou jehlu o průměru 0.5mm pod střed planty myší končetiny. Zařízení automaticky přiblíží jehlu k povrchu planty a lineárně zvyšuje tlak na chodidlo až k hodnotě 15g v průběhu 15s. Moment, kdy myš tlak zaznamená a nohu oddálí, je určující. Počítá se průměr ze tří měření každé ze zadních tlapek.

4.3.3.2 Plantární test

Tento test slouží jako model termické hyperalgesie. Byl proveden pomocí přístroje Dynamic Plantar Analgesiometer 37370, Ugo Basile Biological Instruments Italy. Princip je podobný jako u předchozího testu, avšak podlaha komůrky je z plexiskla a zdrojem bolesti není tlak, ale mobilní zdroj fokusovaného infračerveného záření o výkonu 40W. Hodnotí se čas, kdy myš zareaguje. Výsledek se opět průměruje z celkem 6ti měření u každého zvířete.

4.3.3.3 Hot plate test

Tento test je obdobou testu plantárního, s tím rozdílem, že zdrojem tepla je ploténka rovnoměrně zahřátá na 50 stupňů Celsia. Účelem je testovat hypestezii, zprostředkovanou silně myelinizovanými vlákny. Po obvodu ploténky je plexisklová bariéra, takže přístroj připomíná arénu s rozpálenou podlahou. Myš je do arény vhozena a měří se čas, kdy myš začne lízat tlapku, klonicky s ní hýbat nebo jeví značnou agitovanost či motorický neklid. V ten moment je myš samozřejmě z arény opět odebrána. Průměr času je ze dvou opakovaných měření v rozmezí 30 minut.

4.3.4 Neuropatologické vyšetření

Na konci 4. týdne byla 3 zvířata z každé skupiny po uvedení do celkové anestezie usmrcena. Z každé myši byly shromážděny 4 sensorická míšní ganglia z oblasti lumbální páteře a přibližně 3cm dlouhý proximální úsek N. Ischiadicus dexter pro histologické zpracování. Preparáty byly obarveny toluidinovou modří a v 1.5 μm řezech pozorovány světelným mikroskopem Leica Nikon Eclipse E200. Pro vyhodnocení morfometrické se zhotovily řezy tenčí – o tloušťce 1 μm . Na konci 6. týdne byla utracena další 3 zvířata z každé skupiny a histologické preparáty zhotoveny z obdobných orgánů.

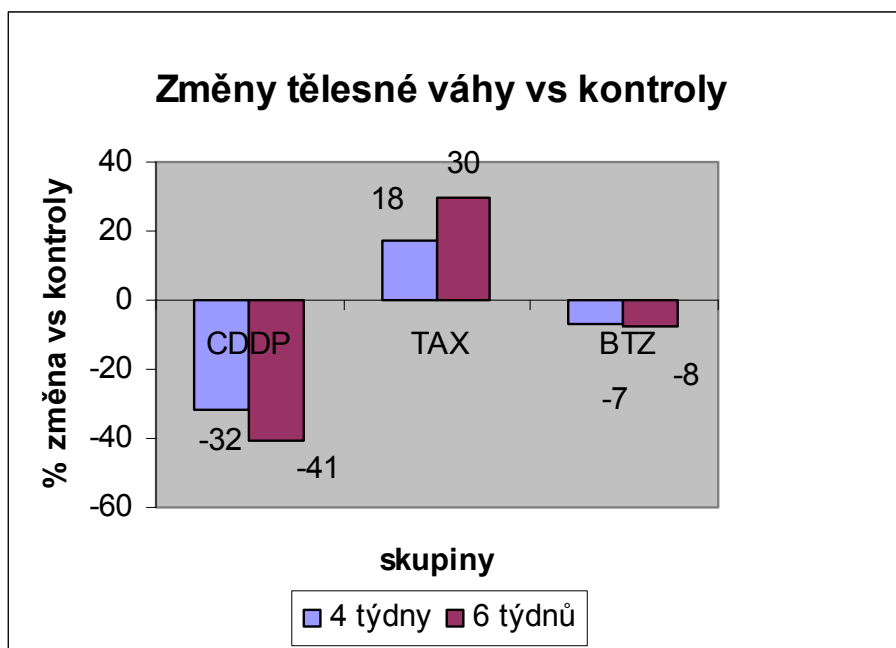
4.4 Statistická analýza

Výsledky byly zpracovány pomocí software GraphPad Prism 3. Spočítala se průměrná hodnota a směrodatná odchylka každé skupiny. Jako statistická metoda k porovnání skupin byla použita analýza variance (tzv. ANOVA) s Dunnettovým post-testem. Vždy byla určena statistická významnost odklonu hodnot léčené skupiny od hodnot kontrolní skupiny. Pro přehlednost a citlivost zjištěných dat jsem data přepočítal jako procentuální rozdíl průměru každé skupiny ve vztahu s průměrem skupiny kontrolní, zaokrouhlené na celá procenta. Rozdíly jsou považovány za významné, jestliže hladina významnosti je na úrovni $p < 0,05$ nebo $p < 0,01$. Rozdíly, u kterých nebyla zjištěna statistická významnost, nejsou v grafech uvedeny.

4.5 Výsledky

4.5.1 Výsledky parametrů obecné toxicity – vliv chemoterapie na tělesnou hmotnost a mortalitu

V průběhu experimentu došlo k několika nečekaným úmrtím. Ve skupině léčené cisplatinou nepřežily do 4. týdne dvě myši. Provedená pitva zjistila dramatickou nekrózu jater a dystrofické změny na thymu. Pravděpodobně se jednalo o přímou toxicitu cisplatinu. Jedna myš ze skupiny TAX zemřela na následky ketaminové anestezie.

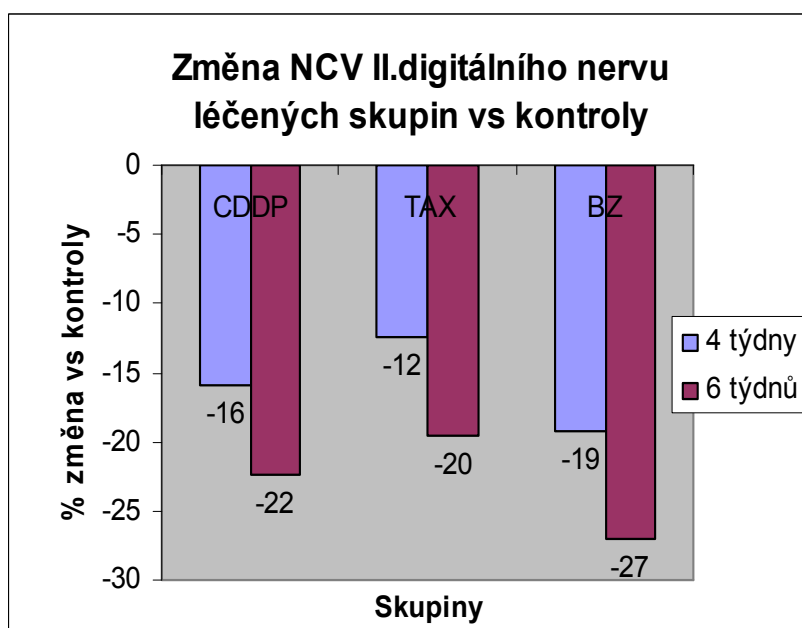
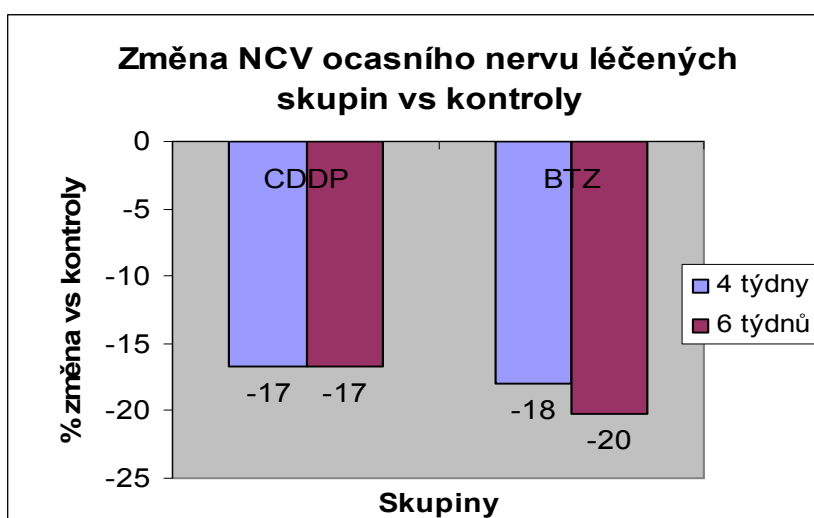


Ve skupině léčené cisplatinou došlo k významnému poklesu váhy oproti kontrolní skupině. U myši léčených borteomibem byl pokles váhy naopak výrazně menší. Překvapením bylo naopak tloustnutí myši léčených paklitaxelem. Pitevní nález prokázal výraznou akumulaci abdominálního tuku. Příčina této adipozity nebyla uspokojivě vysvětlena a byly odebrány krevní a tkáňové vzorky pro podrobnější analýzu.

4.5.2 Změny NCV léčených skupin versus kontroly

Bylo zjištěno, že podávání cisplatinu způsobilo pokles rychlosti vedení ocasním nervem o 17% oproti kontrolní skupině. Ve skupině léčené paklitaxelem nejsou výsledky reprezentativní, neboť se vzhledem

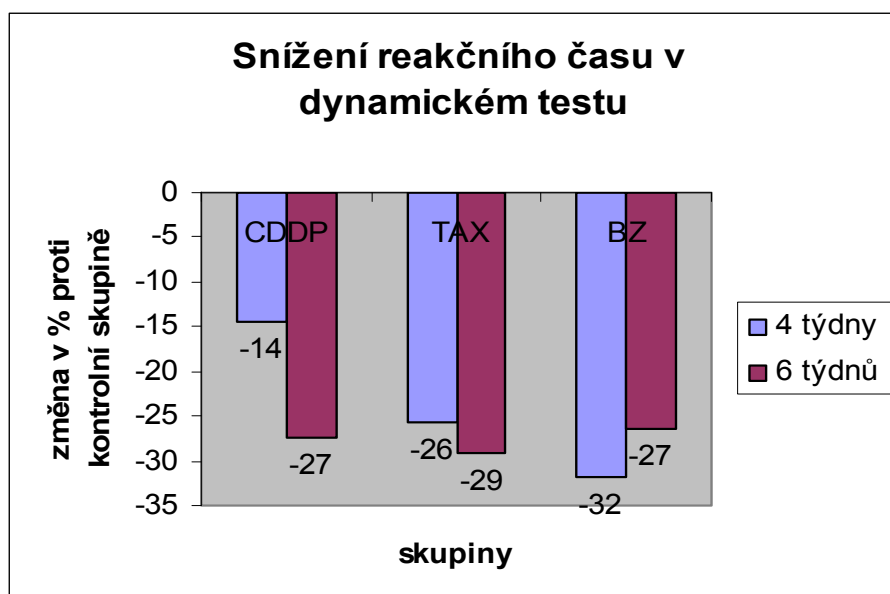
k technickým problémům podařilo změřit pouze dva subjekty. Pravděpodobným důvodem byly přímé histolytické účinky přípravku, způsobené paravazálním únikem při aplikaci injekce. Během měření vznikaly artefakty, které prakticky znemožnily určit latenci elektrických stimulů. Ve skupině léčené bortezomibem se ukázalo, že po 4 týdnech byl pokles NCV o 18%. Hodnota 20% po šesti týdnech ukazuje, že s vyšší dávkou se míra poškození nervových vláken dramaticky nezvyšuje.



Ve variantě měření NCV digitálního nervu se zdálo, že výsledky více odpovídaly představě o progresivním nárůstu poškození v závislosti na čase a dávce. Považuji ji tedy za lepší metodu, než měření NCV na očním nervu. Také všechny myši ze skupiny taxolu mohly být změřeny, problém s artefakty se nevyskytl.

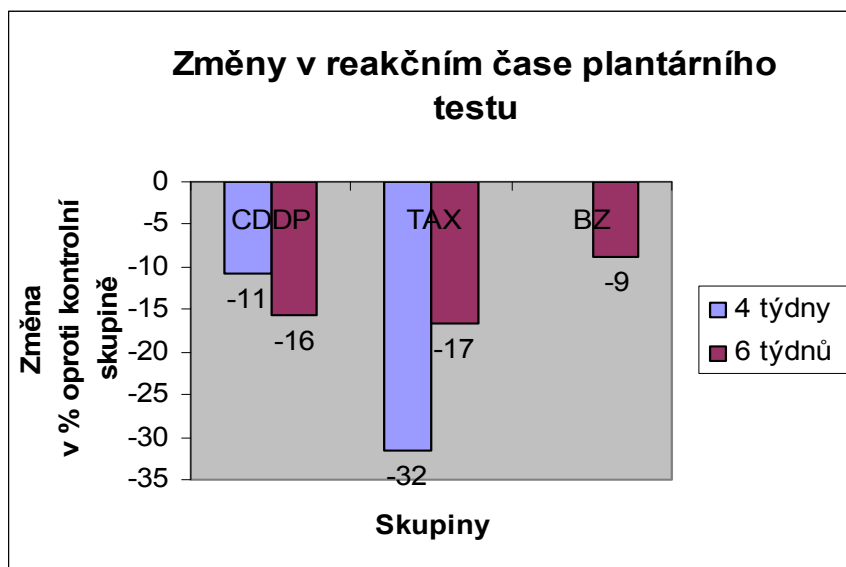
4.5.3 Výsledky neurobehaviorálních testů

4.5.3.1 Dynamický test



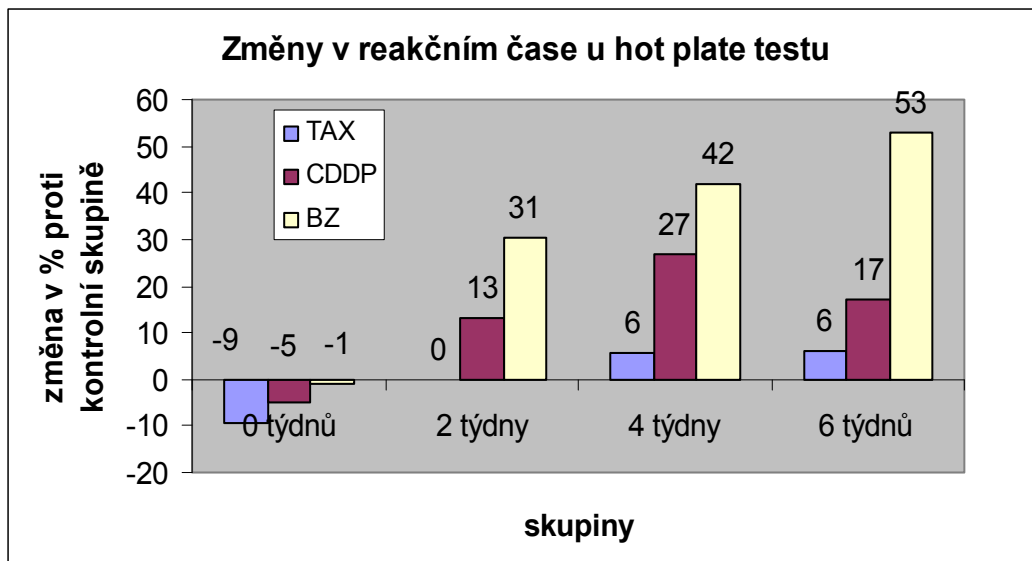
Výsledky dynamického testu prokázaly významný pokles v reakčním čase na stimulaci špendlíkem oproti kontrolním skupině. Můžeme prohlásit, že u léčených myši se vyvinula hyperalgezie na mechanické podněty, zachytitelná tímto testem. Míra postižení byla mezi skupinami překvapivě homogenní.

4.5.3.2 Plantární test



Z výsledků plantárního testu vyplynulo následující. Statisticky významný, ale relativně malý pokles reakčního času na termálně algický podnět se prokázal u cisplatinou léčených myší. U taxolu by se mohlo zdát, že se citlivost myší s časem naopak lepší. Ovšem při zvážení statistické odchylky původních dat se nejspíše nejedná o výrazný rozdíl. Ve skupině bortezomibu nebyl nalezen po 4. týdnu signifikantní rozdíl. Po 6. týdnu byl jistý pokles zřetelný, ale spíše můžeme usoudit, že bortezomib citlivost tohoto typu na CD1 myším modelu výrazně neovlivňuje.

4.5.3.3 Hot plate test



Údaje z měření randomizovaných skupin před začátkem podávání léků uvádím pro ilustraci variace hodnot, které lze při této metodě očekávat. Můžeme říci, že léčba taxolem u myši citlivost na horkou ploténku výrazně neovlivnila. U cisplatiny se myši naopak zdály být méně citlivé na teplo, to se odrazilo v prodlouženém reakčním čase. Zlepšení v šestém týdnu ukazuje na částečnou rekonstituci citlivosti. Nejdramatičtější změny byly zaznamenány u BTZ léčené skupiny. Z těchto výsledků se zdá, že léčba způsobila po dobu šesti týdnů výrazné a progredující snížení citlivosti tlapek.

4.6 Diskuze a závěr

Velkým nedostatkem je, že v době uzávěrky diplomové práce nebyly z časově – organizačních důvodů k dispozici výsledky neuropatologických vyšetření. To by umožnilo zasadit výsledky neurofyziologických metod do jasnější perspektivy, především komentovat morfologický korelát neurotoxického poškození. Lze ovšem předpokládat, že morfologické změny jsou podobného typu a rozsahu, jak ukázaly předchozí experimenty na Balb-C myších a potkanech. (17)

Podářilo se prokázat, že podávání léků dle uvedeného režimu vede k výrazným neurotoxickým změnám, které se pomocí neurobehaviorálních

a neurofyziologických testů podařilo zachytit. Kmen CD1 myši tedy lze využít jako model CIPN. Dobře výpovědní se zdá být zejména dynamický test, hot plate test a měření NCV na digitálním nervu. Za úvahu stojí upravit dávkování CDDP, abychom omezili mortalitu v této skupině.

Zajímavou perspektivou může být srovnání těchto výsledků se studii provedenými na inbredních kmenech. Na geneticky rozmanité skupině je rozhodně obtížnější neurotoxické fenomény demonstrovat.

Za úvahu stojí, zda by bylo vhodné kontrolní skupinu léčit placebem, případně vytvořit skupinu, které budou podány vehikula, tedy Tween 80% a ethanol. V případě behaviorálních testů by také zvířata mohla být pro hodnotitele zaslepena.

Značným problémem byly technické obtíže měření NCV u paklitaxelu. Řešením by bylo měřit pouze na digitálním nervu. Také změny hmotnosti u taxolem léčených myši vedly k myšlence, zda nebyl lék kontaminován, či nebyla zvolena koncentrace, která nebyla pro CD1 myši vhodná.

Konečně, vzhledem k úmrtí některých myši se nedaly skupiny optimálně srovnávat, např. když zemřela myš mezi prvním a druhým měřením NCV. Pravděpodobně by bylo vhodné pro tuto situaci zvolit větší skupiny a provádět měření u co největšího počtu z nich.

5. Možnosti kontroly CIPN

Periferní neuropatie jako pozdní následek chemoterapie patří v současnosti k obtížně kontrolovatelné morbiditě. Bylo provedeno mnoho studií preklinických i klinických u nadějných neuroprotektiv. Zmíním výsledky, kterých bylo na tomto poli v uplynulých letech dosaženo a poučení z nich plynoucí.

Racionální přístup znamená zlepšení prevence v onkologii, abychom omezili množství manifestních onemocnění vyžadujících léčbu. Dále se

zaměřím na současná terapeutická doporučení a přehled možností, které by mohly vyplynout ze studií, které současně probíhají.

5.1 Prevence CIPN

5.1.1 Studie

Prevenčí rozumíme snahu snížit incidenci a závažnost CIPN u pacientů léčených neurotoxickými chemoterapeutiky.

Velká pozornost se věnovala Vitaminu E jako antioxidantu, jež může omezovat zejména toxické působení cisplatiny. Větší počet studií na potkanech a několik menších studií na lidech naznačilo, že suplementace Vitaminem E významně snižuje incidenci a závažnost CIPN. Avšak dokud nebude k dispozici velká, placebem kontrolovaná studie, která potvrdí, že není snížen protinádorový účinek, nelze tuto látku rutinně používat. Lze totiž předpokládat, že efekt cisplatiny, částečně zprostředkovaný produkcí ROS, by mohl být antioxidantem kompromitován. Navíc je třeba obezřetnosti v případě menších studií, které mohou mít závažné chyby v designu hodnocení CIPN.(20)

Dále, studie CONCEPT ověřovala účinek solí Ca a Mg v prevenci neurotoxicity u oxaliplatiny a byla předčasně ukončena, neboť se zdálo, že ve skupině takto léčené se zhoršila odpověď na vlastní onkologickou léčbu. Zajímavě, při revizi a opakovaném vyhodnocení dat jinými radiology se zjistilo, že mezi skupinou neléčenou a léčenou Ca a Mg byl vlastně z hlediska regrese nádoru rozdíl zanedbatelný a spíše ve prospěch skupiny léčené. V té době však již původní studie byla ukončena.(6)

Z řady preklinických modelů se zdálo nadějně, že LIF, leukemia inhibitory factor může hrát roli v terapii CIPN. Větší studie na lidech však toto vůbec neprokázala.

Další naděje byly vkládány do glutathionu, glutaminu, amifostinu, acetylcysteinu, acetylkarnitinu, venlafaxinu, erythropoetinu. Ani v jednom

případě však zatím nejsou k dispozici konklusivní data prokazující efektivitu a bezpečnost.(6)

Zajímavým poznatkem společným několika studiím je stesk, že neuroprotektiva se klinicky obtížně testují. Až polovina pacientů studie ukončila předčasně buď z důvodu nežádoucích účinků nebo jelikož nepociťují profit. Mnohdy se prokázalo, že pacienti nekontrolovatelně užívali současně různá analgetika, fyzioterapeutické procedury, akupunkturu atd. V mnoha případech též studie ztroskotala na způsobu hodnocení neuropatie.(9)

5.1.2 Doporučení k prevenci CIPN

Důležitým indikátorem, který musí být hodnocen při zvažování rizika rozvoje CIPN je identifikace rizikových faktorů. Prakticky to v současnosti znamená zhodnocení farmakologické anamnézy vzhledem k předchozí expozici potencionálně neurotoxickými léčivy. Další ohroženou skupinou jsou pacienti s dalšími predispozicemi, nejčastěji diabetici a pravidelní konzumenti alkoholu v množství převyšujícím 80g etanolu denně. Pro budoucnost může být zajímavá genotypizace např. pro jedince s heterozygotními formami hereditárních neuropatií a s rozvojem farmakogenetiky i screening pro určující genové lokusy, hrající roli v manifestaci CIPN.(13)

V úvahu je také třeba vzít účel, za kterým chemoterapii podáváme. U pacientů s kurativním záměrem se lze pokusit i během hospitalizace o intenzivnější kontrolu symptomů a zasahovat do dávkovacího schématu co nejméně. Naopak, u pacienta léčeného paliativně musíme brát v zřetel zejména kvalitu života a být připraveni dávku neurotoxického agens redukovat nebo úplně ukončit jeho podávání. Jako vodítko mohou sloužit guidelines, které byly vypracovány pro řadu léčebných schémat. (8)

Vynechat nelze důležitost obecné onkologické prevence. Je logické, že pokud omezíme známé rizikové faktory karcinogeneze v našem životě,

Medicína může přispět osvětou, skrínigovými programy a časnou detekcí nádorových onemocnění a dalšími aktivitami, jako je například očkování proti onkogenním virům. Medicínský výzkum v onkologii hraje velkou roli – snad se v budoucnu dočkáme vývoje léčiv, které budou méně toxická, více cílená a kauzálně zaměřená. První kroky v tomto již byly učiněny s objevem tzv. nádorových kmenových buněk, pravděpodobně zodpovědných za recidivy malignit, které však v současnosti jen velmi obtížně vůbec dokážeme detekovat, natož specificky eliminovat.

5.2 Léčba CIPN

5.2.1. Studie

Velké naděje byly vkládány do léků gabapentinu, lamotriginu a tricyklických antidepresiv. To jsou léky velmi efektivní u neuropatických bolestí jiné etiologie, zejména diabetické nebo u nádorové infiltrace. U CIPN však velké zaslepené placebem kontrolované studie přínos neprokázaly, navíc vznikají potíže z řady dalších nežádoucích účinků. Je zřejmé, že je třeba se zaměřit na ovlivnění patofyziologických příčin CIPN, neboť extrapolace obvyklé léčby z příbuzných indikací zatím nepřináší větší efekt, než lze přisoudit placebo. (10)

Objevují se stále další a další potencionálně nadějně látky, například kapsaicin, pregabalin, oxkarbazepin. Údaje o jejich účinnosti se zpravidla odvíjí z anekdotálních empirických zkušeností, malých nezaslepených či placebem nekontrolovaných studiích, případně z experimentů na zvířatech. Obezřetnost je třeba i u vitaminů nebo herbálních produktů – Scott et al. 2008 zjistil, že nadbytek vitamínu B6 naopak neuropatii může způsobit.

V posledních dvou letech se objevily zprávy o účinku akupunktury nebo přístrojů emitujících elektromagnetické záření. Jedná se však zatím

5.2.2. Doporučení

Sočasná doporučení v terapii CIPN jsou následující. V první linii nasazujeme obecně NSAID, tedy nesteroidní analgetika / antirevmatika. Pokud tato strategie nevede k žádoucímu efektu, můžeme se pokusit o kontrolu symptomů použitím opioidních farmak. Více možností oficiální doporučení zatím nenabízejí. Obvykle je výhodné pacienta informovat a ujistit, neboť ve většině případů po skončení chemoterapie neuropatie ustoupí a zlepší se spontánně.

V současné praxi se stává, že lékaři předepisují další farmaka, především z nouze. Nejčastěji thiamin a různá antidepresiva či antikonvulziva, která jsou často efektivní u diabetické neuropatie nebo neuropatických bolestí jiné etiologie. Jejich účinnost u CIPN však nebyla ve velkých kvalitních studiích prokázána. Jejich obecné a široké použití v této indikaci bez řádného zdůvodnění nelze tedy doporučit.

Jedince, u kterých se vyvinula dlouhodobá ireverzibilní neuropatie, ať už se symptomatikou pozitivní či negativní, bychom měli integrovat do rehabilitačního programu zaměřeného na fyzikální a okupační terapii. Ve specifických případech může být vhodné využít pomoc psychoterapeuta.

6. Závěr

V současné době bohužel nedisponujeme léky, které by dokázaly efektivně zvrátit sensorické nebo motorické výpadky a musíme se omezit na pouhou podpůrnou terapii. V praxi to znamená zejména léčbu bolesti a prevenci vzniku zranění, dekubitů atd. Další typy farmakoterapie, jak bylo zmíněno výše, bývají také používány, ovšem s nejistým výsledkem.

Ačkoliv bylo testováno množství látek, které by mohly pozitivně ovlivnit rozvoj periferní neuropatie, výsledky jsou zatím značně neuspokojivé a dosud neexistují žádné jasné guidelines pro profylaxi této komplikace, což je pro pacienty nevýhodné. Je nutné pokračovat v prospektivních studiích, zkoumajících zdali i v klinické praxi jsme schopni dosáhnout skutečného neuroprotektivního efektu. Zřetel musí být brán i na deklaraci toho, že nedojde k ohrožení původní protinádorové aktivity. (18)

Zvířecí modely jsou pro tuto problematiku zatím pravděpodobně nejlepší způsob, jak nové postupy preklinicky ověřit. V současné době je jedním z trendů rozšířit funkční modely neuropatie na vybrané kmeny myší. Existuje totiž množství buněčných linií, původem humánních nebo murinních, které jsou u myší schopny při subkutánní aplikaci indukovat růst příslušného maligního nádoru. To umožňuje zkoumat najednou jak neurotoxicitu, tak protinádorovou aktivitu používaných i nových léčiv a dokonce je i současně využívat pro studie neuroprotektiv a úpravy dávkovacích schémat. Naděje se také kladou do představy, že využití speciálně vyšlechtěných myších kmenů by mohlo přispět k přesnější definici patogeneze periferní neuropatie. To je nezbytné k hledání vhodných neuroprotektiv. Mnoho autorů se přiklání k názoru, že racionálním řešením je hledání kauzální léčby, která by byla specifická pro různá chemoterapeutika. Různé léky působí neurotoxicky různým mechanismem a zejména proto nejsou efektivní terapeutické postupy, které

předpokládají stejnou efektivitu pouze na základě empirických zkušeností z léčby neuropatií jiné etiologie, nejčastěji diabetické.

Souhrn

Tato práce se zabývá problematikou periferní neuropatie způsobené protinádorovou chemoterapií. V úvodu jsou rozpracovány příčiny, symptomy a diagnostika periferní neuropatie.

V druhé části jsou podrobněji uvedeny nejdůležitější chemoterapeutika, které nejčastěji postihují periferní nervový systém. Dále jsou popsány běžné in vivo a in vitro metody sloužící k experimentálnímu modelování tohoto typu neuropatie.

V praktické části je popsán experiment, jehož smyslem bylo ověřit, zdali kmen laboratorních myší CD1 může sloužit jako užitečný zvířecí model polékové neuropatie. Výsledky prokázaly, že po šestitýdenní aplikaci cisplatin, paklitaxelu a bortezomibu došlo k poškození periferního nervového systému, což se podařilo zachytit pomocí neurofyzilogických a neurobehaviorálních testů.

Práci zakončuje shrnující pojednání o současně probíhajícím výzkumu v oblasti terapie polékové periferní neuropatie, spolu se shrnutím současných doporučení pro lege artis léčbu a prevenci tohoto problému u onkologických pacientů.

Summary

The topic of this diploma thesis is chemotherapy induced peripheral neuropathy. The first part is concerned with etiology, symptoms and diagnostics of peripheral neuropathy.

The second part consists of a description of the most common antineoplastic drugs causing peripheral neuropathy. Different in vivo and in vitro models that are used in laboratory research to demonstrate the occurrence of peripheral neuropathy are discussed.

In the practical part, an experiment is described that was designed to evaluate whether the strain of CD1 mice can be a useful animal model to study chemotherapy induced peripheral neuropathy. Results of this experiment indicate that after 6 weeks of administration of cisplatin, paclitaxel and bortezomib, evidence of damage to the peripheral nervous system can be detected using neurobehavioral and neurophysiological tests.

The final section includes information about current research in prevention and management of chemotherapy induced peripheral neuropathy. Latest recommendations for prevention and therapy of peripheral neuropathy in oncological patients are given.

Seznam použité literatury

1. KLENER, P. a KLENER, P. jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2010. 209 s. ISBN 978-80-247-2808-7
2. MASUHR, K.F. a NEUMANN, M. *Duale Reihe – Neurologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2007, pp. 466-478
3. EHLER, E. Periferní neuropatie v ambulantní praxi. *Neurologie pro praxi*, 2009, roč. 10, č. 1, s. 32-36
4. MECHL, Z. a BRANČÍKOVÁ, D. Nežádoucí účinky protinádorové léčby a jejich léčba. *Medicína pro praxi*, 2009, roč. 6, č. 6, s. 325-329
5. MALIK, B., STILLMAN, M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2008, no. 8, pp. 56-65
6. WOLF, S. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *European Journal of Cancer*, 2008, no. 44, pp. 1505-1515
7. CVALETTI, G. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity assessment: a critical revision of the currently available tools. *European Journal of Cancer*, 2010, no.46, pp. 479-494
8. PAICE, J.A. Clinical challenges: Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Seminars in oncology nursing*, 2009, vol. 25, no 2, pp. 8-19
9. SIREN, A.L. Therapeutic potential of erythropoetin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics*, 2009, vol 9, no.1, pp. 108-27
10. RAO, R.D. Efficacy of Lamotrigine in the management of Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Cancer*, 2008, vol. 112, no. 12, pp. 2802-2808
11. CVALETTI, G., CUNDARI, S. Thalidomide chemotherapy-induced peripheral neuropathy: actual status and new perspectives with thalidomide analogues derivatives. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 2009, No. 9, pp. 760-768

12. MIELKE, S. Individualized pharmacotherapy with paclitaxel. *Current opinion in oncology*, 2007, No. 19, pp. 586-589
13. LANZANI, F. et al. Role of pre-existing neuropathy on the course of bortezomib-induced peripheral neurotoxicity. *Journal of the peripheral nervous system*, 2008, No. 13, pp. 267-274
14. CAROZZI, V. et al. Glutamate Carboxypeptidase Inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotoxicity research*, 2010, No. 17, pp. 380-391
15. KALEY, T.J., DEANGELIS, L.M. Therapy of chemotherapy induced peripheral neuropathy. *British Journal of Haematology*, 2009, No. 145, pp. 3-14
16. CAVALETTI, G., JAKUBOWIAK, A. J. Peripheral neuropathy during bortezomib treatment of multiple myeloma: a review of recent studies. (online) *Leukemia and Lymphoma*, 2010, (cit. 1.6.2010), dostupnost www.informahealthcare.com, ISSN 1029-2403
17. CAROZZI, V. et al. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *European Journal of Cancer*, 2009, No. 45, pp. 656-665
18. BIANCHI R. et al. Cisplatin-induced peripheral neuropathy: neuroprotection by erythropoietin without affecting tumour growth. *European Journal of Cancer*, 2007, No. 43, pp. 710-717
19. MEREGALLI, C. Bortezomib induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *European Journal of Pain*, 2010, No. 14, pp. 343-350
20. AUTHIER, N. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics*, 2009, Vol.6, pp. 620-629

Seznam příloh

Příloha č. 1: Seznam zkratek

ICR CD-1 international cancer research, caesarian derived 1
NCV nerve conduction velocity
CDDP cisplatina
BTZ bortezomib
TAX paclitaxel, taxol
NSCLC non-small cell lung cancer
CIPN chemotherapy induced peripheral neuropathy
HMSN hereditární motoricko sensorické neuropatie
EMG elektromyografie
TNS total neuropathy scale
CTC common toxicity criteria
ECOG eastern cooperative oncology group
NCI national cancer institute
SNAP sensory nerve action potential
CMAP compound muscle action potential
MNAP mixed nerve action potential
PNS periferní nervový systém
HIV human immunodeficiency virus
HAART highly active antiretroviral therapy
WHO světová zdravotnická organizace
ROS reactive oxygen species
NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NFkB nuclear factor kappa B
NGF nerve growth factor
TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
ALT alanin amino transferáza
AST aspartát amino transferáza