

EFECTE INDUSE IN VIVO DE CIS- PLATINĂ ASUPRA HOMEOSTAZIEI BIOCHIMICE A UNOR METABOLIȚI PROTEICI ȘI A UNOR BIOMETALE LA ANIMALE DE LABORATOR

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul CHIMIE
de către

Farm. Ariana-Bianca Martău

Conducător științific:

Referenți științifici:

prof.univ.dr. Zeno Gârban

prof.univ.dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu

prof.univ.dr. Nicolae Manolescu

prof.univ.dr. Trăilă Nicola

Ziua susținerii tezei: 28. 11.2008

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2008

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat cu titlul „Efecte induse in vivo de cis-platină asupra homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și a unor biometale la animale de laborator” a fost elaborată în cadrul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului de la Universitatea „Politehnica” Timișoara, între anii 2001 și 2008.

Investigațiile întreprinse pe „modele experimentale animale” sunt utilizate în biochimie, xenobiochimie, farmacologie, nutriție, etc. Datele interesează aspectul dual normal / patologic, pornind de la nivel molecular până la nivel de celulă, țesut, etc. În acest cadru se poate studia acțiunea diverselor substanțe chimice sub aspect biochimic/patobiochimic; fiziologic/fiziopatologic; morfologic/morfopatologic.

În prezenta teză de doctorat s-a cercetat, pe modele animale, acțiunea cis-platinei asupra homeostaziei biochimice interesând unele aspecte ale metabolismului proteic și ale metabolismului hidro-electrolitic. Abordarea acestui subiect a necesitat documentarea în domeniul biologiei moleculare, biochimiei anorganice, biologiei experimentale etc.

Modificările homeostaziei biochimice investigate experimental, pot explicita mecanismele moleculare create de injuria biochimică atât în patogeneza neoplazică (patobiochimie, patofiziologie) cât și în chimioterapia citostatică.

Se impune menționarea faptului că în cadrul tezei sunt abordate aspecte particulare referitoare la biochimie - metabolismul proteic, metabolismul hidro-electrolitic (în speță metalele) dar și la xenobiochimie.

În acest sens se reiterează faptul că xenobiochimia este un domeniu subsecvent al biochimiei în care se studiază biotransformarea xenobioticelelor de interes alimentar (e.g.: aditivi), de interes farmaceutic (e.g.: chimioterapice citostatice), de interes toxic (e.g.: biocide: insecticide, rodenticide, etc.).

În cazul de față cis-platina, ca și xenobiotic de interes farmaceutic, evidențiază mecanisme de biodegradare specifice (i.e. acvatara, formarea de aducți, etc.). În final acești compuși interferă cu metabolismul (mai exact cu producția metabolică) oferind o explicitare a mecanismelor moleculare ale dishomeostaziei.

Timișoara, noiembrie 2008

Farm. Ariana – Bianca Martău

Pe tot parcursul efectuării acestei teze am beneficiat de sprijinul permanent al D-lui Prof. Dr. Zeno Gârban, căruia îi aduc pe această cale cele mai sincere mulțumiri pentru îndrumarea activității mele științifice, pentru generozitatea împărtășirii cunoștințelor, răbdare, profesionalism, dar și pentru exigența cu care a coordonat activitatea științifică a subsemnatei.

Tuturor cadrelor didactice și colegilor de la Universitatea Politehnica din Timișoara și de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului din Timișoara, cu care am cooperat și mi-au oferit sprijin în diverse etape ale cercetării experimentale și la elaborarea lucrărilor științifice le adresez sincere mulțumiri.

În fine, dar nu în ultimul rând doresc să exprim recunoștință și mulțumiri familiei mele pentru susținerea, înțelegerea și liniștea pe care mi-au acordat-o pe parcursul anilor de studiu.

Martău, Ariana – Bianca

Efecte induse in vivo de cis-platină asupra homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și a unor biometale la animale de laborator

Teze de doctorat ale UPT, Seria 2, Nr. 6, Editura Politehnica, 2008, 224 pagini, 55 figuri, 20 tabele.

ISSN: 1842-8444

ISBN: 978-973-625-765-0

Cuvinte cheie:

Cis-platina, chimioterapice citostatice, modele experimentale animale, homeostazie biochimică, metaboliți azotați neproteici, biometale

Rezumat,

Lucrarea abordează un domeniu de interes și actualitate reprezentat de investigațiile bioanalitice întreprinse pe "modele experimentale animale", care permit evidențierea efectelor induse de medicamente chimioterapice citostatice asupra homeostaziei biochimice și explicitarea diverselor mecanisme de acțiune.

Efectele induse de cis-platină (cis-diaminodicloroplatina) asupra homeostaziei biochimice a acidului deoxiribonucleic (DNA) hepatic reprezintă o expresie a acțiunii la nivelul macromoleculii care conține informația genică. Modificările induse de cis-platină asupra concentrației proteinelor serice și a fracțiunilor electroforetice sunt o consecință a acțiunii asupra succesiunii proceselor de replicare –transcripție-translație care vizează sinteza proteică. Administrarea unor doze crescute de cis-platină influențează statusul homeostazic al metaboliților azotați neproteici și al unor biometale din sânge. De asemenea, modificarea homeostaziei principalelor biometale din diverse organe este influențată specific de administrarea de cis-platină. Datele analitice furnizate de investigațiile pe animale de laborator pot avea caracter predictiv pentru orientarea conduitei în nutriție, în chimioterapie, în instituirea dietei asociate acesteia, în monitorizarea unor procese metabolice, în utilizarea de markeri, etc.

CUPRINS

INTRODUCERE	9
1. CHIMIOTERAPICE CITOSTATICE : CARACTERISTICI ALE COMPUȘILOR	
PLATINICI	13
1.1. Considerații generale.....	13
1.2. Medicamente chimioterapice de uz citostatic – caracteristici structurale	14
1.2.1.Principalele clase de compuși chimioterapici.....	16
1.2.2.Compuși alchilanți.....	18
1.2.2.1.Derivați azotiperitici	20
1.2.2.2.Derivați aziridinici.....	22
1.2.2.3.Esteri ai acidului metansulfonic	24
1.2.2.4.Derivați de N – nitrosouree și N-hidroxiuree	24
1.2.2.5.Derivați de metilhidrazină și triazenă	26
1.2.2.6.Complecșii metalici cu platina.....	27
1.2.3.Compuși din clasa antimetaboliților.....	29
1.2.3.1.Antimetaboliți ai acidului folic	29
1.2.3.2.Analogi ai nucleobazelor din acizii nucleici.....	30
1.2.3.2.1. Analogi ai nucleobazelor purinice	30
1.2.3.2.2. Analogi ai nucleobazelor pirimidinice.....	31
1.2.4. Antibiotice cu acțiune citostatică.....	32
1.2.5. Compuși citostatici de extracție	35
1.3. Specificul mecanismelor de interacție ale chimioterapicelor citostatice...	38
1.3.1.Privire sinoptică.....	38
1.3.2.Mecanisme de interacție specifice compușilor alchilanți	39
1.3.3.Mecanisme de interacție specifice antimetaboliților	42
1.3.4.Mecanisme de interacție specifice antibioticelor cu acțiune citostatică..	44
1.3.5. Mecanisme de interacție ale compușilor citostatici de extracție	45
1.4. Caracteristici structurale și mecanismul de acțiune al compușilor platinici ..	46
1.4.1. Structura compușilor platinici	46
1.4.2. Activitatea biologică și mecanismul de acțiune.....	48
1.4.2.1. Formarea aducțiilor specifici cis-platinei	50

1.4.2.2. Particularități ale relației structură -activitate la cis-platină în interacția cu DNA.....	53
1.4.3. Problema stabilității chimice și toxicitatea cis-platinei.....	54
2. MODALITĂȚI DE INVESTIGARE A EFECTELOR CIS-PLATINEI IN VIVO.....	59
2.1. Considerații generale.....	59
2.2. Investigații pe animale de laborator.....	60
2.2.1. Specificul metodologiei experimentale	60
2.2.2. Particularități ale etapelor de cercetare.....	61
2.2.2.1. Conținutul animalelor de laborator.....	61
2.2.2.2. Anestezia animalelor de laborator.....	62
2.2.2.3. Calea de administrare a substanței cercetate.....	64
2.2.2.4. Prelevarea probelor biologice.....	65
2.2.2.5. Conservarea probelor biologice cercetate.....	65
2.3. Metode de investigare pentru metaboliți proteici sanguini	67
2.3.1. Metode de investigare pentru proteine serice.....	67
2.3.2. Metode de investigare pentru DNA tisular.....	68
2.3.3. Metode de investigare pentru metaboliți azotați neproteici.....	69
2.3.3.1. Determinarea ureei serice.....	69
2.3.3.2. Determinarea creatininei serice.....	71
2.3.3.3. Determinarea acidului uric în ser	73
2.4. Metode de investigare a unor electroliți metalici sanguini.....	74
2.4.1. Determinarea sodiului și potasiului	75
2.4.2. Determinarea calciului.....	76
2.4.3. Determinarea magneziului.....	76
2.5. Spectroscopia de absorbție atomică în determinări de metale din țesuturi.....	77
2.5.1. Spectrometria de emisie atomică.....	78
2.5.2. Spectrometria de absorbție atomică	79
2.5.2.1. Principii metodologice.....	79
2.5.2.2. Aparatura necesară - generalități.....	80
2.5.2.2.1. Sursa de radiație.....	80
2.5.2.2.2. Sisteme de atomizare.....	81
2.5.2.2.3. Monocromatorul	82
2.5.2.2.4. Detectorul	83

2.5.2.2.5. Sistemul de evaluare a datelor.....	83
2.5.2.3. Stabilirea selectivă a unei tehnici de analiză.....	84
2.6. Aspecte generale privind evaluarea statistică a datelor	85
3. INVESTIGAREA ACȚIUNII CIS-PLATINEI PE MODELE EXPERIMENTALE	
ANIMALE.....	89
3.1. Constituirea modelului experimental.....	89
3.2. Pregătirea animalelor de experiență.....	90
3.3. Specificul metodologiei experimentale	92
3.4. Administrarea soluției de cis-platină	94
3.4.1. Primul experiment	97
3.4.2. Secundul experiment.....	97
3.5. Prelevarea de probe analitice.....	98
3.5.1. Prelevarea probelor de sânge	99
3.5.2. Prelevarea probelor de organe.....	100
4. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA DNA HEPATIC ȘI A SERUMPROTEINELOR.....	103
4.1. Efectul cis-platinei asupra DNA hepatic.....	103
4.2. Efectul cis-platinei asupra serumproteinelor.....	117
4.3. Acțiunea chimioterapicelor citostatice în cadrul ciclului celular.....	124
5. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA UNOR METABOLIȚI NEPROTEICI ȘI BIOMETALE DIN SERUL SANGUIN.....	129
5.1. Efectele cis-platinei asupra unor metaboliți azotați neproteici	129
5.2. Efectele cis-platinei asupra unor biometale.....	135
6. INVESTIGAREA UNOR BIOELEMENTE METALICE DIN ȚESUTURI ȘI ORGANE....	143
6.1. Prelevarea probelor biologice	143
6.2. Pregătirea probelor analitice	144
6.3. Determinarea cantitativă a bioelementelor	145
6.4. Analiza bioelementelor din țesuturi și organe	146
6.5. Analiza bioelementelor din ficat.....	146
6.6. Analiza bioelementelor din rinichi	153
6.7. Analiza bioelementelor din creier.....	159
6.8. Analiza bioelementelor din cord.....	164
6.9. Analiza bioelementelor din splină	169
6.10. Analiza bioelementelor din mușchi	173

Cuprins	8
6.11. Efectul produs de cis-platină asupra unor biometale prezentat comparativ pe diferite organe	181
CONCLUZII.....	185
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	189

**Titluri recent publicate în colecția „TEZE DE DOCTORAT”
seria 2: Chimie**

1. **Adina-Elena Segneanu** – *Utilizarea carbonaților organici pentru protejarea grupei amino- și activarea grupei carboxil ale aminiacizilor în sinteze de peptide, ISBN 978-973-625-431-4, 2007;*
2. **Marcela-Elena Stoia** – *Contribuții la obținerea de nanomateriale cu proprietăți magnetice, nedispersate și dispersate în matrici anorganice, ISBN 978-973-625-463-5, 2007;*
3. **Cristian Neanu** – *Contribuții la sinteza și studiul unor compuși anorganici ai hidraților de carbon cu potențială activitate biologică, ISBN 978-973-625-519-9, 2007;*
4. **Maria Daniela Șofei** – *Contribuții la studiul reacțiilor de funcționalizare a compușilor heterociclici cu azot, ISBN 978-973-625-552-6, 2007.*



EDITURA POLITEHNICA

INTRODUCERE

În biochimia anorganică (chimia bioanorganică) diverși compuși de extracție și/sau de sinteză sunt studiați sub raportul compoziției, structurii chimice, activității biologice, a relației structură - activitate și a aplicațiilor în științele vieții. În acest cadru se includ compuși metalici de natură anorganică și/sau organică care și-au aflat utilizare în domeniul nutriției (e.g.: nutrienți, aditivi alimentari), al farmacologiei (e.g. medicamente chimioterapice diverse) și chiar în scop toxic (e.g. substanțe destinate combaterii bolilor la plante și a vectorilor patogeni la animale).

În mod consecvent au fost sintetizați și investigați diferiți compuși anorganici cercetându-se activitatea biologică a acestora. În general se face distincția noțiunilor de: fiziologic-activ, pentru compușii care interesează nutriția; farmacologic-activ, pentru medicamentele chimioterapice (de extracție sau de sinteză); toxicologic-activ pentru diverși compuși utilizați ca biocide (substanțe care distrug dăunătorii vegetali și paraziții animalii).

Numeroși compuși metalici sub formă de săruri ale unor acizi organici și anorganici, sau sub formă de complecși, sunt utilizați curent ca medicamente chimioterapice. În acest cadru s-a abordat problema chimioterapicelor citostatice și s-a inițiat investigarea in vivo a acțiunii cis-platinei pe modele experimentale animale.

Perturbarea homeostaziei biochimice conduce la modificări ce pornesc de la nivel molecular și conduc spre nivelele celular, tisular, de organ și în final afectează întregul organism. În aceste circumstanțe se urmăresc modificările metaboliților ca expresie a „dihomeostaziei biochimice”, acestea interesând domeniile duale: biochimie / patobiochimie (patologie biochimică); fiziologie / fiziopatologie; respectiv morfologie / morfopatologie.

Teza de doctorat cu titlul: „Efecte in vivo induse de cis-platină asupra homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și a unor biometale la animale de laborator” este structurată în două părți distincte: prima – cu specific monografic redând aspecte generale asupra subiectului, secunda – cu informații privind rezultatele experimentale.

În prima parte, inițial s-au expus date generale referitoare la principalele clase de chimioterapice citostatice: compuși alchilanți,

10 Introducere

antimetaboliți, antibiotice cu acțiune citostatică, alcaloizi, etc. și o particularizare referitoare la compușii platinici. Din pleiada de substanțe folosite în chimioterapia citostatică, cis-platina, (cis-diaminodicloroplatina) notată uzual cis-DDP sau cDDP a fost utilizată ca medicament chimioterapic citostatic. Cu referire la acest compus se cunoaște faptul că interacția cu acidul deoxiribonucleic poate conduce la formarea de aducți de tipul cis-platină – DNA.

În continuare sunt prezentate succint principalele metode folosite pentru investigarea DNA tisular și a serumproteinelor, precum și metode specifice pentru determinarea electroliților metalici sanguini. Cu referire la investigațiile analitice asupra metalelor din țesuturi, efectuate pentru această lucrare s-a prezentat spectroscopia de absorbție atomică - principiile de bază ale metodei fiind expuse succint. În finalul primei părți s-au prezentat aspecte generale privind evaluarea statistică a datelor .

A doua parte a prezentei teze de doctorat include patru capitole în care se redau datele analitice după evaluarea statistică, făcându-se referiri la aspectele modificărilor homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și a unor biometale. Deci, în ansamblu, se discută acțiunea cis-platinei asupra metabolismului proteic și a metabolismului hidro-electrolitic (circumscris) la metale din sânge și țesuturi.

Astfel, inițial se prezintă specificul metodologiei experimentale folosite pentru cercetările efectuate pe animale de laborator (șobolani linia Wistar). De asemenea se fac referiri la timpii operatori (conținție animale, prelevare probe, etc.) precum și la unele detalii ale protocolului experimental (cale de administrare, relația doză-efect, conservare probe, preliminarii etapa analitică, etc).

Se reiterează faptul că în cadrul cercetărilor experimentale s-au efectuat două serii de experimente, deci s-au utilizat două „modele experimentale” animale. Astfel: primul dintre acestea a urmărit aspectele legate de biosinteza DNA hepatic și de biosinteza proteinelor serice; secundul a urmărit efectele asupra metaboliților azotați neproteici și a metalelor din sânge și din țesuturi (metalogramme sanguine și tisulare).

Datele referitoare la modificările homeostaziei biochimice evaluate prin determinarea concentrației DNA hepatic și a serumproteinelor (primul

model experimental) oferă informații asupra efectelor in vivo la originea cărora se află modificările structurale ale macromoleculii de DNA apărute odată cu formarea aducțiilor cis-platină – DNA și cis-platină – DNA - proteine. Acestea influențează sinteza proteinelor, afectând succesiunea proceselor de replicare - când este afectată direct molecula de DNA; de transcripție - vizând în general precursorii de tip nucleozid monofosfatic ai acizilor nucleici; dar și de translație - când sunt legate și diverse fragmente din macromoleculele polipeptidice (e.g. aducții DNA – Pt – proteine). Separat au fost prezentate și discutate datele referitoare la modificările homeostaziei biochimice apărute în cazul proteinelor serice și a fracțiunilor electroforetice albuminice și globulinice în urma administrării de cis-platină (Cap.4).

Interacția cis-platinei cu DNA cu repercure asupra sintezei proteinelor este considerată ca un efect de „stres genotoxic”. Perturbarea succesiunii proceselor de replicare, transcripție și translație în care DNA este purtătorul de „informație biologică” la nivelul genelor (deci informația genică) are implicații la nivel celular. Modificările în transmiterea coerentă a informației genice (conținută de gene) influențează fazele ciclului celular, citocinetica și conduce la tanatocitoză (moartea celulară).

Modificările homeostaziei biochimice investigate experimental, pot explicita mecanismele moleculare create de injuria biochimică atât în patogeneza neoplazică (patobiochimie, patofiziologie) cât și în chimioterapia citostatică.

În continuare (urmărind secundul model experimental), se prezintă date analitice referitoare la statusul metaboliților azotați neproteici uree, creatinină și acid uric precum și al unor electroliți metalici (sodiul, potasiul, calciul, magneziul) din serul sanguin (Cap. 5).

În final se prezintă rezultatele cercetărilor privind metalogramele tisulare obținute din țesuturi și organe – sub formă de excizate- urmată de determinări analitice asupra unor elemente metalice alcalino-terose (Ca, Mg) și microelemente metalice (Zn, Cu, Fe). În acest sens a fost urmărită modificarea homeostaziei biochimice tisulare prin variația concentrației unor bioelemente, după administrarea de cis-platină, precum și modul în care aceasta afectează respectivele organe (Cap 6). Determinarea metalogramelor tisulare a fost realizată din probe de țesuturi și organe

12 Introducere

prelevate de la animalele de laborator, și anume: ficat, rinichi, creier, cord, splină și mușchi.

Problemele referitoare la metoda de lucru aleasă, evaluarea statistică a rezultatelor, particularitățile dishomeostaziei pentru fiecare din metalele luate în studiu, caracterul predictiv al rezultatelor experimentale, etc., sunt prezentate detaliat.

Se impune menționarea faptului că în cadrul tezei sunt abordate aspecte particulare referitoare la biochimie - metabolismul proteic, metabolismul hidro-electrolitic (în speță metalele) dar și la xenobiochimie.

În acest sens se reiterează faptul că xenobiochimia este un domeniu subsecvent al biochimiei în care se studiază biotransformarea xenobioticilor de interes alimentar (e.g.: aditivi), de interes farmaceutic (e.g.: chimioterapice citostatice), de interes toxic (e.g.: biocide: insecticide, rodenticide, etc.).

În cazul de față cis-platina, ca și xenobiotic de interes farmaceutic, evidențiază mecanisme de biodegradare specifice (i.e. acvatarea, formarea de aducți, etc.). În final acești compuși interferă cu metabolismul (mai exact cu producții metabolici) oferind o explicitare a mecanismelor moleculare ale dishomeostaziei.

Datele analitice obținute prin investigații experimentale pe animale de laborator au caracter predictiv și se pretează cercetării conduitei nutriționale și terapeutice în chimioterapia citostatică.

1. CHIMIOTERAPICE CITOSTATICE: CARACTERISTICI ALE COMPUȘILOR PLATINICI

1.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Investigarea medicamentelor chimioterapice cu efecte citostatice necesită o abordare complexă inter- și multidisciplinară. În oncologie se utilizează curent: intervențiile chirurgicale, chimioterapia, radioterapia și imunoterapia [1-4]. În practică se apelează curent, simultan, la mai multe metode. Astfel chimioterapia poate fi însoțită de radioterapie, imunoterapie și, uneori este precedată de intervenția chirurgicală [5-8]. Asocierea metodelor terapeutice amintite este practică în terapia primară (la debutul bolii), sau în terapia unei tumori recurente. Terapia combinată este cea mai eficientă în încercarea de a atinge cele trei deziderate ale oncoterapiei: îndepărtarea tumorii, prevenirea recurenței, minimizarea efectelor toxice [9-13].

Chimioterapia tumorală întâmpină dificultăți în elaborarea unor scheme optime de tratament. Chimioterapia citostatică a necesitat găsirea unor agenți cu toxicitate selectivă. În acest scop s-a urmărit aprofundarea cunoștințelor privind structura chimică a medicamentelor citostatice și evaluarea relației structură – activitate [14, 15]. Astfel se pot cunoaște mai bine mecanismele de acțiune ale chimioterapicelor citostatice și posibilitățile de utilizare a acestora în diverse combinații în cazul polichimioterapiei. În acest scop s-a apelat la farmacologie, patobiochimie, fiziopatologie, morfofopatologie, etc. [16-19]. S-a demonstrat că celulele canceroase diferă de cele normale prin comportament, deoarece manifestă trei caracteristici care nu se regăsesc la celulele normale:

a) proliferare necontrolată – unele celule normale, cum ar fi neuronii au o capacitate foarte mică sau nu au capacitatea de a se divide și a prolifera [20-22]. Altele, cum ar fi de pildă celulele medulare sau ale tractului gastrointestinal au capacitate mare de diviziune. În cazul celulelor canceroase, unele se multiplică lent, altele se multiplică rapid (e.g.: celulele limfomului Burkitt). Prin urmare, nu poate fi generalizat faptul că celulele canceroase proliferează mai rapid decât cele normale. Diferența rezidă în faptul că proliferarea acestora nu este controlată de mecanismele specifice biologiei celulare și moleculare.

b) invazia – celulele normale pe parcursul diferențierii, al creșterii și dezvoltării țesuturilor și organelor relevă anumite legături spațiale care se mențin chiar și atunci când intervin în procese reparatorii. În cazul cancerelor neoplazice se produce o trecere a acestora spre alte țesuturi. Spre exemplu, în cazul cancerelor rectale are loc invazia altor țesuturi din regiunea pelviană.

c) metastazarea – rezidă în apariția de tumori secundare formate de celule care provin din tumora primară (inițială). Astfel de celule sunt vehiculate prin vasele de sânge sau prin vasele limfatice, spre diverse țesuturi.

În oncologie se folosește predilect termenul de „neoplasm” și nu cel de „cancer”. Neoplasmele care au doar dezvoltare locală sunt numite benigne, iar acelea care au caracter invaziv (capabile de metastazare) sunt numite maligne. În accepția Societății Medicale Americane, termenul de „cancer” este de regulă folosit pentru stadiile mai avansate ale bolii [23]. Termenul de „tumoră” care înseamnă în realitate creștere, protuberanță, este folosit adesea ca și sinonim pentru cancer [24].

În continuare se vor prezenta date generale privind structura chimică a principalelor medicamente utilizate în chimioterapia citostatică. De asemenea se vor prezenta particularități ale relației structură – activitate, în cadrul unor descrieri succinte a mecanismelor de reacție, unele din acestea interesând macromoleculele de acid deoxiribonucleic, (DNA), altele, macromoleculele polipeptidice.

1.2. MEDICAMENTE CHIMIOTERAPICE DE UZ CITOSTATIC - CARACTERISTICI STRUCTURALE

Conceptul de „medicamente citostatice” sau „chimioterapice citostatice”, în sens larg, se referă la orice medicament capabil de a limita proliferarea sau de a

„ucide” celulele cancerigene. În realitate, acest concept se aplică acelor medicamente chimioterapice care interferează în diviziunea celulelor cancerigene [25-28].

Pentru a avea o imagine a interacțiilor care se produc între chimioterapicele citostatice (ca și xenobiotice de interes farmaceutic) în cursul biotransformării și bioconstituției din celule în cursul proceselor metabolice în fig. 1-1 se prezintă schematic [2], „sediile” la nivel molecular.

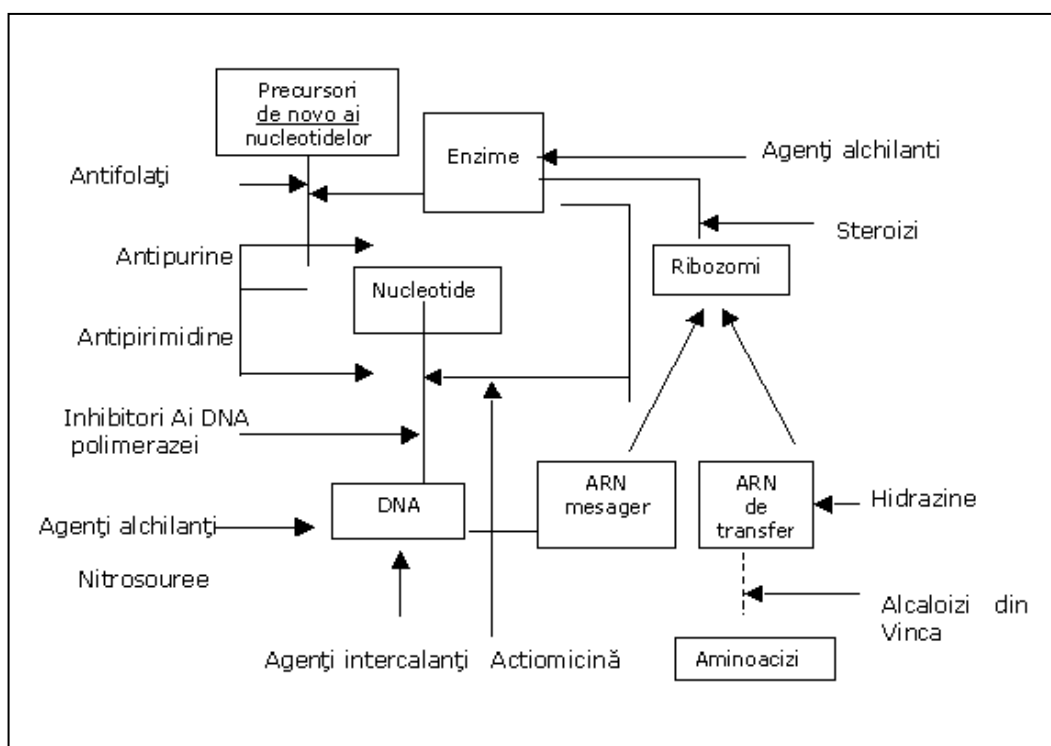


Fig. 1-1. Sediul acțiunii diferitelor medicamente citostatice [2]

Mecanismul de acțiune al citostaticelor este foarte complex și diferă de la o clasă de compuși la alta [29-30]. Ceea ce este comun este mecanismul de acțiune la nivel celular, citostaticele intervenind în procesele de metabolizare și de biotransformare determinând moartea celulelor prin blocarea diviziunii acestora, deci intervin în cinetica ciclului celular (citocinetică). Procesul decurge prin inhibarea biosintezei proteinelor și a acizilor nucleici sau prin modificarea structurii chimice a acestora, împiedicând desfășurarea normală a ciclului celular.

Acest mod de prezentare apelează la particularitățile topobiochimice ale celulei dar și la aspectele cu totul particulare ale „sediilor” diverselor interacții de tipul farmakon-receptor pentru interacții care dau o orientare asupra farmacocineticii citostaticelor [31-35].

Chimioterapicele citostatice sunt reprezentate de clase de compuși chimici care împiedică proliferarea celulelor tumorale [3, 36, 37].

În urma administrării de substanțe chimice în țesutul tumoral are loc pe de o parte o distrugere și o reducere a prezenței celulelor neoplazice, iar pe de altă parte o reacție de multiplicare și creștere numerică a celulelor viabile.

1.2.1. PRINCIPALELE CLASE DE COMPUȘI CHIMIOTERAPICI

Termenul de chimioterapie a fost introdus de Ehrlich în 1909, pentru a descrie tratamentul bolilor infecțioase cu substanțe chimice cu acțiune asupra germenilor care invadează organismul.

Chimioterapia, spre deosebire de intervenția chirurgicală și radioterapie, este reprezentată printr-un tratament sistemic. Aceasta este caracterizată prin faptul că medicamentele chimioterapice pătrund în circulația sistemică și se distribuie în organism. Astfel, în cazul cancerului, chimioterapicele pot ataca celulele canceroase răspândite în organism.

În această abordare conceptul de „chimioterapie a cancerului” se referă la tratamentul sistemic al cancerului care nu se adresează unor agenți patogeni externi, ci unor celule proprii organismului care au devenit maligne. Celulele malignizate au următoarele caracteristici: proliferază spontan și ireversibil, se multiplică logaritmice cu invazie locală, precum și loco-regională, în final apărând „metastaze”. Toate aceste procese sunt de lungă durată astfel că la pronunțarea diagnosticului pot exista linii celulare rezistente la tratament și chiar micrometastaze.

Prin utilizarea chimioterapicelor se urmărește distrugerea selectivă a celulelor cu lezarea minimă a țesutului sănătos, ținta fiind celulele tumorale. Medicamentele acționează prin interferare cu metabolismul celular și prin citoliză [38].

Atunci când se folosește ca terapie unică, chimioterapia citostatică este mai puțin eficientă. Dacă este aplicată și o terapie adjuvantă, rata de supraviețuire este mult mărită (e.g.: imunoterapia).

Pentru a reduce la minimum efectele toxice, medicamentele chimioterapice se folosesc frecvent în asociere (două sau mai multe) instituindu-se așa-numita polichimioterapie.

Chimioterapia acționează asemeni radioterapiei cu cele mai bune efecte asupra formelor de cancer care se caracterizează printr-o proporție mare de celule aflate în diviziune celulară, cum este cazul leucemiilor și al limfoamelor [37, 39, 40]. Chimioterapia este mai puțin eficientă în formele de cancer caracterizate printr-un număr redus de celule aflate în diviziune, cum este cazul tumorilor solide ale organelor.

Din aceste motive, chimioterapia este mai frecvent folosită în asociere cu radioterapia și metodele chirurgicale. Atunci când este folosită în asociere cu radioterapia, poate să distrugă celulele canceroase sensibile la radioterapie, sau să distrugă independent celulele canceroase [41].

Chimioterapia poate fi folosită fie înainte, fie după intervenția chirurgicală, însă cel mai frecvent este folosită după excizarea tumorii cu scopul de a distruge celulele canceroase care pot rămâne în apropierea tumorii, sau care s-au răspândit în alte zone ale corpului sub forma unor micrometastaze [42].

Medicamentele anticanceroase sunt extrem de numeroase, făcând parte din diferite clase de substanțe chimice. Clasificarea acestora este convențională și se bazează pe proprietățile chimice și farmacologice ale diferitelor medicamente citostatice [43].

În funcție de structura, proveniența și mecanismul de acțiune al principalelor chimioterapice citostatice, s-au adoptat diverse clasificări ale acestora utilizate în farmacologie și oncologie. În principal se disting: compuși alchilanți, antimetaboliți, antibiotice citostatice, alcaloizi, citostatice cu diverse structuri, etc. [44-46]. O succintă prezentare este redată în continuare.

1) Compușii alchilanți

- a) derivați azotiperitici, e.g.: ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucil, clormetina;
- b) derivați aziridinici, e.g.: trietilamina, tiotepa, mitomicina C, triaziconul, hexametilamina;

- c) esteri ai acidului metansulfonic, e.g.: busulfan;
- d) derivați de nitrosouree și hidroxiuree, e.g.: carmustin, lomustin, streptozocina, hidroxiureea;
- e) derivați de metilhidrazină și triazenă, e.g.: procarbazina, dacarbazina;
- f) complexii metalici ai platinei, e.g.: cis-platina, carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, satraplatina, picoplatina.

2) Antimetaboliți

- a) analogi ai acidului folic, e.g.: metotrexat;
- b) analogi ai nucleobazelor purinice, e.g.: 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, fludarabina;
- c) analogi ai nucleobazelor pirimidinice, e.g.: 5-fluorouracilul, citarabina;

3) Antibiotice citostatice

- a) antracicline, e.g.: daunorubicina și doxorubicina, idarubicina;
- b) acridine, e.g.: amsacrina
- c) elipticine, e.g.: acetat de elipitinium
- d) antrachinone, e.g.: mitoxantrona
- e) actinomicine, e.g.: actinomicina D

4) Alcaloizi din plante și alte produse naturale

- a) colchicina
- b) alcaloizi din Vinca și analogi, e.g.: – vinblastina, vincristina
- c) derivați de podofilotoxină, e.g.: – podofilotoxina, etoposid, teniposid
- d) taxani, e.g.: docetaxel, paclitaxel

5) Alte citostatice, e.g.: asparaginaza, hidroxycarbamida, miltefosin, topotecan, tretinoin

De asemenea există o clasificare a chimioterapicelor citostatice după acțiunea la nivel molecular. Astfel, în funcție de natura interacțiilor biochimice responsabile de efectul citostatic se disting chimioterapice citostatice incluse în două categorii: α) substanțe care intervin în inhibarea biosintezei acizilor nucleici și β) substanțe care produc direct inhibarea biosintezei macromoleculilor proteice.

1.2.2. COMPUȘI ALCHILANȚI

Agenții antitumorali alchilanți constituie cea mai veche clasă de compuși folosiți în chimioterapia combinată, pentru tratarea tumorilor solide diseminate și pentru refacerea culturilor de celule stem [47].

1.2 – Medicamente chimioterapice de uz citostatic – caracteristici structurale 19

O parte din compușii alchilanți au fost introduși în grupa medicamentelor nespecifice, care acționează în cadrul ciclului celular, înlocuind un atom de hidrogen dintr-o altă moleculă cu un radical alchil (e.g.: radical alchil activat $R-CH_2 - CH_2^+$).

În acțiunea farmacodinamică a acestor compuși radicalul (R-) important prin faptul că influențează distribuția și metabolizarea produsului în organism, dar și bazicitatea atomului de azot, care la rândul său influențează reactivitatea întregii molecule.

Grupările electrofile reactive din constituția agenților alchilanți pot fi:

- la azotiperite: $R-N-(CH_2-CH_2-Cl)_2$
- la aziridine: $R-(N-CH_2)_2$
- la esterii metansulfonici: $R-O-O_2S-CH_3$

Majoritatea studiilor sugerează că apariția efectelor toxice se datorează speciilor reactive formate în urma biotransformărilor caracteristice procesului de alchilare care implică și acizii nucleici din celulă. Prin alchilare se produc rupturi ale macromoleculii de DNA la nivel monocatenar sau dicatenar destabilizând dublul helix. Interacțiunea influențează procesele de replicație, transcripție și translație.

Agenții alchilanți conțin gruparea alchil care are proprietatea de a forma legături covalente cu substanțele cu caracter nucleofil din celulă. Un agent alchilant cu două grupări funcționale este capabil să reacționeze cu două grupări și pot produce legături intra- și intercatenare, reacție care poate avea loc în etapele de replicație și transcripție a moleculei de DNA [48].

Azotul N_7 de la guanină este puternic nucleofil și constituie principală a alchilării la DNA. De asemenea pot fi implicați atomii N_1 sau N_3 de la adenină, sau N_3 de la citozină. Un alt efect al alchilării la N_7 la guanină este eliminarea nucleobazei guanină ca o consecință a inciziei moleculare a lanțului polinucleotidic, sau legarea guaninei alchilate de timină, în loc de citozină, și eventual substituția nucleobazelor guanină-citozină (G-C) cu nucleobazele adenină-timină (A-T). Ultimele două efecte pot fi determinate de agenți alchilanți monofuncționali care sunt cu precădere mutageni și cancerigeni, dar nu citotoxici.

Agenții alchilanți sunt capabili să acționeze asupra acizilor nucleici și/sau proteinelor din celulă în oricare fază a ciclului celular.

Ciclul celular numit și „ciclul mitotic”, reprezintă o succesiune de faze prin care se asigură desfășurarea normală a proceselor morfo-fiziologice la nivel celular. La acest ciclu se descriu fazele: a) de pre-sinteză (G_1); de sinteză (S); de post-

sinteză (G_2); de mitoză (M) - toate acestea caracterizând cinetica celulară, numită cu un termen generic „citocinetică” [49]. În fazele menționate are loc sinteza de DNA și de proteine și evident se desfășoară procesele metabolice generale, având loc proliferarea celulară. Există și o fază de repaus (G_0) în care nu are loc proliferarea celulară. O descriere mai detaliată a acestor faze se face în cazul discuției referitoare la cis-platină și mecanismul de acțiune al acesteia (v. Cap 4).

Efecte majore însă se produc pe durata replicației DNA (corespunzând pasajului dintre fazele G_1 și S) când nucleobazele care nu sunt angrenate în realizarea unor legături chimice sunt mai susceptibile la alchilare. În oricare dintre fazele ciclului celular poate avea loc reacția de alchilare, efectul se manifestă în faza S, urmând o blocare în faza G_2 , urmată de moartea celulară [50, 51].

Diferențele în activitatea agenților alchilanți se datorează predilect diferențelor de absorbție dintre substanțe, ratei metabolismului și afinității țesutului. Cu rare excepții, rezistența celulelor tumorale la un anumit agent alchilant indică rezistența și la alți agenți aparținând aceleași clase de compuși.

1.2.2.1. Derivați azotiperitici

Derivații azotiperitici provin din β -cloretilamină (iperita) și o parte sunt agenți alchilanți utilizați în chimioterapia citostatică. Deși au fost sintetizați numeroși compuși din această clasă, în prezent în chimioterapia citostatică se folosesc doar cinci: ciclofosfamida (I), ifosfamida (II), melfalan (III), clorambucil (IV) și clormetina (V) – v. fig. 1-2.

Ciclofosfamida - cu denumirea chimică N,N-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amin-2-oxid - are o toxicitate scăzută datorată intervenției enzimei aldehyd - dehidrogenaza care oxidează aldofosfamida la carboxifosfamida, un compus inactiv care se elimină prin urină. Datorită bazicității reduse a atomului de azot al grupării cloretilaminice, acest medicament este inactiv in vitro. Ciclofosfamida are efect imunosupresiv și uneori potențial carcinogenetic, fiind implicată în producerea cancerului de vezică urinară [52].

Ifosfamida - cu denumirea chimică 3-(2-cloroetil)-2-[(2-cloroetil)amino] tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxid- este un izomer structural al ciclofosfamidei, folosit în tumori testiculare și sarcoame. Are „profil metabolic” similar cu

1.2 – Medicamente chimioterapice de uz citostatic – caracteristici structurale 21

ciclofosfamida, dar poziția grupării cloretil pe nucleul aromatic produce schimbări semnificative în biotransformarea medicamentului.

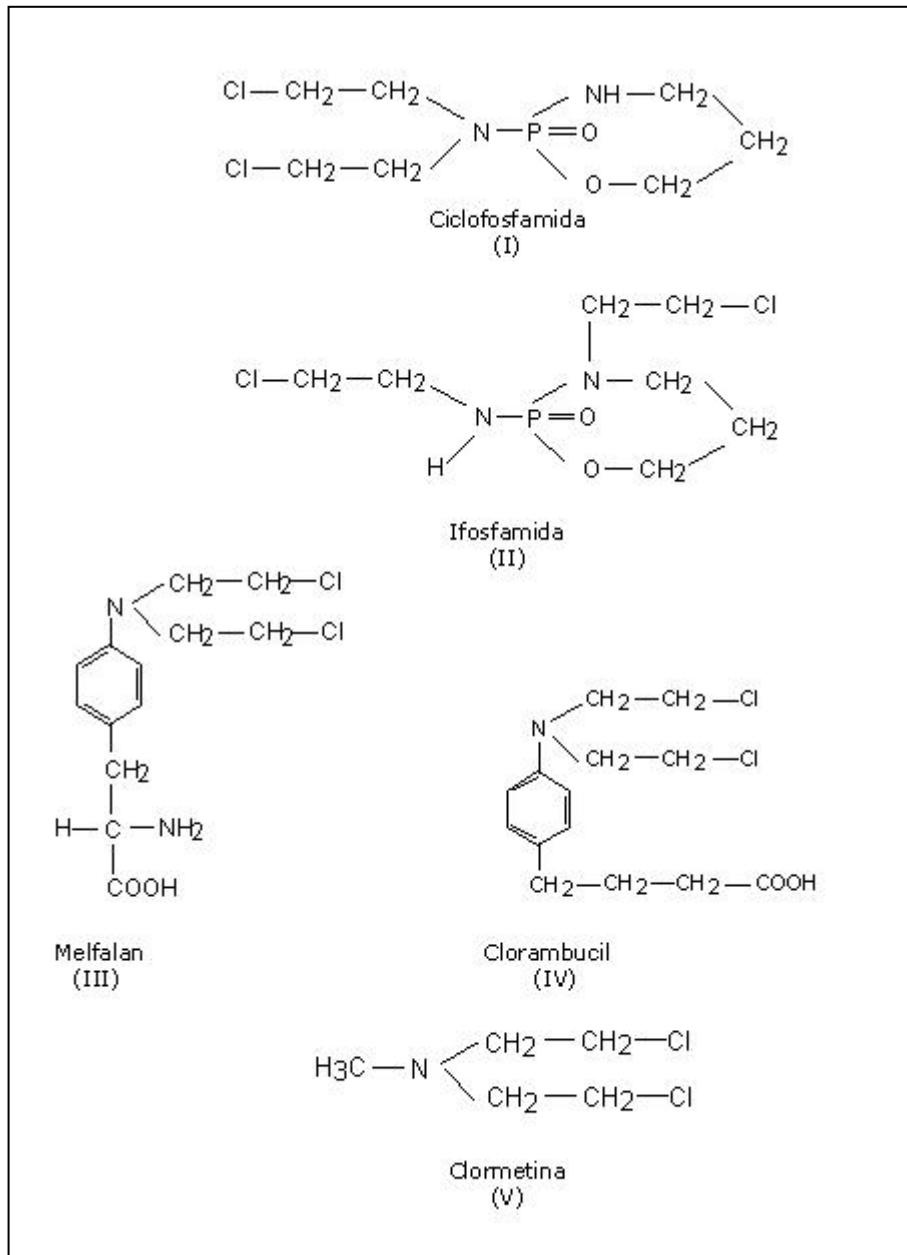


Fig.1-2 Formulele structurale ale principalilor derivați azotiperitici utilizați în chimioterapie

Melfalanul - are denumirea chimică acid 2-amino-3-[4-[bis(2-cloroetil) amino]fenil] -propanoic - este un agent alchilant folosit exclusiv în tratamente pentru mielom multiplu, cancer ovarian, și cancer de sân. Melfalanul poate traversa bariera hematoencefalică, prin transport transmembranal activ. Tranzitul melfalanului în celule din sistemul nervos central este favorizat de prezența de aminoacizi în lichidul extracelular.

Clorambucilul - are denumirea chimică acid 4-[bis(2-cloroetil)amino] benzenbutanoic - este compusul preponderent utilizat dintr-un număr mare de azotiperite aromatice, la care gruparea alchilantă este greafată pe nucleul benzenic [53].

Clormetina - sau metil-bis (2-cloroetil)-amina - este din punct de vedere al reactivității substanța cea mai activă chimic și farmacologic. Acțiunea citostatică se evidențiază în toate țesuturile, iar în contact cu umorile apoase ale organismului se descompune rapid [54].

1.2.2.2. Derivați aziridinici

Din această categorie de agenți alchilanți fac parte următorii compuși: trietilamina (VI), tiotepa (VII), mitomicina C (VIII), triaziconul (IX) și hexametilamina (X) - v. fig. 1-3.

Trietilamina, cu denumirea chimică N,N-dietiletilenamina - se folosește cu succes în unele forme de cancer, mai ales în boala Hodgkin. Datorită proprietăților antimicotice, tratamentul poate fi repetat la anumite intervale [55].

Tiotepa, cu denumirea chimică N,N'-trietilen-etiofosfamida - este un agent antialchilant polifuncțional care conduce la leziuni biochimice, și poate denatura acidul deoxiribonucleic.

Mitomicina C, cu denumirea chimică esterul 6-amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahidro-8-(hidroximetil)-8a-metoxi-5-metil-azirino[2',3':3,4]pirolo[1,2-a]indol-4,7-dion- carbamatul - este un antibiotic izolat din *Streptomyces caespitosus* fiind considerat un produs natural. Se utilizează în tratamentul cancerului mamar și gastro-intestinal [56, 57].

Triaziconul, cu denumirea chimică 2,3,5-tris-(etilenimino)-p- benzochinona - este compusul cel mai activ din această serie. Are efect citostatic puternic la doze

foarte mici, acționează rapid având un spectru larg de acțiune asupra tumorilor maligne.

Hexametilamina sau altretamina, cu denumirea chimică 2,4,6-hexametil-triamino-1,3,5-triazina - acționează ca un citostatic alchilant. Sub acțiunea microzomilor hepatici se formează metaboliți activi, care interacționează cu acidul nucleic [58].

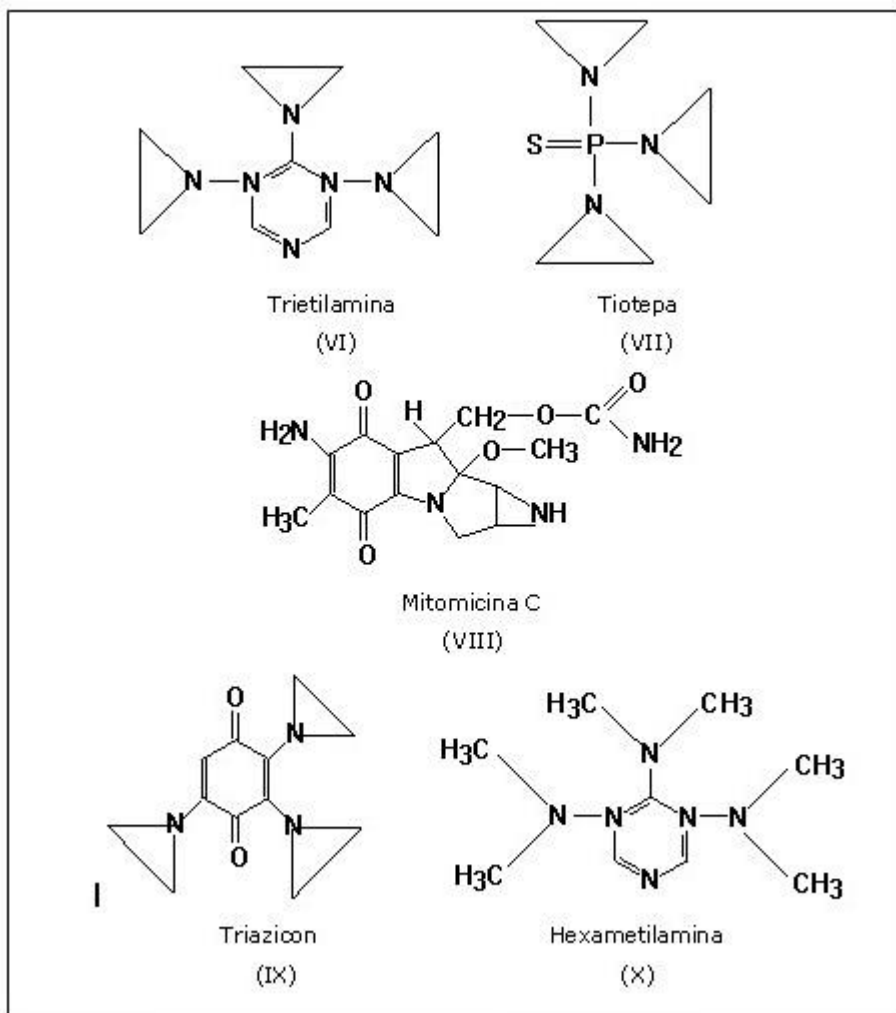


Fig.1-3 Formulele structurale ale principalilor derivați aziridnici

Utilizarea lor este limitată de efecte digestive, (grețuri, vomă) și de toxicitatea neurologică (polinevrita). În cazul acestor compuși nu a fost semnalată rezistență încrucișată între aceste medicamente și alți agenți alchilanți.

1.2.2.3. Esteri ai acidului metansulfonic

Din această clasă de compuși alchilanți se exemplifică busulfanul (XI), cu denumirea chimică 1,4-bis (metil-sulfinil-oxo-butan). Busulfanul (fig. 1-4), este unul dintre primele medicamente introduse în chimioterapia citostatică.

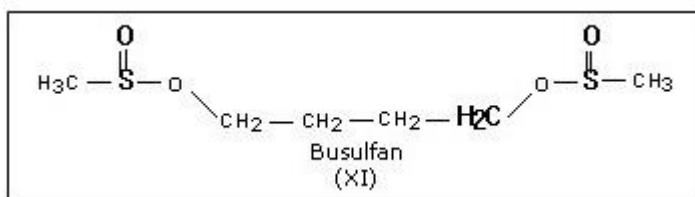


Fig. 1-4 Formula structurală a busulfanului

Mecanismul de acțiune se bazează pe o reacție de substituție nucleofilă, derivații difuncționali fiind mult mai eficienți. În seria esterilor polioliilor cu acidul metansulfonic există cazuri de stereospecificitate. Busulfanul este folosit cu precădere în tratamentul leucemiilor mieloid.

1.2.2.4. Derivați de N-nitrozouree și N-hidroxiuree

Din această clasă, trei derivați ai N - nitrozouree sunt folosiți în clinică: carmustin (XII), lomustin (XIII), și streptozocin (XIV). De asemenea se menționează și un derivat de tip N-hidroxi, denumit hidroxiureea (XV). Caracteristici structurale ale compușilor menționați sunt prezentate în fig. 1-5.

Carmustin, cu denumirea chimică 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitroso-urea - este derivatul de nitrosouree cel mai studiat, fiind unul dintre puținele medicamente care difuzează în lichidul cefalo-rahidian (fluidul cerebro-spinal). Este folosit cu succes în tratamentul tumorilor cerebrale. Se administrează intravenos, are un timp de înjumătățire de 90 de minute, eliminare rapidă pe cale ranală în 24 de ore.

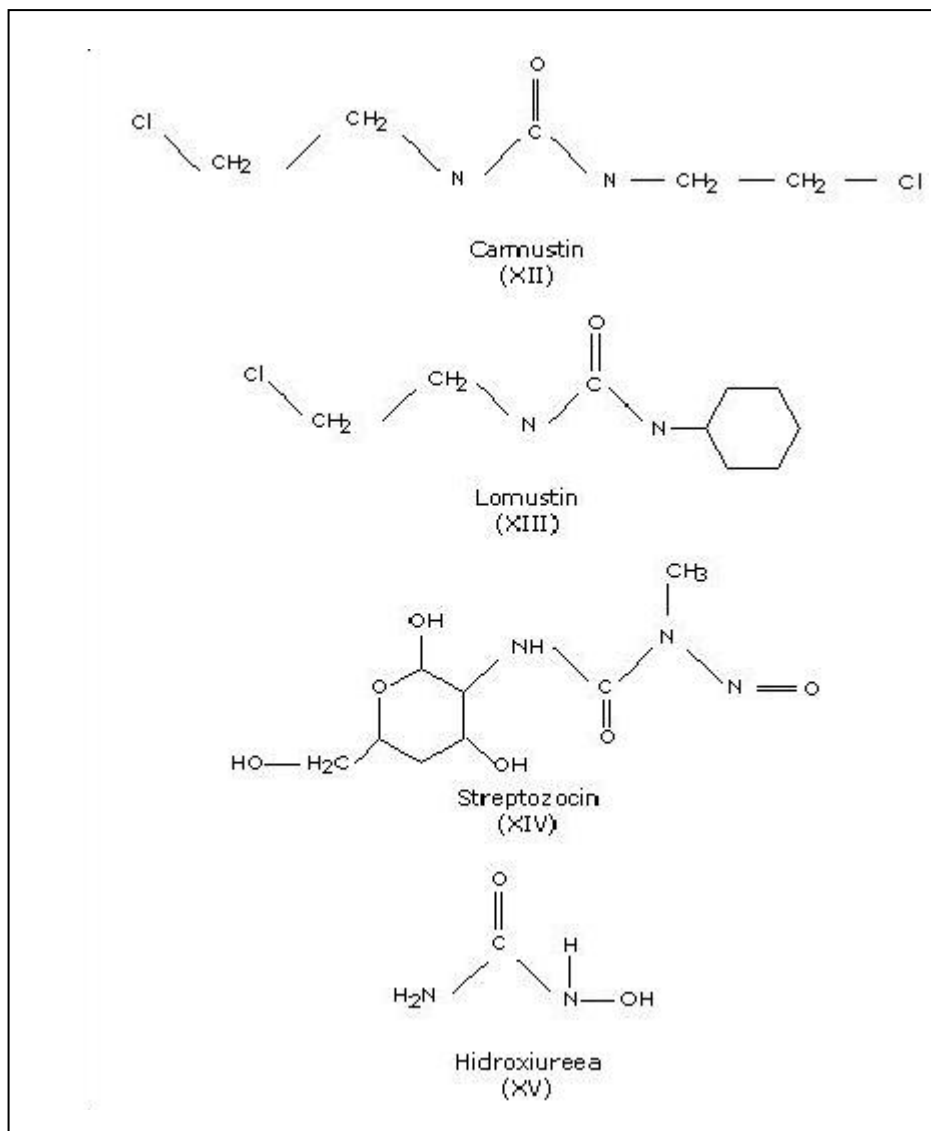


Fig. 1-5 Derivați ai N-nitrozoureei și N-hidroxiureei

Lomustin, sau 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitroso-urea - are efecte citostatice și toxice similare carmustinului. Se administrează oral, se absoarbe complet prin tubul digestiv, și este metabolizat integral. Timpul de înjumătățire este de 24-48 de ore, iar eliminarea este cu precădere urinară. În forma administrată

medicamentul nu străbate bariera hemato-encefalică, dar derivații reziduali activi se regăsesc în lichidul cefalo-rahidian imediat după absorbție.

Streptozocin, sau 1-metil-1-nitroso-3-[2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-il]-urea - este un medicament folosit în tratamentul carcinomului de pancreas.

Hidroxiureea, sau hidroxicarbamida - este folosită ca agent antileucemic, fiind indicată în tratamentul leucemiei mieloidă precum și în tratarea tumorilor solide.

Acești compuși au proprietăți citostatice remarcabile și datorită capacității lor de a penetra bariera hemato-encefalică fiind folosiți cu succes în tratarea tumorilor cerebrale. Deși prezența grupării de cloretilamină la N₁, în cazul derivaților N-nitrozoureei potențează efectul alchilant, acesta este mult mai redus comparativ cu cel al derivaților de azotiperită, deoarece bazicitatea atomului de azot este mai redusă.

Compușii din aceste clase se transformă în metaboliți activi care acționează prin mecanisme multiple asupra acizilor nucleici și asupra proteinelor.

1.2.2.5. Derivați de metilhidrazină și triazenă

Acești compuși se descompun spontan sau pot fi metabolizați la un produs intermediar - alchil diazoniu, care este capabil de interacțiune cu grupările biologice active din celulele tumorale. Principalii derivați sunt procarbazona (XVI) și dacarbazona (XVII) redați în fig. 1-6.

Procarbazona, cu denumirea chimică N-(1-metiletil)-4-[(N'-metilhidrazino)metilbenzidamida - este un agent alchilant care acționează asupra bazelor purinice din acizii nucleici, prin formarea carbocationului CH₃⁺. Absorbția este digestivă (în proporție de peste 70%), ceea ce presupune administrare pe cale orală, în produsul Natulan.

Toxicitatea procarbazinei este exclusiv digestivă, acumularea la nivel nervos este extrem de rară, de aceea este indicat a se folosi singur sau asociat în polichimioterapie [59].

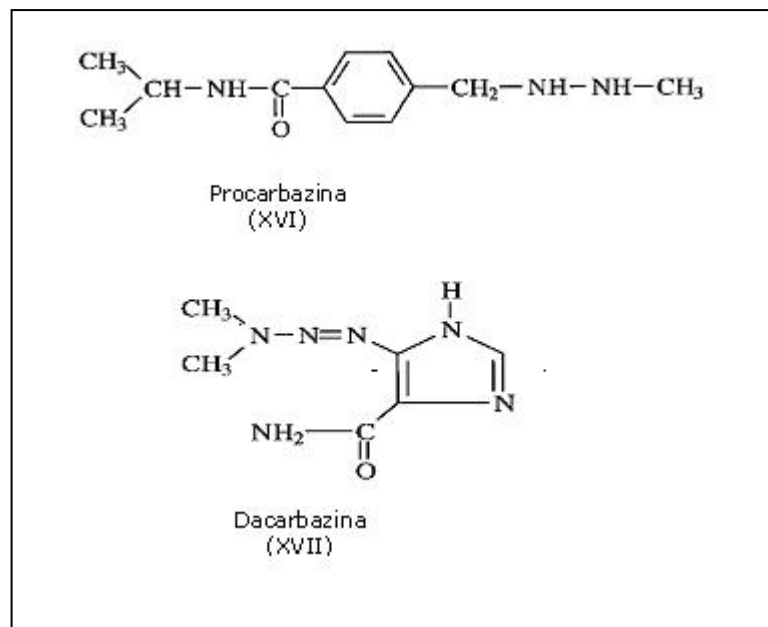


Fig. 1-6 Formulele structurale ale procarbazinei și dacarbazinei

Dacarbazina, are denumirea chimică de 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida. Este un agent alchilant activat prin biotransformare la nivelul microzomilor hepatici, unde are loc o demetilare cu formarea carbocationului CH_3^+ farmacologic activ [60].

Dacarbazina se administrează perfuzabil, și se indică în melanom malign, limfoame Hodgkin, singură sau asociată cu alte citostatice.

1.2.2.6. Complecșii metalici cu platina

Dintre complecșii platinei s-au impus în chimioterapia citostatică doar anumiți derivați care conțin platina divalentă Pt (II) și tetravalentă Pt (IV). Datele obținute în urma studiilor efectuate in vitro și in vivo atestă eficacitatea chimioterapicelor antitumorale a unor complecși metalici [1, 61, 62].

În urma investigațiilor asupra structurii diversilor compuși platinici, a relației structură chimică – activitate biologică și a efectelor farmacologice au reținut atenția substanțele: cis-platina (XVIII), carboplatina (XIX), ormaplatina (XX), oxaliplatina (XXI), satraplatina (XXII), picoplatina (XXIII)- prezentate în fig. 1-7.

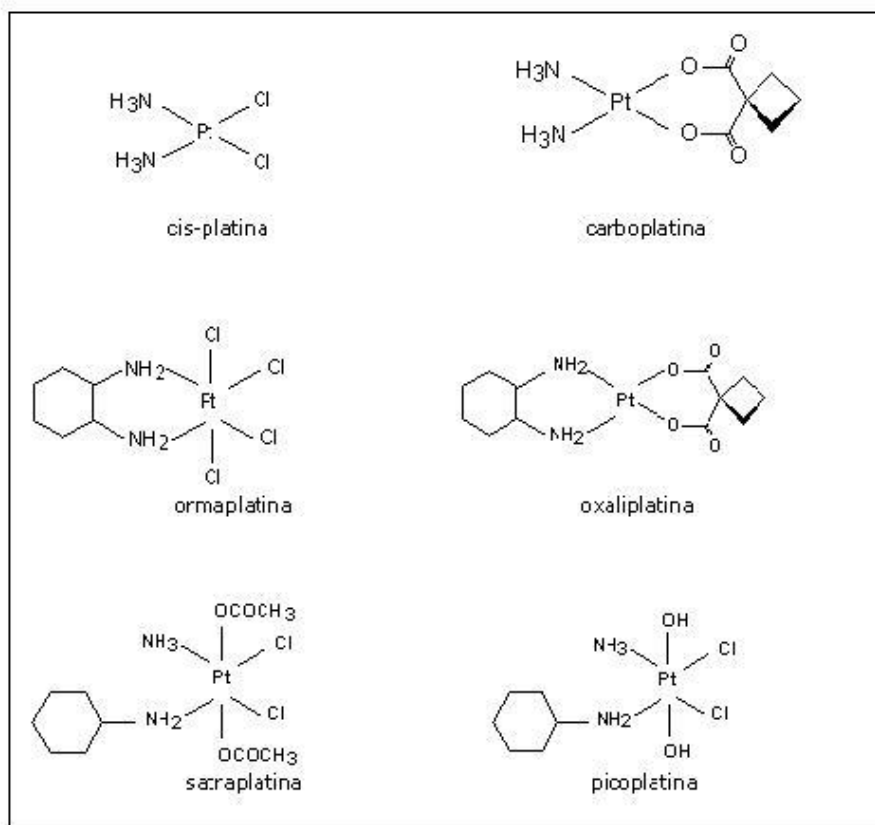


Fig. 1-7 Compuși platinici de interes terapeutic

Cis-platina este un agent chimioterapeutic cu spectru larg de activitate, fiind folosit în tratamentul tumorilor solide, și anume cancer pulmonar, cancer de cap și gât, dar și în diferite forme de leucemie. Activitatea antitumorală este determinată de interacția dintre cis-platină și macromolecula de DNA.

Carboplatina, cu denumirea chimică acid ciclobutan-1,1-dicarboxil platina - a fost folosită limitat în unele forme ale bolilor neoplazice. Spre exemplu s-a folosit în cum ar fi cancerul ovarian, datorită ușurinței cu care se administrează și datorită toxicității reduse [63, 64, 65, 66].

Ormaplatina, sau tetraplatina, cu denumirea chimică (tetracloro (1,2,-ciclohexandiamin - N,N') -(OC - 6-22-transplatina) - este un compus care conține Pt tetravalentă. Este mai puțin citotoxică decât cis-platina, acționând prin realizarea unor legături intracatenare cu macromolecula de DNA.

Oxaliplatina, cu denumirea chimică (R,R)-1,2-diaminociclohexan(etandioat-O,O')platina - este un alt analog al cis-platinei care are nevoie de o durată mai mare de timp pentru a se lega la situsurile nucleofile ale DNA. Are eficiență mai mare decât aceasta în tratamentul cancerului de colon [67].

Satraplatina, cu denumirea chimică-[bis-acetato-cis-diclor(ciclohexilamino) platina IV-este un compus de ultimă generație, eficient în tratamentul antineoplazic.

Picoplatina, cu denumirea chimică - [trans-amino-dicloro-(ciclohexilamino)-dihidroxiplatina IV] este un compus nou introdus în terapie.

1.2.3. COMPUȘI DIN CLASA ANTIMETABOLIȚILOR

Medicamentele din această clasă au structură foarte apropiată metaboliților întâlniți în organism. Substituirea unui metabolit cu un antimetabolit (xenobiotic farmacologic-activ) are loc prin inhibiția unor enzime naturale sau prin încorporarea eronată a unui rest molecular străin. Antimetabolitul se poate combina și cu centrele active ale enzimelor în poziția ocupată inițial de metabolit.

Această categorie de compuși acționează în special asupra celulelor din faza S și faza G₂ a ciclului celular. Sunt afectate și celulele normale aflate în aceste faze apărând mielosupresia și leziuni inflamatorii ale mucoaselor.

Pentru un antimetabolit activ, modificările produse în molecula de metabolit, sunt condiționate de poziția, natura și dimensiunea resturilor moleculare intersanjabile.

În continuare se prezintă succint câteva caracteristici pentru:
a) antimetaboliți ai acidului folic; b) analogi ai unor nucleobaze purinice și pirimidinice.

1.2.3.1. Antimetaboliți ai acidului folic

Acidul folic cu denumirea chimică acidul N – [4(2 – amino – 4 hidroxipteridin – 6- metilamino) benzoil] – L (+) glutamic - este introdus în organism odată cu alimentele fiind de fapt o vitamină din complexul B.

Experimental s-a realizat modificări la nivelul structurii acidului folic obținându-se metotrexatul (fig. 1-8). Metotrexatul are denumirea chimică: acid L-N[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridini)]metilamino]benzoil]- glutamic.

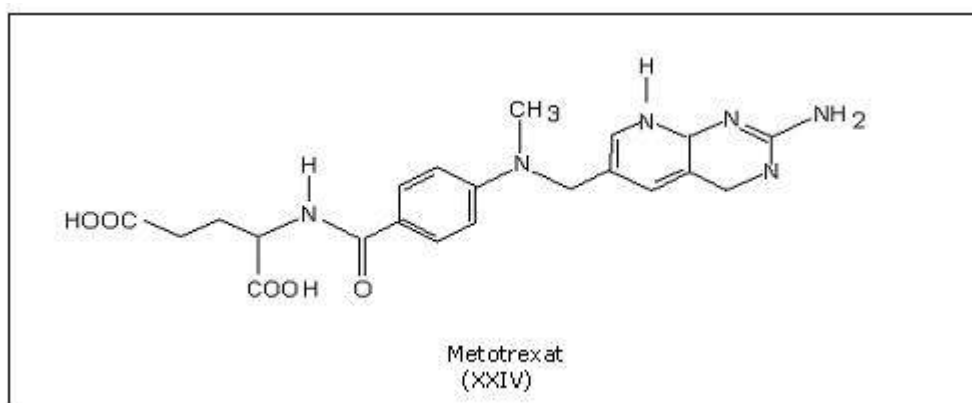


Fig. 1-8 Formula structurală a metotrexatului

Inițial prin înlocuirea grupării hidroxilice $-OH$ cu o grupare aminică $-NH_2$ s-a obținut aminopterina, care a fost primul compus folosit în trialurile clinice [68]. Prin cercetări ulterioare s-a constatat că metilarea la atomul de azot N_{10} conduce la obținerea unui antimetabolit cu proprietăți îmbunătățite, cu denumirea de metotrexat (XXIV).

În terapie metotrexatul poate produce și efecte imunosupresive, fiind utilizat și în tratamentul unor boli autoimune (e.g.: psoriazis).

Cu toate că au fost cercetați un număr mare de compuși antagoniști ai acidului folic, foarte puțini au depășit rezultatele clinice obținute cu metotrexat.

1.2.3.2. Analogi ai nucleobazelor din acizii nucleici

1.2.3.2.1. Analogi ai nucleobazelor purinice

Dintre nucleobazele purinice principalii reprezentanți sunt adenina și guanina. Pe scheletul purinic, ușor modificat prin greșarea de grupări tiolice, se pot obține antimetaboliți. Acești derivați pot modifica metabolismul normal al acizilor nucleici și se pot folosi cu succes în oncoterapie.

Inițial acești compuși analogi ai nucleobazelor purinice au fost sintetizați prin înlocuirea izosterică a unor grupări de atomi în nucleul purinic, adică gruparea $-SH$ în locul grupării $-NH_2$ de la adenină, respectiv în locul grupării $-OH$ de la guanină. În

organism analogii purinici se transformă în pseudo - nucleotide care concurează cu nucleotidele normale. Astfel se blochează o serie de enzime implicate în biosinteza purinelor, și la final în biosinteza acizilor nucleici.

Primul compus sintetizat a fost 6-mercaptapurina (XXV), apoi s-a sintetizat 6-tioguanina (XXVI) derivat de guanină obținut prin grefarea unei grupări -SH. Din această clasă de compuși se mai menționează și fludarabina (XXVII) care este folosită cu succes în leucemii cronice, limfomul Hodgkin și limfoame cutanate. Compușii menționați se redau în fig. 1-9.

1.2.3.2.2. Analogi ai nucleobazelor pirimidinice

Nucleobazele pirimidinice, curent prezente în structura acizilor nucleici sunt: citozina, timina și uracilul.

Din categoria analogilor nucleobazelor pirimidinice fac parte 5-fluorouracilul (XXVIII) și citarabina (XXIX) – redate în fig.1-9.

Compusul 5-fluorouracil, cu denumirea chimică 5-fluoro-2,4-(1H,3H)-pirimidin diona – este un derivat al uracilului care se poate integra în nucleotidă, iar în final în molecula de RNA blocând transcripția. Acest chimioterapic se absoarbe bine și se distribuie selectiv cu precădere în țesutul tumoral unde concentrația la patru ore de la administrare este de șase ori mai mare decât în țesuturile normale [69].

Citarabina cu denumirea chimică 4-amino-1-(D-arabino-furanosil)- 1H-pirimidin-2-dionă, - este un antimetabolit al citidinei, care se pretează integrării în nucleotidele din structura DNA. Metabolitul activ se formează în organism prin fosforilări succesive sub acțiunea enzimelor [70].

Analogii nucleobazelor intervin în sinteza acizilor nucleici și blochează principalele căi metabolice influențând statusul morfo-fiziologic al celulei aflate în diviziune.

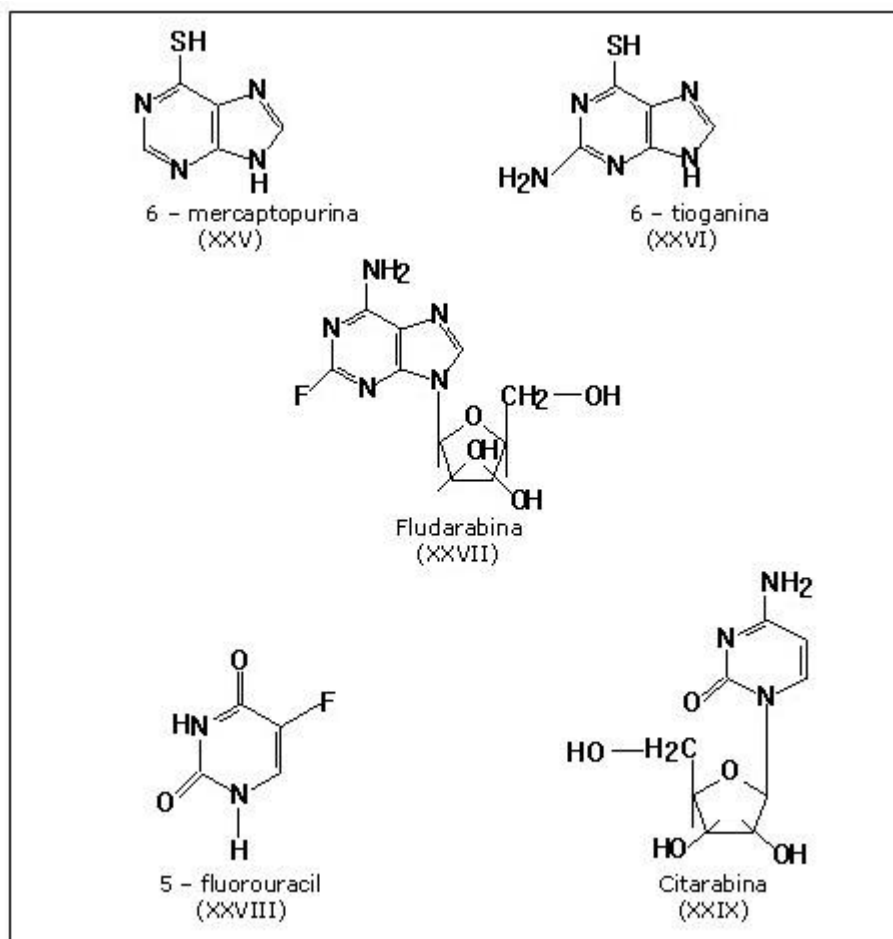


Fig. 1-9 Anali ai nucleobazelor purinice și pirimidinice cu acțiune citostatică

Având structuri foarte apropiate de ale metaboliților nucleobazelor din celule, acești compuși (de fapt xenobiotice de interes farmaceutic) concurează cu precursorii nucleobazici ai biosintezei acizilor nucleici perturbând biosinteza acestora și producând efecte citostatice.

1.2.4. ANTIBIOTICE CU ACȚIUNE CITOSTATICĂ

Sub această denumire sunt grupate chimioterapice citostatice care pot realiza la nivelul macromoleculii de DNA legături chimice intracatenare între două

nucleobaze. De asemenea este posibilă legarea directă cu moleculele de protein-enzime care intervin în replicația DNA, e.g.: topoisomeraza II. Această categorie de agenți antitumorali este reprezentată de cinci familii de compuși: a) antracilinele, b) acridinele, c) elipticinele, d) antrachinonele, e) actinomicinele - în fig. 1-10 se redau formulele structurale ale compușilor mai frecvent utilizați.

a) Antracilinele

Sunt chimioterapice citostatice obținute din ciuperca *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, considerate ca antibiotice. Daunorubicina (XXX) și doxorubicina (XXXI) au fost primii compuși descoperiți în 1960 [71]. Ulterior au fost studiate și alți substanțe aparținând acestei clase, dintre care se menționează idarubicina (XXXII).

Antracilinele au în structură un nucleu tetracilinic legat de daunosamină printr-o legătură glicozidică. Daunorubicina și doxorubicina diferă printr-o singură grupare -OH aflată la atomul de carbon din poziția C₁₄. Idarubicina este un derivat semisintetic de daunomicină, fără gruparea metil din poziția C₄. Un epimer al doxorubicinei, epirubicina are o lipofilicitate sporită datorată poziției grupării -OH [4, 72].

Acești compuși sunt capabili să participe la reacții redox care sunt responsabile de efectele citostatice.

b) Acridinele

Amsacrina (XXXIII) cu denumirea chimică N-(acridin-9-xilamino)-3metoxifenil] metansulfonamida - este singurul derivat din clasa acridinelor utilizabil ca și chimioterapic citostatic. Se administrează exclusiv intravenos, iar eliminarea este hepatică. Nu difuzează în lichidul cefalo-rahidian.

c) Elipticinele

Acetatul de eliptinium (XXXIV) cu denumirea chimică hidroxid de 9-hidroxi-2-metil elipticina (Celiptium) - este compusul reprezentativ al acestei familii de compuși. Intervine ca inhibitor de topoisomeraza II.

d) Antrachinonele

Compusul reprezentativ este mitoxantrona (XXXV) cu denumirea chimică 1,4-dihidroxi-5,8-bis[2-(2-hidroxi-etilamino)etilamino]-anthracen-9,10-diona. Aceasta se poate administra intravenos în funcție de schema de tratament, fiind folosită în tratarea tumorilor solide [10].

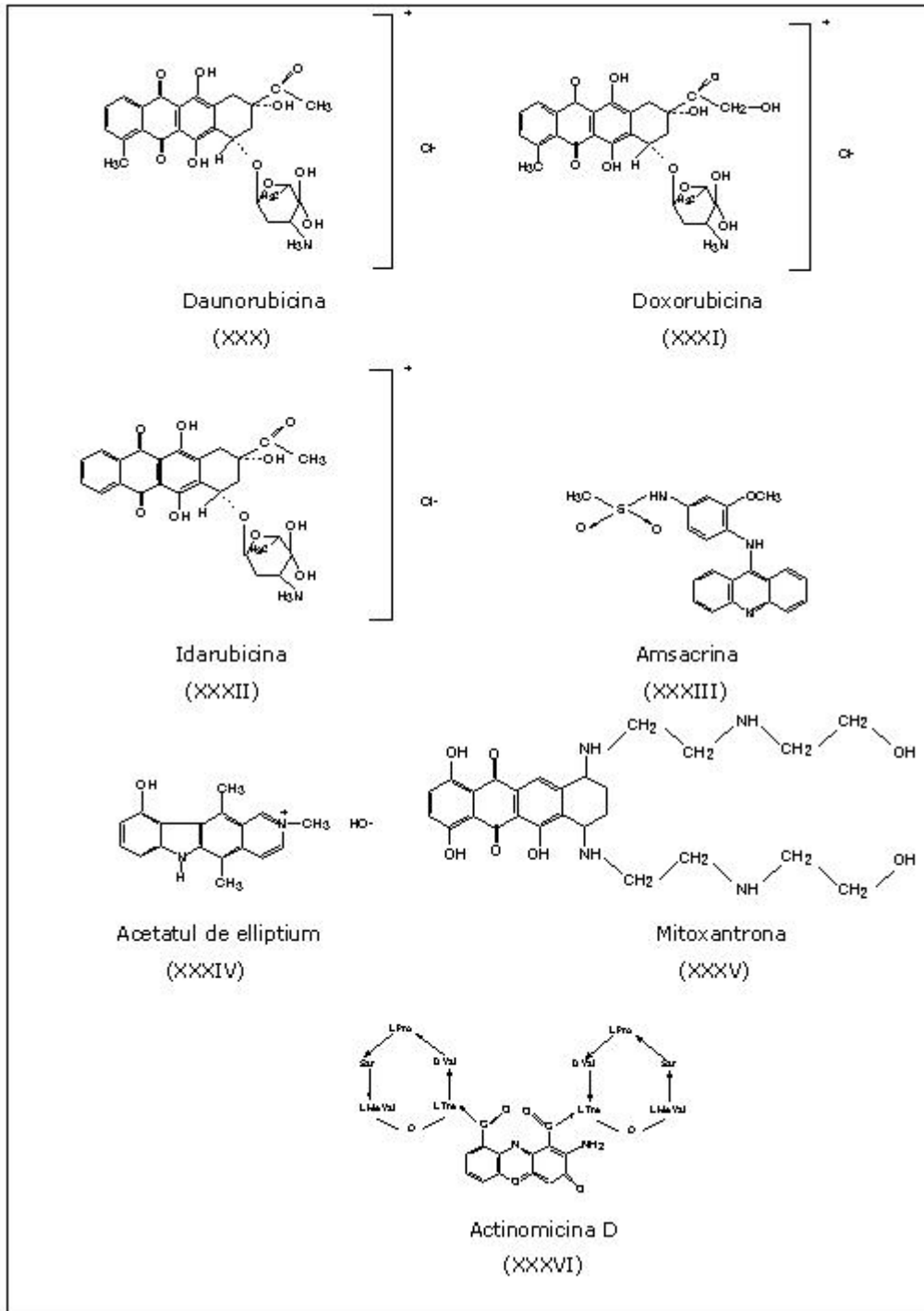


Fig. 1-10 Principalele chimioterapie citostatice cu specific de antibiotice

e) Actinomicinele

Actinomicina D (XXXVI) sau dactinomicina, are denumirea chimică 2-amino-4,6-dimetil-3-oxo-N,N'-bis [7,11,14-trimetil-2,5,9,12,15-pentaoxo-3,10-di(propan-2-il)-8-oxa-1,4,11,14-tetrazabicio [14.3.0] nonadecan-6-il] fenoxazin-1,9-dicarboxamid-2-amino-4,6-dimetil-3-oxo-N,N'-bis [7,11,14-trimetil-2,5,9,12,15-pentaoxo-3,10-di(propan-2-il)-8-oxa-1,4,11,14-tetrazabicio [14.3.0] nonadecan-6-il]fenoxazin-1,9-dicarboxamida, după nomenclatura IUPAC. Actinomicina D intră în interacție cu macromolecula de DNA. În urma interacției este favorizată formarea radicalilor liberi care pot cauza apariția de anomalii cromozomiale.

1.2.5. COMPUȘI CITOSTATICI DE EXTRACȚIE

În medicina populară se folosesc numeroase plante ca remedii pentru tratarea papiloamelor epidermei și a altor tumori maligne ale pielii. Tratamentul multor boli se datorează produselor naturale, iar cancerul nu reprezintă o excepție. Produsele provenite din plante sunt reprezentate, în principal, de alcaloizi extrași din brândușa de toamnă, reprezentativă fiind colchicina (XXXVII) și alcaloizi din Vinca sp., e.g.: vinblastina (XXXVIII) și vincristina (XXXIX). Formulele structurale se redau în fig. 1-11.

În ultimii ani au fost introduși în chimioterapia citostatică și alți compuși derivați din plante cum sunt podofilotoxina, etoposidul și teniposidul. Acești compuși acționează prin blocarea diviziunii celulare ca rezultat al inhibării funcției microtubulilor.

a) Colchicina

Colchicina este un alcaloid extras din brândușa de toamnă (*Colchicum autumnale*), care inhibă mitoză celulelor în metafază, blocând multiplicarea acestora. Utilizarea în chimioterapie este limitată de toxicitatea foarte ridicată, la doze terapeutice.

Derivații colchicinei sunt: demelcocin, tiocolociran, colchicozid, și tiocolchicozid. Aceștia au și ei toxicitate ridicată și se utilizează mai rar datorită spectrului antitumoral limitat.

b) Vinblastina și vincristina

Din plante de *Vinca* sp. s-au extras compuși cu acțiune citostatică, dintre care se menționează: vinblastina și vincristina (fig. 1-11).

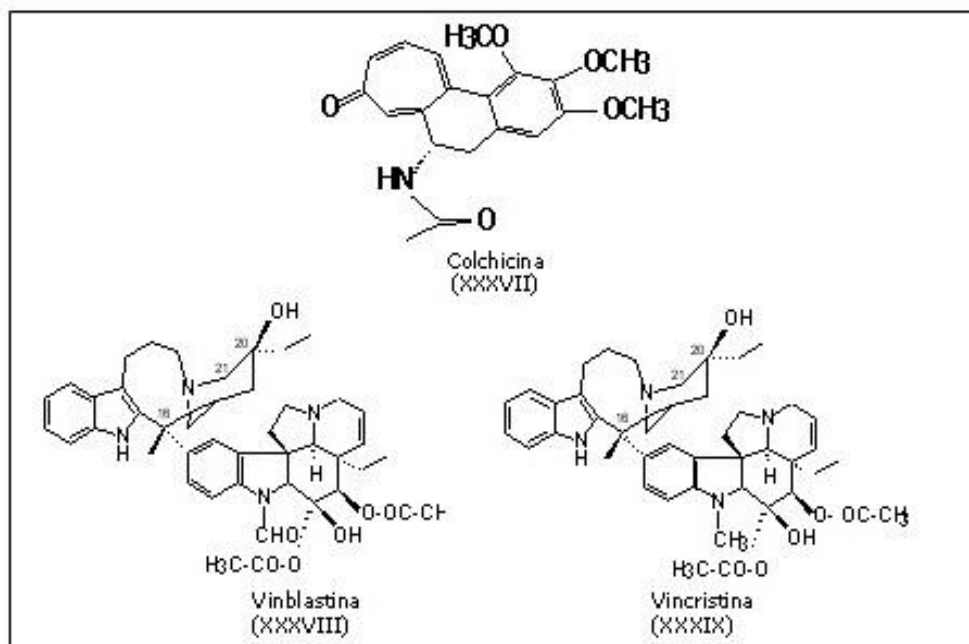


Fig. 1-11 Formulele structurale ale alcaloizilor extrași din plante aparținând genurilor *Colchicum* și *Vinca*

Vinblastina și Vincristina, după administrare orală se distribuie rapid formând legături reversibile cu macromoleculele proteice din celule. Derivații reziduali se elimină pe cale biliară și mai puțin pe cale urinară. În chimioterapie au avantajul că difuzează în lichidul cefalo-rahidian.

c) Derivații de podofilotoxină

Acești compuși au fost izolați de la planta numită *Podophyllum peltatum*. Structura de bază este dată de podofilotoxină (XL) în derivații de interes chimioterapeutic reprezentați de etoposid (XLI) și teniposid (XLII). Structura acestora este redată în fig. 1-12.

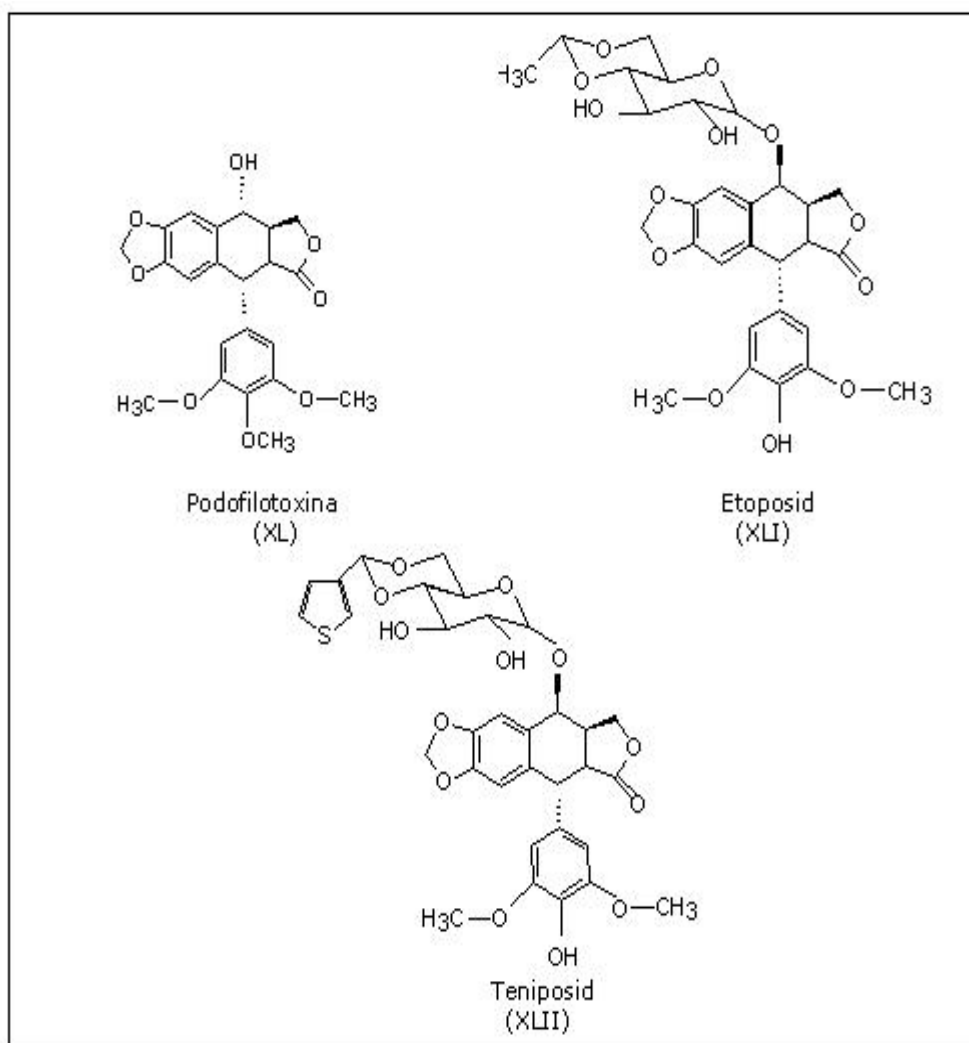


Fig. 1-12 Derivați de podofilotoxină (formule structurale)

Etoposidul se folosește în preparatul comercial Vepesid, iar Teniposidul în preparatul comercial Vumon [73]. Acești compuși sunt activi la un număr mare de tumori solide ale diferitelor organe, cu precădere tumori cerebrale, și tumori ale aparatului uro-genital. De asemenea se pot include în numeroase scheme de polichimioterapie a limfoamelor și leucemiilor.

1.3. SPECIFICUL MECANISMELOR DE INTERACȚIE ALE CHIMIOTERAPICELOR CITOSTATICE

1.3.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

O privire generală asupra mecanismelor de acțiune ale citostaticelor evidențiază faptul că acestea interacționează la nivel celular cu macromoleculele de proteine (catenele polipeptidice ale holo- și heteroproteidelor) și îndeosebi cu macromoleculele de acizi nucleici (catene poliheteronucleotidice) interesând cu precădere acidul deoxiribonucleic [74-76].

Mecanismele de acțiune ale citostaticelor sunt foarte complexe și diferă de la o clasă de compuși la alta. O caracteristică comună rezidă în faptul că acționează la nivel molecular și celular. Astfel determină blocarea diviziunii celulare și în final moartea celulelor - tanatocitoza. Aceasta se produce prin perturbarea biosintezei proteinelor și mai ales a biosintezei acizilor nucleici cu modificarea structurii chimice a acestora, împiedicând astfel desfășurarea normală a ciclului celular și a diviziunii celulare [2, 77].

Medicamentele chimioterapice cu acțiune citostatică prezintă interacțiuni specifice în care importantă este și topobiochimia celulelor. Astfel, principalele interacții confirmate de biologia celulară și moleculară, pot acționa la nivelul diverselor fracțiuni celulare:

- nucleul celular - sediul biosintezei acizilor nucleici - poate fi influențat prin perturbarea biosintezei proteinelor cu formare de polipeptide anormale.
- mitocondriile - care conțin enzimele responsabile de procesul respirației celulare [78]
- lizozomii - afectați de hipoxie, acidoză sau agresiuni producătoare de inflamație [21]
- citoplasma celulară - implicată în biogeneza unor heteroproteide, intervenind în metabolismul proteinelor implicat a glico- și lipoproteinelor

Acțiunea chimioterapicelor citostatice poate fi influențată și de factorii biologici, cum ar fi: greutatea, suprafața corporală, vârsta, sexul, starea fiziologică, starea patologică. Toate acestea pot modifica farmacocinetica sau farmacodinamia acestor medicamente chimioterapice.

În continuare se prezintă date generale asupra mecanismelor de acțiune ale diverselor chimioterapice citostatice remarcând interacțiile specifice. Cu referire la compușii platinici (în special la cis-platină) se rezervă un capitol special (v. Cap. 1.4.) în care se prezintă date mai detaliate.

1.3.2. MECANISME DE INTERACȚIE SPECIFICE COMPUȘILOR ALCHILANȚI

Chimioterapicele citostatice reprezentate de compuși alchilanți constituie clasa cea mai numeroasă de medicamente antitumorale. Prezența în moleculă a grupărilor: bis-(2-cloretil)-amină, etilenimină, epoxid, etc., conferă caracterul electrofil grație căruia aceste substanțe, interacționează cu substanțele ce conțin în moleculă centrii nucleofili, anioni anorganici și organici, sau cu substanțele care au grupări de electroni neparticipanți aminoderivați, mercaptoderivați, care au grupări hidroxil.

Mecanismul de acțiune este influențat de proprietățile fizico-chimice ale substanțelor (e.g. reactivitatea agenților alchilanți), și de factori biologici.

a) Interacția cu derivați azotiperitici.

Azotiperitele acționează prin inhibarea mitozei în toate țesuturile germinative, determinând fenomene de regresie, cu precădere a limfoamelor maligne și a carcinoamelor bronhice nediferențiate.

Azotiperitele sunt alchilanți difuncționali care acționează prin substituție nucleofilă la nivelul atomilor de azot din structura nucleobazelor purinice și pirimidinice. Această reactivitate se datorează densității electronice ridicate de la nivelul atomului de azot.

Prezența atomului de halogen la clormetină, spre exemplu determină desfășurarea reacției prin mecanism de substituție nucleofilă rapidă, în timp ce introducerea unor substituenți aromatici duce la scăderea bazicității atomului de azot. Acest mecanism de acțiune cu viteză mai mică duce și la o scădere a toxicității.

b) Interacția cu derivați aziridinici.

Aziridinele în contact cu substanțe nucleofile din celule reacționează prin deschiderea ciclului, dând naștere la compuși care modifică structura chimică a acizilor nucleici și a proteinelor.

Studiul mecanismului de acțiune al derivaților aziridinici a relevat importanța ionului de aziridiniu ca agent de alchilare. S-a urmărit sinteza unor agenți alchilanți mai selectivi prin grefarea acestei grupări funcționale pe molecule suport selectate (i.e.: melanina, benzochimona), având în vedere posibilitatea acestora de a interveni în procesele redox celulare. De asemenea au fost folosiți acizii pirofosforic și tiofosforic în vederea obținerii unor compuși capabili să se bioactiveze preferențial în tumoră, în condiții de pH scăzut [79].

c) Interacția cu esteri ai acidului metansulfonic.

În seria acestor compuși se remarcă cazuri de stereospecificitate. O importantă acțiune citostatică prezintă busulfanul care se comportă ca un alchilant bifuncțional, reacționând cu grupările nucleofile. Substituția se desfășoară prin mecanism bimolecular.

d) Interacția cu derivați de nitrosouree și hidroxiuree.

Derivații de nitrosouree și hidroxiuree pot produce perturbări în biosinteza DNA, prin blocarea ribonucleotidreductazei, împiedicând transformarea ribonucleotidelor în 2-deoxiribonucleotide. Sunt agenți specifici fazei S a ciclului celular, blocând celulele în această fază. Pot acționa de asemenea prin blocarea unor enzime necesare în repararea celulară [80-82].

Acești compuși au o remarcabilă reactivitate citostatică, fiind considerați superiori altor citostatice în tratamentul tumorilor cerebrale.

e) Interacția cu derivați de metilhidrazină și triazenă.

Dacarbazina are un mecanism de acțiune citostatică dublu: inhibă biosinteza DNA prin legarea de precursori nucleotidici și perturbă activitatea biologică a acizilor nucleici prin mecanism alchilant [83]. Substanța medicamentoasă inactivă ca atare, se activează sub acțiunea unor enzime microzomiale hepatice suferind demetilare și ulterior duce la formarea de ioni carboniu H_3C^+ , diazometan $H_3C-N\equiv N$, formaldehidă HCHO - compuși care reacționează cu agenții alchilanți, cu grupările nucleofile din proteine și acizii nucleici.

Explicația acțiunii citostatice a procarbazinei se bazează pe posibilitatea ca o soluție apoasă diluată de sare de carbazină aflată în prezența oxigenului molecular să ducă la incizia moleculară a DNA cu formarea unor fragmente mici, fără a distruge structura de dublu helix.

Procarbazine este metabolizată sub acțiunea enzimelor hepatice formând metaboliți activi [79]. Se distribuie în toate țesuturile concentrațiile din LCR fiind

echivalente cu cele plasmatiche, fiind activă în terapia unor tumori cerebrale. În urma metabolizării se formează metaboliți activi ca peroxidul de hidrogen (H_2O_2), care în prezența urmelor de fier degradează DNA, iar formaldehida și formil hidrazina inhibă RNA - și DNA- polimeraza. Acești carbocationi alchilanți reacționează cu acizii nucleici și cu proteinele.

f) Interacția cu compuși platinici.

Cu referire la compușii platinici cercetările au fost orientate pe anumite aspecte care au fost considerate esențiale cum ar fi: 1) obținerea efectului terapeutic la administrarea unor doze mai reduse de medicament ; 2) profilul toxicologic al analogului poate fi mai favorabil prezentând similitudini cu cel al compusului inițial; 3) eficacitatea analogului în cazuri rezistente la compusul inițial ; 4) complianța crescută față de compusul analog (e.g.: analogul se administrează oral, iar compusul de bază se administrează i.v.). O prezentare mai detaliată a interacției cu compuși platinici se prezintă la Cap. 1.4.

Astfel cercetările au fost orientate în vederea obținerii unor compuși ai Pt^{II} și Pt^{IV} ușor solubili în apă, mai puțin toxici și cu spectru antitumoral mai larg [46]. Modificările produse în structura chimică a cis-platinei au avut în vedere geometria moleculei și anume structura : (amină)₂,Pt(II)X₂, respectiv (amină)₂,Pt(IV)X₂Y₂, orientarea liganzilor fiind totdeauna cis.

De asemenea, liganzii aminici reprezentați de gruparea NH_3 , de amine primare sau secundare trebuie să realizeze legături de hidrogen. Liganzii de tip X₂ anionic trebuie să fie reprezentați de grupări ușor eliminabile : clor, sulfat, oxalat, malonat, ascorbat, în timp ce liganzii Y₂ pentru complecții Pt(IV) sunt reprezentați de grupări hidroxil sau atomi de clor, așezate în poziție trans.

Dintr-un număr mare de compuși sintetizați care îndeplinesc aceste condiții structurale, au intrat în terapie - ca a doua generație de complecși ai Pt(II) și Pt(IV) doar carboplatina și ormaplatina. Acești compuși sunt considerați superiori cis-platinei deoarece sunt mai solubili în apă și mai stabili în soluții perfuzabile. În privința efectelor adverse, acestea sunt mai reduse cu excepția mielotoxicității (toxic la nivelul celulelor măduvei spinării), iar spectrul antitumoral și eficacitatea clinică nu sunt net superioare.

Din generația a treia de analogi platinici face parte și oxaliplatina, compus care a fost introdus în terapie în anul 2004, fiind folosit cu succes în tratamentul

cancerului [84]. Acest compus are ligand de tipul diaminociclohexan, fiind mai ușor solubil decât ormaplatinul care a fost puțin folosit în practică.

Aducții realizați de oxaliplatină cu macromolecula de DNA au structură diferită de aducții cis-platină – DNA. Din acest considerent oxaliplatină este eficientă în unele forme de cancer rezistente la cis-platină (e.g. : cancer de colon). Dintre derivații platinei Pt(IV) de menționează, Satraplatin și Picoplatin.

Satraplatina este un compus Pt(IV) care poate fi considerat versiunea orală a carboplatinei, fiind încă în faza de studiu clinic, iar picoplatina, este activă in vitro pe culturi de celule rezistente la cis-platină și oxaliplatină.

1.3.3. MECANISME DE INTERACȚIE SPECIFICE ANTIMETABOLIȚILOR

Datorită faptului că au structuri apropiate cu cele ale metaboliților celulari, antimetaboliții concurează cu aceștia pentru anumite enzime, acționând prin faptul că se substituie metabolitului normal sau inhibă sinteza sau utilizarea acestuia. În urma acestui proces se formează așa-numiții „metaboliți frauduloși” – compuși cu structură chimică foarte apropiată de cea a metaboliților normali, dar care nu pot îndeplini rolul acestora.

a) Interacția specifică antimetaboliților acidului folic.

Antimetaboliții acidului folic perturbă indirect formarea bazelor purinice și pirimidinice și a acizilor nucleici, cu precădere a DNA.

Metotrexatul, principalul antimetabolit este un antagonist al acidului folic, obținut în urma unor modificări ale structurii acestuia. Metotrexatul se leagă de enzima dihidrofolatreductaza realizând o legătură mai puternică față de legătura cu substratul normal, reprezentat de acidul folic.

În urma legării metotrexatului de enzimă are loc inhibarea formării acidului dihidrofolinic, tetrahidrofolinic și a acidului folinic, care are capacitatea de donare de grupări formil, metil, metin, importante în biosinteza nucleobazelor purinice, pirimidinice și a unor aminoacizi [85]. Ca urmare, este afectată sinteza de acizi nucleici, cu precădere biosinteza nucleobazei timină, și implicit biosinteza DNA.

b) Interacția cu derivați purinici și pirimidinici.

b₁) Interacția cu derivați purinici.

Antimetaboliții purinici conțin în structura lor gruparea –SH, care înlocuiește gruparea –NH₂ din adenină și gruparea –OH din guanină (v. Cap. 1.2.). La nivelul

căilor biochimice specifice nucleoproteinelor, acești derivați purinici concurează cu nucleotidele normale; prin blocarea purinelor provenite din aportul exogen inhibă sinteza acizilor nucleici. Analogii bazelor purinice folosiți în terapia anticancerasă sunt: 6-mercaptapurina și 6-tioguanina.

În cazul 6-mercaptapurinei, metabolitul activ este o nucleotidă tiolată, tionozin-5'-monofosfat care acționează prin inhibarea aminotransferazei și al altor enzime implicate în sinteza și utilizările nucleotidelor purinice. Deosebirea de metabolizii activi este că timpul de înjumătățire este mai scurt [86].

Compusul 6-tioguanina se deosebește de guanină prin absența atomului de azot din poziția 3, și înlocuirea lui cu un atom de carbon. Deazaguanina rezultată inhibă puternic și selectiv biosinteza purinică, acționând astfel ca și citostatic.

b₂) Interacția cu derivați pirimidinici.

Derivații cu nucleu pirimidinic sunt în mare parte produși ai metabolismului intermediar, dintre care se poate aminti citozina, uracilul, timina, și 5-metiluracilul, aflate ca atare, în nucleozide, nucleotide, vitamine, și coenzime.

Derivatul numit 5-fluorouracil este un antimetabolit al uracilului și al timinei care se diferențiază prin prezența atomului de fluor în poziția 5 (vezi fig. 1-13).

La nivelul celulei, 5-fluorouracilul este transformat în nucleotidă, ulterior fosforilat și integrat în structura RNA și DNA unde acționează prin blocarea transcriptiei. Sub formă de 5-fluorouracil monofosfat inhibă ireversibil timidilat-sintetaza, și indirect biosinteza DNA. Acest chimioterapic este activ asupra celulelor aflate în fazele G₁, G₂, și S ale ciclului celular determinând în final blocarea sintezei proteinelor și a acizilor nucleici [87, 88].

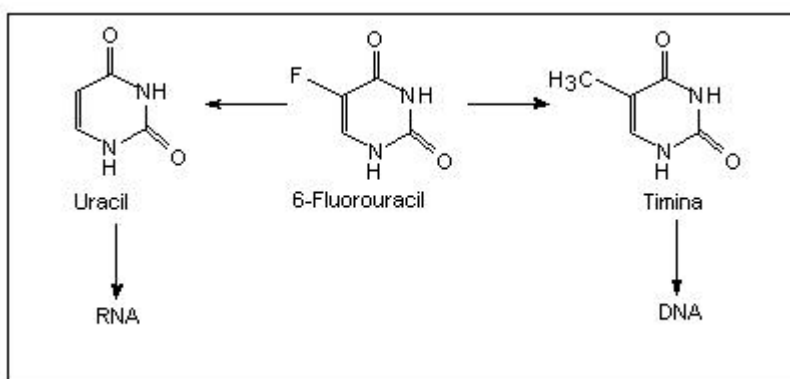


Fig 1-13 Structura chimică a 5-fluorouracilului și biotransformarea în nucleobaze pirimidinice

Citarabina este un citostatic care acționează prin metabolitul său arabinozid-citidin-trifosfat care are rol de „nucleotidă frauduloasă” în structura DNA. Acest citostatic specific pentru faza S a ciclului celular, este totodată și un inhibitor specific al DNA polimerazei. Metabolitul activ se formează în organism prin fosforilări succesive [89].

Sub acțiunea citidindeaminazei are loc deaminarea citarabinei care generează un compus inactiv care se numește arabinozid-uracil și care se distribuie și în țesuturile normale și în țesutul canceros.

1.3.4. MECANISME DE INTERACȚIE SPECIFICE ANTIBIOTICELOR CU ACȚIUNE CITOSTATICĂ

Un număr mare de antibiotice se pot include în grupa chimioterapicelor citostatice. Principalele antibiotice anticanceroase utilizate în prezent aparțin următoarelor clase structurale: antraciline, acridine, elipticine, antrachinone și actinomicine.

a) Interacția cu antracilinele.

Mecanismul de acțiune rezidă într-o succesiune de reacții complexe care duc la blocarea sintezei DNA și RNA. Antracilinele (e.g. daunorubicina, doxorubicina ș.a.) au o mare afinitate pentru acizii nucleici celulari cu care formează complecși stabili, modificând structura chimică și activitatea biologică a acestora. Prin intercalare între catenele dublului helix al DNA este blocată în special transcripția. La efectul citostatic contribuie însă și formarea unor radicali liberi și blocarea DNA și RNA polimerazelor.

b) Interacția cu acridinele.

Amsacrina – principalul derivat acridinic citostatic - acționează prin mecanisme asemănătoare celorlalte antibiotice citostatice, prin blocarea DNA polimerazei.

c) Interacția cu elipticinele.

Mecanismul de acțiune al acetatului de eliptium se bazează pe intercalare în structura DNA, blocând biosinteza acestuia.

d) Interacția cu antrachinonele.

Dintre produșii obținuți prin sinteză totală care au structură chimică înrudită cu antracilinele s-a introdus în terapie compusul mitoxantrona. Mecanismul de acțiune se bazează pe inhibarea biosintezei macromoleculelor de DNA și RNA prin intercalare în structura acestora.

e) Interacția cu actinomicinele.

Actinomicina D acționează în special prin blocarea replicării macromoleculii de DNA. Prin structura triciclică, planară, se intercalează între perechile de nucleobaze din dublul helix al DNA. Sunt vizate în special perechile guanină-citozină, care formează legături multiple prin componenta carboxamidică din aglicon și cele două cicluri lactonice.

1.3.5. MECANISME DE INTERACȚIE ALE COMPUȘILOR CITOSTATICI DE EXTRACȚIE

a) Interacția cu colchicina.

Din punct de vedere al mecanismului de acțiune, colchicina inhibă mitoză celulelor, în metafază, blocând multiplicarea acestora [90]. Activitatea anticanceroasă se datorează prezenței în moleculă a grupării benzociclopentanotropolonice, a grupării carbonil, și a grupărilor metoxil.

b) Interacția cu vincristina și vinblastina.

Acești compuși acționează prin formarea unor legături cu proteinele microtubulare în faza S a ciclului celular. Consecințele sunt vizibile abia în faza M a ciclului celular. Acțiunea vincristinei și a vinblastinei poate fi contracarată de către acidul glutamic și de către triptofan, care pot inhiba și procesele care pot inhiba și procesele de energogeneză celulară necesară mitozei.

c) Interacția cu derivați de podofilotoxină.

Există un mecanism de acțiune specific derivaților de podofilotoxină (e.g.: podofilotoxina, etoposidul ș.a.) care au utilizare ca și chimioterapice citostatice.

Acești compuși au efecte antimitotice prin blocarea intrării celulelor tumorale în faza de mitoză a ciclului celular, datorită interferării cu topoisomeraza.

1.4. CARACTERISTICI STRUCTURALE ȘI MECANISMUL DE ACȚIUNE AL COMPUȘILOR PLATINICI

1.4.1 STRUCTURA COMPUȘILOR PLATINICI

Complecșii platinici sunt stabili în soluție apoasă. Liganzii compușilor platinei pot fi înlocuiți de agenți nucleofili, care pot forma legături covalente puternice, cu grupări tiolice sau grupări amino din structura proteinelor și a acizilor nucleici, similar altor clase de compuși alchilanți [91, 92].

Așa cum s-a arătat, doar un număr redus de compuși platinici au fost utilizați în chimioterapia citostatică (v. Cap.1.2.2.6.). Între aceștia se menționează: cis-platina, carboplatina, oxaliplatina, ormaplatina, satraplatina, picoplatina (v. și Fig. 1-7). Dintre aceștia primii trei compuși conțin Pt (II), iar ultimii trei compuși au în compoziție Pt (IV).

Experimental s-a demonstrat că în complecșii platinei legătura Pt-NH₃ este mai puternică decât legătura Pt-Cl, de unde explicația hidrolizei reduse la nivel sanguin, datorită concentrației scăzute a ionilor de clor.

Din punct de vedere chimic, cis-platina este un complex metalic care are platina ca și atom central, iar ca și liganzi două molecule de amoniac și doi atomi de clor situați în poziție cis. Acest compus cu denumirea de cis-diaminodicloroplatină, a fost pentru prima dată descrisă de Peyrone în 1845. Ulterior, după jumătate de secol, în 1895 Alfred Werner a realizat separarea celor doi izomeri cis și trans [93].

În 1965, Rosenberg și colaboratorii au descoperit în urma unui proces de electroliză că electrodul de platină inhibă diviziunea mitotică în celula bacteriei de *Escherichia coli*. În prezent este general acceptat faptul că principala țintă a acțiunii la nivel celular a cis-platinei este reprezentată de acidul deoxiribonucleic (abreviat DNA) care este purtătorul mesajului genic. Acest mesaj genic este conținut în secvențele de deoxiribomononucleozidfosfații din catenele DNA. Aceasta este de fapt informația genică transmisibilă de la o celulă la altă celulă în cadrul diviziunii celulare (ciclul celular) și de la o generație la altă generație în cursul filiației genetice.

În laborator, sinteza cis-platinei pornește de la un derivat anorganic tetracloroplatinat al potasiului (fig. 1-14).

1.4 – Caracteristici structurale și mecanismul de acțiune al compușilor platinici 47

Pornind de la un compus tetracloroplatinat al potasiului, K_2PtCl_4 , prima grupare NH_3 este adăugată la oricare dintre cele patru valențe, a doua grupare NH_3 putând adera la moleculă în poziție cis- sau trans [94].

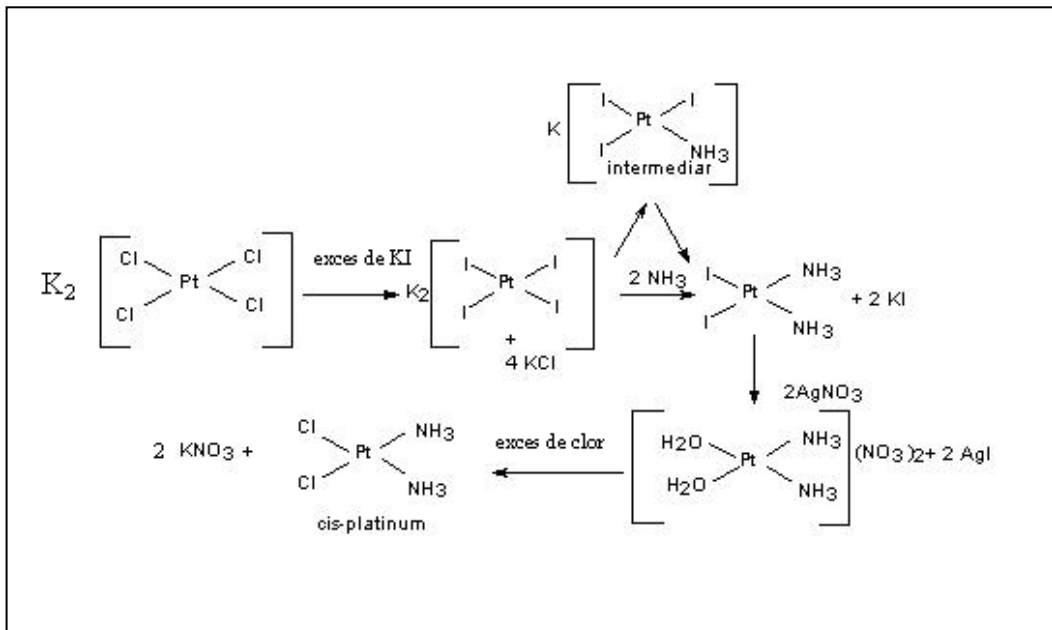


Fig. 1-14 Sinteza cis-platinei în laborator (etape)

Atomul de platină poate avea stările de oxidare diferite Pt (II) și Pt (IV) (vezi fig. 1-15). Deci poate avea stările Pt^{+2} și Pt^{+4} , la starea de oxidare Pt (II) compusul are simetrie tetraedrică, iar la starea de oxidare Pt (IV) compuşii rezultați au simetrie octaedrică [93, 95] – v. Fig. 1-15.

În prezent s-a ajuns la concluzia că prin legarea cis-platinei la DNA se formează un aduct care intervine în succesiunea proceselor de replicare, transcripție și translație producând perturbarea acestora. Formarea aductului la una sau la ambele catene ale macromoleculii de DNA produce destabilizarea structurală. Aceasta este urmată de perturbarea activității biologice [48, 62, 93, 96]. La nivel celular are moartea celulară programată – apoptoza [97, 98]. Se impune mențiunea că în cazul interacției cu medicamente citostatice (și în general cu substanțe xenobiotice), celulele sunt distruse (în parte), dar aceasta nu este o moarte celulară programată (apoptoza). Procesele care conduc la moartea celulară indusă de diferite

substanțe corespund mai mult necrozei. În general se poate considera că este un proces de tanatocitoză [99].

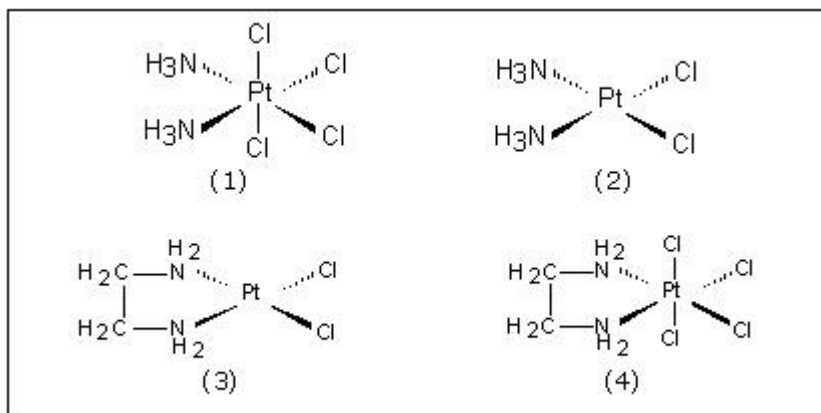


Fig. 1-15 Compuși obținuți sinteză chimică:

- (1) cis-Pt^{IV}(NH₃)₂Cl₄; (2) cis-Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂;
 (3) Pt^{II}(NH₂CH₂CH₂NH₂)Cl₂; și (4) Pt^{IV}(NH₂CH₂CH₂NH₂)Cl₄

În urma cercetărilor întreprinse, s-a stabilit că nu orice izomer al platinei care realizează combinații coordinative cu DNA are potențial citostatic (e.g. izomerul trans- al diaminodicloroplatinei nu este un agent chimioterapeutic).

Datorită diferenței între izomerii geometrice cis și trans, nici modul de realizare al complexului coordinativ nu e identic, acest lucru determinând care dintre compuși e eficace în tratamentul cancerului [100, 101]. Descoperirea proteinelor celulare specifice care recunosc complexul DNA – cis-platină precum și examinarea modului de interacțiune a acestora cu aducții au putut conduce la moartea programată a celulelor cancerigene.

1.4.2. ACTIVITATEA BIOLOGICĂ ȘI MECANISMUL DE ACȚIUNE

Cis-platina are o structură relativ stabilă și un reacționează în mediu apos. (sânge, plasmă, unde concentrația anionilor Cl⁻ (~100 mM) este relativ ridicată. Sub această formă inactivă compusul ajunge în celulă prin două mecanisme de transport: prin transport activ și prin difuziune pasivă. La nivel intracelular cis-platina pierde cei doi anioni Cl⁻ devenind un compus reactiv care poate realiza

legături covalente cu numeroși compuși, printre aceștia numărându-se și macromolecula DNA [102].

La nivelul celulei, molecula este supusă unei reacții de tip hidrolitic în urma căreia un anion de Cl^- este înlocuit de o moleculă de apă, cu formarea unui nou compus, cu sarcină pozitivă (vezi fig.1-16). Transformarea produsă este denumită adesea "reacție de acvatare".

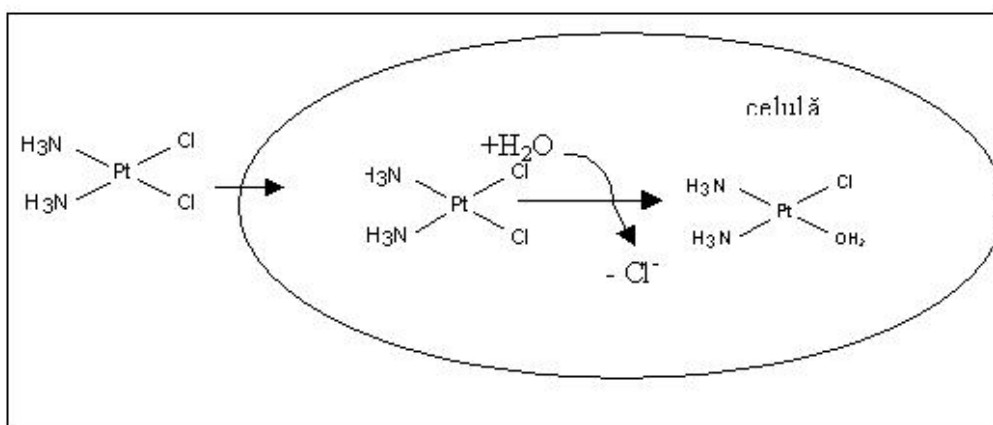


Fig. 1-16 Acvatarea cis-platinei – mecanism general

Eliberarea clorului (Cl^-) se produce în interiorul celulei și se datorează unei concentrații scăzute de Cl^- ($\sim 3 - 20 \text{ mM}$) – și unei concentrații crescute de H_2O [103].

Ulterior este favorizat schimbul de liganzi, de anioni Cl^- cu H_2O și formarea de combinații complexe cu H_2O (derivați acvatați). Ajunsă la nivelul celulei, cis-platina are mai multe ținte: DNA, RNA, proteinele îndeosebi catenele polipeptidice care conțin aminoacizi cu sulf (e.g.: metalotionina și glutation). La nivel mitocondrial efectele cis-platinei nu sunt binecunoscute. Se remarcă faptul că interacția cu DNA poate viza DNA nuclear, dar și DNA mitocondrial. Este însă sigur faptul că acțiunea cis-platinei conduce la moartea celulară [104-106].

Cis-platina realizează legături de tipul aducțiilor cu DNA, la nivelul perechilor de nucleobaze modelul Watson-Crick, 1953 [99]– (fig. 1-17).

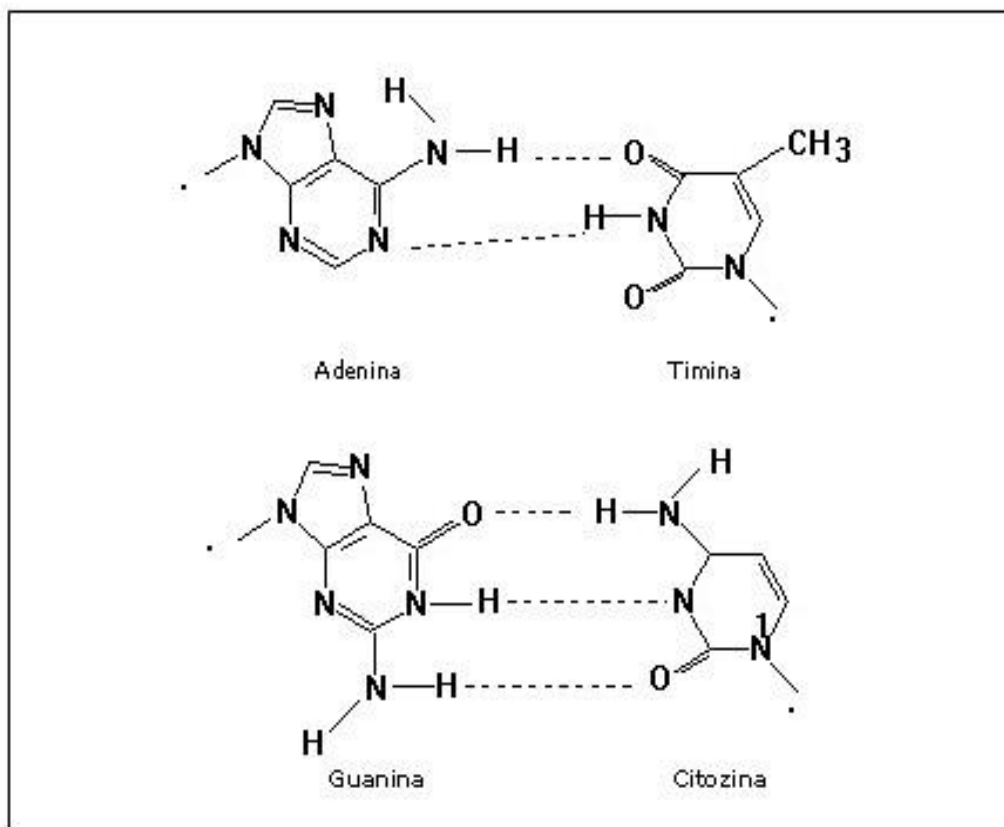


Fig.1-17 Fragment din dublul helix al DNA (model Watson-Crick), 1953

În DNA dublu catenar există perechile de baze adenină-timină și guanină-citozină la nivelul cărora legarea cis-platinei precede distorsia helixului și chiar incizia moleculară (ruperea catenei).

1.4.2.1. Formarea aducțiilor specifici cis-platinei

Cercetările întreprinse în ultimele cinci decenii relevă realizarea unor descoperiri fundamentale referitoare la structura macromoleculilor de acizi nucleici [107, 108].

Derivații cis-platinei cu apa sunt agenți electrofili difuncționali care se pot fixa la oricare situs nucleofil de la molecula de DNA. Dintre cele patru nucleobaze prezente în structura macromoleculii de DNA, cis-platina prezintă afinități mai mari

față de guanină [109, 110]. Totuși se acceptă că la nivelul fiecărei nucleobaze există atomi la care cis-platina se poate lega, datorită caracterului nucleofil.

Aceste ipoteze au fost abandonate după ce s-a demonstrat că cis-platina se leagă preferențial la atomul N₇ de la nucleobazele purinice guanină și adenină și la atomul N₃ de la citozină, în urma măsurării energiilor de respingere dintre atomii de metal și atomii de azot din structura nucleobazelor.

Investigațiile cu privire la interacția dintre cis-platină și macromolecula de DNA evidențiază posibilitatea formării aducțiilor cis-platină – DNA care perturbă structura secundară a macromoleculei.

Particularitățile stereochemice ale legării implică tranziția macromoleculei de la forma B-DNA (starea nativă) la formele A-DNA și C-DNA [111, 112].

Datorită geometriei sale, izomerul trans nu poate forma combinații intracatenare cu DNA, motiv pentru care este inactiv în procesul de liză al celulelor canceroase [113].

Există și compuși ai Pt (IV) care prezintă de asemeni izomeri cis și trans.

Formulele structurale ale celor doi izomeri cis și trans sunt prezentate în fig. 1-18.

Structura (a) corespunde cis-diaminotetracloroplatinei și relevă dispunerea grupărilor (NH₃) în același plan. Această structură este instabilă, ușor reactivă.

În structura (b) cele două grupări NH₃ se află situate în plan opus una față de alta, având central atomul de platină. Structura trans este mai stabilă din punct de vedere termodinamic, fiind primul compus sintetizat și studiat de cercetători [114].

În urma descoperirii activității antitumorale a cis-platinei de către Rosenberg (1965) studiile cu privire la interacțiunea ionilor de platină cu acizii nucleici și a aducțiilor formați de Pt (II) cu DNA, au demonstrat că DNA celular constituie ținta majoră a cis-platinei. Nu există informații privind interacția cu DNA mitocondrial dar în mod sigur aceasta există [115].

Legarea cis-platinei de macromolecula de DNA afectează atât structura macromoleculei de acid nucleic cât și biosinteza proteinelor. Activitatea citostatică a cis-platinei poate fi corelată cu cuantumul de platină legat de macromolecula de DNA [116, 117].

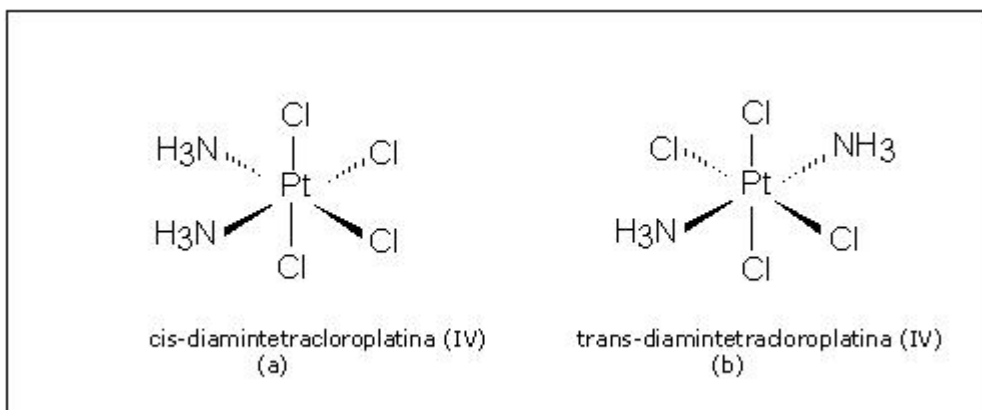


Fig.1-18 Structuri posibile ale izomerilor generați de Pt (IV)

Studii in vitro și in vivo au sugerat că cis-platina poate realiza aducți cis-platină – DNA cu legături intra- și intercatenare cu DNA, dar și aducți macromoleculare cis-platină – DNA – proteine [118].

Substituirea în nucleobaze a unui atom de hidrogen participant la realizarea unei legături de hidrogen, cu un atom metallic cu configurație potrivită duce la formarea unor complecși nucleobaze – metale. În cazul unor astfel de aducți legătura dintre nucleobaze este mai puternică. Elucidarea rolului legăturilor de hidrogen între nucleobaze conform modelului Watson-Crick s-a bazat pe studii de modelare geometrică și pe calcule de mecanică cuantică [93].

Interesul pentru formarea unor aducți ai platinei cu nucleobazele pirimidinice își are originea în structura chimică a acestora, în multiplele modalități de legare, incluzând agregatele supramoleculare și în interacțiunile dintre Pt și ligand [93].

Interacția agenților alchilanți cu acizii nucleici conduce la o stabilitate scăzută a acestora, la o distorsiune sau chiar ruperea macromoleculei, cu repercursiuni asupra activității biologice interesând țesutul atacat și în final întregul organism.

1.4.2.2. Particularități ale relației structură – activitate la cis-platină în interacția cu DNA

Studiile in vitro bazate pe cristalografia cu raze X și pe metode spectroscopice (e.g. spectroscopia în UV, dicroismul circular, etc.) au demonstrat că în urma interacției cis-platinei cu DNA, are loc formarea unor aducți intracatenari în proporție de 90%. Dintre acestea aproximativ 65% se formează între doi atomi de azot situați în poziția N₇, aparținând a două nucleobaze de tip guanină adiacente [5'-d(GG)] și 25% se formează între atomul N₇ al guaninei, și N₇ al adeninei [5'-d(AG)]. Restul legăturilor formate sunt intracatenare, intercatenare și aducți monofuncționali [119]. Procentul mare de legare intracatenară a cis-platinei cu două nucleobaze guaninice adiacente la nivelul atomilor N₇ este cauzat de stările de torsiune minime de la acest nivel precum și stabilității crescute a acestui tip de aduct. La acest tip de aduct este realizată cea mai scurtă distanță dintre doi atomi de N₇ din macromolecula de DNA.

Investigațiile in vitro au demonstrat că macromolecula DNA, sub acțiunea cis-platinei prezintă modificări, care au fost evidențiate cu ajutorul dicroismului circular [112].

Metoda dicroismului circular (DC) a adus contribuții importante la înțelegerea modificării structurilor sterice ale edificiilor moleculare, cu profunde implicații în denaturarea relației structură chimică – activitate biologică.

Este binecunoscut faptul că prin dicroism circular au fost investigați diverși compuși optic activi. Între domeniile de interes major studiate cu ajutorul dicroismului circular se numără și acizii nucleici – v. fig. 1-19. Cu ajutorul DC s-au studiat modificările conformaționale B-DNA sub acțiunea cis-platinei și formarea altor genuri de DNA, cum ar fi C-DNA, A-DNA [112].

În cazul RNA studiile chimice au evidențiat că atomul N₃ al citozinei poate acționa ca donor, iar la acidul ribonucleic de transfer (tRNA) a fost observată legătura intercatenară între guanină și citozină. În cazul DNA, legarea la N₃ al timinei prezintă de asemenea importanță pentru că duce la obținerea unuia dintre cei mai stabili compuși din punct de vedere

termodinamic dintre toți compușii platinei care implică atomi de azot ca donori de electroni [120].

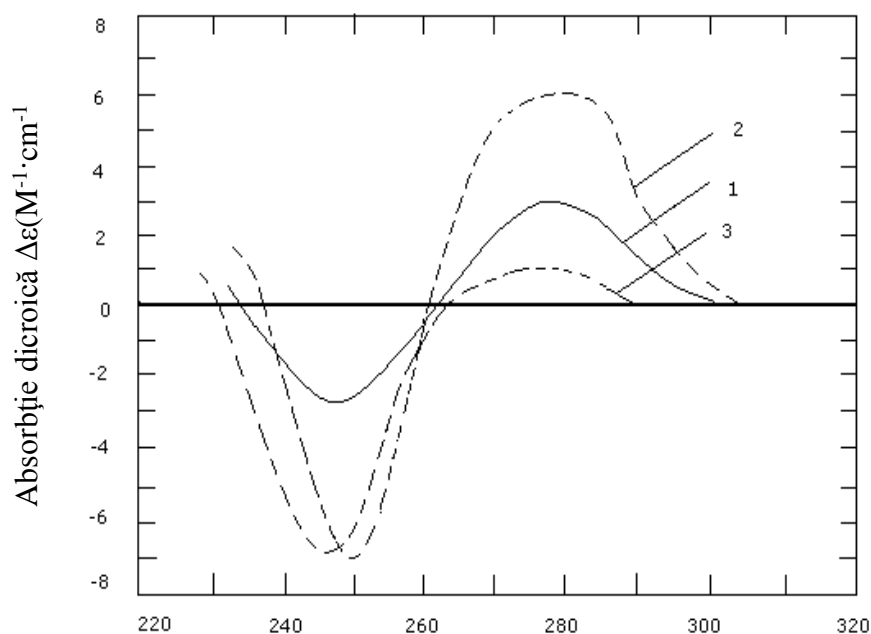


Fig. 1-19 Spectrele de dicroism circular : DNA (1); aducți DNA – cDDP- $r= 7,5$ (2); aducți DNA – cDDP- $r= 15$ (3) – [112]

Activitatea citostatică a medicamentului se datorează în mare parte formării aducțiilor intracatenari în proporție mai mare decât cei intercatenari [121]. Fiecare tip de legătură contribuie în parte la profilul toxicologic al medicamentului [122]. Astfel, cis-platina este mai citotoxică decât trasplatina, și datorită formării legăturilor intracatenare, trans-platina formând legături intercatenare [62].

1.4.3. PROBLEMA STABILITĂȚII CHIMICE ȘI TOXICITATEA CIS- PLATINEI

Platina face parte din categoria metalelor tranziționale, fiind în grupa 10 a sistemului periodic alături de nichel și paladiu, având în configurația electronică 8 electroni de tip d atunci când se află în stare de oxidare +2. Metalele tranziționale

1.4 – Caracteristici structurale și mecanismul de acțiune al compușilor platinici 55

au anumite caracteristici comune, și anume pot avea mai multe valențe, putând avea și mai multe stări de oxidare (e.g. platina poate avea starea de oxidare +2, +4, dar și +5 și +6).

Metalele tranzitionale joacă un rol esențial în sistemele biologice, însă trebuie avut în vedere și potențialul toxicogen al acestora [123]. Pentru a putea utiliza metalele în sistemele biologice, organismele au dezvoltat „căi biochimice specifice”- un aspect al xenobiochimiei bazate pe mecanisme homeostazice și homeorezice pentru intrarea acestora în mediul celular, transferul în interiorul celulei, stocarea, detoxifierea, excreția. Aceste căi biochimice, sunt reglate astfel încât metalele să fie disponibile în caz de necesitate, dar să se evite acumularea lor cu apariția efectelor toxice [124-126].

Primul compus coordinativ descoperit în 1845 a fost cis-diaminodicloroplatina II, numit și cis - DDP, sau cis-platina.

Medicamentele obținute ulterior, pornind de la structura cis-platinei, au fost numite medicamente ale “generației a II-a”. Acestea prezintă un spectru mai larg de activitate, concentrat pe aria tumorală rezistentă la cis-platină.

Proprietățile medicamentelor din generația a-II-a sunt mult îmbunătățite, acestea prezentând o selectivitate superioară, și un spectru antitumoral mai larg decât cis-platina [127].

Pentru ca un medicament analog cis-platinei să fie eficient, acesta trebuie să îndeplinească următoarele criterii: a) să fie neutru din punct de vedere chimic, pentru a permite transportul pasiv al substanțelor prin membrana celulară; b) să aibă două grupări mobile, situate de preferință în poziție cis una față de cealaltă; c) să dețină un ligand inert purtător de obicei a unei amine terțiare, care crește stabilitatea aductului prin realizarea unor legături de hidrogen între nucleobazele vicinale.

Dintre analogii cis-platinei putem aminti: carboplatina, ormaplatina, oxaliplatina, bisplatina. Caracteristicile chimice și mecanismul de acțiune al acestora a fost prezentat la Cap. 1.2.

În urma studiilor citofotometrice s-a demonstrat că platina suferă modificări chimice care variază de la un compus încărcat cu sarcină electrică la o specie neutră de tipul $[\text{PtIV}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$.

Compusul neutru există sub două forme izomere: izomerul trans - $[\text{PtIV}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$ și cis - $[\text{PtIV}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$. Forma trans – este mai stabilă din punct de

vedere termodinamic și a fost prima sintetizată.

Platina utilizată în compușii chimioterapici are două stări de valență dominante +2 și +4. Platina la valența inferioară Pt (II) formează o structură plană iar la valența Pt (IV) formează complexe octaedrice.

Compușii activi din punct de vedere chimic sunt cis - $[\text{PtII}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ și cis - $[\text{PtIV}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$. Structura trans are liganzii situați de o parte și de alta a planului, și ambele sunt inactive la concentrații mici (ppm în soluție).

Cis-platina, este un agent alchilant antineoplazic, cu formula brută $\text{PtCl}_2\text{H}_6\text{N}_2$, cu greutatea moleculară 300,1, cu structura plan tetraedrică, având aspect de cristale alb-gălbui, care în urma dizolvării generează o soluție limpede. În tabelul 1-1 este prezentată solubilitatea cis-platinei în principalii solvenți.

Compusul se descompune la 270°C eliberând oxid de azot și vapori de clor. În soluție de HCl de concentrație 0,1 N, are absorbția în lumină ultravioletă $\lambda_{\text{max}} = 301 \pm 2 \text{ nm}$, $\epsilon = 124\text{-}145$ [128].

Cis-platina a fost aprobată de Organizația Food and Drug Administration (FDA) în 1978 pentru tratamentul tumorilor genito-urinare [129, 130]. Azi se folosește cu succes în combinație cu unul până la trei și chiar patru medicamente cu bune efecte (e.g. cis-5-fluorouracil) pentru tratamentul pacienților cu carcinom de colon aflați în fază terminală [131, 132].

În terapie combinată, în asocierie cu vinblastina și bleomicina, cis-platina produce remisiune completă în 74% din cazuri la pacienții cu cancer testicular, și remisiune parțială la 26%.

Tabel 1-1. Solubilitatea cis-platinei în diverși solvenți.

Solvent	Solubilitate
Apă	<1mg/mL la 19°C (2.53mg/mL la 25°C)
Soluție salină	1 mg/mL
Alcool etilic 95%	<1 mg/mL la 19°C
Acetonă	<1 mg/mL la 19°C
Dimetilsulfoxid (DMSO)	≥ 100 mg/mL la 19°C
N,N dimetilformamidă (DMF)	>2 mg/mL
N,N dimetilformamidă pură anhidră (DMF)	24 mg/mL

Cis-platina este folosită cu succes și în cancerul de sân alături de taxani, antracicline și alcaloizi din Vinca. Combinațiile duble taxani – cis-platină și triple cu efect sinergic, care conțin pe lângă compușii menționați anterior, un anticorp monoclonal, numit trastuzumab, cu acțiune pe proteinele oncogene, reprezintă medicația de elecție în cancerul de sân [133].

Unul dintre obstacolele majore întâmpinate la administrarea cis-platinei îl reprezintă efectele toxice severe [134]. Cîteva dintre acestea sunt prezentate succint în continuare :

a) nefrotoxicitatea - este efectul advers care limitează doza de administrare a cis-platinei. Acest efect este dependent de doză, este ireversibil și afectează în special tubii renali proximali, apărând și degenerarea tubulară, necroza și mineralizarea celulelor epiteliale tubulare [135-138]. Mecanismul de acțiune nefrotoxică a cis-platinei este similar celui indus de mercur prin care are loc depleția aminoacizilor cu grupări tiolice de la nivelul tubilor renali. Prin urmare la administrarea de compuși tiolici scade riscul de nefrotoxicitate [139-144].

b) ototoxicitatea - are efect cumulativ și ireversibil. Acesta care se accentuează în urma radioterapiei. În cazul cis-platinei este mai frecventă la copii, la care apar tulburări de echilibru, asociate cu tulburări ale auzului. Acest efect toxic poate fi diminuat prin administrare de vitamine E [145-149].

c) efecte adverse comune cu alte chimioterapice: grețurile și starea de vomă, pierderea poftei de mâncare, a gustului și dificultății de deglutiție care duc la diaree și anorexie ; mielosupresia, angioedem, eritem, dermatită exfoliativă, edem facial, hiperhidroză, alopecie, șoc anafilactic, leziuni la nivelul cavității bucale.

d) tulburări neurologice, atrofie musculară, tulburări de coordonare ale mișcărilor – apar la doze mari și la tratament îndelungat.

Reacții adverse secundare sunt: conjunctivită, halucinații, aritmii, cefalee, hemoliză, intoleranță la glucoză, pancreatită, hiperuricemie, reacții anafilactice, hepatotoxicitate, tetanie, teratogenitate, sterilitate, reacție alergică, dispnee, febră, amețeli, anxietate [150-152]. Un alt aspect care trebuie menționat constă în faptul că cis-platina este și mutagenă.

O mențiune specială se face cu referire la faptul că cis-platina conduce la efecte mutagene (interesând interacția cu moleculele de DNA) și efecte teratogene

(interesând interacțiile cu DNA și proteine). Teratogenitatea a fost studiată asupra produșilor de concepție la animale de laborator [153-155].

În general, limitele succesului agenților antineoplazici sunt trasate de rezistența la medicament a celulelor tumorale [156].

Pentru a preveni instalarea de la bun început a rezistenței la cis-platină a fost implementată o nouă tehnică, și anume a chimioterapiei intensive la doze mari, care reduce șansele de instalare a rezistenței, dar o dată cu administrarea de doze mari cresc și efectele citostatice care sunt un important factor pentru supraviețuire.

2.MODALITĂȚI DE INVESTIGARE A EFECTELOR CIS-PLATINEI IN VIVO

2.1.CONSIDERAȚII GENERALE

Numeroși compuși metalici sub formă de săruri ale unor acizi organici și anorganici, sau sub formă de complecși, sunt utilizați curent ca medicamente chimioterapice [2, 7, 157-160]. O importanță deosebită se acordă compușilor cu platină care sunt utilizați ca agenți chimioterapici.

Chimioterapia citostatică reprezintă una dintre modalitățile de intervenție în oncologie. În acest scop s-au utilizat diverse medicamente în compoziția cărora se află substanțe organice și în puține situații substanțe anorganice. Complecșii metalici inițiali au fost evitați, datorită potențialului toxicogen al acestora [161].

Problemele referitoare la acțiunea medicamentelor citostatice sunt studiate prin mijloace specifice chimiei clinice dar și prin studiul microscopic al probelor prelevate din țesuturi [162].

În mod consecvent au fost investigați și sintetizați diferiți compuși anorganici care conțin Pt, Pd, etc. cercetându-se structura chimică, activitatea biologică, stabilitatea, caracteristicile farmacologice (cinetica, dinamica) și efectele antitumorale [163-165].

În acest cadru numeroase studii au fost întreprinse (in vivo) asupra efectelor cis-platinei prin investigații experimentale pe animale de laborator. În astfel de situații s-au urmărit variațiile homeostaziei biochimice, hematologice precum și modificările histologice la nivelul diverselor țesuturi și organe.

Efectele asupra homeostaziei biochimice pot evidenția modificări ale metaboliților interesând predilect proteinele (proteinele sanguine, enzimele, acizii nucleici, etc), lipidele și electroliții sanguini și tisulari. Astfel de studii interesează biochimia, farmacologia, biologia moleculară, etc. [166-170].

De asemenea au fost întreprinse studii (in vitro) utilizându-se culturi de celule pentru decelarea unor efecte conexe interesând biologia celulară și moleculară, biochimia și farmacologia [108, 171- 173].

2.2. INVESTIGAȚII PE ANIMALE DE LABORATOR

2.2.1. SPECIFICUL METODOLOGIEI EXPERIMENTALE

Cercetările cu specific de biologie experimentală și medicină experimentală efectuate pe animale de laborator sunt folosite pentru investigații biochimice, biofizice, fiziologice, fiziopatologice, nutriționale, etc. Utilizarea acestor animale de laborator în cercetare a stat la baza dezvoltării științifice a multor domenii de vârf, deosebit de importante pentru explicarea multor aspecte din patologia biochimică, biologia celulară și moleculară, clinica medicală, farmacoterapie, ș.a [174-177].

Importanța pe care o prezintă utilizarea animalelor de laborator s-a confirmat în acțiunile de testare și cercetare a diferitelor substanțe destinate utilizării ca și chimioterapice, ingrediente nutriționali (e.g.: aditivi coloranți, conservanți, etc.) sau ca și substanțe pentru combaterea agenților patogeni în acțiunile fitosanitare și sanitar-veterinare. În acest scop s-a dezvoltat o adevărată industrie de creștere și ameliorare a animalelor destinate studiilor experimentale având ca scop final obținerea unor rase și linii tot mai performante.

Inițial în desfășurarea unor experimente s-au folosit animale de fermă (i.e.: cabaline, bovine, ovine, porcine și chiar păsări de curte). Treptat s-a renunțat și s-a încercat utilizarea în laboratoarele de cercetare a câinilor și pisicilor îndeosebi pentru experimente în fiziologie, farmacologie, neurologie, etc.

Extinderea experimentelor, însă, a determinat Asociațiile pentru protecția animalelor – care le consideră animale de agrement, însoțire și pază – să obțină legi pentru protejarea acestor specii.

Termenul de experiment în biologie are, de fapt, o extensie mai mare, vizând și studiile efectuate pe organisme eucariote, procariote și pe virusuri. Cercetătorul încearcă o corelare a ipotezelor științifice și a teoriilor, astfel încât să compare un număr tot mai mare de fapte reale și să se apropie cât mai mult posibil de adevăr.

Cu titlu informativ se menționează că în prezent, în farmacologie, se efectuează studii și asupra unor subiecți umani (voluntari).

2.2.2. PARTICULARITĂȚI ALE ETAPELOR DE CERCETARE

Experimentele întreprinse pe animale de laborator sunt caracterizate de aspecte specifice, diferite de la procedeu la procedeu și de la animal la animal [178-180].

În abordarea oricărei metodologii experimentale este necesară o bună cunoaștere a metodelor de conținere a animalelor, a modului de administrare și a relațiilor doză – efect, etc. Este important modul de prelevare a probelor din lichide biologice și țesuturi. De asemenea sunt importante și modalitățile de conservare a probelor biologice precum și pregătirea pentru determinările analitice [181-183].

Cercetările efectuate pe animale de laborator au ca scop final recoltarea unor probe biologice destinate determinărilor bioanalitice, precum și evaluarea unor parametri fiziologici. În acest scop uneori se întreprind intervenții chirurgicale cu sau fără recuperarea animalelor care au fost folosite în experimentul respectiv.

Pentru a face o succintă expunere a acestor aspecte se prezintă în continuare câteva caracteristici ale intervențiilor, cu exemplificare pe animale de experiență utilizate mai frecvent în laboratoare de cercetare.

2.2.2.1. Conținerea animalelor de laborator

În experimentele pe animale este necesar să existe o perioadă de acomodare a cercetătorului cu animalele pe care urmează a se efectua experimentul. Pentru o bună desfășurare a lucrării se recomandă utilizarea anumitor tehnici de abordare diferite de la o specie la alta și caracteristice fiecărei specii. În cadrul speciei se iau în considerare și aspectele legate de vârstă, sex, sistemul de creștere al animalului, etc. De asemenea se au în vedere operațiunile care urmează a fi efectuate, e.g.: observații, examinări, administrare de substanțe (medicamente, aditivi alimentari, ș.a.), tratamente superficiale sau complexe, operații etc.).

Contenția animalelor se realizează prin prinderea animalului urmată de imobilizarea acestuia, în scopul executării diverselor manevre operatorii specifice etapelor experimentului.

Modul de abordare și de contenție reprezintă operațiuni care trebuie efectuate cu blândețe și cu circumspecție. Acestea se execută după o prealabilă studiere a comportamentului animalului.

În scopul efectuării diferitelor intervenții experimentale pe animale, este necesar ca acestea să fie aduse în stare de contenție și / sau în stare de narcoză (anestezia generală). Prin administrarea unui anesteziec (imobilizare farmacologică) se realizează atât imobilizarea mecanică a animalului, cât și suprimarea durerii. Narcoza se induce cu ajutorul unor substanțe anestezice, administrate mai ales parenteral [184, 185].

2.2.2.2. Anestezia animalelor de laborator

În vederea prelevării de probe biologice se recomandă, în unele cazuri, anestezierea animalului. Acest procedeu mai poartă denumirea colocvială de „imobilizare farmacologică” deoarece se realizează prin administrarea de substanțe farmaceutice. Imobilizarea farmacologică prin anestezia generală sau parțială este metoda prin care se realizează suprimarea temporară a sensibilității dureroase cu ajutorul unor substanțe chimice sau al unor agenți fizici.

Alegerea anesteziecului se face în funcție de specia de animal asupra căreia se efectuează experimentul, de rasă, sex, vârstă, starea fiziologică, sensibilitatea speciei, calea de administrare. De asemenea se are în vedere scopul experimentului și operațiile experimentale pe care dorim să le efectuăm în timp ce animalul este anesteziat. Anesteziec trebuie să suprimă durerea produsă de actul operator, să producă o relaxare musculară completă, să prevină reflexele neurovegetative, starea de șoc și să asigure în final revenirea (trezirea) animalului.

De asemenea, în alegerea metodei de anestezie este necesar să se țină cont de faptul că animalele tinere sunt mai sensibile comparativ cu cele adulte, iar femelele gestante trebuie anesteziate cu substanțe care nu traversează bariera placentară, evitând astfel posibile riscuri teratogene.

Anestezicele generale intravenoase sunt substanțe care induc o anestezie superficială, permițând revenirea rapidă din anestezie. Din această clasă fac parte:

tiopentalul sodic (cu denumirea chimică de sodiu 5-etil-5-[2-metilpentil]-4,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-tiolat; metohexital (5-hex-3-in-2-il-1-metil-5-prop-2-enil-1,3-diazinane-2,4,6-triona); benzodiazepin-flumazenil (etil 8-fluoro-5,6-dihidro-5-metil-6-oxo-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine-3-carboxilat); ketamina, (2-(2-clorofenil)-2-metilamino-ciclohexan-1-ona; diazepam (7-cloro-1-metil-5-fenil-1,3-dihidro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona); opioide; fentanil (*N*-(1-(2-feniletil)-4-piperidinil)-*N*-fenil-propanamida, etc.

În cazul experimentelor noastre a fost folosit anestezicul ketamina, care face parte din grupa fenilciclidinelor. Aceasta produce anestezie disociată astfel încât o parte din percepția anumitor stimuli este anulată, iar cea a altor stimuli rămâne intactă. Este un anestezic și analgezic cu acțiune rapidă. Nu afectează reflexele faringo-laringiene, intensifică ușor ritmul cardiac, are efect depresor asupra respirației și menține tonusul muscular. Poate fi asociată cu toate neurolepticele și anesteziicele (inclusiv cele inhalatorii). După administrarea parenterală se produce o absorbție și distribuție rapidă urmată de instalarea efectului narcotic.

Anestezierea animalelor parcurge mai multe etape și anume: preanestezia, anestezia propriu-zisă (narcoza) și trezirea din anestezie. Preanestezia - se realizează cu substanțe farmacologic - active ce au rolul de a pregăti animalul pentru anestezie prin reducerea mișcărilor de apărare periculoase, a anxietății, a toxicității unor substanțe analgezice generale, prin inhibiția secrețiilor și prin diminuarea sensibilității algice. De asemenea, substanțele narcotice au rolul de a potența și reduce acțiunea și astfel se reduc dozele anesteziicelor generale, având efect: analgezic, neuroleptic, tranchilizant sau vagolitic diferit. Efectele sunt condiționate de specia de animale, de calea de administrare și de doza administrată. Pentru a evita unele probleme în ceea ce privește utilizarea succesivă a narcoticelor se recomandă utilizarea așa numitelor "amestecuri litice" (soluții preparate din mai multe substanțe anesteziice) care au drept scop final o inhibiție corticală suficientă, o bună stare analgezică și stabilizare neurovegetativă.

Modul de anestezie al animalelor de experiență ca și în cazul omului diferă prin calea de administrare a substanțelor anesteziice și prin modul de acțiune al anestezicului [186]. Astfel, narcoza se poate realiza prin administrarea parenterală, prin administrarea orală a unor soluții anesteziice, precum și prin inhalarea unor substanțe ușor volatile.

2.2.2.3. Calea de administrare a substanței cercetate

Cercetările științifice pe animale de laborator se desfășoară după un protocol bine stabilit diferit de la experiment la experiment, având în vedere mai multe criterii: scopul cercetării, specia de animale de laborator folosite, calea de administrare, durata experimentului, etc.

Foarte importantă pentru cercetarea experimentală este calea de administrare a substanțelor testate pe animalele de laborator. Dintre diversele căi de administrare a substanțelor amintim: administrarea orală - per os (p.o.), intravenoasă (i.v.), subcutanată (s.c.), intramusculară (i.m.), intraperitoneală (i.p.), intraarterială (i.a.), intracardiacă, intrapleurală, intrapulmonară, percutanată, intradermică (i.d.), intrarectală, intracaudală, intrarahidiană, intracerebrală, intranasală, pe cornee, intratesticulară. Există și alte căi mai puțin utilizate - în organele interne, la nivel de epiteliu lingual, etc. [187].

În general diversele căi de administrare ale substanțelor pe care dorim să le utilizăm sunt selectate și aplicate conform unui protocol experimental. Alegerea căii de administrare se va face ținând seama de mai multe criterii dependente de animalul de laborator pe care dorim să facem testarea, de tipul de substanță ce urmează a fi testată, de posibilitățile tehnice și de dotarea laboratorului de cercetare.

Aspectele ce concură la obținerea unor rezultate foarte bune și reprezentative sunt diverse și complexe, și de aceea este necesară stabilirea protocolului experimental [188]. Cercetătorul stabilește caracteristicile și obiectivele experimentului astfel încât rezultatele obținute să fie corecte și să permită interpretări statistice și biomedicale adecvate.

2.2.2.4. Prelevarea probelor biologice

Etapa de prelevare presupune recoltarea unor probe biologice în vederea determinărilor în laboratoare specializate (e.g.: sânge, lichide biologice, țesuturi (biopsii, necropsii), organe. Scopul prelevării de probe rezidă în investigarea acțiunii substanțelor luate în studiu pentru a obține date de interes fizico-chimic referitoare la concentrația, densitatea, pH-ul sau de interes biologic privind efectele asupra diversilor metaboliți.

Prelevarea probelor se poate face în cursul experiențelor sau în faza terminală a acestora. Pe animale de laborator se pot urmări diversele efecte sub aspect cinetic sau dinamic vizând diverse substanțe – nutrienți, farmaci, produse de uz toxic necesare în combaterea dăunătorilor. În cazul medicamentelor chimioterapice se poate urmări mecanismul de acțiune, precum și modificările homeostazice [189-190]. Probele pot fi reprezentate de fragmente de țesuturi și organe – prelevate de la animalul viu prin biopsie sau de la cadavru prin necropsie. De asemenea de la animale pot fi prelevate probe de sânge sau alte lichide biologice. Aceste probe sunt ulterior supuse diferitelor examene: biochimice, microscopice, histologice, embriologice, toxicologice, hematologice, bacteriologice, virusologice, conform protocolului experimental. Astfel de examinări pot furniza diverse date asupra homeostaziei biochimice și asupra efectelor substanțelor testate.

Prelevarea probelor este o etapă foarte importantă, iar modul în care s-a făcut aceasta influențează direct rezultatele determinărilor analitice care se efectuează ulterior.

2.2.2.5. Conservarea probelor biologice prelevate

După parcurgerea tuturor etapelor preliminare ale protocolului experimental, un rol aparte are modul de conservare a probelor.

Metoda de conservare depinde de tipul probei prelevate (lichide biologice, țesuturi, organe), dar și de analizele de laborator la care vor fi supuse. Astfel, pentru sângele prelevat de la animale de laborator se recomandă păstrarea probelor în eprubete sterile și în termostate la 37°C până la analizarea efectivă sau se procedează la centrifugarea acestora. Astfel de prevederi sunt necesare pentru separarea serului sanguin din sânge, deoarece majoritatea metaboliților biochimici se determină din ser sanguin. Alte lichide biologice (urina, limfa) se conservă conform procedurilor specifice care preced investigarea prin metode analitice.

Și în cazul țesuturilor și organelor prelevate de la diverse animale de laborator se respectă prevederile din protocolul experimental având în vedere specificul determinărilor analitice.

Pentru determinarea concentrației metalelor – știind faptul că probele vor fi calcinate – acestea se pot păstra la temperaturi scăzute de refrigerare (2 ÷ 4°C) dacă determinările se fac în maxim 24 ore de la recoltare; sau la temperaturi de congelare (-4 ÷ -20°C) în cazul în care perioada de timp de la recoltare până la determinare este mai mare de 24 ore.

Pentru determinarea altor metaboliți din probele de țesuturi și organe – și în special în cazul punerii în evidență a unor eventuale modificări histologice – se recomandă ca timpul scurs de la recoltare până la determinare să fie cât mai scurt posibil.

De asemenea, trebuie avut în vedere faptul că și procedeele de conservare pot influența pozitiv sau negativ (pot chiar compromite) rezultatele experimentelor. Este necesar să existe o corelare strânsă între metode de conservare și specificul investigațiilor fizico-chimice, biochimice, microbiologice, histochimice etc., care urmează a fi efectuate.

Aspectele legate de modul de prelevare și de conservare a probelor sunt importante stabilindu-se ab initio, dacă animalele vor fi în stare de conștiență sau anesteziate. De asemenea se stabilește dacă prelevarea de probe se face de la animale

în viață sau post-mortem. Buna desfășurare a tuturor etapelor din cadrul cercetării se va reflecta întocmai asupra calității rezultatelor experimentale obținute.

2.3. METODE DE INVESTIGARE PENTRU METABOLIȚI PROTEICI SANGUINI

Metodele utilizate în analitica biochimică au în vedere materialul biologic luat în studiu. Sângele conține metaboliți rezultați din fazele catabolică (de biodegradare) și anabolică (de biosinteză) precum și substanțe care acced în organism sub forma unor medicamente chimioterapice sau a unor xenobiotice prezente în mediul ambiant.

Sângele, mai frecvent plasma și serul sanguin constituie materialul biologic principal pentru efectuarea diferitelor analize biochimice.

Din punct de vedere fiziologic și biochimic sângele constituie o cale de transport atât pentru componentele biochimice necesare unor procese anabolice, dar și pentru produșii de biodegradare rezultați din procese catabolice.

2.3.1. METODE DE INVESTIGARE PENTRU PROTEINE SERICE

Dintre metodele specifice pentru investigarea proteinelor serice (serumproteinelor), în chimia clinică, în prezentul studiu s-a folosit metoda biuretului. În continuare pentru determinarea fracțiunilor electroforetice serice s-a utilizat electroforeza pe hârtie [86, 191, 192].

A. Determinarea proteinelor totale din serul sanguin.

Metoda biuretului utilizată pentru determinarea proteinemiei se bazează pe prezența în molecula proteinelor a grupărilor peptidice ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Această reacție este pozitivă pentru toate substanțele care au în structură cel puțin două legături peptidice. Protidele reacționează cu sărurile de cupru în mediu alcalin formând un complex de culoare violetă. Proteinele totale se determină fotocolorimetric prin citirea extincției la λ de 546 nm.

Concentrația proteinelor serice (C_p), se poate calcula conform relației:

$$C_p = A_p \times \frac{C_s}{A_s}$$

în care:

A_p -absorbția probei

C_s -concentrația standardului

A_s – absorbția standard

B. Determinarea fracțiunilor electroforetice din serul sanguin

Metoda electroforetică aparține grupului de metode fizico-chimice, iar utilizarea acesteia se pretează pentru cercetări în domeniul biochimiei analitice.

Separarea și identificarea fracțiunilor proteice albuminice și globulinice se realizează prin electroforeză. Această metodă permite confirmarea modificărilor homeostazice de interes clinic în condiții patologice necunoscute [192]. De asemenea se pot efectua cercetări experimentale privind efectul unor medicamente sau este posibilă monitorizarea efectelor terapeutice, evoluția unor stări morbide, etc.

Particulele proteice încărcate electric migrează sub influența unui câmp electric, cu o anumită mobilitate care depinde și de puterea ionică a soluției tampon. În urma separării proteinelor serice prin electroforeză se obțin fracțiunile: albuminică și globulinică. În cadrul acesteia din urmă se obțin subfracțiunile: α_1 - globuline, α_2 -globuline, β -globuline și γ -globuline.

2.3.2. METODE DE INVESTIGARE PENTRU DNA TISULAR

Determinarea acidului deoxiribonucleic (DNA) hepatic s-a realizat prin metoda Ogur-Rosen (1950) modificată de Spirin (1958) [193,184]. Această metodă a fost adaptată pentru înregistrarea spectrografică în UV. Acidul nucleic din materialul biologic este extras și hidrolizat în același timp, cu acid percloric. Produsul biologic luat în studiu după hidroliza prin care s-au eliberat acizii nucleici este supus centrifugării.

După centrifugare se determină extincția supernatantului la două lungimi de undă diferite pe domeniul UV: λ de 270 nm și λ de 290 nm. Diferența dintre valorile

extincției (E) citite pentru aceeași probă deci E_{270} și E_{290} și divizată cu 0,19, indică concentrația fosfatului nucleic exprimat în μg într-un ml [191].

Calculul concentrației fosfatului din acizii nucleici ($C_{(P-AN)}$) exprimată în $\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut umed se face pe baza concentrației fosfatului - specificul metodei - după relația:

$$C_{(P-AN)} = \frac{E_{270} - E_{290}}{0,19}$$

în care:

E_{270} - extincția hidrolizatului la $\lambda = 270 \text{ nm}$

E_{290} - extincția hidrolizatului la $\lambda = 290 \text{ nm}$

0,19 - indicele extincției specifice

În principiu de știe că extincția RNA și DNA în soluții pure, stabilită experimental, este diferită.

Concentrația acidului deoxiribonucleic (C_{DNA}) din produsul analizat se calculează folosind coeficientul mediu de transformare. Pentru determinarea DNA se folosește relația:

$$C_{DNA} = 10,3 \times C_{(P-AN)}$$

În cazul determinării DNA coeficientul mediu de transformare este de 10,3, iar în cazul RNA este 10,1. Diferența este explicată de conținutul procentual al fosfatului din acizii nucleici: în RNA reprezintă 9,5 %, iar în DNA reprezintă 9,9%.

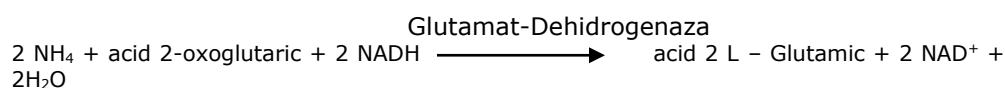
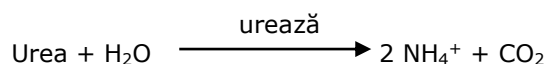
2.3.3. METODE DE INVESTIGARE PENTRU METABOLIȚI AZOTAȚI NEPROTEICI

2.3.3.1. Determinarea ureei serice

Eliminarea ionului de amoniu NH_4^+ are loc în urma catabolizării aminoacizilor în ciclul ureogenezei. Enzimele care catalizează această reacție sunt sintetizate în ficat, produsul final fiind ureea care este un metabolit netoxic, nepolar și cu o moleculă mică, care se elimină prin rinichi [86, 195].

70 Modalități de investigare a efectelor cis-platinei in vivo - 2

Determinarea analitică a ureei se bazează pe formarea amoniacului și a dioxidului de carbon care sunt sintetizate în urma hidrolizei ureei sub acțiunea ureazei. Amoniacul rezultat din descompunerea ureei reacționează cu acidul 2-oxoglutaric și cu NADH în prezența glutamat dehidrogenazei (GIDH), rezultând acid 2-L-glutamic și NAD⁺. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația ureei din probă. Determinările spectrofotometrice se fac la lungimea de undă (λ) de 340 nm măsurându-se absorbția. Reacțiile menționate se prezintă astfel:



Calculul concentrației ureei (C_U) se face conform relației:

$$C_U = C_S \times \frac{A_p}{\Delta A_s}$$

în care:

c_s = concentrația standard

A_p – absorbția pentru probă

A_s – absorbția pentru standard

Concentrația ureei se determină obișnuit pentru probe de ser sanguin și urină în cercetările experimentale și în investigațiile de chimie clinică când servesc la stabilirea unui diagnostic sau prognostic.

Evident valorile diferă cu specia, starea fiziologică, specificul experimentului (la animale), sau este condiționată de un anumit tratament instituit (la om). În cazul ureei, la șobolani linia Wistar valorile normale ale ureei serice sunt 6.3-9.1 mmol/L [196], respectiv 32-54 mg/dL. La om valorile de referință sunt: în ser: 22.6 mg/dL și în urină: 1000-1600 mg/kg_c/zi.

Valori diferite se pot decela în cazul diverselor experimente, evident și în cazul inducerii de injurii biochimice la nivel tisular prin administrare de substanțe.

Nivelele crescute de uree pot fi asociate cu afecțiuni renale, stare de deshidratare, colaps circulator, hemoragie gastro-intestinală și comă diabetică. Valori scăzute ale ureei pot apare în cazul unor afecțiuni severe ale ficatului.

2.3.3.2. Determinarea creatininei serice

Creatinina serică este un metabolit rezultat în urma deshidratării spontane a creatinei. În cantitate mare creatina se află în țesutul muscular, sub formă de creatin – fosfat, având rolul de a stoca energia pentru conversia la adenozin – trifosfat (ATP). Rata de formare a creatininei este relativ constantă, un procent de 1-2 % din creatina totală din organism transformându-se în creatinină după 24 de ore [197].

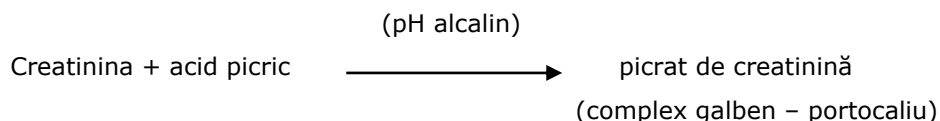
Creatinina și ureea serică prezintă valori ridicate la pacienții cu afecțiuni renale, în special în cazul unei filtrări glomerulare deficiente. În fazele incipiente ale afecțiunilor renale o creștere a nivelului seric de uree este urmată de o creștere a nivelului seric de creatinină. Acest avantaj este contrabalansat de faptul că nivelele serice ale ureei sunt afectate de numeroși factori, printre care dieta, un anumit grad de deshidratare, precum și perturbări ale metabolismului proteic. Pe de altă parte nivelul seric de creatinină tinde să fie constant și nu este afectat de aceiași factori amintiți mai sus. Creatinina serică este un parametru sanguin care se menține în limite relativ constante comparativ cu ureea [198, 199].

În cercetările experimentale vizând efectele metabolice ale unor nutrienți /xenobiotice /produse chimioterapice se fac determinări curente și asupra creatininei cunoscându-se complexitatea efectelor asupra homeostaziei biochimice.

Metoda Jaffé folosită pentru determinarea creatininei serice este cea mai veche metodă de identificare și dozare folosită și în prezent. În 1886 Jaffé a descris reacția creatininei cu acid picric, iar în 1904 Folin a demonstrat utilitatea acestei metode în determinarea creatininei serice și urinare [86].

Principiul metodei se bazează pe faptul că în mediu alcalin creatinina reacționează cu acidul picric formând un complex – picratul de creatinină care este

colorat în galben portocaliu (reacția Jaffé). Intensitatea culorii formate este direct proporțională cu concentrația creatininei și se evaluează spectrofotometric la lungimea de undă (λ) de 512 nm determinându-se absorbția (A). Reacția generală este:



Relația de calcul folosită pentru a determina concentrația creatininei (C_{cr}) este:

$$C_{cr} = C_s \times \frac{A_p}{A_s}$$

în care

c_s = concentrația standard

A_p - absorbția pentru probă

A_s - absorbția pentru standard

La șobolani linia Wistar valorile normale sunt cuprinse între: 46,2-69,3 μ mol/L [196], respectiv 0,8 mg/dL [200].

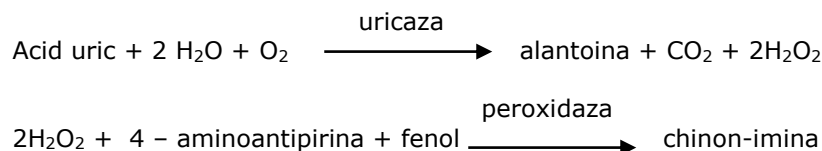
Cu titlu informativ se menționează că la om, valori mai mici ca 0,2 mg/dL (mai mici decât 18 μ mol/L) sau valori negative apar mai rar la vârste tinere și la vârste înaintate [197]. La om se cunosc următoarele valori normale: în ser 1,00 - 2,70 mg/dL și în urină 24-40 mg/kgc/zi. Modificările homeostazice ale acestor valori se obțin în cercetările experimentale care urmăresc evidențierea perturbărilor induse de medicamente chimioterapice și evident în condiții patologice.

Marele avantaj al metodei Jaffé în determinarea creatininei rezidă în simplitate și expeditivitate. Dezavantajul este reprezentat de interferențele care pot apare cu alte substanțe (e.g.: acid ascorbic, acetonă, acid acetilacetic, glucoză, acid uric, antibiotice). Aceste substanțe intervin în formarea unor complexe cromogene cu acidul picric.

2.3.3.3. Determinarea acidului uric în ser

Acidul uric este un produs al metabolismului purinic. Aproximativ jumătate din cantumul de acid uric este înlocuit zilnic prin excreția urinară și prin degradarea microbială din tractul intestinal. Acidul uric este oxidat de către uricază la alantoină și apă oxigenată. Aceasta sub influența peroxidazei oxidează dihidroxiaceton-fosfatul la chinon-imină. Acest compus colorat este determinat spectrofotometric la lungimea de undă λ de 520 nm prin măsurarea absorbției - A [201].

Sucesiunea de reacții care evidențiază determinarea enzimatică a acidului uric este prezentată în continuare:



Determinările de acid uric sunt necesare frecvent în cercetările experimentale, având în vedere influența exercitată asupra homeostaziei metaboliților purinici. De asemeni sunt necesare în investigațiile clinice sau în monitorizarea unor cazuri.

Concentrația acidului uric (C_{au}) se calculează în mg/dL sau (după aplicarea indicelui de conversie) cu valoarea de 59,485, în $\mu\text{mol/L}$. Relația pentru calcul este:

$$C_{au} = C_s \times \frac{A_p}{A_s} \text{ ng/dL} \times 59,485 = \mu\text{mol/L}$$

în care

C_s = concentrația standard

A_p – absorbția pentru probă

A_s – absorbția pentru standard

La animale de laborator, șobolani linia Wistar valorile normale sunt cuprinse între 0,60 – 3,00 mg/dL [200].

La om se întâlnesc următoarele valori normale: în ser: 0,50 – 3,40 mg/dL și în urină: 8,00 – 12,00 mg/kgc/zi.

Nivele crescute de acid uric sunt asociate cu retenție de azot, uree, creatinină și alți compuși non-proteici. Determinarea concentrației de acid uric este folosită în diagnosticul gutei și a insuficienței renale.

2.4. METODE DE INVESTIGARE A UNOR ELECTROLIȚI METALICI SANGUINI

Investigarea electroliților metalici din sânge este utilizată în cercetările instituite pe modele experimentale animale precum și în domeniul chimiei clinice pentru diagnosticul diverselor afecțiuni sau pentru monitorizarea cazurilor în care se urmărește efectul unor medicamente chimioterapice.

Astfel de investigații în cercetările de biologie/medicină experimentală interesează efectul diverselor substanțe – e.g.: nutrienți, ingrediente ale suplimentelor alimentare, aditivi, (alimentari și farmaceutici), chimioterapice, substanțe de interes strict toxicologic (spre a se cunoaște efectele cumulative ale diverselor xenobiotice chimice).

În domeniul chimiei clinice datele analitice servesc diagnosticului (și uneori prognosticului) în medicina umană și veterinară [202-204]. În cazul monitorizării efectelor unor medicamente, conjugate cu efectele altor factori ambientali se pot efectua corelații de interes medico-biologic. Adesea în acest scop datele de chimie clinică sunt asociate cu rezultatele diverselor explorări funcționale (e.g.: electrocardiografie, electromiografie, etc.).

Cercetările pe modele care includ animale de laborator pot avea caracter predictiv pentru conduita în nutriție, chimioterapie, dieta asociată acesteia, etc.

Conform WHO (World Health Organisation) în cercetările experimentale bazate pe specificul chimiei clinice se folosesc metode analitice chimice (gravimetria, volumetria) sau fizico-chimice (spectrofotometria UV-VIS, IR, spectroscopia de absorbție atomică, etc.) [205].

Investigarea electroliților sanguini luați în studiu în această lucrare, se poate

efectua prin ambele tipuri de metode (chimice și/sau fizico-chimice). În continuare se vor discuta doar metodele utilizate în cazul studiului prezentat.

2.4.1. DETERMINAREA SODIULUI ȘI POTASIULUI

Datorită rolului pe care-l îndeplinesc în organism, sodiul și potasiul sunt elemente de bază în menținerea homeostaziei organismului. Acestea îndeplinesc în organism o serie de funcții de extremă importanță, între care se menționează: asigură menținerea presiunii osmotice și a balanței hidro-electrolitice în țesuturi și în sânge; intervin în contracția musculară, acționează ca activatori sau inhibitori ai unor enzime; sunt implicate în metabolismul hidraților de carbon, lipidelor și proteinelor; au și rol morfogenetic intrând în structura unor țesuturi, etc.

Sodiul este principalul ion metalic prezent în sânge care intervine în menținerea presiunii osmotice și a echilibrului acido-bazic. Datorită sistemelor homeostazice foarte eficiente, doar în condiții extreme, patologice apar modificări ale electroliților. Scăderi semnificative ale electroliților apar în graviditate, obstrucție pilorică, nefrită severă, după administrarea de medicamente diuretice (saluretice), etc.

Potasiul crește mai ales în cazuri severe de boală Addison, comă uremică, obstrucție intestinală, și scade în diaree severă și vomisme. Deoarece conținutul în potasiu al hematiilor este de 20 de ori mai mare decât potasiul plasmatic, chiar și o hemoliză ușoară poate determina modificarea potasemiei [206].

Determinarea analitică în chimia clinică a sodiului și potasiului se face prin metoda flamfotometrică. În acest scop se procedează la diluarea serului cu apă deionizată (1/100).

Soluția stoc de sodiu se diluează la diferite concentrații prin adăugarea unei soluții de 4,5 mmol/L, iar soluția stoc de potasiu prin adăugarea unei soluții de 140 mmol/L.

Valorile specifice pentru emisia în flacără în cazul Na și K sunt prezentate în tabelul 2.1.

Tabel 2-1. Valori caracteristice pentru emisia în flacără acetilenică în cazul sodiului și potasiului

Element	Lungimea de undă (nm)	Limita de detectare (mol/L)
K	404,4	$2 \cdot 10^{-4}$
Na	589.0	$1 \cdot 10^{-5}$

La șobolani linia Wistar, valorile normale în serul sanguin sunt de 138,5 mmol/L pentru sodiu [196], sau de 152,20 mEq/L [207], și respectiv 2,76 –3,95 mmol/L pentru potasiu [196],, sau de 5,40-5,70 mEq/L ([207]. La om, valori normale în ser pentru sodiu sunt: 135-145 mmol/L, iar pentru potasiu: 3,6-5,0 mmol/L.

2.4.2. DETERMINAREA CALCIULUI

Există diverse metode de determinare a calciului din serul sanguin, bazate pe analize chimice și/sau fizico-chimice. În cazul experimentului nostru, pentru determinarea analitică s-a folosit metoda colorimetrică cu o-crezolfaleină. Această metodă se pretează pentru determinarea calciului din lichide biologice. Are loc formarea unui complex violet între calciu și o-crezolfaleină, în mediul alcalin. Lungimea de undă (λ) la care se face citirea este de 578 nm.

La șobolani linia Wistar valorile normale sunt 2,43-2,76 mEq/L [196], 5,10 mEq/L [207]. Valori normale pentru calciul din ser la om sunt: 9-10,3 mg/dL.

Hipercalcemia apare în hiperparatiroidism, neoplasme cu metastaze osoase, intoxicații cu vitamina A și D. Hipocalcemia poate apare în cazul unei malabsorbții intestinale, a unei pancreatite acute, în caz de alcaloză sau datorită unor perturbări ale metabolismului vitaminei D, ale magneziului și fosforului.

2.4.3. DETERMINAREA MAGNEZIULUI

Dintre metodele de determinare a magneziului din lichide biologice a fost folosită metoda cu albastru de xilidină. Această metodă presupune formarea unui

complex ce poate fi dozat spectrofotometric. Magneziul prezent în serul sanguin formează un complex roșu cu o soluție alcoolică de albastru de xilidină, care este de culoare albastră după adăugarea unei soluții tampon la pH de 9-10. Intensitatea culorii obținute este proporțională cu concentrația. Determinarea spectrotometrică se realizează la lungimea de undă (λ) de 520 nm.

La șobolanii linia Wistar valorile normale sunt de 2,66 mEq/L [207]. La om, valorile normale ale magneziului în ser variază între 1,5-2,2 mEq/L sau 0,75-1,10 mol/L.

Valori scăzute apar în pancreatită acută, sindrom de malabsorbție, alcoolism cronic, hiperparatiroidism, terapie cu diuretice. Valori crescute apar în uremie, precum și în insuficiență renală acută și cronică.

2.5. SPECTROSCOPIA DE ABSORBȚIE ATOMICĂ ÎN DETERMINĂRI DE METALE DIN ȚESUTURI

Metodele spectrochimice aparțin grupului de metode fizico-chimice. În cadrul metodelor spectrochimice, spectrometria atomică se evidențiază ca unul dintre mijloacele cele mai redutabile pentru determinările calitative și cantitative, de la macrobioelemente la microelemente și mai departe la analiza de urme. Obținerea de informații analitice în spectrometria atomică se bazează pe interacțiunea între radiația electromagnetică și materie [208-211].

Interacțiunea atomilor liberi cu diferite forme de energie se poate desfășura în trei moduri, corespunzătoare celor trei metode de spectrometrie atomică : emisia, absorbția și fluorescența.

Pentru realizarea oricărei din cele trei modalități de obținere a semnalului spectrometric proba trebuie adusă în stare de atomi liberi. În acest scop se procedează la introducerea probei, adusă în soluție, într-o plasmă sau în flacără, unde în urma evaporării și disocierii termice a moleculelor se produc atomi liberi [208].

În investigațiile analitice asupra metalelor din țesuturi prezentate în această lucrare s-a utilizat spectroscopia de emisie și de absorbție atomică.

2.5.1. SPECTROMETRIA DE EMISIE ATOMICĂ

În cadrul spectrometriei de emisie atomică se disting mai multe tipuri de procedee: spectrometria în arc electric, în flacără, spectrometria de emisie atomică în plasmă și spectrometria cu laser. Dintre aceste metode, pentru prezentul studiu a fost folosită spectrometria în flacără (flamfotometria).

Această tehnică este caracterizată de faptul că sursa de energie este o flacără, fapt pentru care această metodă se numește "flamfotometrie" sau "fotometrie de flacără". Pulverizarea soluției se realizează în flacără, are loc vaporizarea solventului, disocierea sării în atomi, care sub acțiunea flăcării emit radiația caracteristică [212].

Principiul și părțile constructive ale unui spectrofotometru de emisie în flacără sunt prezentate în figura 2-1.

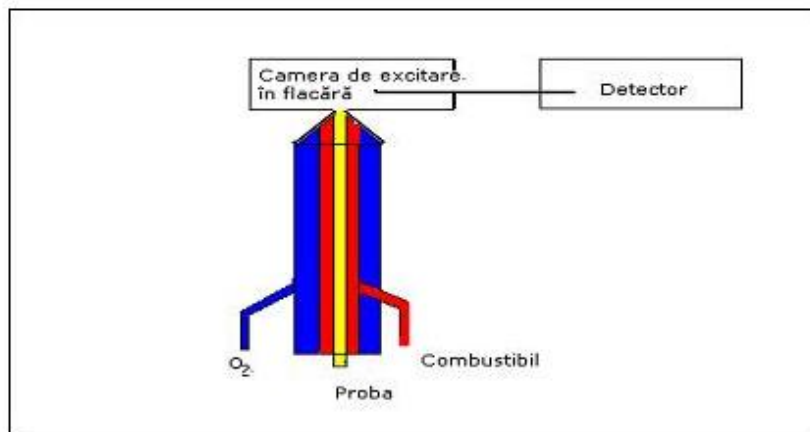


Fig. 2-1 Schema de principiu a unui flamfotometru de emisie în flacără [213]

O parte din atomii liberi formați pot absorbi energie din flacără trecând într-o stare de excitație, care are o viață foarte scurtă, astfel că atomii revin la starea fundamentală prin emisie de fotoni cu lungime de undă caracteristică fiecărui element. Fotonii emiși pot fi detectați cu un cuplu monocromator-detector.

În cazul metalelor alcaline se pot utiliza numai filtre de interferență.

Intensitatea emisiei este direct proporțională cu concentrația metalului prezent în soluție. Pentru determinări cantitative este necesară întocmirea unei curbe de calibrare.

2.5.2.SPECTROMETRIA DE ABSORBȚIE ATOMICĂ

2.5.2.1. Principii metodologice

Spectrometria de absorbție atomică se definește ca o metodă fizico-chimică de determinare a concentrației unui element dintr-o probă, prin măsurarea absorbției radiațiilor atomilor vaporizați. Măsurarea se face la lungimea de undă din domeniul vizibil sau ultraviolet, specifică elementului considerat [213].

Spre deosebire de flamfotometrie, spectrofotometria de absorbție atomică prezintă o sensibilitate mult mai mare. Atomii volatilizați în flacără sunt excitați de sursa unei radiații care are o frecvență egală cu frecvența liniei de rezonanță a atomilor respectivi. Această frecvență este absorbită de atomi, iar intensitatea radiației care străbate flacăra este diminuată.

Intensitatea radiației absorbite este proporțională cu numărul atomilor prezenți în flacără (concentrația) și cu grosimea stratului absorbant (lățimea flăcării). Absorbția poate fi calculată cu formula:

$$A = K \cdot l \cdot c$$

în care:

A - absorbanța

K - constanta care include coeficientul specific de absorbție

l - lățimea stratului absorbant

c - concentrația atomilor în flacără (proporțională cu concentrația soluției de analizat)

Prin această metodă devine posibilă determinarea concentrației unui element dintr-o probă măsurându-se absorbția radiației electromagnetice de o anumită lungime de undă, caracteristică elementului analizat, la trecerea printr-un mediu omogen în care atomii liberi ai probei sunt uniform distribuiți, sub formă de vapori rezultați în urma pulverizării soluției în flacără.

2.5.2.2. Aparatura necesară – generalități

Determinările analitice în investigațiile prin metoda spectrofotometriei de absorbție atomică (SAA), necesită o aparatură specială care include în principiu: a) sursa de radiație; b) sistemul de atomizare; c) monocromatorul; d) detectorul; e) un sistem de evaluare a datelor [210].

Schema bloc a spectrometrului de absorbție atomică și principiul de funcționare sunt prezentate în figura 2-2.

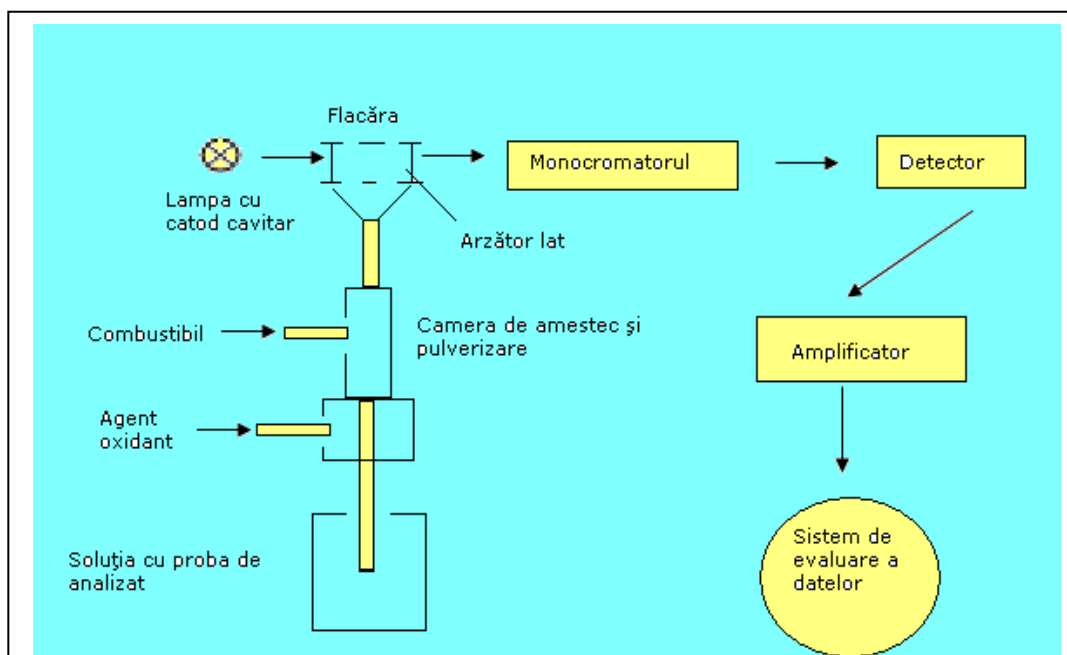


Fig. 2-2 Schema bloc și principiul de funcționare a unui spectrometru de absorbție atomică

În continuare se prezintă date generale referitoare la părțile constitutive ale aparaturii pentru SAA și sumare descrieri asupra funcționalității acestora.

2.5.2.2.1. Sursa de radiație

În domeniul SAA se utilizează diverse surse de radiații. Principalele surse

utilizate în absorbția atomică sunt: lămpile cu catod cavitărilor, lămpile cu descărcare în gaze și lămpile cu descărcare fără electrozi. Alte surse mai rar utilizate sunt : laserul, flacăra, plasmă analitică.

Cerința principală pentru o sursă, în spectrometria de absorbție atomică este aceea de a prelua radiația de rezonanță specifică a elementului studiat cu o semilărgime a liniei inferioară lungimii de undă pentru absorbție.

2.5.2.2.2. Sisteme de atomizare

Obținerea populației de atomi liberi este una din cele mai importante caracteristici ale spectrofotometriei de absorbție atomică (SAA). În SAA se pot folosi, în principiu două sisteme: a) atomizarea în flacăra; b) atomizarea fără flacăra (în cuptor electric).

a) Atomizarea în flacăra. Reprezintă un procedeu mai economic. Flacăra poate fi ușor interfațată cu un sistem adecvat de introducere a probelor solide, lichide și gazoase. În absorbția atomică proba este introdusă în flacăra sub formă de aerosoli, generați cu ajutorul unui nebulizator. În flacăra aceasta suferă succesiv procese de atomizare, excitare și ionizare.

Din punct de vedere chimic flacăra este rezultatul unor procese de ardere între un combustibil și un agent oxidant. Reacțiile dintre aceștia sunt puternic exoterme, rezultatul fiind obținerea unui mediu cu o temperatură suficient de mare pentru realizarea atomizării.

Principalele flăcări utilizate în absorbția atomică sunt: propan-aer, aer-acetilenă și acetilenă-protoxid de azot.

Temperatura flăcării este adesea cea mai importantă caracteristică a unei flăcări atunci când se ia în considerare utilizarea acesteia în absorbția atomică. Temperatura este parametrul care guvernează distribuția energiei după diferite grade de libertate, distribuția produșilor de disociere sau ionizare și distribuția spectrală a radiației.

b) Atomizarea în cuptor electric. Pentru evitarea deficiențelor atomizării în flacăra, s-a introdus sistemul de atomizare electrotermică, în cuptor cu grafit. S-a realizat astfel un salt calitativ pentru aducerea probei în stare de atomi.

Proba se introduce în cuptor prin orificiul central al unui tub de grafit. Prin controlarea curentului aplicat, se poate stabili temperatura la care trebuie încălzit tubul, putându-se ajunge până la maximum 3000°C. Prin carcasa instalației se circulă apă pentru a nu fi transmisă căldura în exterior și pentru a asigura răcirea rapidă după efectuarea fiecărei determinări. Pentru a se evita oxidarea cu aer a grafitului în timpul încălzirii, cilindrul se află plasat într-o atmosferă controlată de gaz inert, prin două circuite: interior și exterior.

Durata atomizării este de 4-8 secunde. Datorită încălzirii bruște în etapa atomizării, semnalul înregistrat are forma unui maxim de absorbție îngust și a cărui înălțime este proporțională cu cantitatea din elementul de determinat.

Folosirea acestui sistem de atomizare permite luarea în lucru de cantități mici de probă, de ordinul zecimilor sau chiar sutimilor de mililitru. De asemenea, limita de detecție este de 2-3 ordine de mărime mai mică prin folosirea sistemului de atomizare electrotermică, decât în cazul atomizării în flacără.

Un avantaj important al atomizării fără flacără constituie faptul că nu este necesară o tratare prealabilă a probelor, mai ales a celor de natură organică, din această categorie făcând parte și unii compuși biologic-activi. În cazul unor astfel de probe, matricea de natură organică este descompusă în etapa de calcinare.

2.5.2.2.3. Monocromatorul

Monocromatoarele sunt sisteme de limitare a lungimii de undă, cu ajutorul acestora se poate izola o bandă spectrală îngustă, ce poate fi selectată dintr-un domeniu spectral mai larg. Un monocromator include o fantă de intrare și un colimator care focalizează imaginea fantei pe un dispozitiv de dispersie.

Dispozitivul de dispersie poate fi o prismă sau o rețea de difracție. Radiația incidentă este dispersată după trecerea prin prismă sau după reflectarea ei de către rețea. În continuare, sistemul de focalizare preia radiația dispersată, reproduce imaginea fantei de intrare și o proiectează pe o fantă de ieșire. O astfel de imagine este reprodusă pentru fiecare lungime de undă cuprinsă în radiația incidentă.

2.5.2.2.4. Detectorul

Detectoarele folosite în spectrometria de absorbție atomică sunt de tip fotoelectric. Din punct de vedere al construcției spectrometrelor de absorbție atomică, se disting două configurații de bază: cu un singur fascicul și cu două fascicule.

Un spectrometru cu un singur fascicul prezintă avantajul unei luminozități ridicate, foarte importantă în cazul determinării unor elemente cum ar fi seleniu sau arsen și funcționează astfel: un fascicul de radiații de la sursă, după ce trece de sistemul de atomizare, pătrunde în monocromator unde este dispersat de prismă sau de rețea.

2.5.2.2. Sistemul de evaluare a datelor

În funcție de aparat, instrumentul de măsură al spectrometrelor de absorbție atomică permite citirea transmitanței (T) în procente, pe o scală liniară sau a absorbanței (A) pe o scală logaritmică [214].

Sistemul de evaluare permite compararea semnalului obținut după absorbția radiației de rezonanță provenită de la sursă, cu semnalul corespunzător intensității incidente a acestei radiații. Raportul celor două intensități, exprimat în procente, reprezintă transmitanța probei (T). Valoarea acesteia este dată de relația:

$$T = 100 \times \frac{I_t}{I_a}$$

în care:

I_t = intensitatea radiației transmise;

I_a = intensitatea radiației incidente.

La aparatele moderne, transmitanța (T) este convertită electronic direct în extincție (E), ale cărei valori apar pe o scală liniară sau sunt afișate în sistem digital.

Absorbanța (A) este direct proporțională cu concentrația soluției pulverizate în flacăra. Semnalul nu depinde deci de volumul total al acestei soluții. Pentru exprimarea absorbției se folosește relația:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

În etapa următoare, printr-un program matematic inclus în memoria computerului, are loc extrapolarea automată pe curba de etalonare, a absorbției (A) corespunzătoare pentru substanța aflată în proba de analizat. În final este afișat direct electronic rezultatul reprezentând concentrația probei.

2.5.2.3. Stabilirea selectivă a unei tehnici de analiză

La elaborarea unei metode de analiză prin spectrometria de absorbție atomică, trebuie să se țină seama de o serie de factori care pot influența determinarea. Între aceștia se menționează:

1) Comportarea specifică a elementelor în spectrometria de absorbție atomică.

Proprietățile fizice și chimice ale elementului de analizat, ca de exemplu: volatilitatea, solubilitatea în diverse medii, potențialul de ionizare, valența, gradul de oxidare, pot influența rezultatul determinării. În funcție de proprietățile menționate, trebuie stabiliți corect o serie de parametri ca: natura flăcării sau compoziția mediului de dizolvare.

2) Interferențele ce pot apărea în spectrometria de absorbție atomică.

Interferențele reprezintă totalitatea fenomenelor fizice și chimice care acționează asupra elementului de determinat și care au drept rezultat modificarea semnalului analitic. Aceste se pot clasifica, în funcție de mecanismul care le generează, în: a) interferențe spectrale; b) interferențe fizice; c) interferențe chimice.

Există o serie de procedee pentru micșorarea și eliminarea interferențelor de formarea compușilor stabili în fază condensată. Printre acestea se menționează:

a) îndepărtarea anionilor care interferă prin tehnici chimice, în special prin schimb ionic;

β) adăugarea unui exces de anioni care interferă atât în probă cât și în soluțiile standard;

γ) folosirea unei flăcări mai fierbinți - este necesară pentru metalele alcalino-terose în care caz se utilizează o flăcără de protoxid acetilenă. În timp ce temperatura flăcării este suficient de mare pentru a elimina interferențele ionice, folosirea unei

flăcări mai fierbinți induce un alt efect cunoscut sub denumirea de interferență de ionizare.

δ) adăugarea unui "curent de eliminare" este tehnica cea mai des utilizată; un agent de demascare este o sare a unui metal care formează un compus stabil cu anionul care interferează. Astfel clorurile de lantan sau alte pământuri rare sunt foarte utile, iar clorura de stronțiu poate funcționa ca agent de demascare pentru calciu și magneziu, în prezența anionilor cu care interferează. În funcție de natura lor reactivii utilizați pentru eliminarea interferențelor chimice pot acționa în două moduri. O categorie de reactivi formează un compus mai puțin stabil termic cu analitul decât cu elementul interferent. Alți reactivi formează complecși metalici cu analitul sau interferentul și împiedică reacția dintre analit și interferent.

Interferențele în faza solidă cresc la folosirea flăcărilor cu temperaturi scăzute. Astfel în flăcări aer-propan sau aer-hidrogen în care disocierea termică este incompletă, analitul poate reacționa în flăcără cu oxigenul, radicalul hidroxil sau chiar cu hidrogen, pentru a forma noi compuși.

Formarea lor este diminuată la folosirea unor flăcări mai bogate în combustibil. Gradul de interferențe este variabil la înălțimi diferite ale flăcării, astfel că nivelul semnalului de absorbție este dependent de zona de observare. Deoarece sensibilitatea este direct proporțională cu constanta de descriere a compusului ce conține analitul, compoziția flăcării trebuie să rămână constantă pe tot parcursul determinărilor.

2.6. ASPECTE GENERALE PRIVIND EVALUAREA STATISTICĂ A DATELOR

Cercetarea biologică se bazează pe rezultate obținute pe un număr limitat de observații din multiplele posibile, este deci o „cercetare pe eșantion”. Este cunoscut faptul că aceeași substanță activă, experimentată prin aceeași metodă, poate da rezultate diferite, nu numai în laboratoare diferite, chiar și în același laborator. De aceea cunoașterea de către cercetător a factorilor care determină această variabilitate, precum și a tipurilor de erori ce pot să apară este o necesitate. În acest cadru general se fac mențiuni privind eroarea absolută, eroarea relativă.

Eroarea absolută (E_a) reprezintă diferența numerică dintre valoarea decelată de către experimentator și valoarea reală a unei mărimi:

$$E_a = |M - A|$$

în care:

M – valoarea măsurată

A – valoare adevărată

Factorii de eroare care pot fi înlăturați alcătuiesc așa numitele erori sistematice și ele afectează exactitatea rezultatului. Acestea au un caracter constant, adică distorsionează rezultatele determinărilor într-un singur sens, cu o valoare constantă față de conținutul adevărat. Erorile sistematice pot avea origini diverse, fiind rezultatul uneia sau mai multor cauze care acționează concomitent. Astfel de erori apar în urma folosirii incorecte a instrumentelor de măsură incluse în sistem, a unei calibrări incorecte, a folosirii unor reactivi de puritate necorespunzătoare, etc.

Factorii care țin de reactivitatea individuală, de exemplu, nu pot fi înlăturați, ei determinând ceea ce numim erori aleatoare (întâmplătoare), care afectează atât exactitatea cât și precizia rezultatelor experimentale.

Eroarea relativă (E_r) - reprezintă apropierea valorii numerice determinate experimental de valoarea adevărată:

$$E_r = \frac{M - A}{M} \cdot 100$$

Raportul de mai sus reprezintă eroarea relativă, exprimată uzual în procente. Cu cât rezultatul obținut se apropie mai mult de rezultatul real, cu atât determinarea este mai exactă.

Precizia unei determinări este dată de concordanța valorilor obținute în urma determinărilor efectuate. Se spune despre o metodă că este precisă când rezultatele determinărilor sunt reproductibile, adică sunt mai apropiate ca valoare în experimente repetate [215, 216].

Prelucrarea statistică a datelor se face la finea determinărilor analitice, și are drept scop estimarea riguroasă a rezultatelor analitice. Pentru aceasta se calculează

prioritar media (\bar{X}) și deviația standard (ΔS).

Media (\bar{X}) - este valoarea numerică obținută prin împărțirea sumei unei serii de măsurători identice la numărul rezultatelor individuale din serie:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

în care:

x_i = măsurătorile individuale

n = numărul total de măsurători

Cu cât numărul determinărilor crește, cu atât media acestor numere se apropie tot mai mult de rezultatul adevărat, totuși există o limită practică, care este dată fie de metoda de măsurare, fie de cantitatea de probă luată pentru efectuarea analizei. Alegerea măsurătorilor (care trebuie reținute și care eliminate) depinde de gradul de precizie cerut pentru analizele respective.

Deviația standard numită și abaterea standard notată ΔS se folosește în cazul mai multor măsurători luate pe o singură probă, iar rezultatele se vor apropia de o curbă de distribuție normală, în care frecvența de răspândire a măsurătorilor este dată de valoarea măsurătorii.

Valoarea abaterii standard DS , poate fi obținută cu ajutorul relației:

$$DS = \frac{(x_i - \bar{x})}{n}$$

în care:

$x_i - \bar{x}$ - abaterea valorilor individuale

n - numărul de probe

Testul numit *abaterea medie* se folosește atunci când măsurătorile sunt mai mult de trei, iar dacă o măsurătoare deviază de la medie mai mult decât $4\bar{d}$ aceasta va fi exclusă [216].

Abaterea medie (\bar{d}) este calculată cu relația:

$$\bar{d} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})}{n}$$

în care:

$x_i - \bar{x}$ este valoarea absolută a abaterii valorii individuale x_i față de media aritmetică

Distribuția t se aplică în cazul în care nu este posibilă efectuarea unui număr mare de măsurători, iar rezultatul provine din media calculată care poate fi diferită de media distribuției. Distribuția t prevede limitele în care o medie va corespunde cu media distribuției.

Formula de calcul a diferențelor semnificative în cazul testului t se calculează cu formula:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_d} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

în care:

$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ - media rezultatelor eșantionului 1 și 2

n_1, n_2 - numărul de animale din eșantionul 1, respectiv 2,

S_d = eroarea standard a diferenței, care se calculează conform formulei:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum d_1^2 + \sum d_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

în care:

$$\sum d_1^2 + \sum d_2^2 = \sum \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \text{ în eșantioanele 1 și 2}$$

x_i + valorile individuale în eșantioanele 1 și 2.

În cadrul cercetărilor experimentale efectuate, evaluarea statistică s-a făcut cu ajutorul programului Microsoft Excel. S-a calculat și probabilitatea (p), urmărindu-se semnificația datelor analitice.

3. INVESTIGAREA ACȚIUNII CIS-PLATINEI PE MODELE EXPERIMENTALE ANIMALE

3.1. CONSTITUIREA MODELULUI EXPERIMENTAL

Investigațiile asupra animalelor de laborator concepute pe „modele experimentale” sunt utilizate curent în domeniul biologiei și medicinei cu aplicații în fiziologie, biochimie, farmacologie, nutriție, toxicologie, biologie moleculară, etc. [99, 120, 189, 217-219].

Importanța pe care o prezintă utilizarea animalelor de laborator pentru cercetarea acțiunii diverselor substanțe chimice a condus la dezvoltarea unei adevărate „industrii” de creștere și ameliorare. Scopul final a fost extinderea creșterii animalelor din diverse specii care se pretează pentru cercetările experimentale. De asemenea s-a urmărit obținerea unor rase selectate, iar în cadrul raselor a unor linii mai rezistente la condițiile de mediu, deci mai performante pentru scopuri experimentale [220].

Experimentele pe animale au avut o contribuție remarcabilă în descoperirea efectelor biochimice și patobiochimice a efectelor fiziologice și fiziopatologice, precum și a efectelor terapeutice [221-226]. Experimentele pe animale sunt necesare pentru cercetarea farmacologică a medicamentelor chimioterapice, pentru cercetarea nutrițională a nutrienților și xenobioticelor de interes alimentar (e.g.: aditivi de sinteză), precum și pentru cercetarea diverselor substanțe utilizate pentru combaterea dăunătorilor în fitopatologie [227]. În cercetările farmacologice în prezent se întreprind investigații pe voluntari sănătoși, chiar dacă nu există un beneficiu imediat [228].

Comunitatea Europeană a adoptat propriile legi privind cercetarea pe animale încă din anii '60 (Declarația de la Helsinki, adoptată la a 18-a Adunare Generală a Asociației Medicale Mondiale, Helsinki, Finlanda, iunie 1964, cu amendamente elaborate succesiv în 1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2002, 2004;

Convenția Europeană de la Strasbourg din 1986, privind drepturile animalelor vertebrate utilizate în scop experimental sau pentru alte scopuri științifice, care a intrat în vigoare în ianuarie 1991, adoptată și de țara noastră).

În cercetările experimentale trebuie aplicate metode de anestezie generală, de analgezie sau orice alte metode concepute în scopul diminuării pe cât posibil a durerii și stresului suferite de animale. Excepție fac cazurile în care metodele de reducere a durerii interferă cu rezultatele cercetării și când stimulul dureros aplicat la animal nu produce modificări ale stării fiziologice a acestuia.

Datele rezultate din investigațiile experimentale permit emiterea de noi ipoteze cu privire la fenomenele care se petrec, bazându-se pe un criteriu care controlează gândirea și oferă cunoaștere.

În accepția gnoseologică orice raționament bazat pe experiment este caracterizat printr-un punct de plecare - o ipoteză, o supoziție și o concluzie a raționamentului. Astfel se poate ajunge la descoperirea unei teorii care explică un fenomen.

3.2. PREGĂTIREA ANIMALELOR DE LABORATOR

În investigarea mecanismelor de acțiune ale diverselor substanțe utilizate ca medicamente chimioterapice, ca aditivi alimentari, sau în combaterea bolilor și dăunătorilor la plantele de cultură și paraziților la animale domestice se folosesc modele experimentale animale.

În astfel de situații se efectuează cercetări experimentale cu durată limitată, dar și unele experimente cu durată mai mare, care vizează efecte genetice (mutagene) și efecte teratogene.

În vederea cercetării efectelor induse de cis-platină la animalele de laborator, s-au constituit modele experimentale în care au folosit șobolani din linia Wistar, pornind de la premiza că există anumite caracteristici morfologice și fiziologice asemănătoare speciei umane. Rezultatele experimentelor întreprinse pe animale de laborator se pretează a fi extrapolate la om [229]. Studiul acțiunii cis-platinei asupra animalelor de laborator se referă la efectele consecutive administrării pe cale intraperitoneală a acesteia.

Alegerea animalelor de experiență a avut în vedere tema propusă pentru studiu, precum și complexitatea experimentului. Pentru aceasta s-au luat în

considerare câteva aspecte, și anume: specia animalului, rasa, linia, greutatea corporală, sexul, vârsta, starea fiziologică. De asemenea se au în vedere date referitoare la substanțele testate: proprietățile fizico-chimice (e.g.: starea de agregare), calea de administrare a substanțelor, etc.

Sub aspect evolutiv inițial în desfășurarea unor experimente, îndeosebi în medicina veterinară și zoocultură s-au folosit animale de producție – care se cresc obișnuit în ferme (i.e.: cabaline, bovine, ovine, porcine și chiar păsări). Aceste experimente au prezentat multe inconveniente, motive pentru care s-a renunțat preferându-se utilizarea în laboratoarele de cercetare cu profil de fiziologie comparată, nutriție, farmacologie, etc., a câinilor și pisicilor. Ideea însă a determinat constituirea de Asociații pentru protecția animalelor – care consideră aceste specii ca fiind animale excelente de agrement, de companie și de pază și s-a urmărit obținerea de legi pentru a le proteja.

În aceste condiții în laboratoarele de cercetare s-a procedat la utilizarea în experimente a rozătoarelor (șoareci, șobolani etc.) ca animale de laborator. Animalele mai frecvent utilizate în scopul cercetării experimentale sunt: șoarecele, șobolanul, cobaiul, hamsterul, iepurele, broasca, și gerbilul [207]. Creșterea animalelor pentru experiențe se practică în microintreprinderi special destinate acestui scop numite „biobaze”.

Creșterea în biobază trebuie să asigure un cadru optim de microclimat (temperatură, umiditate, lumină, zgomot), astfel încât animalele să fie în perfectă stare de sănătate în momentul începerii experimentelor și să facă parte din specii, rase și linii distincte cu anumite performanțe biologice. Condițiile de microclimat pot influența foarte mult rezultatele experimentale și pot conduce la date eronate.

Alimentația animalelor destinate cercetărilor experimentale reprezintă un alt aspect esențial care se stabilește diferit în baza normelor și standardelor în vigoare. Astfel, alimentația prezintă caracteristici specifice fiecărei specii, vârste și fiecărei categorii de animale. Rația alimentară a animalelor va asigura necesarul de principii nutritive: glucide, lipide, protide, săruri minerale, vitamine și fibre alimentare care de asemenea este caracteristică fiecărei specii de animale.

Ameliorarea animalelor de experiență a avut în vedere scopul folosirii ulterioare a acestora pentru diverse experimente. Trebuie luată în considerare și reproducerea animalelor. Ameliorarea raselor de animale urmărește obținerea unor linii de animale cu caracteristici diferite. Tehnicile folosite sunt diverse, dar

cele mai folosite sunt metoda încrucișării interrasiale și metoda încrucișării intrarasiale [220, 230].

Prin creșterea animalelor în biobaze se încearcă evitarea modificărilor induse de arealul habitual al acestora, situație care poate avea efecte indezirabile asupra comportamentului. Astfel există exemplare care se încadrează în standardele morfofiziologice ale speciei, și în „parametrii” fiziologici normali biochimici și hematologici. Aceasta se confirmă prin datele generale care definesc „homeostazia biochimică” și „homeostazia termică”, precum și „homeostazia morfofiziologică” [231].

Animalele au un comportament înnăscut sau dobândit, care diferă în funcție de specie și de vârstă. Un aspect deosebit de important este așa-numitul comportament colectiv, de grup, sau de colonie - care poate fi întâlnit la aglomerări de animale. De asemenea se distinge un comportament individual - care este caracteristic la exemplarele izolate [232] .

Urmărirea acestor aspecte referitoare la animalele de laborator are drept obiectiv final obținerea de rezultate experimentale reproductibile, obiective, care să respecte normele activității de cercetare în acest domeniu.

3.3. SPECIFICUL METODOLOGIEI EXPERIMENTALE

Experimentele efectuate pe animale de laborator sunt caracterizate de câteva aspecte specifice, diferite de la procedeu la procedeu și de la animal la animal [178, 233]. În abordarea oricărei metodologii experimentale este necesară o bună cunoaștere a tehnicilor de conținere a animalelor, a relației doză - efect, a modului de prelevare a probelor, dar și a tehnicilor de conservare a probelor biologice prelevate.

Conținerea animalelor este necesară pentru protecția experimentatorului, dar și pentru facilitarea efectuării examinărilor, prelevarea probelor și prevenirea transmiterii unor boli. Alegerea mijloacelor și metodelor de conținere se face în funcție de specie, vârstă, talie, temperament și scopul urmărit. Conținerea se poate realiza prin imobilizare propriu-zisă, preferabil prin utilizare de anestezice, sau prin provocarea unei dureri într-o zonă sensibilă asupra căreia animalul își va concentra atenția.

În cazul șobolanilor contenționarea urmărește imobilizarea acestora prin prinderea cozii și a pielii din regiunea cefei. În continuare animalul este pregătit pentru narcoză (fig. 3-1).



Fig. 3-1 Faza de preanestezie a animalelor

În ceea ce privește prelevarea probelor sanguine, aceasta trebuie efectuată în condiții propice determinărilor analitice, evitând hemoliza sângelui.

În astfel de cercetări se are în vedere faptul că modul de conservare poate influența (sau chiar compromite) rezultatele experimentelor. Este necesar să existe o corelare foarte strânsă între parametrii biochimici, hematologici, microbiologici etc. care urmează a fi determinați după prelevarea și conservarea probelor biologice.

Aceste aspecte legate de modul de conservare a probelor sunt tot atât de importante și pentru probele prelevate de la animale în stare de conștiență sau anesteziate, (i.e. cazul biopsiilor) cât și în cazul prelevării de probe de la animale care au fost în prealabil suprimate (e.g. cazul necropsiilor). În această lucrare se va utiliza termenul de „animale suprimate” în scop experimental. Se atrage atenția că noțiunea de „animale sacrificate” are o semnificație bine definită și aflată în relație cu „ritualuri sacre”. Parcurgerea literaturii de specialitate, chiar la modul orientativ, este edificatoare în acest sens.

Tehnica de conservare trebuie adaptată tipului de probă prelevată (sânge, țesuturi, organe), dar și analizelor la care acestea vor fi supuse.

Probele de sânge vor fi păstrate în vacutainere cu sau fără anticoagulant, în funcție de scopul urmărit, (prevederile protocolului experimental), în termostate la 37°C până la efectuarea analizelor. După caz, se poate proceda la centrifugarea imediată a acestora, în vederea separării serului sanguin.

Organele și țesuturile se vor conserva conform prevederilor protocolului experimental și metodelor analitice preconizate a fi folosite. În vederea determinării conținutului de metale din diferite organe, anterior calcinării probelor, acestea vor fi păstrate la temperaturi cuprinse între 2 - 4°C, dacă determinările se efectuează în maxim 24 de ore de la recoltare. Dacă perioada de timp dintre momentul recoltării și momentul determinării conținutului de metale este mai mare, probele se păstrează la congelator (între -4 și - 20°C). Se evită menținerea în ambalaje cu conținut de metale sau în soluții (e.g.: ser fiziologic).

Condițiile de conservare pot influența rezultatele investigațiilor analitice experimentale. Buna desfășurare a tuturor etapelor din cadrul cercetării se va reflecta asupra calității rezultatelor experimentale obținute.

3.4. ADMINISTRAREA SOLUȚIEI DE CIS-PLATINĂ

În scopul realizării experimentelor propuse, privind efectele cis-platinei asupra homeostaziei biochimice s-au folosit animale de laborator - șobolani linia Wistar, (femele și masculi), de vârstă și greutate apropiată. În acest sens s-a urmărit alegerea de animale cu stare bună de sănătate, fără leziuni externe. Starea de sănătate și comportamentul acestora în grupa (eșantionul) luat în cercetare s-a urmărit o perioadă de timp considerată ca „perioadă de carantină”.

Pentru administrarea cis-platinei s-a procedat la injectarea intraperitoneală. Pentru cercetări s-au folosit două modele experimentale: a) primul a urmărit investigarea concentrației DNA hepatic și a proteinelor serice; b) secundul a vizat determinarea unor compuși care definesc homeostazia biochimică a metaboliților azotați neproteici și metalelor în sânge și țesuturi.

În cazul ambelor experimente, (descrise în continuare) după așezarea animalelor pe grupe în cuști, toate animalele au fost marcate pentru a putea fi monitorizate. Animalele au fost marcate prin crestarea urechilor la vârful, și la bază, în locuri diferite pentru fiecare animal. Crestarea s-a făcut conform unui cod numeric care a permis identificarea fiecărui animal.

3.4. Administrarea soluției de cis-platină 95

Se precizează că nu s-a utilizat marcarea cu substanțe chimice, și nici nu s-a procedat la tăierea unghiilor. În prima situație substanțele fie nu persistau pe blana sau pielea animalului, fie erau absorbite prin piele sau „preluate” pe cale bucală, existând de asemenea riscul unor distorsii ale rezultatelor analitice.

Animalele au fost lăsate în aceste grupe situate în cuști timp de patru zile, timp în care au fost alimentate și hidratate corespunzător (fig. 3-2). În același timp, ele au putut să se acomodeze la condițiile de microclimat, la temperatură, lumină, umiditate, aer, eventuale zgomote.



Fig. 3-2 Constituirea grupelor experimentale

După marcarea, animalele au fost cântărite, pentru a putea fi urmărite pe parcursul experimentului, observând eventualele modificări în greutate apărute în cursul experimentelor.

Înainte de administrarea soluției de cis-platină s-a procedat la o anestezie a fiecărui animal pentru a evita eventualele accidente ce pot apărea pe durata administrării intraperitoneale. Anestezicul folosit a fost ketamina sub denumirea comercială de Calypsol (flacon de 10 ml care conține 500 mg clorhidrat de ketamină). Soluția de anestezic a fost astfel administrată încât 0,8 ml (32 UI) din soluție să corespundă la 100 g greutate corporală (raportare la greutatea corporală conform prospectului). Efectul anestezicului se instalează la 10-15 minute de la administrarea acestuia și a durat aproximativ o oră.

Atât administrarea anestezicului cât și a soluției de cis-platină s-a făcut cu seringi de unică folosință. După instalarea narcozei s-a procedat la administrarea soluției de cis-platină pe cale intraperitoneală (i.p.). Această cale de administrare a fost aleasă deoarece permite o mai rapidă difuziune a substanței medicamentoase în organism [234].

Administrarea intraperitoneală a fost precedată de conținerea animalului și apoi de administrarea propriu-zisă a substanței de testat. Astfel animalul a fost poziționat cu capul în jos pentru ca viscerele abdominale să se deplaseze în direcția craniană și pentru a nu produce leziuni în timpul administrării. La o astfel de administrare injectarea se face în jumătatea caudală abdomenului (vezi fig. 3-3).

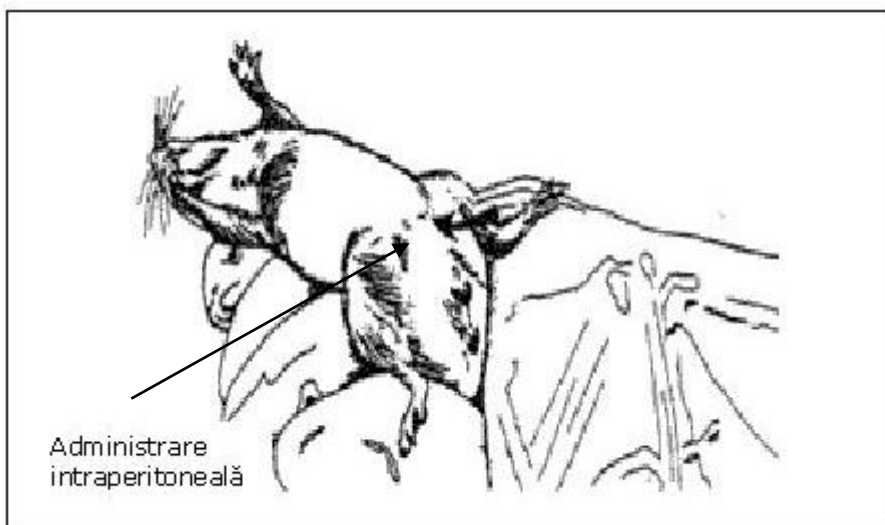


Fig. 3-3 Administrarea intraperitoneală la șobolani

După injectarea intraperitoneală, animalul este așezat din nou în cușca sa, fiind atent monitorizat cu privire la comportarea sa post-narcoză, precum și la eventualele manifestări care pot apărea ulterior.

Se reiterează faptul că în cadrul cercetărilor experimentale s-au efectuat două serii de experimente deci s-au utilizat două „modele experimentale” prin care s-au urmărit efectele induse de cis-platină la animale de laborator – șobolani linia Wistar. Astfel:

- a) prima dintre acestea urmărind aspectele legate de biosinteza proteinelor și biosinteza DNA hepatic la șobolan;

- b) secunda urmărind efectele asupra metaboliților azotați neproteici și a metalelor din sânge și din țesuturi.

3.4.1. PRIMUL EXPERIMENT

În primul experiment, așa cum s-a menționat, s-au urmărit modificările homeostaziei biochimice induse de cis-platină asupra proteinelor serice (serumproteinelor) și asupra acidului deoxiribonucleic (DNA) hepatic. În acest scop s-a constituit un model experimental destinat acestor studii.

Experimentele „in vivo” au fost realizate pe șobolani linia Wistar cu greutatea de 180 ± 20 g. Animalele au fost împărțite în patru grupe, un grup de control, notat C_a și trei grupe experimentale (E), notate cu E_I , E_{II} și E_{III} . Fiecare grup a fost constituit din 16 animale, (8 femele și 8 masculi).

Animalele din lotul de control (C_a) au fost injectate intraperitoneal (i.p.) cu ser fiziologic.

La grupele experimentale a fost administrată soluție de cis-platină (pulbere dizolvată în ser fiziologic) intraperitoneal (i.p.) după cum urmează: la animalele din grupul experimental E_I s-au administrat 5 mg/kgcorp, la grupul E_{II} cantitatea 10 mg/kgcorp, iar la animalele din grupul E_{III} cantitatea 15 mg/kgcorp.

După 48 de ore animalele au fost anesteziate trecându-se la deschiderea cavității abdominale. Probele de sânge au fost prelevate prin puncția venei cave caudale și ulterior prin puncția cardiacă (ventriculară). În final au fost prelevate excizate din țesutul hepatic.

Concentrația DNA hepatic a fost determinată folosind metoda Ogur-Rosen (1950) adaptată de Spirin (1958) [193, 194].

Din serul sanguin au fost determinate proteinele serice prin metoda biuretului și fracțiunile (albuminele și globulinele) prin electroforeza pe hârtie.

3.4.2. SECUNDUL EXPERIMENT

În al doilea experiment s-au studiat efectele cis-platinei asupra homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și biometale.

Animalele au fost repartizate în cinci grupe, reprezentând grupa de control (C) notată prin C_b , și patru grupe experimentale (E) notate prin E_1 , E_2 , E_3 , E_4 .

Fiecare grup a fost constituit din 10 animale – șobolani linia Wistar, de ambele sexe, având o greutate corporală medie de 200 ± 20 grame.

Dozele de cis-platină folosindu-se produsul medicamentos numit Sinplatin au fost administrate intraperitoneal după cum urmează: la grupa experimentală (E_1) soluție cis-platină în concentrație de 2 mg/Kg corp; la animalele din grupa (E_2) 4 mg/Kg corp; la animalele din grupa (E_3) 6 mg mg/Kg corp; la animalele din grupa (E_4) 8 mg/Kg corp. La animalele din grupa de control (C_b), a fost administrată soluție de ser fiziologic (soluție NaCl 0,9%).

În cadrul secundului experiment, în ziua 5-a de experiment s-a procedat la prima administrare intraperitoneală de cis-platină. A doua administrare s-a realizat în ziua a 10-a a experimentului. Sacrificarea animalelor a avut loc în ziua 15-a de experiment.

Soluțiile utilizate au fost: ser fiziologic (soluție NaCl 0,9%) la animalele din grupa de control, respectiv soluție cis-platin (sub forma produsului Sinplatin-chimioterapic citostatic) la animalele din grupele experimentale $E_1 - E_4$.

Soluția de cis-platină s-a preparat extemporaneu, și anume: flaconul cu pulbere Sinplatin care conține 50 mg cis-platină, s-a dizolvat în 50 ml apă distilată. Apoi s-au calculat concentrațiile specifice pentru fiecare grup experimental, iar în cadrul grupului s-a avut în vedere greutatea fiecărui animal.

Determinările analitice s-au efectuat asupra serului sanguin urmărind metabolizii azotați neproteici și principalelor biometale din serul sanguin. De asemenea a fost urmărită modificarea homeostaziei biochimice prin variația concentrației unor bioelemente în diferite țesuturi și organe după administrarea de cis-platină.

3.5. PRELEVAREA DE PROBE ANALITICE

În perioada experimentelor s-au respectat protocoalele de lucru concepute pentru ambele modele experimentale: materiale utilizate, timpi operatori, pregătirea probelor analitice, etc.

Manipulările preanalitice ale animalelor din eșantioanele (grupele) luate în studiu animalelor trebuie să urmărească evitarea denaturării calității probelor. În acest scop s-au utilizat instrumentar și recipiente confecționate din materiale care în contact cu probele să nu intre în combinații chimice. Recipientele trebuie să

dispună de posibilități de închidere ermetică, atât pentru a reduce riscul evaporării cât și al contaminării probelor.

În vederea prelevării de probe s-au luat și măsuri pentru protecția individuală. Manipularea probelor s-a efectuat respectând aceleași reguli. Prelevarea nu se efectuează dacă în prealabil nu este realizată conștiența.

Probele analitice prelevate de la animalele de laborator au fost: sânge prin puncție venoasă și excizate de organe sau organe integral. Pentru ambele serii de experimente prelevarea sângelui s-a făcut după o prealabilă anestezie cu ketamină, urmată de laparotomie.

3.5.1. PRELEVAREA PROBELOR DE SÂNGE

La animalele anesteziate s-a procedat la laparotomie, s-au îndepărtat cu atenție viscerale abdominale pentru a vizualiza câmpul de intervenție. Sângele a fost prelevat din vena cavă posterioară (caudală), cu seringă de unică folosință (fig. 3-4).

Prelevarea se face în vacutainere etichetate pentru experimentele menționate și anume: în recipiente care conțin EDTA (1 μ g/mL) pentru plasmă, recipiente fără anticoagulant pentru ser (cazul prezentei lucrării). La prelevare s-a avut în vedere evitarea hemolizării probelor. Serul hemolizat nu mai poate fi analizat, din cauza posibilelor distorsii informaționale. Vacutainerele cu probe sanguine au fost supuse centrifugării. Serul a fost separat și preluat cu ajutorul unor pipete automate în vederea determinărilor analitice.

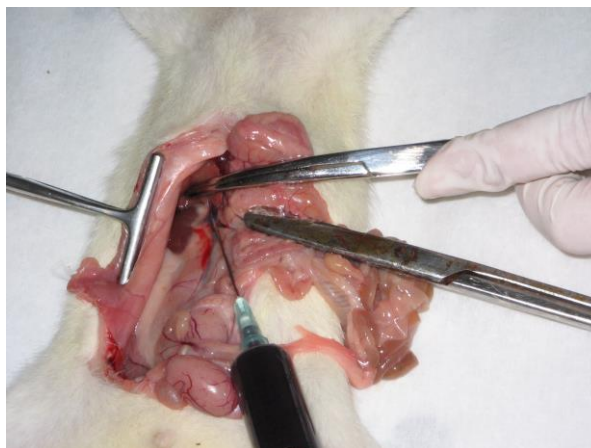


Fig. 3-4 Prelevarea de sânge prin puncția venei cave posterioare (de la șobolani linia Wistar)

Prelevarea probelor de sânge, având aceiași timpi operatori a prezentat similitudini caracteristice pentru ambele modele experimentale. Diferențe au existat în etapele ulterioare în funcție de determinările analitice efectuate.

Probele de sânge obținute în vederea analizării unor bioelemente metalice, și a unor metaboliți azotați neproteici au fost investigate cu un aparat Hospitex Screen Master produs de Hospitex Diagnostics, Italia.

3.5.2. PRELEVAREA PROBELOR DE ORGANE

Inițial s-au prelevat probe de organe, : ficat, rinichi, creier, cord, splină și în final din țesut muscular. Evident se face precizarea că în cazul primului model experimental s-au prelevat doar excizate hepatice – conform obiectivelor experimentale menționate (determinarea DNA). În cazul secundului experiment s-au prelevat toate organele menționate și țesut muscular - pentru determinări de metale (fig. 3-5).

Instrumentarul chirurgical folosit a fost steril și bine pregătit pentru recoltarea corespunzătoare a probelor. Probele prelevate au fost separate și puse în vase de sticlă speciale spălate și uscate, prevăzute cu dop. Etichetarea sticlelor s-a făcut ulterior. Pe etichetă au fost înscrise următoarele: indicativul grupei de animale, numărul animalului, data recoltării. În tabelele însoțitoare ale lucrărilor experimentale au fost înscrise aceleași date, greutatea animalului, precum și sexul acestuia.

Probele astfel recoltate și etichetate au fost conservate în congelator la temperaturi cuprinse între -18°C și -20°C , astfel au fost pregătite pentru a fi supuse acestora ulterior calcinării și determinărilor analitice.

Recipientele de păstrare pentru probe au fost curate și uscate. În timpul conservării a fost evitată contaminarea sau degradarea probelor. Pe durata calcinării s-a evitat "expandarea" pulberii provenită din țesutul calcinat, deoarece în cazul nerespectării protocolului de lucru, există riscul pierderii probei din creuzet. Astfel puteau apărea rezultate eronate-distorsionate, prin evaporarea unor constituenți ai probei sub formă de aerosoli.

Solubilizarea cenușii obținute la calcinare a fost și ea însoțită de riscuri, în timpul mineralizării în sistem deschis (prin calcinare), deoarece în cazul unui

mediu bogat în cloruri, acestea se puteau volatiliza. De asemenea, incompleta dizolvare a cenușii putea conduce la pierderea unor oligolemente nevolatilizabile, iar un mediu bogat în sulfuri se putea produce eliminarea cuprului și a mercurului sub formă de sulfuri.

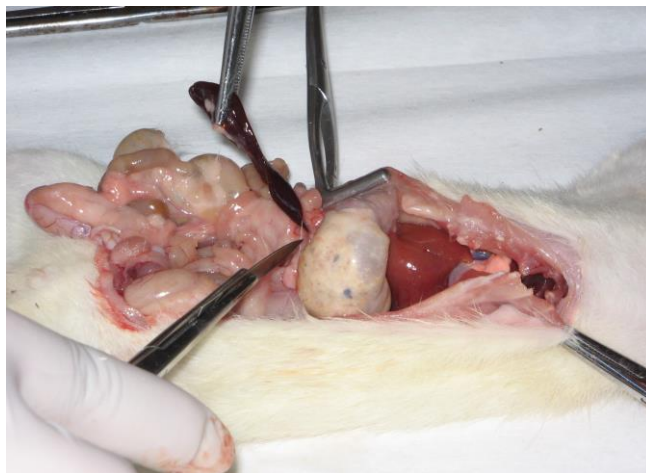


Fig. 3-5 Prelevarea de probe de țesut

Determinările analitice ale metalelor s-au efectuat prin spectrofotometria de absorbție atomică (AAS). Pentru analiza spectrofotometrică au fost folosite probe de țesut umed provenit de la animalele de experiență. Probele au fost scoase din congelator, dezghețate și cântărite cu o balanță analitică din Seria AFA/210 – LC, și produs de firma ADAM, puse în creuzete de porțelan, care au fost fiecare marcate, fiind notat numărul probei introduse în calcinator.

Protocolul de lucru al calcinării a fost stabilit în prealabil, și anume, calcinarea inițială la 100°C timp de 2 ore, apoi la 200°C timp de 4 ore, după care temperatura se ridică la 450°C timp de 18 ore, în total probele fiind calcinate 24 de ore. Calcinarea în trepte se realizează pentru a evita expandarea țesutului incinerat pe durata deshidratării și a calcinării probei, precum și evitarea pierderilor de metale cu volatilitate mare.

Astfel, în cadrul experimentului, pragul inițial de temperatură ales a fost de 150°C, evaporarea bruscă a apei și expandarea probei, urmată de pierderea acesteia în cuptorul de calcinare fiind evitată. S-a realizat apoi o calcinare în trepte, până la 450°C, temperatura mai mare producând volatilizarea unor compuși din probă. În anumite momente ale calcinării s-a verificat cenușa, pentru

a nu prezenta așa –numite “puncte negre”, care pot apare datorită unor substanțe organice neoxidate.

După calcinare a urmat răcirea probelor la o temperatură care să permită scoaterea acestora din calcinator. În cazul unei calcinări incomplete cenușa a prezentat puncte negre fiind tratată cu o soluție de acid azotic: apă 1:1, în volum de 5 ml pentru fiecare creuzet, cu o pipetă, spălând pereții creuzetului. Creuzetele au fost puse pe o baie de nisip sub nișă pentru evaporarea lentă a acidului până la sec. Cenușa aflată pe hârtia de filtru a fost reluată cu acid azotic 5%, după o prealabilă umectare a hârtiei de filtru, și colectată într-un balon cotat de 50 ml. Astfel s-a obținut soluția de lucru care ulterior este supusă analizei spectrofotometrice.

Respectarea procedurilor specifice pentru diverse etape din cadrul cercetării experimentale este importantă prin faptul că poate influența rezultatele analitice.

Investigațiile experimentale efectuate pe animale de laborator permit obținerea de informații cu privire la efectele administrării cis-platinei asupra homeostaziei biochimice a diversilor metaboliți serici și tisulari.

4. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA DNA HEPATIC ȘI A SERUMPROTEINELOR

4.1. EFECTUL CIS-PLATINEI ASUPRA DNA HEPATIC

Interacțiile dintre ionii metalici și metaboliții proteici, lipidici și glucidici din sistemele biologice prezintă numeroase implicații de interes nutrițional interesând alimentația enterală și parenterală și de interes farmacologic interesând utilizarea medicamentelor chimioterapice [235-239]. În acest cadru se includ și chimioterapicele citostatice reprezentate de compuși platinici introduși în clinica medicală.

Activitatea citostatică a cis-platinei poate fi corelată cu interacția acesteia cu macromolecula de acid nucleic. Efectele asupra homeostaziei biochimice a acizilor nucleici (în cazul studiat a acidului deoxiribonucleic) la nivel tisular. Este general acceptat faptul că efectul anticancerigen al cis-platinei se bazează pe interacțiile acesteia cu macromolecula de DNA [93, 240, 241].

Se cunoaște faptul că macromolecula de DNA poate genera formarea de aducți caracterizați prin existența unor legături covalente la nivelul nucleobazelor.

Consecințele interacției DNA cu cis-platină se repercutează și asupra biosintezei proteinelor. Se consideră chiar că este un efect de „stres genotoxic” [242]. Afectarea biosintezei proteinelor implică perturbarea succesiunii proceselor de replicare, transcripție și translație în care DNA este purtătorul de informație biologică la nivelul genelor deci informația genică – [243-245]. Perturbarea transmiterii informației genice influențează, de asemenea ciclul celular și moartea celulară [246, 247].

Cercetări efectuate pe animale de laborator, au demonstrat că cis-platina interacționează cu DNA, cu consecințe asupra concentrației DNA hepatic [248].

Din numărul mare de substanțe folosite în chimioterapia citostatică, cis-diclorodiaminoplatina (abreviat cis-platina, cis-DDP sau cDDP) a fost utilizată cu succes ca agent anticanceros [93, 115] .

Se reiterează faptul că din punct de vedere chimic, cis-platina este un complex metalic care are platina ca și atom central, iar ca și liganzi două molecule de amoniac și doi atomi de clor situați în poziție cis (v. Cap 1).

Cis-platina ca și compus a fost pentru prima dată descrisă de Peyrone în 1845. Ulterior, în 1895 a avut loc separarea celor doi izomeri cis și trans de către Alfred Werner, [249]. În 1965, Rosenberg și colaboratorii au descoperit în urma unui proces de electroliză că electrodul de platină inhibă diviziunea mitotică în celula bacteriei de *Escherichia coli* [250].

Este unanim acceptat faptul că principala țintă a acțiunii la nivel celular a cis-platinei este reprezentată de acidul deoxiribonucleic care are rol de purtător al mesajului genetic [251].

Legarea cis-platinei de macromolecula de DNA denaturează structura chimică și perturbă activitatea biologică a macromoleculilor cu efecte asupra biosintezei proteinelor. Activitatea citotoxică a cis-platinei poate fi corelată cu cantumul de platină legat de macromolecula de DNA [84, 117, 252] .

Studii anterioare au sugerat că cis-platina poate realiza legături intra- și intercatenare cu DNA, dar și complexe macromoleculare de tipul cis-platină - DNA - proteine [118].

Legarea cis-platinei la macromolecula de DNA se realizează majoritar (65%) la nivelul nucleobazelor de guanină adiacente (GG). Alte legături ale cis-platinei cu DNA (20%) se realizează la nivel intracatenar între nucleobazele guanină și adenină, și în mai mică măsură (9%) derivă din legături între două nucleobaze separate de o a treia nucleobază [253].

Datele referitoare la modificările homeostaziei biochimice evaluate prin determinarea concentrației DNA hepatic sunt discutate în continuare. Rezultatele analitice sunt prezentate în tabelul 4-1.

Tabel 4-1 Concentrația DNA hepatic la șobolanii linia Wistar

Specificare	n	DNA hepatic ($\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut)	
		$\bar{X} \pm DS$	$\Delta \bar{X}$
Grupa C _A	16	3.03 ± 0.28	-
Grupa E _I	16	2.99 ± 0.31	-0.04
Grupa E _{II}	16	2.94 ± 0.53	-0.09
Grupa E _{III}	16	$2.88 \pm 0.42^*$	-0.15

n – număr de animale

p<0,01;

Cu referire la cis-platină se cunoaște faptul că aceasta realizează aducți covalenți cu numeroase macromolecule, dar este dovedit faptul că proprietățile biologice – active (în speță farmacologic – active) cu implicații citostatice sunt o consecință a formării aducțiilor DNA – difuncționali [84, 246].

În urma administrării de chimioterapie citostatică, acesta va fi supus în organism fazelor de metabolizare, respectiv de biotransformare, care include etapele de biodegradare (prin reacții de oxido-reducere sau de hidroliză) și de biosinteză (prin reacții cu formare de aducți).

O schemă generală a biotransformării medicamentelor chimioterapice include existența unei etape de biodegradare (prin reacții de oxido-reducere sau hidroliză) și o etapă de biosinteză (prin reacții de conjugare sau reacții cu formare de aducți). Schema generală a reacțiilor de biotransformare este redată în fig. 4-1.

O remarcă specială se face asupra faptului că substanțele care intră în interacție cu DNA formează compuși cu „structură specială”. Inițial aceștia au fost observați la mijlocul secolului trecut fiind numiți „asociații moleculare”, „complexi macromoleculari”, etc. Ulterior s-a acreditat terminologia de „aducți ai DNA”.

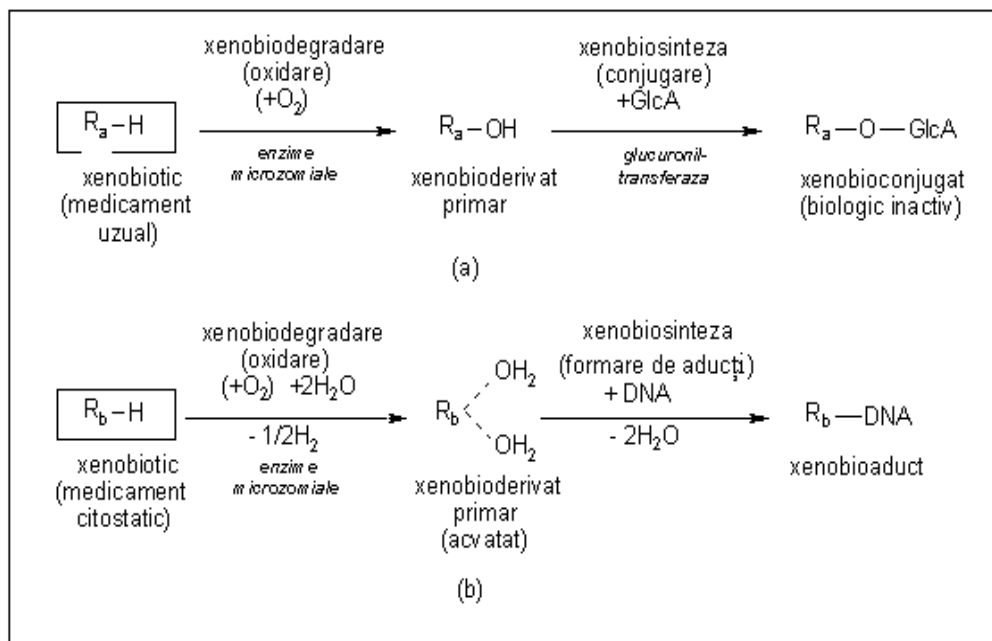


Fig. 4-1 Reacțiile de biotransformare a) medicament chimioterapic uzual; b) medicament chimioterapic citostatic

În fig 4-1a este prezentată biotransformarea pentru o substanță care parcurge reacții de oxido-reducere și conjugare. În prima etapă are loc formarea unui compus hidroxilat. În etapa a doua, după interacția cu acidul glucuronic, formează un compus glucurono-conjugat de tipul O-glucuronidă.

În fig. 4-1b este prezentat cazul unui chimioterapic citostatic care are în moleculă ioni metalici (e.g. cis-platina). În acest caz în prima etapă are loc o reacție de acvatare, iar în etapa a doua are loc formarea aductului între chimioterapicul citostatic și macromolecula de DNA.

Legarea cis-platinei la DNA se poate face rezultând aducți homomacromoleculari de tipul cis-platină – DNA, dar este posibilă legarea la DNA și proteine, rezultând complecși heteromacromoleculari de tipul DNA – cis-platină – proteine. În urma interacțiilor rezultă compuși mono- sau bidentați [254] .

Principala moleculă țintă a cis-platinei la nivel celular este macromolecula de DNA. La nivelul nucleobazelor purinice există un număr mare de situsuri de legare : cei cinci atomi de azot fiecare cu o pereche de electroni neparticipanți și atomul de oxigen din compoziția grupării carbonilice (în cazul guaninei). Perechea de electroni neparticipanți de la atomii de azot N_1 și N_9 și gruparea aminică exociclică fac parte

din sistemul de electroni din structura heterociclului purinic și prin urmare acestea nu pot realiza legături chimice cu cis-platina.

Din datele prezentate în fig 4-2 se poate remarca scăderea concentrației DNA hepatic odată cu creșterea dozei de cis-platină administrate, între cele două existând o relație de inversă proporționalitate. Se observă apariția unei diferențe semnificative la animalele din lotul experimental E_{III} la care s-a administrat cea mai mare doză de cis-platină.

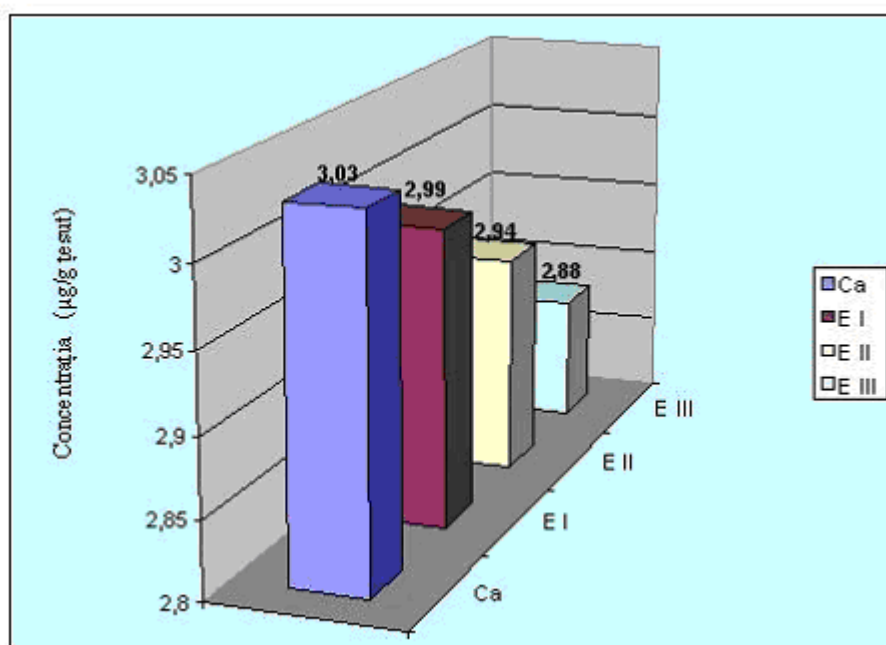


Fig. 4-2 Histograma privind concentrația DNA hepatic

Astfel, principalele situsuri de legare ale cis-platinei sunt atomii (N_3) și (N_7) și (O_6) de la guanină. Având în vedere că atomul (N_3) se află în apropierea legăturii glicozidice $N(9) - C(4)$ și prezintă constrângeri sterice, astfel încât locul preferat de legare al cis-platinei este atomul de azot (N_7).

Din datele anterioare reiese că în soluție neutră atomul (N_7) de la guanină este preferat atomului (N_7) de la adenină [93]. Caracterul bazic al atomului de (N_7) scade în ordinea:

guanină>inozina>adenina>2-aminoadenina.

Cis-platina are afinitate pentru atomii (N_7) de la nivelul bazelor azotate purinice, în urma interacțiunii cis-platină – DNA rezultând aducți mono- și bifuncționali care pot fi separați prin cromatografie, spectroscopie atomică de masă sau compuși platinici radiomarcați.

Mai frecvent se formează aducți intracatenari cis-platină – DNA notați adesea: d(GpG)Pt, d(ApG)Pt și d(GpNpG)Pt. Acești aducți intracatenari reprezintă 60%, 15% și 20% din totalul aducțiilor formați responsabili de activitatea citostatică a cis-platinei [253].

Legarea cis-platinei (cDDP) la macromolecula de DNA vizând uneori și macromoleculele polipeptidice din proteine evidențiază diverse structuri (fig. 4-3) ale aducțiilor. Se evidențiază astfel formarea de: a) legături intercatenare cu nucleobaze identice (fig. 4-3 a); legături intercatenare cu nucleobaze diferite (fig.4-3 b); legături intracatenare cu nucleobaze identice (fig. 4-3c); legături intracatenare cu nucleobaze diferite (fig. 4-3 d); legătură morfofuncțională cu o nucleobază aparținând uneia din catenele DNA (fig. 4-3 e); legătură heteromacromoleculară între o catenă DNA și o catenă polipeptidică (fig. 4-3 f).

Studii cristalografice efectuate asupra aductului d(*GpG*) intracatenar au urmărit efectele directe ale cis-platinei asupra structurii DNA. În urma formării aductului d(GpG)Pt apar modificări care privesc dispunerea nucleobazelor față de planul legăturii coordinative realizată în cadrul structurii planare de către atomul de platină. Ionul metalic este deplasat cu 0,1 nm față de planul nucleobazelor guaninice, iar distorsia dublului helix este severă, producând o înclinație de 40°. Ambele catene ale dublului helix sunt dispuse într-un aranjament anticomplementar, și, deși sunt afectate mai multe perechi de baze, totuși macromolecula per ansamblu rămâne intactă, multe dintre distorsiuni fiind datorate modificărilor conformaționale a nivelul complexului pentoză-rest fosfat din proximitatea injuriei biochimice produse de leziunii induse de cis-platină [117].

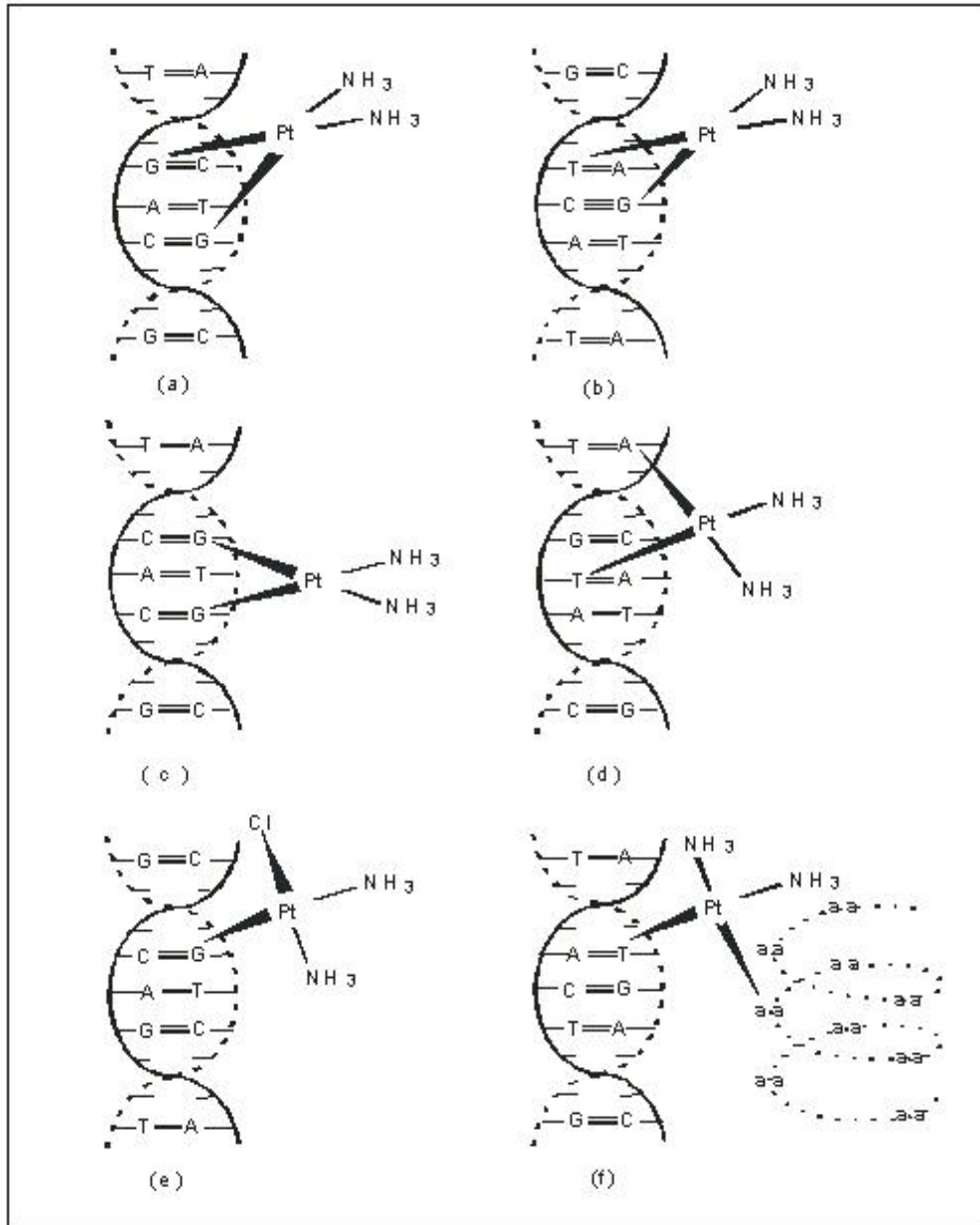


Fig. 4-3 Modele sterice de legare a cis-platinei la DNA sau la DNA și proteine [118]

Tranzițiile macromoleculii afectează liganzii mobili reprezentați de 2 Cl și nu liganzii inerti (2 NH₃) care rămân nemodificați, în timp ce atomii de clor sunt eliberați (fig. 4-4).

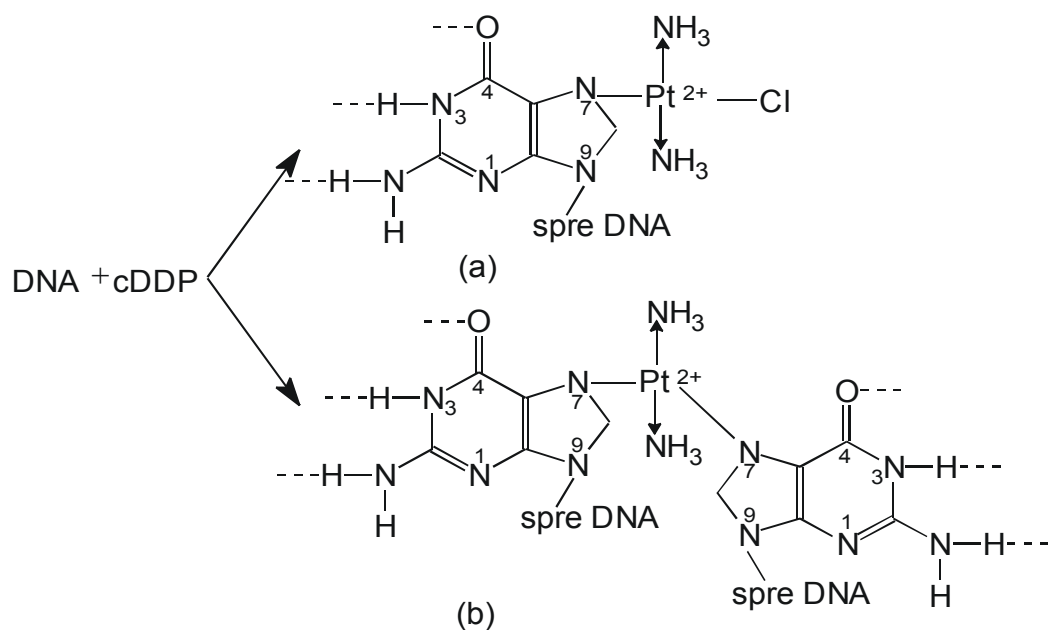


Fig. 4-4 Biogeneza aducțiilor DNA – cDDP: a) legarea monodentată a cDDP la guanina din DNA; b) legarea bidentată a cDDP la guanina din DNA

Dintre toți aducții posibili, mai importanți sunt aceia la care atomii de clor din cis-platină sunt înlocuiți cu atomii de azot purinici de la două nucleobaze adiacente plasate pe aceeași catenă a dublului helix de DNA.

Mai puțin frecvenți sunt aducții monodentați și aducții bidentate intercatenari notați uneori d(G₂)Pt. Aceștia din urmă sunt și ei responsabili de activitate citotoxică, intervenind în procesele de inhibare a transcripției și translației de la nivelul macromoleculii DNA.

Afinitatea crescută față de N₇ al guaninei și se datorează stabilității mărite a moleculei și faptului că există distorsiuni minime ale helixului realizându-se cea mai scurtă distanță între doi atomi de N₇ din DNA [255] .

Platina divalentă Pt (II) se poate lega la două nucleobaze de la nivelul unei singure catene sau de la nivelul a două catene (unite prin punți de hidrogen), vizând atomul de azot N₇ și atomul de oxigen (legat la C₄) din proximitate.

Pentru a forma un aduct nucleobazele trebuie să fie dispuse vicinal. Este posibilă legarea între nucleotide de pe catene diferite, dar trebuie să fie situate față în față sau pe diagonală.

Formarea unor legături chimice între catenele complementare și antiparalele sau pe aceeași catenă induce apariția efectului citotoxic. Izomerul cis al platinei este mult mai toxic, prin formarea unor legături intracatenare, în timp ce izomerul trans intervine în realizarea unor legături intercatenare. Izomerul trans este din punct de vedere cinetic mult mai reactiv și mult mai labil decât izomerul cis având un timp de înjumătățire mai scurt. Astfel se explică, prin lipsa activității citostatice, faptul că legăturile intercatenare formate sunt scindate mai ușor decât legăturile intracatenare.

În urma hidrolizei cis-platinei are loc formarea a două specii moleculare acvatate, instabile, care pot conduce la formarea unor resturi de liganzi monodentat (IV) și bidentat (V). Acești liganzi se pot lega de guanina din macromolecula de DNA. În funcție de ligandul angajat în legarea la DNA se pot forma două tipuri de aducți (fig. 4-5).

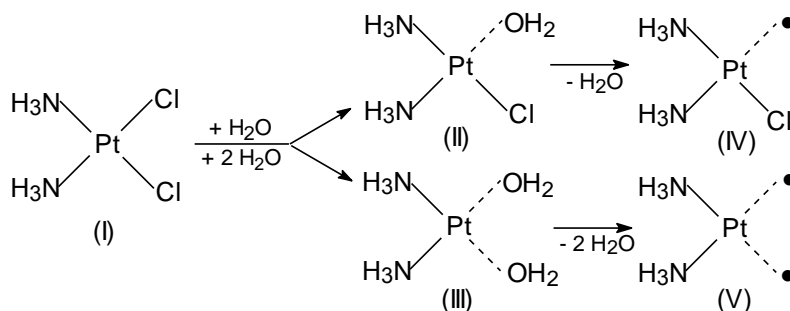
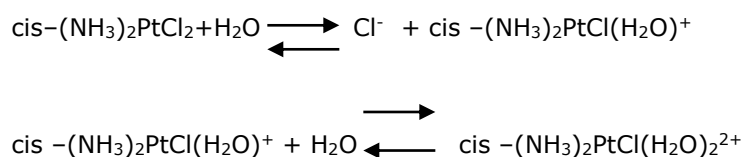


Fig. 4-5 Cis-platina – formula structurală și căile de acvatare specifice

Acțiunea chimioterapicelor citostatice asupra biosintezei DNA se explică prin interacția care are loc in vivo și a cărei principală caracteristică rezidă în formarea de aducți. Interacția se poate realiza cu DNA în cursul procesului de replicație, dar se poate considera că procesul poate afecta și deoxiribonucleotidele precursorare.

Evoluția studiilor cu privire la aducții realizați cu macromolecula de DNA s-a dovedit importantă pentru studiile de farmacologie, pe baza lor putându-se explica mecanismul interacțiilor dintre citostatice și DNA [256].

Interacția cis-platinei cu DNA, așa cum s-a arătat mai sus, este precedată de formarea a două specii de compuși - un derivat monoacvatat și un derivat diacvatat.



Constantele de echilibru specifice etapelor menționate mai sus sunt următoarele:

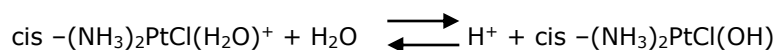
$$K_1 = \frac{[\text{Cl}^-] [\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})^+]}{\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{Cl}^-] [\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}]}{\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})^+]}$$

Derivații mono- și diacvatat ai cis-platinei pot realiza legături la una sau la ambele catene ale DNA rezultând aducți de tipul cis-platină - DNA. Legarea la nucleobaze nu implică timina, și se face preferențial în seria:

guanină > adenină > citozină.

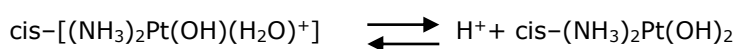
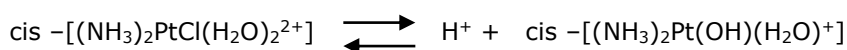
Derivații monoacvatați și diacvatați ai cis-platinei sunt deprotonați în soluție slab acidă sau neutră. În cazul derivatului monoacvatat, reacția de deprotonare se prezintă astfel:



Constanta de aciditate pentru această reacție este:

$$K_{a3} = \frac{[\text{H}^+] [\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{OH})]}{\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})^+]}$$

În cazul derivatului diacvatat au loc două reacții de deprotonare succesive, care se pot reda după cum urmează:



Constantele de aciditate sunt specifice pentru derivații diacvatați, corespund la două în etape, [93] și se prezintă astfel:

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+] [\text{cis} - (\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})^+]}{\text{cis} - [(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}]}$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{H}^+] [\text{cis} - (\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{OH})_2]}{\text{cis} - [(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})^+]}$$

Formele mono- și/sau diacvate, așa cum s-a arătat, se implică succesiv în interacțiile cu macromoleculele de DNA sau cu macromoleculele polipeptidice din proteine.

În cazul experimentului din această lucrare s-a constatat o depresie a concentrației DNA hepatic la grupele experimentale (v. tabel 4-1). Acest fapt pledează pentru existența unei interacții cu macromolecula de DNA din țesutul hepatic. În această situație o parte din DNA este angajat în biogeneza de aducți.

Acvatarea cis-platinei în mediu slab acid sau neutru (determină pierderea clorului) și prin aceasta activarea interacției. În continuare protonarea derivaților acvatați a precedat interacția cu macromolecula de DNA. Constantele de aciditate pentru derivații mono- și diacvatați în etapa de protonare prezentate mai sus [93] evidențiază situația tranzitorie premergătoare interacției dintre derivații cis-platinei și macromolecula de DNA.

Denaturarea structurii macromoleculii de DNA conduce la modificarea relației structură chimică-activitate biologică care interesează genele prezente în genomul celular. În acest cadru se modifică întreaga succesiune a proceselor de replicație-transcripție-translație. Astfel este influențată și biosinteza proteinelor. În aceste circumstanțe sunt perturbate mecanismele reparatoare ale celulei, situație care poate duce la moartea celulară. Există patru mecanisme de acțiune:

1) afinitatea proteinelor cu mobilitate mare este de o sută de ori mai mare față de DNA modificat de cis-platină, comparativ cu DNA nemodificat [93]. Aceste proteine cresc citotoxicitatea cis-platinei prin legarea de aducți DNA și obstrucționează reparația celulară în etapa de excizie.

2) legarea ireversibilă a cisplatinei de factori de transcripție. Ea este capabilă să înlocuiască Zn^{2+} dintr-o proteină reglatoare vitală pentru transcripția DNA. Zn permite aminoacizilor din structura proteinelor mai ales Cys și His, să unească domeniile de legare într-o structură densă [127].

3) reparația de corecție implică acțiunea DNA-polimerazelor ce cauzează rupturi în catenă, antrenând și mecanismele de reparație post-replicație. Intervin DNA polimerazele care produc rupturi ale lanțului macromoleular. În cazul ruperilor și a intervenției mecanismelor de reparație apare o dereglare a proteinei p53 și eventual apoptoza [246].

4) dereglarea activității topoisomerazelor I și II, reprezintă o perturbare care intervine în formarea DNA dublu (d.c. DNA) helix, precum și în plierea și rotirea acestei macromolecule [257].

De asemenea se cunoaște faptul că există o implicare a cis-platinei în desfășurarea ciclului celular. In fact, celulele proliferative sunt mai sensibile la cis-platină comparativ cu cele neproliferative. Cis-platina acționează asupra celulelor aflate în faza G_2 a ciclului celular, și mai puțin asupra inhibării proceselor de sinteză a DNA.

Cis-platina poate fi implicată în moartea celulară indusă (necroza) care prezintă unele similitudini cu moartea celulară programată (apoptoza) celulelor, fapt demonstrat experimental [258, 259]. Aceste afirmații au la bază un experiment realizat pe o familie de gene bcl-2 și bcl-x. În urma replicării proteinelor bcl-2 și bcl-x a fost demonstrat faptul că aceste proteine previn moartea prin apoptoză a celulelor la nivelul cărora acționează cis-platina și alți agenți citotoxici.

Cu privire la moartea celulară în unele tratate este utilizată noțiunea de "tanatocitoză" pentru cazul general. În acest cadru se disting "apoptoză" ca moarte celulară programată și necroza ca moarte celulară produsă în condiții patologice și în condiții terapeutice (radio- și chimioterapie).

Apoptoza este dependentă de ATP (adenozintrifosfat) și de sinteza proteică de novo. Marea majoritate a moleculelor de cis-platină interacționează predilect cu proteinele, acest tip de interacție influențând în mare măsură apoptoza. Diferența dintre necroză și apoptoză se poate observa din punct de vedere al mecanismului de acțiune. În ciuda diferențelor existente, între cele două procese există o relație de interdependență. Există unele ipoteze conform cărora unele celule sunt distruse ca rezultat al unui proces de apoptoză eșuat [260]. În cazul administrării de cis-platină moartea celulelor poate surveni prin unul din cele două mecanisme: apoptoză sau necroză [261]. Aceasta poate fi influențată de procesele metabolice care se desfășoară la nivel celular.

Studiile in vitro au fost realizate pe celule procariote (bacteriene) și eucariote (celule ale glandei mamare) și au demonstrat că aducții DNA realizați cu ambii izomeri ai diclorodiaminoplatinei au blocat acțiunea DNA-polimerazei, enzimă cu important rol în procesul de replicare [262].

Studiile in vivo au arătat de asemenea că izomerii cis- și trans- ai platinei, inhibă replicarea într-o măsură similară. Cercetările anterioare au arătat că izomerul cis este un agent antitumoral, iar forma trans este inactivă. Se deduce că replicarea DNA nu este singurul factor implicat în activitatea citostatică a cis-platinei.

Efectele izomerilor cis- și trans- asupra replicăției DNA au fost studiate in vivo (în interiorul organismului gazdă) și in vitro (pe culturi de celule provenite de la organismul gazdă).

În cazul cis-platinei s-a decelat și o activitate citotoxică [263]. Această activitate a cis-platinei poate apare datorită unei „inadvertențe” în sistemul de reparare a catenei DNA. În cadrul acestui sistem, înainte ca secvența de nucleotide distrusă din macromolecula de DNA să fie separată de restul catenei, trebuie recunoscută de celulă. Celulele recunosc porțiunea afectată de DNA prin acțiunea unor proteine de recunoaștere [153, 264].

Ca prim pas în studierea sistemului de reparare, s-a încercat realizarea diferențierii între DNA legat de o proteină și DNA liber, și ulterior izolarea mai multor proteine implicate în formarea de aducții cis-platină - DNA. Aceste proteine conțin

toate o secvență similară sau chiar identică de aminoacizi care poartă denumirea de grup de înaltă mobilitate - high mobility proteins groups notat uzual HMG.

Investigațiile efectuate au arătat că aceste proteine intervin în interacția DNA cu cis-platina in vitro. Cercetările in vivo au demonstrat că proteinele aparținând grupului HMG sunt mai puțin sensibile la cis-platină față de celulele care conțin gena, ceea ce înseamnă că cis-platina este mai puțin eficientă în procesul de distrugere a acestor celule. Grupul de proteine HMG are un rol major în procesul de distrucție a celulelor canceroase prin intermediul cis-platinei.

Două teorii explică probabilitatea implicării proteinelor HMG în activitatea citotoxică a cis-platinei. Multe din aceste proteine sunt factori de transcripție, prin aceasta înțelegându-se implicarea lor în biosinteza RNA pornind de la DNA. Astfel:

a) prima teorie susține că factorii de transcripție reprezentați de proteinele HMG „aderă” în special la aductul cis-platina-DNA, ele fiind implicate în procesul de transcripție, și având legătură cu apoptoza [265] .

b) secunda teorie susține că odată cu legarea proteinelor HMG, de aductul cis-platina - DNA, acesta nu va fi recunoscut de către sistemul reparator și astfel procesul de regenerare va fi îngreunat [266] .

Acest proces poate interfera cu funcția normală a celulelor și poate cauza uneori moartea celulară.

Studii in vitro au arătat că cis-platina se leagă la trei ținte moleculare majore; a) RNA prezent în concentrații mari în citoplasmă alături de nucleoproteine - 50%, β) DNA -40%, și γ) proteine -10% [93]. Această situație se pare că este specifică pentru culturile de celule în care sunt afectați predilect precursorii structurali ai acizilor nucleici (nucleobaze, nucleozide, nucleotide).

În interacția cis-platinei cu DNA sunt afectați și nucleosomii. Aceștia sunt subunități fundamentale ale cromatinei care constitutiv prezintă în zona centrală (histone), două formațiuni de DNA torsionate în jurul acesteia. În această situație nu au fost observate diferențe între acțiunea cis-platinei și trans-platinei, situație diferită în raport cu aceea a interacției cu DNA izolat [93]. Legarea la macromolecula de DNA din nucleul celular prezintă un anumit grad de complexitate pentru faptul că acesta este integrat cromatinei. În această structură compactă marea majoritate a secvențelor de DNA sunt inaccesibile din punct de vedere structural și inactive din punct de vedere funcțional.

4.2. EFECTUL CIS-PLATINEI ASUPRA SERUMPROTEINELOR

Modificările structurale ale macromoleculei de DNA apărute odată cu formarea aducțiilor cis-platină - DNA influențează sinteza proteinelor, afectând succesiunea proceselor de replicare - transcripție - translație. Importantă este interacția și în faza de replicare (când este afectată chiar molecula de DNA), dar și faza de translație când are loc legarea aminoacizilor și formarea catenelor polipeptidice. La catenele polipeptidice formate se pot forma aducții ai cis-platinei de tip heteromacromolecular i.e. aducții DNA - cis-platină - proteine (v. fig. 4-3f).

Inițial se consideră că legarea cis-platinei vizează doar macromoleculele de DNA, deci cu formare de aducții homomacromoleculare i.e. aducții cis-platină - DNA. În această accepție s-a admis că cis-platina poate afecta doar replicarea fără a bloca transcripția sau translația [83, 119].

În cadrul ciclului celular cis-platina poate interveni în blocarea fazei G₂ a acestuia, ceea ce implică „leziunea” biochimică a unei gene și nu replicarea în sine [97, 267].

În cazul studiului asupra proteinelor serice sanguine, discutate în această lucrare, biogeneza aducțiilor amintită mai sus influențează direct statusul homeostaziei biochimice.

La nivelul serului sanguin se regăsește un amestec complex de fracțiuni proteice cu caracteristici structurale, funcționale și metabolice diferite. Deoarece reflectă în mare măsură desfășurarea metabolismului protidic celular și tisular, investigarea proteinelor plasmatică este realizată în diverse afecțiuni [192, 268-270].

Datele referitoare la modificările homeostaziei biochimice apărute în cazul proteinelor serice totale și a fracțiilor electroforetice în urma administrării de cisplatină sunt discutate în continuare.

Cis-platina are capacitatea de a se lega de proteine extracelulare și intracelulare. Cu ajutorul rezonanței magnetice nucleare s-au identificat legături ale atomilor de platină la atomii de azot din proteinele serice reprezentate predilect de albumine și globuline.

Reacția dintre cis-platină și albuminele serice este principala modalitate prin care cis-platina se leagă de proteinele din sânge. Cercetări anterioare au sugerat că

legătura dintre albumine și platină poate fi sursa acțiunii anticanceroase a substanței [93].

Un studiu efectuat de Ivanov et al., (1998), a sugerat că albumina serică are capacitatea de a lega un număr mare de metaboliți, ioni metalici și molecule ale unor medicamente chimioterapice [271]. Interacția moleculelor cu albumina serică influențează distribuția tisulară, metabolizarea și eficacitatea acțiunii substanțelor administrate. Spre exemplu s-a observat că pacienții cu hipoalbuminemie răspund greu la tratamentul cu cis-platin, iar administrarea unor soluții perfuzabile cu amestec cis-platină – albumină crește rata de supraviețuire a bolnavilor la acest tratament. Complexele formate de albumina umană cu cis-platină sunt citotoxice pentru celulele canceroase. Legarea cis-platinei de albumină poate reduce nefrotoxicitatea acesteia [272].

Ca un element de detaliu, s-a constatat, contrar părerilor inițiale, că legarea cis-platinei la albumine nu se realizează la nivelul grupărilor tiolice din structura cisteinei, ci la nivelul grupărilor tiolice din structura metioninei [273].

În afara datelor prezentate, informații privind concentrația proteinelor serice și a fracțiunilor electroforetice sunt prezentate în tabelul 4-2.

Cu referire la subfracțiunile globulinice, a fost observată o scădere a α_1 -globulinelor și o creștere a α_2 -globulinelor, β - globulinelor și a γ - globulinelor.

Experimentele efectuate pe animale de laborator relevă faptul că interacția la nivel molecular după distribuția cis-platinei în organism, conduce la formarea de aducți. Dacă absorbția și distribuția medicamentului are loc rapid (în cazul administrării intraperitoneale) procesul de formare al aducțiilor cis-platină – DNA se derulează mai lent. Nivelele maxime sunt atinse într-o perioadă de timp cuprinsă între 30 de minute și 4 ore după administrarea medicamentului și sunt menținute pentru 24 de ore. Prin metoda imunohistochimică s-a relevat în cazul biogenezei aducțiilor, existența unei specificități de țesut. La o creștere a concentrației cis-platinei apare o creștere lineară sau aproximativ lineară a concentrației platinei, iar prezența aducțiilor cDDP – DNA a fost observată în toate probele examinate [274].

Tabel 4-2 Concentrația proteinelor serice totale și a fracțiunilor proteice din sânge – date analitice

Specificare		Grup C _a	Grup E _I		Grup E _{II}		Grup E _{III}	
		(n = 16)	(n = 16)	ΔX	(n = 16)	ΔX	(n = 16)	ΔX
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
Proteine serice (g%)		5.77 ± 0.68	5.61 ± 0.73	-0.16	5.54 ± 0.91	-0.23	5.46 ± 0.84	-0.31
Fracțiuni electroforetice (%)	Albumine	54.96 ± 3.47	54.12 ± 3.72	-0.84	53.52 ± 4.19	-1.44	52.99 ± 4.97	-1.97
	Globuline totale	45.04 ± 3.47	45.88 ± 3.72	+0.84	46.48 ± 4.19	+1.44	47.01 ± 4.97	+1.97
	α_1 -globuline	12.02 ± 0.76	11.93 ± 0.64	-0.09	11.85 ± 0.85	-0.17	11.64 ± 0.72	-0.38
	α_2 -globuline	11.07 ± 0.83	11.11 ± 0.71	+0.04	11.16 ± 0.80	+0.09	11.21 ± 0.67	+0.14
	β -globuline	13.97 ± 0.48	14.31 ± 0.70	+0.34	14.58 ± 0.73	+0.61	14.73 ± 0.79 *	+0.75
	γ - globuline	7.98 ± 0.88	8.53 ± 0.97	+0.55	8.89 ± 1.10	+0.91	9.43 ± 1.03 *	+1.45

n – număr de animale pe fiecare grup

p<0,01; p<0,05

Indiferent de modul de legare al chimioterapicelor citostatice la DNA, efectul final este același : denaturarea structurii dublului helix al DNA, urmată de modificarea activității biologice. Interacția cis-platinei cu DNA, care este macromolecula purtătoare a mesajului genetic, poate influența succesiunea proceselor de replicare-transcripție-translație, afectând totodată și sinteza proteică. Interacția produsă la nivel molecular este urmată de modificări fiziologice la nivel celular și tisular [93, 275].

Datele prezentate evidențiază faptul că există o relație doză-efect de inversă proporționalitate. Se remarcă o scădere a concentrației proteinelor totale odată cu creșterea dozei de cis-platină administrate.

Pentru investigarea aducțiilor cis-platină - DNA s-au perfectat tehnici de evaluare cantitativă. O astfel de tehnică, realizată pe țesuturi izolate de la șoarece, se bazează pe metoda imunohistochimică, care permite vizualizarea și cuantificarea pozițiilor active ale cis-platinei, legăturile cu DNA nuclear [174]. Aceasta confirmă în fapt și influența certă asupra activității biologice a DNA cu repercursiuni asupra sintezei proteinelor serice.

În cazul fracțiunilor electroforetice serice se înregistrează o scădere a concentrației albuminelor și o creștere la concentrației globulinelor. Evidențierea acestor modificări homeostazice induse de administrarea i.p. a cis-platinei este evidențiată în histograma din fig. 4-6.

Aceste modificări la grupele experimentale ($E_I - E_{III}$) în raport cu grupa de control (C_a) sugerează posibilitatea perturbării proceselor legate de imunitate.

Sinteza proteinelor serice (cu excepția gama - globulinelor) este influențată de funcționarea normală a ficatului, biosinteza de proteine contribuind, alături de alte țesuturi la menținerea homeostaziei biochimice.

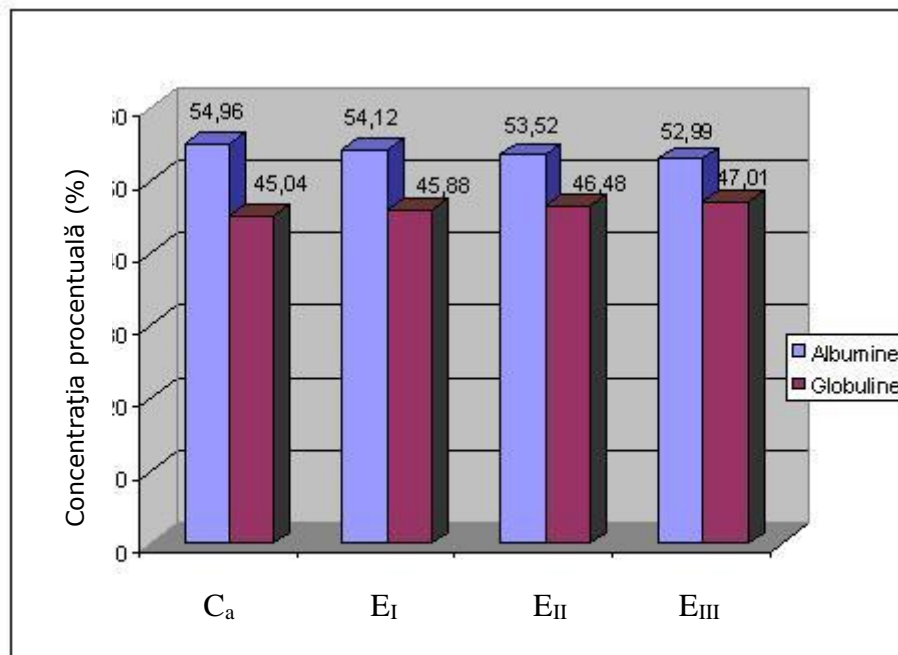


Fig. 4-6 Histograma privind valorile concentrației albuminelor și globulinelor

Concentrația albuminelor este scăzută în afecțiuni hepatice și este însoțită de o creștere a β – și γ – globulinelor ca rezultat al producerii de imunoglobuline de tip IgG și IgM în hepatitele cronice active și de tip IgM și IgA în ciroza hepatică. Identificarea claselor de imunoglobuline poate fi realizată prin intermediul imunoelectroforezei. O scădere a albuminelor serice nu este specifică doar afecțiunilor hepatice. Această situație se mai întâlnește și în malabsorbție, în malnutriție, afecțiuni renale, alcoolism și afecțiuni maligne.

Fracțiunea α_1 globulinice serice prezintă valori crescute în afecțiuni hepatice, iar o valoare scăzută sau absența acestei fracțiuni de globuline serice indică o afecțiune hepatică indusă de valori scăzute ale α_1 – antitripsinei. O valoare crescută a α_2 și β – globulinelor este asociată cu perturbarea metabolismului lipoproteic [276] .

Datele prezentate obținute în experimentul prezentat în această lucrare (v. tabel 4-2), relevă o scădere a concentrației proteinelor serice totale invers proporțională cu doza de cis-platină administrată. Frațiunile electroforetice arată o scădere a concentrației albuminelor și o creștere a concentrației globulinelor.

Referitor la subfracțiunile globulinice apare o scădere a α_1 – globulinelor și o creștere a α_2 – , β – și γ – globulinelor. Creșterea γ – globulinelor evidențiază o perturbare a sistemului imunitar.

Cu referire la subfracțiunile globulinice se prezintă histograma din fig. 4-7, care permite o vizualizare grafică a modificărilor existente.

Având în vedere că activitatea biologică a compușilor metalici este influențată de legarea acestora de proteinele sanguine, Khalaila et al., (2006), au examinat interacția dintre proteine și doi compuși metalici folosiți ca și chimioterapice: cis-platina și un compus cu ruteniu (NAMI-A) [277]. În urma studiului efectuat, se observă că ambii compuși interacționează cu albumina, legarea realizându-se în diferite situsuri ale moleculei proteice. Legătura covalentă realizată de cis-platină este de 10 ori mai puternică decât cea realizată cu compusul care conține ruteniu. Deoarece situsurile de legare la nivelul proteinelor sunt diferite, cele două substanțe ar putea fi folosite cu succes în asociere, mecanismul de acțiune la nivel celular rămânând neschimbat.

Se reiterează faptul că modificările metabolismului proteic evidențiază disfuncții renale. De asemenea, a fost stabilit faptul că metaboliții azotați neproteici, creatinina, acidul uric și ureea se modifică în urma administrării de cis-platină evidențiind efectul nefrototoxic al acesteia [278, 279].

Din punct de vedere farmacodinamic este necesar să menționăm faptul că cis-platina interacționează cu unele proteine în special cu glutationul (G-SH), formând complexul de tip cis-platină - G-S. Apar și efecte hematologice și neurologice ca o consecință a interacțiunii cu proteinele [280] . S-a observat că selenitul de sodiu reduce toxicitatea cis-platinei fără a inhiba activitatea antitumorală. Aceste date pot sugera rolul protectiv al seleniului.

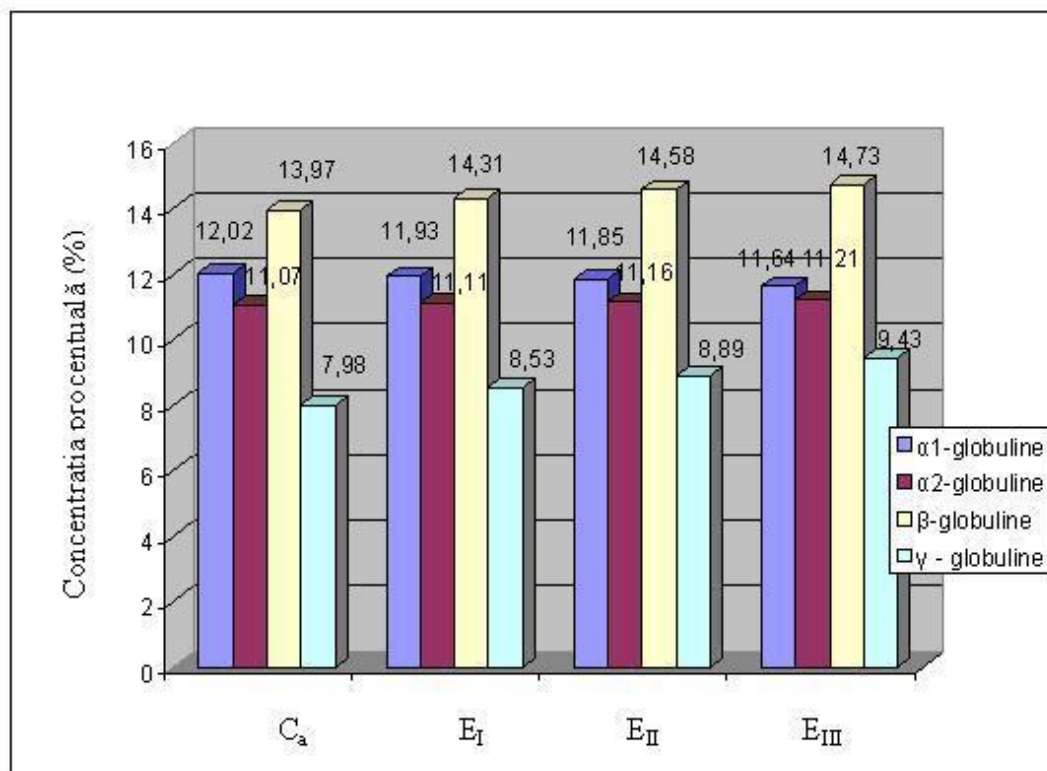


Fig. 4-7 Histograma privind concentrația subfracțiilor globulinice

Mai multe studii recente demonstrează că ținta cis-platinei e reprezentată de proteinele p53 și p73 care acționează ca și factori de transcripție în cadrul ciclului celular, reglarea dezvoltării celulare și /sau procesele de apoptoză [281, 282] .

Cercetări din domeniul farmacologiei au relevat că doar un procent de 1% din platina intracelulară interacționează cu DNA nuclear, cea mai mare proporție fiind angrenată în realizarea unor interacțiuni cu situsuri nucleofile ale altor molecule (e.g.: fosfolipide, proteinele din citosol, citoschelet și membrana celulară, RNA și DNA mitocondrial [260]. Studii recente au demonstrat de asemenea că utilizarea combinată de cis-platină cu taxani influențează activitatea biologică mărind considerabil eficacitatea acțiunii cis-platinei.

Pe țesuturi sănătoase la animale s-au studiat efectele toxice ale cis-platinei asupra mitocondriilor. Efectele adverse gastro-intestinale, ototoxicitatea, nefrotoxicitatea pot fi datorate efectelor cis-platinei la nivel mitocondrial [283-285].

Se cunoaște faptul că mecanismul de acțiune al cis-platinei are la bază interacția acesteia cu macromolecula de DNA, efectul citostatic fiind atribuit capacității acesteia de a forma aducții intra- și intermoleculare cu DNA nuclear. Recent s-a demonstrat că mecanismul de acțiune al cis-platinei are legătură cu procesul de moarte celulară (tanatocitoză). Mecanismele prin care aducții formați de DNA nuclear cu cis-platina conduc la tanatocitoză, nu sunt pe deplin elucidate.

Evaluarea biosintezei macromoleculei de DNA poate fi evaluată și din perspectiva cronobiochimiei. Astfel, au fost evidențiate variații circadiene ale biosintezei DNA, care demonstrează faptul că datele de cronobiochimie pot oferi un real ghid pentru conduita terapeutică în cazul administrării chimioterapicelor citostatice [286].

Datele oferite de cronobiochimie urmăresc eficientizarea chimioterapiei citostatice. În literatura de specialitate există unele recomandări privind timpul optim pentru chimioterapia circadiană. În acest sens se fac unele referiri la compușii platinici (e.g.:cis-platina), care se administrează cu mai multă eficiență seara.

4.3. ACȚIUNEA CHIMIOTERAPICELOR CITOSTATICE ÎN CADRUL CICLULUI CELULAR

Problemele referitoare la activitatea biologică a medicamentelor chimioterapice în general și a chimioterapicelor citostatice în special se corelează adesea cu ciclul celular pentru a se putea explicita mecanismul de acțiune.

Dacă se urmăresc aspectele de biochimie (în speță xenobiochimie) este importantă cunoașterea modificărilor homeostazice la nivel sanguin și/sau la nivel tisular. Acestea evidențiază, indirect, modificările produse în celulă, în cazul prezentat în această lucrare, variațiile concentrației DNA hepatic și proteinelor serice. Dacă se urmăresc aspecte legate de biologia celulară și moleculară datele se pot asocia cu

imagini microscopice, care se corelează cu modificările homeostazice din cadrul ciclului celular [99, 287, 288].

Ciclul celular este constituit dintr-un compartiment proliferativ cu fazele de presinteză (G_1), post-sinteză G_2 , mitoză (M), și un compartiment neproliferativ cu faza G_0 . În fig. 4-8 este redată o prezentare generală a ciclului celular [77].

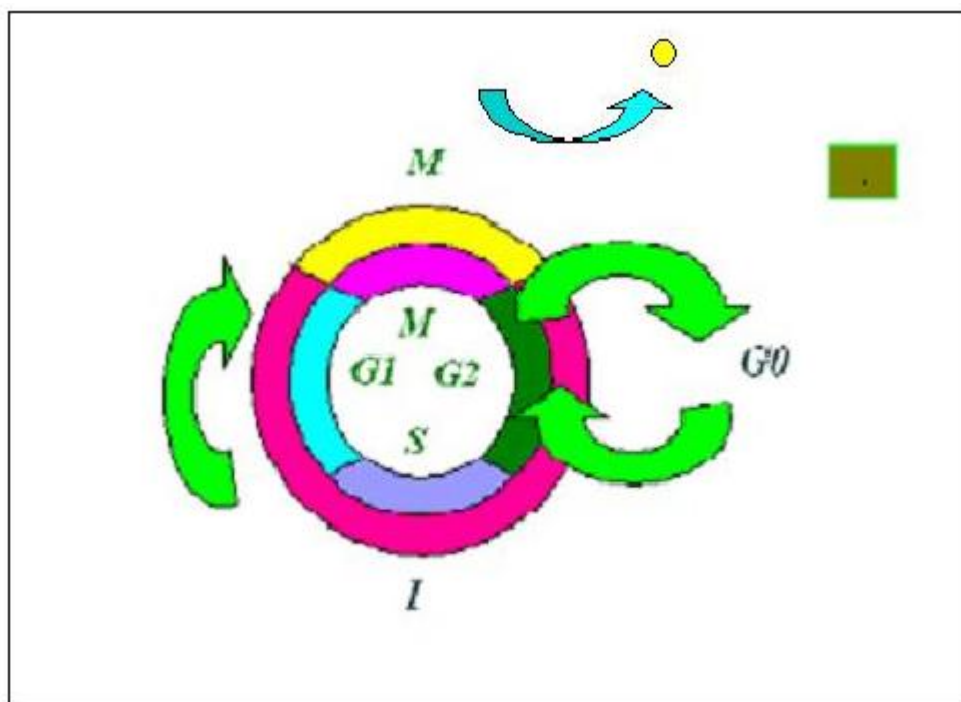


Fig. 4-8 Reprezentarea schematică a ciclului celular [77]

În general se cunosc aspectele de biologie moleculară asociate cu probleme de biochimie și farmacologie care interesează anumite conexiuni cu problematica cronobiochimiei.

În derularea ciclului celular – domeniu circumscris de „citocinetică” – există unele observații interesante care se pot face cu privire la fazele ciclului celular și modul de acțiune al diverselor medicamente chimioterapice cu acțiune citostatică [1] .

Nucleul celular, parte esențială a aparatului genetic, evidențiază modificări morfofiziologice specifice fazelor ciclului celular (mitotic).

Prin studii de citofotometrie și microaudiografie s-a conchis că în citocinetică există fazele de:

- presinteză G_1 – în care aparent nu se produce biosinteza DNA pentru reproducerea celulară, iar sinteza RNA și a proteinelor continuă normal (la finele perioadei G_1 pasajul G-S, se declanșează sinteza activă a DNA

- sinteză S- în cursul căreia se produce biosinteza DNA, cantitatea acestuia dublându-se;

- post-sinteză G_2 (premitotică) – în care biosinteza DNA încetează în timp ce sinteza RNA și a proteinelor continuă;

- mitoză (M) – în care viteza biosintezei RNA și a proteinelor este mult diminuată, iar materialul genetic se repartizează între celulele fiice;

- repaus (G_0) – în care celulele sunt capabile de proliferare (faza G_0 se situează în afara ciclului celular).

Aspectele legate de citocinetică sunt frecvent asociate studiilor de farmacocinetică interesând chimioterapia citostatică. Astfel, s-a observat că celulele aflate în faza de repaus a ciclului celular sunt cel mai frecvent refractare la acțiunea chimioterapicelor citostatice.

Diagrama fazelor ciclului celular redată în fig. 4-9 [99, 289, 290], prezintă acțiunea unor medicamente chimioterapice citostatice în raport cu ciclul celular.

Acestea se deosebesc, în principal, prin mecanismul de acțiune, distingându-se chimioterapice : cu acțiune specifică în ciclul celular (SCC); cu acțiune nespecifică în ciclul celular (NSCC).

Se remarcă faptul că medicamentele chimioterapice cu acțiune specifică în ciclul celular (SCC) prezintă particularități ale mecanismului de acțiune, caracteristic fiind faptul că parte din aceștia pot evidenția toxicitate selectivă față de celulele în curs de proliferare. Medicamentele cu acțiune SCC au o eficiență mai mare în hemopatiile maligne și în alte tumori cu rată de proliferare înaltă.

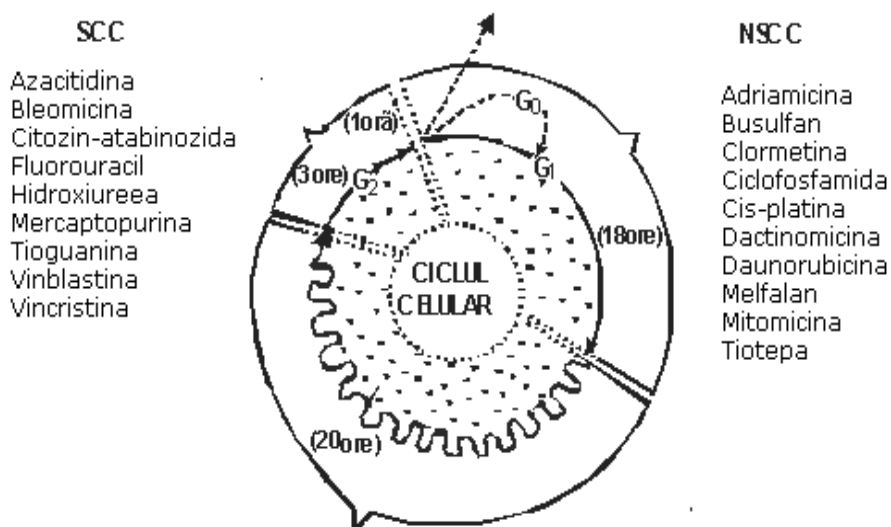


Fig. 4-9 Ciclul celular și medicamentele citostatice – mecanisme de acțiune (detalii în text)

Medicamentele chimioterapice cu acțiune nespecifică în cadrul ciclului celular (NSCC) interacționează, în majoritatea cazurilor, cu DNA și sunt frecvent utilizate în chimioterapia tumorilor solide. Această grupă include și numeroase azotiperite a căror acțiune este independentă de faza ciclului celular [290]. În această categorie de chimioterapice citostatice se include cis-platina.

Acest mecanism de acțiune este confirmat și de rezultatele prezentate în această lucrare.

Dependența de fază a ciclului celular (fazo-dependența) în acțiunea indusă de chimioterapicele citostatice reprezintă una din problemele de importanță majoră în practica medicală.

5. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA UNOR METABOLIȚI NEPROTEICI ȘI BIOMETALE DIN SERUL SANGUIN

5.1. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA UNOR METABOLIȚI AZOTAȚI NEPROTEICI

Proteinele sunt compuși cu distribuție ubicvitară în materia vie, cu un rol esențial în procesele de morfogeneză și secundar în procesele de energogeneză. În metabolismul proteic în faza de catabolism proteinele sunt supuse proceselor de biodegradare care conduc în principal la aminoacizi și alți produși metabolici reziduali specifici proteinelor simple și conjugate. În faza de anabolism se formează proteinele necesare propriului organism. Evoluția proceselor anabolice și catabolice poate fi caracterizată prin menținerea homeostaziei biochimice a principalilor metaboliți.

În literatura de specialitate referitoare la acțiunea diverselor medicamente chimioterapice (și în general la substanțe biologice active) sunt studiate modificările homeostazice ale metaboliților proteici, lipidici, glucidici și ale bioelectroliților [45, 84, 291]. În cazul proteinelor se studiază metaboliți proteici dar și derivați reziduali ai proteinelor. Studiul acestora este important pentru faptul că oferă informații asupra modificării homeostaziei biochimice și indirect asupra funcției diverselor organe. În acest cadru se pot studia metaboliții azotați neproteici: uree, creatinină, acid uric.

Una dintre funcțiile majore ale rinichiului este eliminarea compușilor azotați neproteici rezultați în cadrul metabolismului protidic. Implicarea rinichiului în acest proces este indicată de faptul că nivelul acestor compuși în sânge nu este excesiv în cazul afecțiunilor renale, cu excepția cazului în care capacitatea de funcționare a acestuia este redusă la jumătate [292].

Datele prezentate în tabelul 5-1 evidențiază modificările homeostazice produse de cis-platina administrată conform mențiunilor referitoare la secundul experiment. Se prezintă date analitice referitoare la statusul metaboliților azotați neproteici uree, creatinina și acid uric din serul sanguin.

Tabel 5-1 Concentrația ureei, creatininei și acidului uric în serul sanguin

Specificare	n	Uree (mg%) $\bar{X} \pm SD$	Creatinina (mg%) $\bar{X} \pm SD$	Acid uric (mg%) $\bar{X} \pm SD$
Grup C _b	10	18,95 ± 3,30	0,98 ± 0.16	2,73±0,16
Grup E ₁	10	28,55 ± 4,42	1,09 ± 0.18	2,87±0,09
$\Delta\bar{X}$		+9,60	+0,11	+0.14
Grup E ₂	10	29,45 ± 4,91	1,14 ± 0.17	2,90±0,02
$\Delta\bar{X}$		+10,50	+0,15	+0.17
Grup E ₃	10	37,15 ± 6,14**	1,81 ± 0,83*	2,92±0,03
$\Delta\bar{X}$		+18,20	+0,83	+0.19
Grup E ₄	10	42,95 ± 7,15*	1,49 ± 0.51**	2,88±0,01
$\Delta\bar{X}$		+22.00	+0,51	+0.15

n – număr de animale

*p<0,01; ** p<0,05

Acțiunea cis-platinei este mai complexă interesând direct metaboliții azotați neproteici menționați mai sus, dar și unele enzime cu atribute specifice în reacțiile redox. Spre exemplu, prin inhibarea unor enzime (i.e.: superoxidismutaza, catalaza și glutatinoxidaza) în rinichi la animale de laborator, cis-platina este responsabilă de apariția stresului oxidativ la nivel renal [293].

Cu referire la uree, din datele prezentate se poate conchide că în urma creșterii dozei de cis-platină administrată, concentrația ureei prezintă o augmentare progresivă. Modificările s-au evidențiat la grupele experimentale E₁-E₄ comparativ cu grupa de control (C) – v. fig. 5-1.

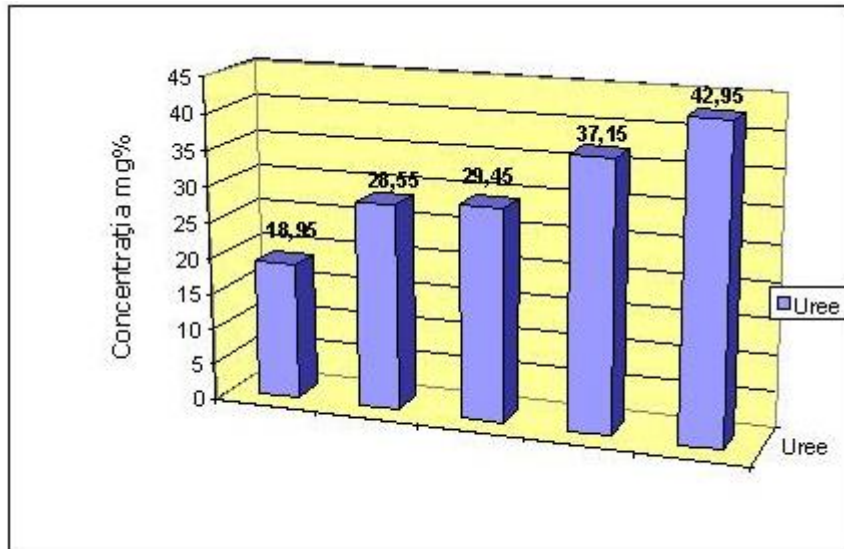


Fig. 5-1 Histograma privind concentrația ureei în serul sanguin

Într-un studiu efectuat de Zhou et al., (2006) pe șobolani supuși unui tratament cu cis-platină în doze de 6 mg/kgcorp, administrată intraperitoneal, s-au urmărit efectele acesteia asupra creatininei, ureei și acidului uric, prin administrarea unui marker urinar numit „malondialdehida”. Rezultatele au demonstrat o creștere a malondialdehidei, care a fost corelată cu creșterea creatininei urmată de o distrucție tubulară la nivel renal [294].

Ureea este un produs rezultat în urma procesului de ureogeneză din ficat. În cadrul proceselor metabolice ureogeneza asigură scăderea amoniemiei și menținerea echilibrului acido-bazic, osmotic și coloid-osmotic [295]. Ionul amoniu este produs în organism în urma deaminării aminoacizilor. Prin conversia ionului de amoniu în uree la nivel hepatic, este împiedicată acumularea de amoniu și apariția unor efecte toxice [200, 296]. Odată cu intensificarea proceselor de deaminare are loc și o creștere a concentrației de uree din sânge. Acest fapt este posibil în cazul unor diete bogate în proteine, a unor distrucții tisulare majore sau a inhibării sintezei proteice. În cazul unor afecțiuni hepatice severe și a unor diete hipoproteice, nivelul ureei sanguine este redus. Datorită multitudinii de factori implicați în stabilirea nivelului ureei în organism, acest „parametru” luat independent nu poate fi considerat de referință în stabilirea bunei funcționabilități a aparatului renal [297-300].

Statusul metaboliților azotați neproteici interesează de asemenea modificările homeostazice ale creatininei, un alt compus eliminat la nivel renal. În cazul cercetărilor întreprinse în prezenta lucrare se remarcă o relație de directă proporționalitate între doza de cis-platină administrată și concentrația creatininei în serul sanguin (v. fig. 5-2).

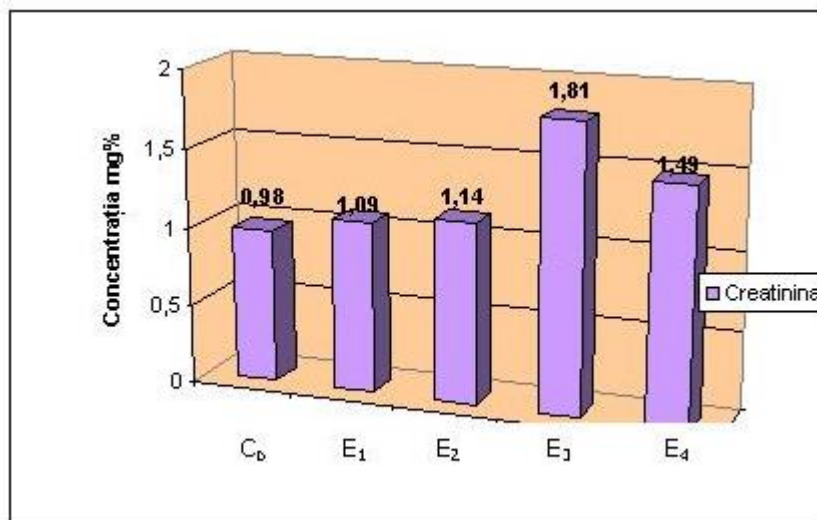


Fig. 5-2 Histograma privind concentrația creatininei în serul sanguin

Injuria funcției renale produsă de cis-platină explică necesitatea determinării creatininei după administrarea acestui citostatic. Privitor la dishomeostazia produsă de cis-platină, aceasta interesează nivelul sanguin al metaboliților corelat cu funcția hepatică și cu funcția renală [279, 301, 302] .

Creatinina se formează în urma unei reacții non-enzimatice a creatininei la nivelul musculaturii scheletice. Aportul de creatină per unitatea de masă musculară este constant, prin urmare concentrația creatininei serice prezintă valori relativ constante existând un echilibru homeostatic. Quantumul creatininei prezintă variații ușoare de la o zi la alta în cazul unei bune funcționări a rinichiului, sau valori crescute în cazul afecțiunilor renale [303, 304] .

Din aminoacizii de tipul argininei, metioninei, glicinei, se formează creatină, care în urma fosforilării se transformă într-o sursă de energie pentru contractibilitatea musculară, fiind ulterior transformați în creatinină, formă sub care sunt eliminați [305, 306] .

În cazul creatininei serice apare o creștere a valorilor acesteia în urma administrării cis-platinei la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Există o creștere direct proporțională cu doza de chimioterapie administrată. Creșterea creatininei serice este un indicator al apariției insuficienței renale, consecință a administrării cis-platinei [307].

După Serrano et al., (1995), cis-platina este asociată cu hipomagneziemia și cu creșterea valorilor serice ale creatininei. Scăderea concentrației magneziului seric se poate datora unui mecanism fiziopatologic care poate implica pierderea magneziului prin excreția urinară [308].

Creșterea creatininei poate fi explicată de afectarea grupării fosfat ca urmare a interacției dintre cis-platină și DNA. Astfel reacțiile specifice biogenezei creatinfosfatului implicate în acest metabolism pot fi influențate.

Acidul uric este un produs al reacției de oxidare a nucleobazelor purinice (adenina, guanina) și altor derivați purinici. Cantitatea de acid uric existentă în organism depinde pe de o parte de aportul de derivați purinici, de metabolizarea acestora, iar pe de altă parte de excreția de acid uric. Aportul de acid uric este dependent de ingestia de purine, de catabolismul nucleoproteinelor celulare, precum și de transformarea directă în acid uric a unei părți a purinelor sintetizate de organism plecând de la precursorii ai nucleului purinic. Pierderile de acid uric au loc și ca urmare a proceselor de degradare care au loc la nivelul intestinului, sub acțiunea bacteriilor intestinale. O cantitate mică de acid uric este metabolizată și la nivelul țesuturilor.

În cazul experimentului efectuat s-au evidențiat creșteri ale uricemiei la toate grupele experimentale (fig. 5-3). Datele relevă o creștere nesemnificativă. Acest fapt arată – indirect – că o cantitate mică de nucleobaze purinice a fost implicată în interacția DNA cu cis-platina. Evident în cazul unor experimente de durată pot apare valori semnificative. Situația poate fi întâlnită în chimioterapie.

Nivelul crescut de acid uric, în condiții non-experimentale (sau a unor experimente țintite asupra metabolismului purinic) poate fi asociat cu apariția gutei. Valori serice ridicate ale acidului uric pot indica prezența calculilor renali de tipul uraților. De asemenea, acidul uric poate fi un marker al stresului oxidativ, având rol de potențial antioxidant [309].

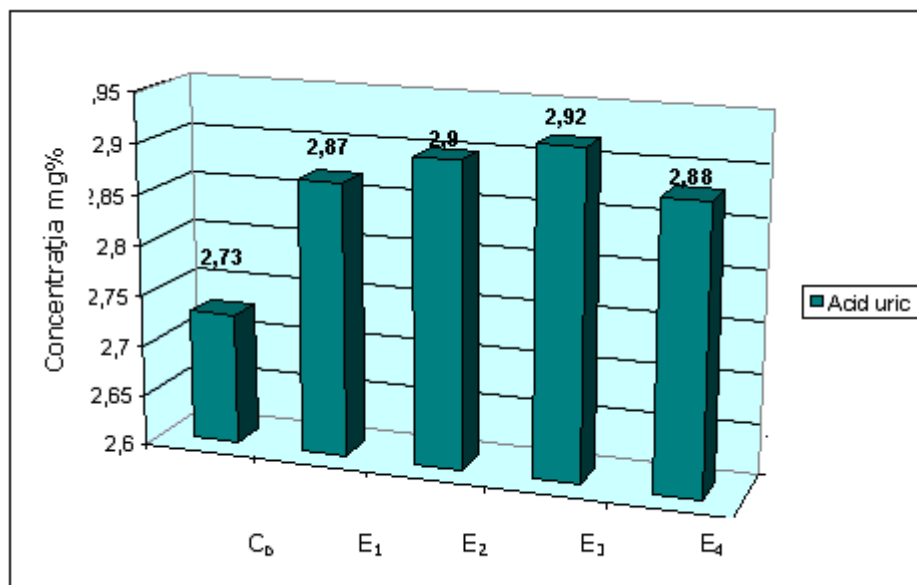


Fig. 5-3 Histograma privind concentrația acidului uric în serul sanguin

În diverse cercetări experimentale efectuate pe șobolani sau șoareci se confirmă existența de modificări biochimice, cauzate de injuria renală, după administrarea de cis-platină în diverse concentrații [310, 311] .

Creșterea moderată, nesemnificativă a concentrației acidului uric la loturile experimentale E₁ și E₄ poate fi explicată de legarea platinei la derivați purinici precursori în biogeneza acidului uric (fig. 5-3).

Un studiu în care s-au făcut determinări analitice de compuși azotați neproteici a urmărit evaluarea influenței tratării șobolanilor cu diverși complecși metalici înainte și după iradiere cu radiații γ . Astfel, s-a observat o creștere semnificativă a ureei serice, creatininei și acidului uric la șobolanii la care s-a administrat cis-platină înainte de iradiere, comparativ cu șobolanii iradiați fără tratare prealabilă cu compuși minerali [312] .

În general, în cazul afectării funcției renale apare o creștere a valorilor creatininei, ureei și acidului uric seric. În cazul unor afecțiuni hepatice și a unui aport insuficient de proteine, nivelul ureei serice este mai scăzut. Cantitatea de acid uric în sânge este crescută în cazul unei insuficiențe renale, dar este mai puțin evidentă în cazul gutei.

5.2. EFECTELE CIS-PLATINEI ASUPRA UNOR BIOMETALE

Sângele este considerat ca o formă aparte de țesut conjunctiv, alcătuit dintr-o substanță fundamentală lichidă (plasma), în care se află diferite celule (elementele figurate). Plasma are o compoziție complexă, având molecule organice, molecule anorganice și ioni metalici. Elementele figurate asigură transportul gazelor respiratorii (e.g.: eritrocitele), repararea leziunilor vasculare și hemostaza (e.g.: trombocitele), intervenția în procesele de apărare (e.g.:leucocitele).

Pentru efectuarea unui examen hematologic complet este necesară prelevarea sângelui. În cazul experimentului efectuat, s-a realizat prelevare de sânge venos, care este și cel mai utilizat în investigațiile din chimia clinică și din hematologie.

În chimia clinică obișnuit investigațiile cu caracter analitic se efectuează pe serul sanguin – procedură aplicată și în cazul prezentei lucrări – și pe sângele integral. În hematologie investigațiile interesează în special eritrocitele (globule roșii), leucocitele (globule albe) și trombocitele (plachete sanguine).

În urma prelevării are loc separarea coagulului de serul sanguin, așa numita exprimare a serului. Dacă în eprubeta în care s-a prelevat sângele se adaugă o substanță anticoagulantă, sângele se separă în două straturi: supernanatul - lichid, constituit din plasmă, și sedimentul constituit din elemente figurate [313, 314] .

Analizele hematologice oferă date cu privire la numărul, forma, și caracteristicile elementelor figurate ale sângelui [315].

Dintre parametrii biochimici s-au determinat: metaboliții azotați neproteici (urea, creatinina, acidul uric) prezentați în capitolul precedent, și electroliți sanguini (sodiul, potasiul, calciul și magneziul).

În tabelul 5-2 sunt redată valorile normale ale unor electroliți sanguini la șobolani linia Wistar, [124, 207] .

Tabel 5-2 Valorile normale ale unor electroliți sanguini la șobolani linia Wistar

Specificare		UM	Valori normale
Metale	Monovalente	Sodiu (Na)	145,10-154,60
		Potasiu (K)	4,90-5,40
	Divalente	Magneziu (Mg))	1,70-2,66
		Calciu (Ca)	5,10 – 5,60

Rezultatele experimentului expus privind concentrația electroliților Na și K din sânge după administrarea de cis-platină este prezentată în tabelul 5-3.

Homeostazia sodiului și potasiului din serul sanguin este extrem de importantă, deoarece acești ioni alături de alți ioni metalici sunt implicați în menținerea echilibrului acido - bazic și echilibrului osmotic [316]. Ionii de sodiu și potasiu au un rol deosebit de important în funcționarea pompei Na-K de la nivel membranar [231] .

Tabel 5-3. Concentrația ionilor de Na și K în serul sanguin

Specificare	n	Na	K
		mmol/L	mmol/L
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Grup C _b	10	108.80±13.02	4.88±0.31
Grup E ₁	10	91.80±5.67	6.42±0.63**
$\Delta \bar{X}$		-17.00	+1.54
Grup E ₂	10	90.60±1.92**	6.12±1.12
$\Delta \bar{X}$		-18.20	+1.24
Grup E ₃	10	87.90±0.12*	6.23±2.14**
$\Delta \bar{X}$		-20.90	+1.35
Grup E ₄	10	86.20±3.49*	6.62±0.38*
$\Delta \bar{X}$		-22.60	+1.74

n – număr de animale

*p<0,01; ** p<0,05

Din datele prezentate reiese că la grupurile experimentale la care s-a administrat cis-platină se manifestă hiponatremie comparativ cu grupurile de control (fig. 5-4).

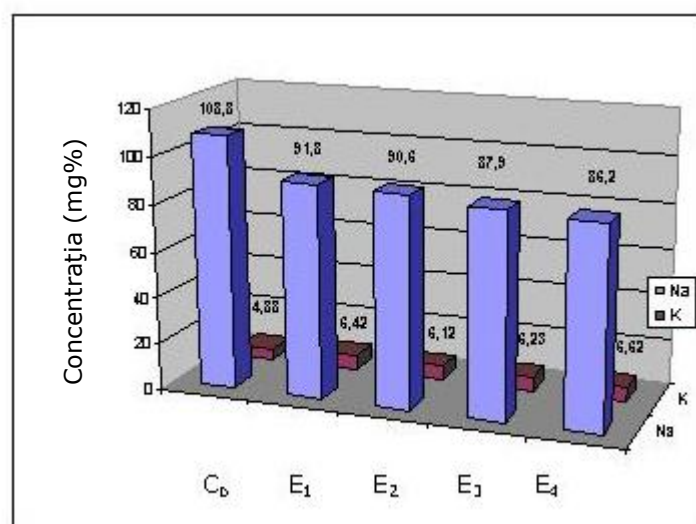


Fig. 5-4 Histograma privind concentrația ionilor Na și K în ser sanguin

În cazul sodiului apare o scădere a concentrației acestui metal în serul sanguin la loturile experimentale, comparativ cu grupul de control. Având în vedere că valorile plasmatiche ale sodiului se află în echilibru cu cele provenite din lichidul interstițial, determinarea concentrației serice a sodiului poate fi reprezentativă și pentru concentrația acestuia în lichidul extracelular.

Conform datelor oferite de RDA-Human Nutrition, sodiul este cationul cel mai abundent în sânge, cu rol în menținerea presiunii osmotice extracelulare, echilibrului acido – bazic. Natremia nu reflectă variația concentrației sodiului din organism și nici nu oferă informații cu privire la volumul lichidelor extracelulare, ci reprezintă un indice al proporției de apă din lichidele extracelulare [317, 318] .

Principalul rol al sodiului în organism rezidă din diferența mare dintre concentrația intra- și extracelulară, având în vedere că este principalul component osmolar extracelular.

Scăderea sodiului de la nivel sanguin poate fi un artefact, (pseudohiponatremie), sau un fenomen care însoțește modificarea echilibrului apă/sodiu în lichidul extracelular [319]. Un mecanism hiponatremiant poate apare și în cazul unei hipoproteinemii, când se poate realiza un „deficit anionic” care în mod

compensator induce o scădere a sodiului din sânge. În cazul experimentului nostru, hiponatremia poate fi asociată cu o scădere a proteinelor serice.

Scăderea concentrației de sodiu poate fi produsă și de creșterea cantității de lichide din corp, în cazul limitării acesteia de o afecțiune renală sau de o capacitate scăzută de funcționare a acesteia [302, 320, 321].

Hiponatremia indusă de cis-platină poate fi explicată prin pierderea de săruri la nivel renal și se caracterizează printr-o osmolaritate serică scăzută și o osmolaritate urinară crescută în absența diureticelor [322-324]. De asemenea, valori scăzute ale sodiului pot apare în cazul tulburărilor gastrointestinale, a acidozei premergătoare comei diabetice, în cazul diabetului insipid. Scăderea concentrației sodiului se poate datora hemodiluției sau acumulării sodiului în celule din cauza disfuncționalității pompei ionice Na/K, iar deplețiile de sodiu sunt o consecință a pierderilor de sodiu mai ales pe cale renală.

Menținerea diferenței de concentrație extra- și intracelulară a sodiului și potasiului se face cu un consum mare de energie. Expulzarea sodiului din celulă se face în contra gradientului de concentrație implicând și modificarea potențialului electric. Transportul activ al sodiului și potasiului la nivel membranar este mediată de o enzimă specifică prezentă la acest nivel, numită adenozintrifosfataza (ATP-aza) dependentă de sodiu și potasiu. Mecanismul de transport al sodiului și potasiului previne ruperea membranei celulare prin menținerea echilibrului osmotic. De asemenea, deoarece multe procese metabolice depind de concentrația ridicată de potasiu și scăzută de sodiu la nivel intracelular, (i.e. propagarea impulsului nervos, absorbția tubulară renală a unor electroliți sau absorbția intestinală a unor principii nutritive), de aceea echilibrul Na-K este de mare importanță.

Datorită sarcinii pozitive potasiul asigură electroneutralitatea mediului celular, fiind principalul component osmolar intracelular [325-327]. După cum am menționat anterior, echilibrul dintre ionii de sodiu și potasiu este mediat de enzima „ATP-aza dependentă de sodiu și potasiu”. Ieșirea sodiului din celulă este asociată cu pătrunderea potasiului la acest nivel. Potasiul participă la sinteza și secreția unor hormoni: glucagon, insulină, STH, aldosteron și catecolamine prin sistemul renină – angiotensină.

Potasiul are un efect diuretic datorită intervenției în eliminarea apei și a clorurii de sodiu. Din totalul de potasiu difuzabil în organism 95% se află în plasmă și numai 5% se află în compartimentul intracelular. Nivelul potasemiei este

rezultatul raportului dintre cantitatea globală de potasiu și capacitatea tisulară de a fixa potasiul, de aceea nu reflectă starea capitalului de potasiu al organismului. În stări patologice variațiile potasemiei sunt mari, și se realizează atât într-un sens cât și în celălalt.

Deoarece concentrația potasiului la nivel intracelular este ridicată, nivelul acestuia în sânge va fi crescut. Acest lucru poate apare ca și consecință a unei insuficiențe renale cronice, când ca urmare a afecțiunii tubilor renali, este afectat schimbul de ioni Na^+/K^+ , cu apariția retenției de potasiu. Unul dintre primele semne ale toxicității renale induse de cis-platină este hiperpotasemia. Dacă dozele sunt crescute pot apare leziuni renale acute [328] .

Deoarece potasiul este principalul cation intracelular, formarea de celule noi, care caracterizează creșterea sau revenirea după o stare catabolică importantă, este însoțită de o retenție de potasiu.

În condiții normale bilanțul potasiului în organism este echilibrat. Un bilanț potasic pozitiv apare când aportul de potasiu se menține, iar eliminarea de potasiu scade, și în această situație apare hiperpotasemia. Un bilanț potasic negativ se realizează prin scăderea aportului și creșterea pierderilor, în acest caz potasemia este scăzută, fenomen care apare mai rar.

Conform datelor de mai sus, se observă apariția unei hiperpotasemii la grupele experimentale comparativ cu grupa de control după administrarea intraperitoneală de cis-platină.

După Stewart et al., (1997), administrarea de cisplatină poate cauza hipokaliemie la unii pacienți, dar nu au fost relatate cazuri în care nivelul potasiului poate influența apariția efectelor nefrotoxice, dar riscul apariției acestora poate fi cauzat de excreția urinară de potasiu [329]. De fapt, hipokaliemia însăși poate cauza afecțiunii renale și poate potența nefrotoxicitatea cis-platinei [330].

Hiperpotasemia poate fi cauzată de trei mecanisme fundamentale: aport crescut de potasiu, scăderea eliminărilor renale (prin injuria acestui organ) și eliberarea de potasiu din celule altor țesuturi. Pentru ca un aport crescut de potasiu să inducă hiperpotasemie trebuie să fie însoțite de o eliminare renală scăzută.

Perturbarea concentrației electroliților este ilustrată de apariția hipomagneziemiei și hipocalcemiei și se datorează toxicității renale induse de administrarea cis-platinei. De asemenea, poate apare un efect de mielosupresie cu leucocite și plachete sanguine scăzute și anemie [276] .

În tabelul 5-4 este prezentată concentrația serică a magneziului, calciului și fierului, la grupa de control (C_b) și la grupele experimentale în urma administrării de cis-platină.

Tabel 5-4. Concentrația ionilor de Mg și Ca în serul sanguin

Specificare	n	Mg mg/dL	Ca mg/dL
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Grup C_b	10	2.12±0.18	9.77±0.70
Grup E_1	10	0.93±0.59	9.54±0.56
$\Delta \bar{X}$		-1.19	-0.23
Grup E_2	10	0.65±0.85**	9.23±1.12
$\Delta \bar{X}$		-1.47	-0.54
Grup E_3	10	0.61±3.13*	9.20±3.11
$\Delta \bar{X}$		-1.51	-0.62
Grup E_4	10	0.52±0.06*	9.15±1.32
$\Delta \bar{X}$		-1.60	-0.57

n – număr de animale

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Din datele prezentate mai sus se poate observa o scădere a concentrației magneziului și calciului la grupele experimentale în comparație cu valorile obținute la grupa de control (fig. 5-5).

Magneziul este un metal cu distribuție predominant intracelulară indispensabil vieții. Magneziul extracelular, provenit din serul sanguin reprezintă aproximativ 1% din magneziul total prezent în sânge. O multitudine de factori influențează concentrația magneziului seric, cum ar fi: creșterea capacității de legare, complexarea sau chelatarea magneziului prin chelatarea de proteine în special la aminoacizii liberi. Variațiile magneziemiei sunt consecința modificărilor bilanțului global al magneziului și a modificării concentrației ionilor de Ca^{2+} și K^+ și nu reflectă decât într-o proporție relativă modificările cuantumului de magneziu din organism, deoarece Mg^{2+} , ca și Ca^{2+} este un ion predominant intracelular.

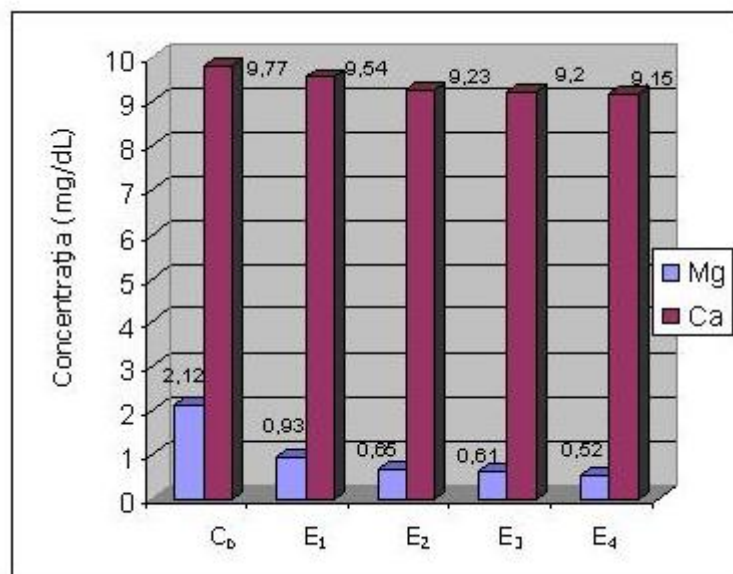


Fig. 5-5 Histograma de redare a valorii ionilor Mg și Ca în sânge

Într-un studiu efectuat, s-a demonstrat apariția unei hipomagneziemii cronice la șobolanii Wistar după administrarea cis-platinei pe cale intraperitoneală timp de trei săptămâni [331]. Concentrația scăzută de magneziu a fost evidentă după a 2-a săptămână de chimioterapie, și a persistat timp de 8 săptămâni. Deși magneziul a fost administrat în dieta zilnică, excreția urinară a acestuia a fost mult crescută comparativ cu concentrația scăzută de magneziu la nivel plasmatic.

În cazul experimentului efectuat, hipomagneziemia poate fi datorată unor modificări morfologice precum și a necrozei tubilor proximali ai rinichiului, la acest nivel având loc reabsorbția magneziului, care poate fi prevenită prin administrarea de diuretice osmotice - substanțe care intervin în filtrarea glomerulară, trec în urină și provoacă eliminarea unei cantități mari de apă, (e.g.: manitol), precum și a unei hidratări puternice și complete [332, 333].

Pe lângă alți factori care pot fi corelați cu apariția efectelor toxice, variația concentrației unor cationi poate reduce nefrotoxicitatea cis-platinei prin diverse mecanisme. Pentru unii dintre aceștia favorizarea efectelor nefrotoxice se poate datora concentrației cis-platinei la nivelul cortexului renal, iar pentru alții modul de administrare poate fi cauza apariției nefrotoxicității.

Calcemia reprezintă una din constantele fundamentale, de aceea variațiile sale fiziologice nu sunt în limite foarte largi. Calciul de la nivel sanguin se află în proporție de 60% sub formă ionizată și ultrafiltrabilă, forma activă implicată în osificarea scheletului, coagularea sângelui, precum și în excitabilitatea neuromusculară. Variațiile calcemiei au importanță patologică deoarece indică alterări profunde ale corelațiilor dintre aport – depozitare – mobilizare și eliminare [334] .

Hipocalcemia poate fi explicată prin efectul cis-platinei asupra funcțiilor renale, a perturbării metabolismului vitaminei D și a hipomagneziemiei [335]. Nivelul seric scăzut al calciului și magneziului poate fi un factor al metastazei implicat în hipercoagulabilitate, care poate participa la răspândirea celulelor neoplazice [45] .

Astfel de aspecte, referitoare la statusul homeostaziei biochimice a metalelor alcaline (Na, K), și alcalino-terose (Ca, Mg) luate în studiu se pot corela cu efectele observate la chimioterapicele citostatice intervenind ulterior în terapia adjuvantă și în alimentație [336].

Din datele prezentate în cadrul prezentului capitol se poate observa că metabolismul potasiului și magneziului suferă modificări ca urmare a absorbției intestinale și a eliminării renale apărute în urma administrării de cis-platină.

Cunoașterea modificărilor homeostazice ale electrolitemiei, apărute în urma administrării intraperitoneale de cis-platină, poate fi utilă în recomandarea unei medicații care să prevină efectele nedorite ale chimioterapiei citostatice. De asemenea, investigațiile experimentale care permit evidențierea efectelor dishomeostazice pot fi utile în dietoterapie permițând orientarea spre anumiți nutrienți prezenți în alimente sau chiar la suplimente alimentare. Deci se poate menționa că informațiile asupra dishomeostaziei pot fi utile atât în dietoterapie cât și în chimioterapie.

6. INVESTIGAREA UNOR BIOELEMENTE METALICE DIN ȚESUTURI ȘI ORGANE

Investigațiile efectuate în cadrul secundului experiment asupra animalelor de laborator (șobolani linia Wistar) incluse în grupa de control (C_b) și în grupele experimentale ($E_1 - E_4$) au urmărit prelevarea de probe sanguine și prelevarea de organe.

Prelevarea de sânge – așa cum s-a prezentat la capitolul precedent – a fost urmată de determinări analitice asupra metaboliților azotați neproteici și a principalelor metale prezente în sânge.

Prelevarea de țesuturi (i.e. mușchi) și de organe (i.e. ficat, rinichi, creier, cord, splină) – efectuată sub formă de excizate – a fost urmată de determinări analitice asupra unor macroelemente metalice alcalino-teroase (Ca, Mg) și microelemente metalice (Zn, Cu, Fe). Rezultatele analitice supuse evaluării statistice sunt prezentate în acest capitol.

6.1. PRELEVAREA PROBELOR BIOLOGICE

Inițial s-au prelevat probe din țesutul muscular, iar apoi probe de organe: ficat, rinichi, creier, cord, splină. Instrumentarul chirurgical utilizat folosit a fost sterilizat, pregătit special prelevarea probelor. În cazul folosirii unor instrumente nesterilizate, acestea pot afecta probele, prin riscul de contaminare a acestora.

Probele puse în vase de sticlă speciale spălate și uscate, prevăzute cu dop. Etichetarea sticlelor s-a făcut cu menționarea riguroasă a grupei și a individului. Pe etichetă au fost înscrise date de reper pentru probele analitice: i.e. grupa de animale (C_b , respectiv E_1-E_4), numărul animalului. Într-un tabel separat s-au înregistrat date referitoare la grupa de animale, individual, greutatea corporală, sexul, organul prelevat, etc. Probele etichetate au fost conservate în congelator la o

temperatură cuprinsă între -18°C și -20°C . Astfel au fost pregătite pentru a fi supuse ulterior calcinării și determinărilor analitice.

În astfel de cercetări se are în vedere și faptul că modul de conservare poate influența (sau chiar compromite) rezultatele experimentelor. Este necesară menținerea unor condiții de păstrare optime pentru a evita degradarea produsă de factori fizico-chimici, microbiologici etc. în cursul conservării probelor biologice. Aceste aspecte legate de modul de conservare a probelor sunt tot atât de importante și pentru probele prelevate de la animale vii anesteziate, (i.e. cazul biopsiilor) cât și în probelor prelevate de la animale care au fost în prealabil sacrificate (e.g. cazul necropsiilor). Buna desfășurare a tuturor etapelor din cadrul cercetării se repercutează asupra acurateții rezultatelor experimentale.

6.2. PREGĂTIREA PROBELOR ANALITICE

Recipientele de păstrare a probelor au fost curate, uscate, iar probele au conservate prin refrigerare spre a se evita contaminarea sau degradarea acestora. Pe durata calcinării se poate produce așa – numita "expandare" a probei provenite din organul calcinat. Nerespectarea protocolului de lucru poate duce la pierderea probei din creuzet. Astfel pot apare rezultate distorsionate, prin evaporarea unor constituenți ai probei sub formă de aerosoli.

Solubilizarea cenușii obținute la calcinare este de asemenea însoțită de riscuri, în funcție de tipul mineralizării : în sistem deschis (prin calcinare), sau în sistem închis (cuptor cu microunde). În cursul pregătirii probelor pentru investigațiile analitice există o seamă de riscuri care pot greva acuratețea rezultatelor.

În cazul unui mediu bogat în cloruri, unele bioelemente se pot volatiliza. Incompleta dizolvare a cenușii poate determina pierderea unor oligolemente nevolatile, iar un mediu bogat în sulfuri poate determina eliminarea cuprului și a mercurului sub formă de sulfuri.

Determinările analitice ale metalelor s-au efectuat prin spectrofotometria de absorbție atomică. Pentru analiza spectrofotometrică au fost folosite probe de țesut umed provenit de la animalele de experiență. Probele scoase din congelator au fost dezghețate și cântărite cu o balanță analitică din seria AFA/210 – LC și puse în

creuzete de porțelan. Creuzetele au fost fiecare marcate, fiind notat numărul probei introduse în calcinator.

Protocolul de lucru al calcinării a fost stabilit în prealabil, și anume, calcinarea inițială la 100°C timp de 2 ore, apoi la 200°C timp de 4 ore, după care temperatura se ridică la 450°C timp de 18 ore, în total probele fiind calcinate 24 de ore. Calcinarea în trepte se realizează pentru a evita "expandarea" cenușii rezultate din țesutul luat în studiu pe durata deshidratării și a calcinării probei, precum și evitarea pierderilor de metale cu volatilitate mare.

În anumite momente ale calcinării s-a verificat cenușa, pentru a nu prezenta puncte negre, care pot apare datorită unor substanțe organice neoxidate.

După calcinare a urmat răcirea probelor la o temperatură care să permită scoaterea acestora din calcinator. În cazul unei calcinări incomplete cenușa a prezentat puncte negre fiind tratată cu o soluție de acid azotic: apă 1:1, în volum de 5 ml pentru fiecare creuzet, cu o pipetă, spălând pereții creuzetului. Creuzetele au fost puse pe o baie de nisip sub nișă pentru evaporarea lentă a acidului până la sec. Cenușa aflată pe hârtia de filtru a fost reluată cu acid azotic 5%, după o prealabilă umectare a hârtiei de filtru, și colectată într-un balon cotat de 50 ml. Astfel s-a obținut soluția de lucru, care ulterior a fost supusă analizei spectrofotometrice.

6.3. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A BIOELEMENTELOR

După calcinare cenușa, care conținea elementele metalice provenite din organele prelevate de la șobolani, a fost adusă în soluție și supusă analizei prin spectrofotometrie de absorbție atomică în flacără. S-a utilizat spectrofotometrul VARIAN Spectra A 110.

Metalele au fost analizate folosind lămpi, după cum urmează: magneziul la 202,6 nm curentul lămpii fiind de 4 mA, calciul la 422,7 nm, prin spectrofotometrie de emisie-absorbție, cuprul la 324,8 nm, la același curent de 4 mA al lămpii, zincul la 213,9 nm la un curent de 5 mA, iar fierul la 248,3 nm la același curent de 5 mA al lămpii.

Citirea valorilor are la bază o anumită tehnică de lucru. Astfel, aparatul se deschide cu aproximativ 30 de minute înainte de începerea citirilor, acesta reprezintă de fapt timpul de " intrare în regim de funcționare" a aparatului. Lămpile catodice s-au verificat cu aproximativ 15 minute înainte de începerea măsurătorilor. S-a definit punctual "0" pe scala aparatului, și s-a efectuat reglarea parametrilor

operaționali. S-a cuplat compresorul de aer, s-a deschis robinetul buteliei de acetilenă, și s-a aprins flacăra. Inițial s-a aspirat în tubul capilar apă bidistilată, reglând poziția arzătorului pentru a stabili punctual "0". Ulterior s-a procedat la aspirarea succesivă a soluției standard, măsurând absorbția pentru fiecare serie de determinări și pentru fiecare soluție etalon.

După trasarea curbelor de etalonare cu concentrații care să se încadreze în domeniul liniar, s-au citit absorbanțele probelor, aria picurilor rezultate fiind o măsură a concentrației de metal din soluție. Soluția de lucru a fost diluată, astfel încât concentrația obținută să fie în domeniul de măsurare posibil.

După determinarea cantitativă a bioelementelor metalice rezultatele au fost centralizate și tabelate.

6.4. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN ȚESUTURI ȘI ORGANE

Prin experimentul efectuat a fost urmărită modificarea homeostaziei biochimice prin variația concentrației unor bioelemente în diferite țesuturi și organe, după administrarea de cis-platină, precum și modul în care aceasta afectează respectivele organe dar și instituirea de măsuri care pot fi luate în sensul diminuării acestor efecte nedorite.

Determinarea cuantumului elementelor biometalice a fost realizată din probe de țesuturi și organe prelevate de la animalele de laborator, și anume: ficat, rinichi, creier, cord, splină și mușchi.

6.5. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN FICAT

Ficatul este considerat o blanda anexă a tubului digestiv care are capacitatea de a stoca o mare cantitate de sânge datorită puternicei vascularizații vehiculând astfel și un important quantum de metale. Celulele hepatice sunt foarte active, cu o rată ridicată a metabolismului, fiind implicate în biotransformarea carbohidraților, lipidelor, proteinelor, în producerea de substanțe cu rol în procesele de coagulare, în eliminarea metaboliților reziduali și a produșilor reziduali ai xenobioticelor.

Ficatul reprezintă constituie un organ foarte activ din punct de vedere biochimic, având și capacitatea de a detoxifia și ulterior de a excreta în bilă o mare cantitate de xenobiotice. Leziunile hepatice duc la acumularea unor substanțe în lichidele biologice. Ficatul are rolul de detoxifiere a organismului. De asemenea, în ficat se găsesc o serie de enzime, cum ar fi ceruloplasmă, citocromoxidaza, liziloxidaza, monoaminoxidaza, superoxid-dismutaza, ascorbicoxidaza, tirozinaza, etc, cu funcții vitale în organism [337].

În tabelul 6-1 este prezentat cuantumul magneziului și calciului în ficat la șobolanii Wistar – rezultatele obținute în cadrul experimentului efectuat.

Tabel 6-1. Concentrația calciu și magneziu în ficat

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	45,52 \pm 7,53	263,16 \pm 42,63
Grupa E ₁	10	46,67 \pm 7,95	269,16 \pm 45,89
$\Delta \bar{X}$		+1,15	+5,98
Grupa E ₂	10	47,55 \pm 6,26	278,64 \pm 48,14
$\Delta \bar{X}$		+2,03	+15,48
Grupa E ₃	10	48,92 \pm 7,65	287,71 \pm 50,64**
$\Delta \bar{X}$		+3,40	+24,55
Grupa E ₄	10	50,98 \pm 7,80*	294,73 \pm 52,56*
$\Delta \bar{X}$		+5,46	+31,57

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Conform celor prezentate se poate observa cum, în cazul ficatului, concentrația calciului nu prezintă diferențe semnificative, apărând variații ale concentrației la grupele experimentale (E₁-E₄), precum și la grupa de control (C_b) – fig. 6-1.

În general, creșterea concentrației ionilor de calciu la grupele experimentale reprezintă un semn de mare importanță care relevă mobilizarea excesivă de săruri

de calciu din țesuturi, a unei perturbări în eliminarea renală sau a asocierii acestor mecanisme. Aceste manifestări pot fi cauzate de hiperparatiroidism, și mai rar de neoplasme osoase, afecțiuni renale cronice, intoxicație cronică cu vitamina D.

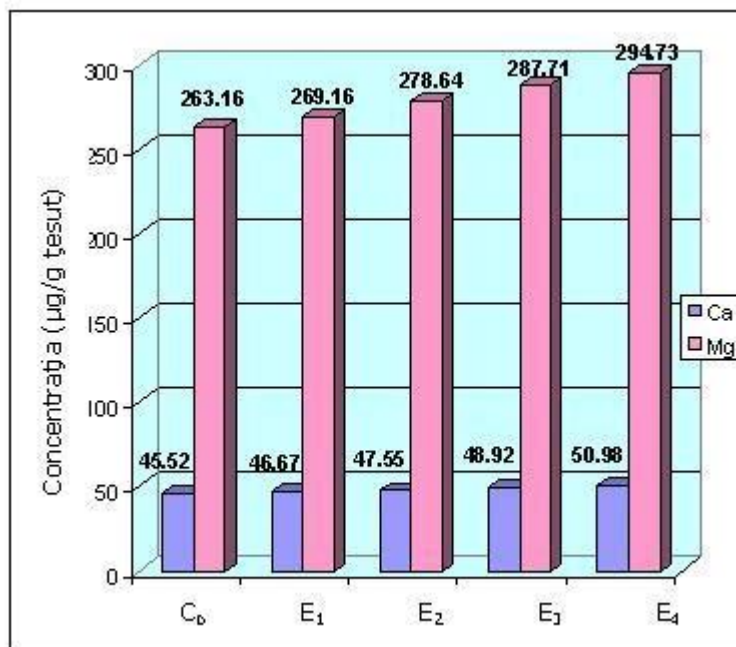


Fig. 6-1 Histograma de redare a valorii ionilor Mg și Ca în ficat

Din datele prezentate anterior, în ficat se constată de asemenea o acumulare de magneziu. Deoarece magneziul este un cofactor enzimatic important pentru un număr mare de enzime, iar ficatul este sediul a numeroase enzime fiind implicat în metabolismul intermediar și în detoxifierea organismului, se poate explica prezența magneziului în concentrații mărite la grupele experimentale comparativ cu grupul de control [338].

Seria de analize efectuate pentru decelarea concentrației zincului, cuprului și fierului în ficatul șobolanilor Wistar este prezentată în tabelul 6-2.

Zincul este prezent în structura metaltoinei, care acționează ca un sistem transportor. De asemenea, este un compus esențial al enzimei superoxid dismutaza, (SOD), alături de cupru. Această enzimă este un compus antioxidant puternic cu rol în legarea radicalilor liberi [339]. Enzima SOD catalizează descompunerea ionului superoxid, generând radicalii liberi [340].

Datorită importanței zincului în activitatea unor enzime, se presupune că variația concentrației zincului produce o schimbare biochimică semnificativă a substratului folosit de enzimă [341].

Tabel 6-2. Concentrația zincului, cuprului și fierului în ficat

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	32,93 \pm 5,48	9,26 \pm 1,52	195,05 \pm 27,50
Grupa E ₁	10	34,57 \pm 5,76	9,38 \pm 1,64	189,87 \pm 26,53
$\Delta \bar{X}$		+1,64	+0,12	-5,18
Grupa E ₂	10	35,18 \pm 5,93	9,59 \pm 1,90	184,79 \pm 24,31
$\Delta \bar{X}$		+2,25	+0,33	-10,26
Grupa E ₃	10	35,76 \pm 6,21	9,97 \pm 2,16	178,33 \pm 24,76**
$\Delta \bar{X}$		+2,83	+0,71	-16,72
Grupa E ₄	10	36,89 \pm 6,75*	10,37 \pm 2,30*	171,71 \pm 23,90*
$\Delta \bar{X}$		+3,96	+1,11	-23,34

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Datele prezentate în tabelul 6-2 ilustrează concentrația zincului în ficat. Acestea sunt direct proporționale cu doza administrată, putându-se observa o creștere a concentrației acestuia la grupele experimentale comparativ cu grupul de control.

Studii efectuate au arătat că, în urma administrării de cis-platină are loc o creștere a peroxidării lipidice la nivelul rinichiului și al ficatului, cu scăderea concentrației unor enzime și vitamine cu rol antioxidant (e.g.: glutation – peroxidaza, vitaminele A și E), cu apariție efectelor nefrotoxice și hepatotoxice[342]. Reacțiile cu formare de radicali liberi sunt responsabile pentru multe din reacțiile adverse ale chimioterapicelor, iar modalitatea de protecție a celulelor necanceroase

și a organelor de acțiunea agenților citostatici este aceea de a administra antioxidanți [343, 344] .

Importanța zincului pentru metabolismul proteic a fost evidențiată la șobolani, unde în ficat, stimulează biosinteza DNA. Scăderea încorporării timidinei radioactive în carența de zinc stimulează sinteza DNA.

Cu privire la cupru, din datele prezentate în tabel 6-2 se observă o creștere a concentrației acestui metal la grupele experimentale comparativ cu grupa de control, despre cupru cunoscându-se faptul că este implicat ca și cofactor enzimatic într-o serie de reacții metabolice din organism.

După [345] supraîncărcarea hepatică a cuprului determină leziuni hepatice progresive.

Din analiza datelor experimentului nostru, putem presupune că administrarea de cis-platină nu favorizează apariția unor tulburări hepatice cronice [346].

Cuprul acționează împotriva bolilor hepatice cronice și favorizează sinteza de colagen. În bolile hepatice cronice concentrația cuprului crește, în timp ce concentrația calciului, magneziului și a zincului scade [347, 348].

Ficatul reprezintă organul care reflectă cel mai bine statusul cuprului în organism, astfel că determinările hepatice de cupru evaluează cel mai bine statusul acestuia în organism. Depozitarea majoră a cuprului hepatic are loc în celulele parenchimotoase, dar cuprul poate apare și în alte formațiuni (i.e. celulele Kupffer) în caz de intoxicație. Distribuția intracelulară a cuprului, în caz de exces, se produce la nivelul nucleului, mitocondriilor și lizozomilor. Cea mai mare parte a cuprului mitocondrial este localizată la nivelul membranei interne a acesteia. La acest nivel, cuprul stocat reprezintă un rezervor pentru sinteza de citocromoxidază care conduce la reducerea cantității de cupru din membrana mitocondrială internă.

Atomii de cupru din compoziția ceruloplasminei stau la baza utilizării cuprului în biosinteza de citocromoxidază. Este cunoscut faptul că o scădere a concentrației de cupru duce la o scădere a citocromoxidazei la nivel de cord, ficat, pulmon și pancreas. Administrarea de ceruloplasmică la șobolani este urmată de reluarea activității citocromoxidazei într-o măsură mult mai mare decât după administrarea altor forme de cupru [349] .

Antagoniștii cuprului pot interfera absorbția intestinală dar și stocarea sa la nivel hepatic. Dintre aceștia putem aminti calciul, zincul, fierul.

Astfel, calciul în exces, așa cum este cazul experimentului nostru, inhibă absorbția cuprului prin creșterea pH-ului mediului digestiv. Cuprul precipită sub formă de hidroxid la pH de 5,5, fiind necesară o cantitate relativ redusă de calciu pentru a aduce pH-ul la nivelul la care ionul de cupru precipită. Calciul poate preveni acumularea periculoasă a cuprului în ficat.

În competiție directă cu zincul se află și cuprul pe parcursul procesului de absorbție. Un exces de zinc poate provoca o scădere a activității citocromoxidazei hepatice și poate reduce toxicitatea cuprului. În cazul unei carențe de zinc, are loc o creștere a absorbției de zinc, dar și de cupru.

Interrelația dintre zinc și cupru constă în faptul că excesul primului are ca urmare diminuarea depozitului hepatic al cuprului și reducerea activității citocromoxidaze hepatice, concomitent cu creșterea cuprului plasmatic pe seama celui mobilizat din ficat.

Deși are numeroase interrelații cu cuprul, fierul îl competiționează direct la nivelul absorbției digestive, interferența fiind reciprocă, având în vedere că în cazul unei carențe de fier la șobolani concentrația hepatică de cupru este crescută, aspect care poate fi observat și în cazul experimentului nostru.

În urma absorbției, cuprul este legat de albumina serică, cu care este distribuit la țesuturi și este captat de eritrocite. Fixarea cuprului de albumina serică este un alt proces în care se poate evidenția antagonismul dintre cupru și zinc.

În condiții normale, majoritatea cuprului absorbit este distribuit în ficat, care este principalul organ implicat în metabolismul cuprului.

Între ionii de cupru și fier există o relație de interdependență, ambii fiind implicați în hemoglobinogeneză deci și în hematopoeză. Carența de cupru induce o creștere a depozitelor de fier la nivel de ficat și viceversa. Administrarea de cupru la șobolani care au carență de cupru determină mobilizarea fierului hepatic și creșterea concentrației fierului sanguin.

Din analiza datelor referitoare la cantumul fierului în ficat, (v. fig. 6-2) se poate observa scăderea concentrației fierului la grupele de experimentale comparativ cu grupul de control, această scădere fiind proporțională cu doza administrată.

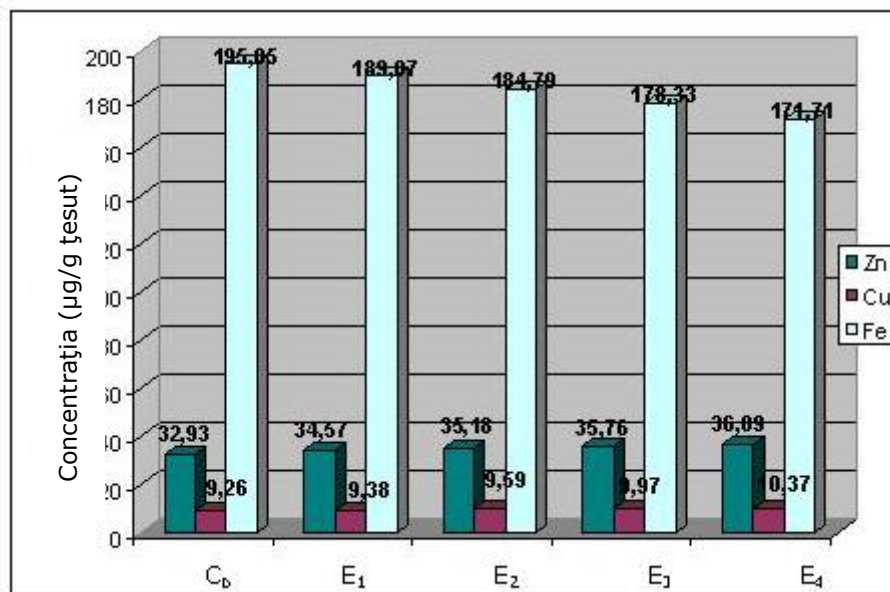


Fig. 6-2 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în ficat

În cazul carenței de fier la șobolani se constată o creștere a concentrației de cupru în ficat, distribuția cuprului acumulat excesiv la nivel intracelular fiind asemănătoare cu cea constatată în cazul cu cea a administrării parenterale a cuprului.

Dacă depozitarea cuprului în ficat devine excesivă se poate instala ciroza. Creșterea valorilor cuprului la nivel hepatic se poate datora deteriorării sintezei de ceruloplasmină, sau a unui defect al încorporării cuprului în globulina care –l leagă.

Fierul, cu excepția celui din structura hemoglobinei, se află depozitat în ficat sub formă de feritină. Hepatocitele conțin o cantitate mare de apoferină care au capacitatea de a lega fierul, formând feritina. La o scădere a concentrației fierului în lichidele biologice, acesta este eliberat din feritină și transportat în sânge. Prin urmare putem presupune că sistemul feritină – apoferină acționează ca un sistem tampon dar și ca un mediu de stocare a fierului.

Având în vedere implicarea fierului în procesele de coagulare, precum și prezența acestuia în structura hemoglobinei, se poate explica prezența unei cantități scăzute de fier în ficat la grupele experimentale, comparativ cu grupul de control, datorată, probabil, apariției leziunilor hepatice. O altă explicație ar putea fi bazată pe aspectele menționate mai sus, și anume, că la o scădere a concentrației fierului

În lichidele biologice, acesta este mobilizat din depozitele localizate la nivel hepatic, și transportat în fluxul sanguin. Dacă luăm în considerare faptul că se remarcă o creștere a valorilor fierului la nivel sanguin, aceasta poate sugera existența unei interdependențe în raport cu scăderea concentrației fierului hepatic.

Fierul hepatic catalizează peroxidarea lipidelor. Supradozarea cu fier poate provoca o creștere a ratei de peroxidare a lipidelor, însoțită de o degradare a reticulului endoplasmatic și, ca și consecință scade capacitatea de oxidare a ficatului [349].

Datele ce ilustrează afectarea ficatului în urma administrării de cisplatină pot fi sintetizate astfel: concentrația calciului este crescută la grupele la care se administrează doze mai mari de cisplatină, și concentrația magneziului prezintă creșteri semnificative. Atât concentrația zincului cât și a cuprului este crescută în cazul ficatului, ceea ce arată apariția fenomenului de sinergism între cele două metale după administrarea de cis-platină. Concentrația ionilor de fier este scăzută, probabil datorită leziunilor hepatice.

6.6. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN RINICHI

Rinichiul are trei funcții majore: de excreție, de menținere a volumului lichidului extracelular și este sediul de sinteză a unor hormoni. Rinichiul este totodată organul cel mai afectat de administrarea cis-platinei, consecința acesteia fiind apariția efectelor nefrotoxice: afectarea reabsorbției tubulare, glomerulonefrită, chiar insuficiență renală [350 – 353].

Rinichiul este principalul responsabil de menținerea homeostaziei, și a echilibrului hidroelectrolitic. Rinichiul este implicat în formarea urinei, reglarea balanței hidro-electrolitice, a echilibrului acido-bazic, excreția produșilor rezultați din metabolismul proteic, are funcție endocrină și intervine în conservarea proteinelor. Datele cunoscute din literatură relevă acumularea cis-platinei la nivel renal, precum și efectele nefrotoxice ale acesteia [329, 354, 355].

În tabelul 6 -3 este prezentată variația concentrației unor bioelemente în rinichi după administrarea de cis-platină, la grupele experimentale comparativ cu grupul de control prezentându-se diferențele mediilor.

Din datele prezentate se poate observa o scădere a concentrației calciului la grupele experimentale comparativ cu grupul de control, scăderea fiind proporțională cu doza administrată (v. fig. 6-3).

Tabel 6-3. Concentrația calciului și magneziului în rinichi

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	63,18 \pm 10,53	204,27 \pm 40,90
Grupa E ₁	10	62,00 \pm 10,20	199,40 \pm 33,20
$\Delta \bar{X}$		-1,18	-4,87
Grupa E ₂	10	61,57 \pm 10,42	194,84 \pm 32,47
$\Delta \bar{X}$		-1,61	-9,43
Grupa E ₃	10	59,88 \pm 9,22**	187,99 \pm 31,33**
$\Delta \bar{X}$		-3,30	-16,28
Grupa E ₄	10	57,86 \pm 8,85**	180,06 \pm 29,52*
$\Delta \bar{X}$		-5,72	-24,11

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Este cunoscut faptul că rinichiul are un rol foarte important în homeostazia ionilor de calciu și magneziu prin capacitatea de a modifica excreția acestora în funcție de necesitățile organismului.

Calciul și magneziul au roluri fundamentale în organism participând la numeroase procese metabolice. Marea parte din aceste metale se află depusă în schelet sub formă de săruri, constituind, alături de ionii de fosfat componenta minerală care conferă rezistență și stabilitate oaselor. O mică cantitate se află sub formă de ioni Ca²⁺ și Mg²⁺ în celule și fluidele corpului, cu rol important în contracția musculaturii netede și striate, coagularea sângelui, transmiterea impulsurilor nervoase. Concentrația acestor ioni este menținută constantă de mecanisme care reglează homeostazia intervenind în absorbția intestinală, mobilizarea acestora din sistemul osos, eliminarea intestinală și renală.

Hipocalcemia apărută la grupele experimentale este o consecință a hipomagneziemiei poate fi datorată scăderii secreției de parathormon, ca urmare a apariției efectelor nefrotoxice secundare administrării de cis-platină [356].

În menținerea nivelului magneziemiei un rol esențial îi revine rinichiului, care intervine și în prevenirea creșterilor spectaculoase ale concentrației plasmatiche ale acestui ion.

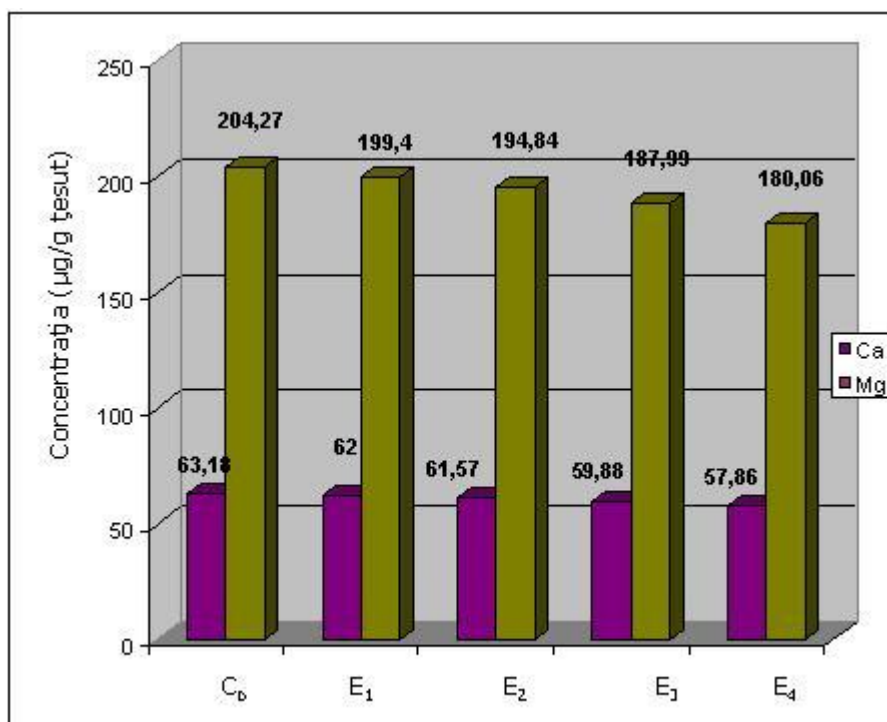


Fig. 6-3 Histograma de redare a valorii ionilor Mg și Ca în rinichi

Studiul mecanismelor implicate în menținerea homeostaziei magneziului este incomplet dar se pare că rinichiul are un rol important în menținerea cu variații reduse, a concentrației plasmatiche a ionilor de magneziu, deoarece poate excreta rapid cantități excesive de magneziu din organism sau poate sista eliminarea în cazul deplețiilor de magneziu.

Depleția de magneziu și hipomagneziemia sunt urmarea bilanțului negativ al magneziului. Datorită capacității crescute a rinichiului de a reține magneziul, aportul alimentar scăzut nu poate produce depleția de magneziu. Aceasta poate fi cauzată

de afecțiuni caracterizate prin pierderi masive asociate cu tulburări de absorbție intestinală.

Manifestările clinice ale depleției de magneziu constau în tulburări musculare și comportamentale. Cercetările experimentale au arătat că depleția de magneziu produce la șobolani tulburări ale funcției renale, caracterizate prin proteinurie, calciurie, aminoacidurie și scăderea capacității de concentrare [357-360].

Una dintre cauzele hipomagneziemiei apărute la nivel renal în urma administrării de cisplatină ar fi și terapia cu diuretice, manitolul fiind prezent în compoziția produsului Sin-Platin, care a fost administrat la animalele de laborator, în cazul experimentului efectuat.

În continuare, tabelul 6-4 prezintă variația concentrației zincului, cuprului și fierului în rinichi la șobolani Wistar după administrarea de cis-platină. Datele obținute de la grupele experimentale sunt comparate cu grupa de control.

Tabel 6-4. Concentrația zincului, cuprului și fierului în rinichi

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	23,87 \pm 3,98	5,46 \pm 1,36	58,23 \pm 11,65
Grupa E ₁	10	24,57 \pm 4,13	5,57 \pm 1,39	59,74 \pm 12,30
$\Delta\bar{X}$		+0,70	+0,11	+1,51
Grupa E ₂	10	25,33 \pm 4,30	5,62 \pm 1,40	61,06 \pm 13,01
$\Delta\bar{X}$		+1,46	+0,16	+2,83
Grupa E ₃	10	25,99 \pm 4,51	5,80 \pm 1,42	62,65 \pm 13,95**
$\Delta\bar{X}$		+2,12	+0,34	+4,42
Grupa E ₄	10	26,73 \pm 4,90*	6,05 \pm 1,46**	64,71 \pm 14,95*
$\Delta\bar{X}$		+2,86	+0,59	+6,48

n - număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Datele prezentate în fig. 6-4 relevă o creștere a concentrației zincului în rinichi la grupele experimentale comparativ cu grupa de control, creșterile fiind semnificative la grupele experimentale E₂, E₃ și E₄ ($p < 0.05$; $p < 0.01$).

Zincul formează complexe stabile cu aminoacizii histidina și cisteina aflați în structura proteinelor. De asemenea zincul intră în compoziția a 200 de metaloenzime. O parte din acestea sunt implicate în sinteza acizilor nucleici și a proteinelor (e.g.: DNA și RNA polimeraza, revers-transcriptaza). Zincul este implicat în sinteza metaltioneinei, care intervine în metabolismul cuprului și zincului. Proteinele realizează legături preferențial cu cuprul și nu cu zincul, cu formarea unor complexe non-absorbabile la nivelul tractului gastrointestinal, diminuând absorbția cuprului.

La nivelul ficatului, declanșarea sintezei de metaltioneină este importantă în condiții de stress când zincul este blocat la nivel hepatic. Proteinele cu zinc realizează legături cu macromolecula de DNA, fiind implicate în sinteza de metaltioneină.

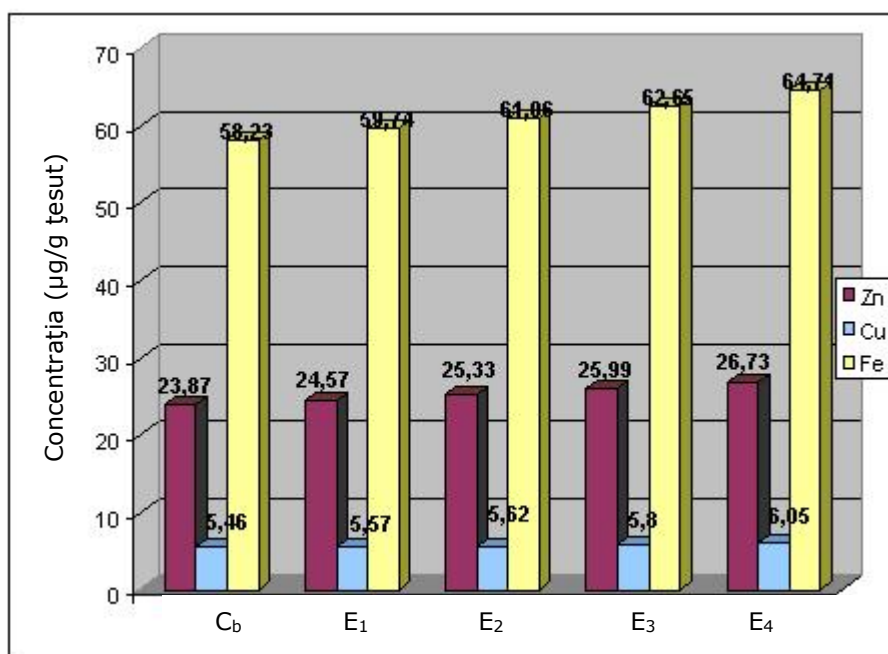


Fig. 6-4 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în rinichi

Având în vedere implicarea zincului în activitatea enzimelor cu rol în sinteza proteinelor și a acizilor nucleici, este explicabil rolul său în procesul de replicare [86].

În ceea ce privește concentrația ionilor de cupru în rinichi, nu se observă variații majore la grupele experimentale comparativ cu grupul experimental, apărând doar ușoare creșteri la grupele experimentale, creșterile fiind semnificative la grupele la care au fost administrate doze mai mari de cis-platină.

Ionii metalici, printre care și ionii de cupru au un rol important în producerea radicalilor liberi [361, 362]. Radicalii liberi generați induc peroxidarea lipidică, influențează sinteza proteinelor, cu efect asupra țesuturilor datorită inducerii unor procese de mutagenză la nivelul macromoleculei de DNA [363 – 366].

O creștere a concentrației ionilor de cupru în circulația sanguină duce la distrucția membranei eritrocitare. Ca urmare a acestui efect distructiv, fierul din eritrocitele lezate se poate acumula la nivel tisular, acesta fiind o posibilă explicație privind concentrațiile ridicate de fier la loturile experimentale la care s-a administrat cis-platină.

Din datele prezentate anterior (fig. 6-4) se poate observa apariția unei creșteri a concentrației de fier la nivel renal, creștere care este proporțională cu doza administrată grupurilor experimentale.

Ionii de fier sunt prezenți în structura hemoglobinei, implicată în transportul oxigenului dar asigură și menținerea structurii unor coenzime cu structură tetrapirolică. Afectarea funcției renale prin administrarea de cis-platină se află la originea acumulării de fier la nivel renal [367].

Concluziile cu privire la afectarea rinichiului în urma administrării de cis-platină se pot rezuma astfel: concentrația magneziului scade cu 31.7 % la grupa E₁, cu 68.3% la grupa E₂, cu 63.5% la grupa E₃ și cu 53.6% la grupa E₄. Concentrația calciului este scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Apare o acumulare a fierului la nivel renal concretizată în creșterea concentrației ionilor de fier. În ceea ce privește concentrația cuprului și a zincului, se observă creșterea concentrației cuprului și zincului la grupele experimentale E₁- E₄ comparativ cu grupa de control (C_b). Astfel, și la nivelul rinichiului, între ionii de cupru și zinc, se constată o relație de sinergism după administrarea cis-platinei. Relații de antagonism s-au observat în raport cu metalele alcalino-terose.

6.7. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN CREIER

În tabelul 6-5 sunt prezentate concentrațiile calciului și magneziului prezente în creier, prelevat de la șobolanii Wistar din grupele luate în studiu.

Conform celor prezentate în tabelul 6-5 se poate observa că în cazul calciului, concentrația acestuia la nivelul creierului scade la grupele experimentale comparativ cu grupa de control.

Tabel 6-5. Concentrația calciului și magneziului în creier

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	41,27 \pm 8,24	143,30 \pm 23,80
Grupa E ₁	10	40,38 \pm 6,84	140,73 \pm 23,46
$\Delta \bar{X}$		-0,89	-2,57
Grupa E ₂	10	39,24 \pm 6,77	136,18 \pm 22,70
$\Delta \bar{X}$		-2,03	-7,12
Grupa E ₃	10	37,95 \pm 7,89	133,04 \pm 22,17**
$\Delta \bar{X}$		-3,32	-10,26
Grupa E ₄	10	36,46 \pm 6,41*	126,98 \pm 25,40*
$\Delta \bar{X}$		-4,81	-16,32

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

În organism scăderea concentrației calciului seric (hipocalcemia) și a calciului tisular poate apare ca urmare a aportului deficitar fosfocalcic, a eliminărilor excesive la nivel digestiv sau renal, sau ca urmare a creșterii fosfatemiei. Cauza cea mai frecventă a hipocalcemiilor este hipoparatiroidismul, care se poate asocia și cu alcaloza, hipokaliemia și hipomagneziemia.

În ceea ce privește variația concentrației magneziului în creier, se observă o scădere considerabilă a concentrației acestuia la grupele experimentale

comparativ cu grupul de control. Depresia concentrației tisulare a magneziului este o caracteristică generală a acțiunii cis-platinei .

Magneziul are o influență puternică asupra sistemului nervos central (este implicat în inducerea somnului) și periferic (deprimă placa neuromotorie, având un efect antispastic).

La nivel sanguin hipomagneziemiile apar în urma unor tulburări ale absorbției intestinale, afecțiunilor pancreatice, cirozelor, alcoolismului [368-370].

Tabelul 6-6 prezintă cuantumul altor biometale: zinc, cupru și fier în probele de creier prelevate de la șobolanii Wistar.

Tabel 6-6. Concentrația zincului, cuprului și fierului în creier

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	12,63 \pm 2,10	2,95 \pm 0,49	27,65 \pm 4,60
Grupa E ₁	10	12,27 \pm 2,04	2,83 \pm 0,47	26,66 \pm 5,33
$\Delta\bar{X}$		-0,36	-0,12	-0,99
Grupa E ₂	10	11,87 \pm 1,96	2,78 \pm 0,46	25,73 \pm 5,14
$\Delta\bar{X}$		-0,76	-0,17	-1,92
Grupa E ₃	10	11,61 \pm 1,60	2,69 \pm 0,66	25,01 \pm 4,75
$\Delta\bar{X}$		-1,02	-0,26	-2,64
Grupa E ₄	10	11,13 \pm 1,48*	2,61 \pm 0,62**	24,27 \pm 4,26*
$\Delta\bar{X}$		-1,50	-0,34	-3,38

n – număr de animale

*p< 0,01; ** p<0,05

Din datele prezentate în tabelul 6-6 se poate observa o scădere a concentrației zincului în creier la grupele experimentale E₁ și E₂, la care s-a administrat o doză mai scăzută de cis-platină, urmată de o ușoară creștere a

concentrației acestuia la grupele care au primit o doză mai mare de cis-platină (v. fig. 6-5).

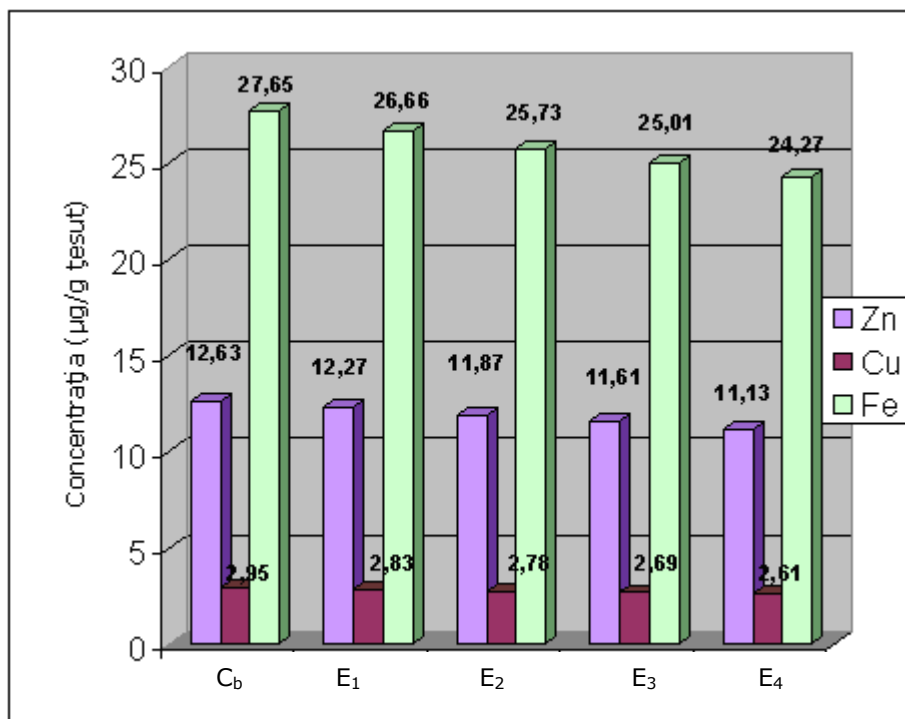


Fig. 6-5 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în creier

Se cunoaște faptul că o însemnată cantitate de zinc se află în creier, în cortexul cerebral și hipocamp, aproximativ 90% din acesta fiind legat de metaloproteine, iar restul este stocat în neuroni [371, 372].

Scăderea concentrației zincului determină alterarea activității Zn - SOD (superoxiddismutaza), care determină peroxidarea lipidelor celulare [373]. Concentrația crescută a zincului este asigurată de transportori membranari de natură proteică, cum ar fi metaltioneinele care asigură chelatarea zincului [374, 375].

Deficitul de zinc a fost descris pentru prima dată în Iran și Egipt, la adolescenți care au prezentat retard mental și hipogonadism.

La animale de experiență aflate în cursul gestației, deficitul de zinc poate avea repercursiuni asupra produșilor de concepție. Pot apărea anomalii fetale și incompleta dezvoltare cerebrală a embrionilor [349].

La om, și în special la copii, deficitul acut de zinc este manifestat prin leziuni ale pielii în special la extremități și în jurul orificiilor, diaree, iritabilitate, tulburări de creștere, și risc crescut la infecții.

În cazul anemiei pernicioase, a afecțiunilor maligne, arsurilor, traumatismelor, infecțiilor acute, concentrația de zinc poate scădea semnificativ, probabil datorită redistribuirii acestuia la nivelul unor țesuturi, în special la ficat [86].

Perturbarea nivelului de zinc din organism poate fi asociată cu anumite manifestări patologice, nivelul zincului fiind mai redus în condiții de stres și după traumatisme, dar concentrația plasmatică de zinc nu poate reda nivelul intracelular al acestuia.

Studii efectuate în ultimii ani au sugerat existența unei relații de inversă proporționalitate între nivelul seric al feritinei și concentrația de zinc din organism [86].

Zincul este vital pentru funcționarea normală a creierului, în special la nivelul hipocampului. Ionii de zinc sunt esențiali în procesul de fosforilare a tubulinei de la nivel cerebral și în transportul acesteia precum și în creșterea numărului de neurofilamente. Deoarece zincul este implicat în structura DNA și RNA este explicabil rolul său vital în maturarea și proliferarea neuronală. La nivel cerebral zincul este prezent în cantități mai mari în bulbul olfactiv și hipocamp unde participă la procesele de neurotransmisie [376].

Studii in vitro sugerează că zincul modulează activitatea receptorilor acidului gama - amino butiric (GABA), și N-metil - D - aspartatului (NMDA), care sunt implicați în stimularea memoriei.

Zincul asigură integritatea barierei hemato - encefalice contracarând efectele aluminiului și a altor compuși toxici. Zincul protejează bariera hemato - encefalică de stresul oxidativ ca urmare a capacității sale antioxidante, asigurând menținerea homeostaziei la nivel cerebral și împiedicând apariția tulburărilor neurologice.

Pe de altă parte, [377], au arătat că o creștere a consumului de zinc crește concentrația acestuia la nivel cerebral, produce tulburări de memorie datorită influxului de zinc din veziculele presinaptice la nivelul neuronilor și pare a fi responsabilă de procesele neurodegenerative.

O scădere a concentrației zincului și a cuprului concomitent, poate fi determinată de o competiție între cele două metale, dar poate genera o scădere a activității Cu-Zn-SOD, ceea ce determină o scădere a protecției antioxidante realizate de această enzimă [378, 379] .

În ceea ce privește concentrația cuprului în creier după administrarea de cis-platină, se poate observa o ușoară scădere a acestui metal, diferențele semnificative existând doar la grupa careia i s-a administrat o doză mai mare de cis-platină.

Cuprul este implicat în absorbția și transportul fierului. Astfel, o scădere a concentrației de cupru la nivel tisular poate atrage după sine o scădere a concentrației de fier [380, 381].

După [382], există o legătură evidentă între hepatotoxicitate și stresul oxidativ apărut la nivelul creierului. Stresul oxidativ a fost declanșat de producerea radicalilor liberi, de peroxidarea lipidică, cu apariția unor nivele ridicate de malondialdehidă (MDA), de specii reactive de oxigen (ROS), de nitrați (NO). De asemenea, acțiunea enzimelor antioxidante glutation-peroxidaza, glutation-reductaza și catalaza au înregistrat valori scăzute, iar activitatea enzimei superoxidismutaza a crescut. Acest studiu demonstrează existența unei legături între efectul toxic generat de administrarea unei substanțe la nivel hepatic și declanșarea stresului oxidativ la nivelul creierului.

Din analiza datelor experimentale se poate observa o scădere a concentrației fierului în creier la grupele experimentale proporțional cu doza de cis-platină administrată, comparativ cu grupul de control.

Pe lângă implicațiile hematologice prezentate în capitolul anterior, putem sugera implicarea fierului în buna funcționare a sistemului imun și a sistemului nervos.

După [383], s-a arătat că la copiii cu deficiențe de fier apar tulburări comportamentale. Ulterior numeroase studii au întărit ideea că scăderea concentrației fierului duce la tulburări psihomotorii și ale funcției cognitive.

Un studiu efectuat de [384] pe șobolani care nu prezentau anemie dar aveau deficiență de fier a relevat apariția unor modificări biochimice la nivel cerebral. Studiului a urmărit conținutul de fier la nivelul creierului, activitatea enzimei monoaminomonooxidaza (MAO) de la nivelul corpilor striați, și a metaboliților acesteia de la nivelul cortexului. Rezultatele au arătat că nivelul de fier

precum și activitatea enzimei MAO la șobolani cu deficiență de fier au scăzut considerabil. De asemenea, concentrațiile metaboliților de la nivelul cortexului cerebral au scăzut considerabil. Acest aspect indică apariția unor tulburări la nivelul metabolismului enzimei MAO pe fondul unei carențe de fier.

Cis-platina este un agent alchilant care interacționează cu macromolecula de DNA, împiedicând astfel și sinteza proteinelor. Astfel poate fi explicată scăderea concentrației zincului la nivelul creierului, fiind cunoscut faptul că, în cantități mici, cis-platina poate traversa bariera hemato-encefalică.

Concluziile cu privire la afectarea creierului de către cis-platină pot fi rezumate astfel: concentrația calciului și magneziului este scăzută, comparativ cu grupa de control. În cazul oligoelementelor concentrația zincului și cuprului prezintă scăderi semnificative la grupa E₄. Concentrația fierului este de asemenea scăzută. Ionii de fier sunt implicați în structura hemoglobinei, cu rol în oxiforeză (transportul de oxigen) a transferinei dar și în structura unor enzime care intervin în reacții de oxido-reducere din cadrul proceselor metabolice.

6.8. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN CORD

Dintre cationii analizați în cadrul experimentului, trei influențează proprietățile electrice ale cordului: potasiul, calciul și magneziul [186, 349, 385]. Calciul este implicat în contractilitatea miocardului, un exces de calciu ducând la vasoconstricție și la accelerarea ritmului cardiac, iar magneziul produce vasodilatație.

La nivelul musculaturii cardiace contracția este declanșată de presiunea exercitată de fluxul sanguin la nivelul inimii în timpul sistolei ducând la reducerea dimensiunii atriilor și ventriculelor. Mușchiul cardiac, extrem de activ necesită cantități mari de oxigen care este furnizat de rețeaua capilarelor. Aproximativ 75% din oxigenul provenit din sânge este tranzitat prin cord, iar modificări ale metabolismului la acest nivel se datorează afecțiunilor de la nivelul arterelor coronare [86].

Cu referire la concentrația unor biometale analizate din cord după administrarea de cis-platină, datele analitice sunt prezentate în tabelul 6-7.

Tabel 6-7. Concentrația calciului și magneziului în cord

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	21,36 \pm 3,26	235,91 \pm 39,20
Grupa E ₁	10	20,28 \pm 3,08	227,41 \pm 37,15
$\Delta \bar{X}$		-1,08	-8,50
Grupa E ₂	10	19,95 \pm 2,92	216,53 \pm 35,98
$\Delta \bar{X}$		-1,41	-12,50
Grupa E ₃	10	19,49 \pm 2,64**	215,75 \pm 34,45**
$\Delta \bar{X}$		-1,87	-20,16
Grupa E ₄	10	18,82 \pm 2,13*	207,61 \pm 33,60*
$\Delta \bar{X}$		-2,54	-28,30

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Din valorile prezentate, legat de concentrația calciului în cord, se poate observa o scădere a concentrației acestuia, mai redusă la administrarea de doze mai mici, creșterea fiind mai marcată la administrarea unor doze mai mari, respectiv la grupele experimentale E₃ și E₄ (v. fig. 6-6). Acest fapt vine în completarea mențiunilor anterioare cu privire la antagonismul magneziu – calciu.

Variația cuantumului de magneziu în cord se concretizează într-o scădere a concentrației acestuia de magneziu în cord invers proporțională în raport cu doza de cis-platină administrată.

La nivel de miocard, magneziul are un rol important în inhibarea centrilor ectopici cardiaci (având un efect antiaritmie) și de protecție împotriva leziunilor aterosclerotice, mecanismul fiind încă incomplet cunoscut. O scădere a nivelului de magneziu la nivelul cordului duce la o diminuare a efectului cardioprotector al acestuia.

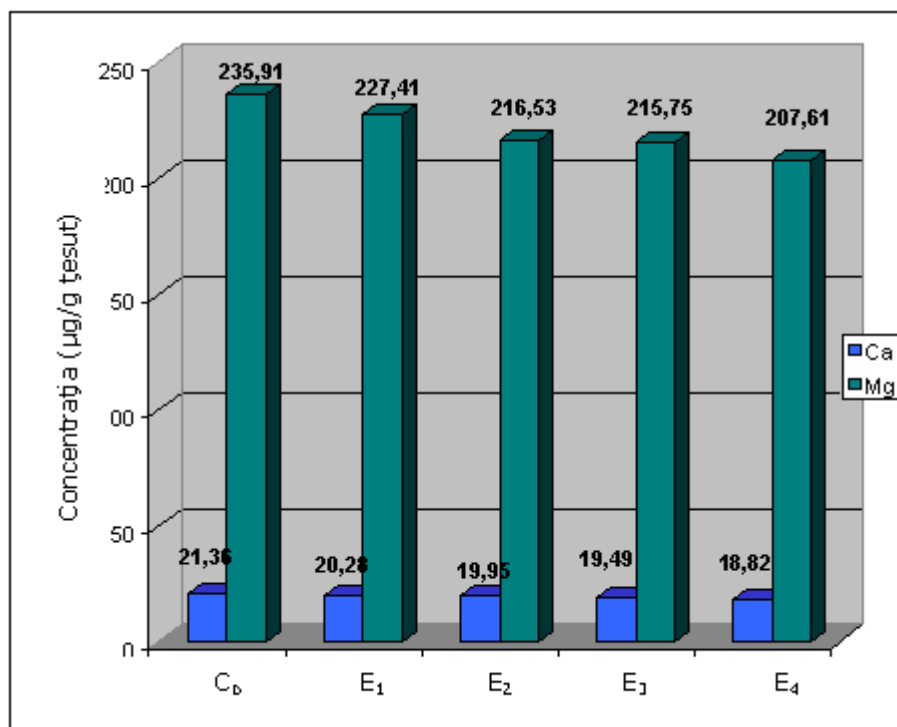


Fig. 6-6 Histograma de redare a valorii ionilor Ca și Mg în cord

La nivelul cordului, activitatea magneziului este strâns legată de cea a calciului. Magneziul se comportă ca un antagonist al calciului, având rol cardioprotector prin diminuarea excitabilității și conductibilității miocardului.

După [386], se poate realiza o legătură între deficiența cronică de magneziu și frecvența unor tulburări cardiovasculare. Efectele cardiovasculare ale carenței de magneziu au fost puse pe seama scăderii timpului de coagulare, pe creșterea adezivității trombocitare și pe scăderea capacității de apărare a organismului. În unele situații deficitul de magneziu poate induce o retenție excesivă de sodiu și calciu, care pot produce modificări ale peretelui vascular.

În tabelul 6-8 se prezintă concentrația unor oligoelemente, respectiv a zincului, cuprului și a fierului după administrarea de cis-platină.

Tabel 6-8. Concentrația zincului, cuprului și fierului în cord

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	14,21 \pm 2,36	5,94 \pm 1,18	65,99 \pm 10,98
Grupa E ₁	10	14,04 \pm 2,34	6,06 \pm 1,21	67,22 \pm 11,20
$\Delta\bar{X}$		-0,17	+0,12	+1,23
Grupa E ₂	10	13,73 \pm 2,28	6,17 \pm 1,24	68,91 \pm 11,48
$\Delta\bar{X}$		-0,48	+0,23	+2,92
Grupa E ₃	10	13,18 \pm 2,14	6,45 \pm 1,30	71,23 \pm 11,95**
$\Delta\bar{X}$		-1,03	+0,51	+5,24
Grupa E ₄	10	12,53 \pm 2,01*	6,69 \pm 1,36*	73,09 \pm 12,34*
$\Delta\bar{X}$		-1,68	+0,75	+7,10

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Zincul, cuprul și fierul au un rol important la nivel tisular, fiind cofactori enzimatici pentru numeroase enzime. De exemplu, zincul și cuprul sunt cofactori enzimatici pentru enzima superoxid-dismutaza. În cazul scăderii concentrației acestor bioelemente, activitatea enzimei SOD este redusă, având ca și consecință apariția speciilor reactive de oxigen. Conform ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), creșterea sau scăderea concentrației acestor elemente la nivel tisular duce la apariția unor perturbări ale homeostaziei [387].

Din datele prezentate se poate observa o scădere a concentrației zincului în cord după administrarea de cis-platină la grupele experimentale comparativ cu grupa de control (v. fig.6-7).

Din analiza datelor prezentate în tabelul 6-8 se observă o creștere a concentrației cuprului în cord la grupele experimentale comparativ cu grupul de control.

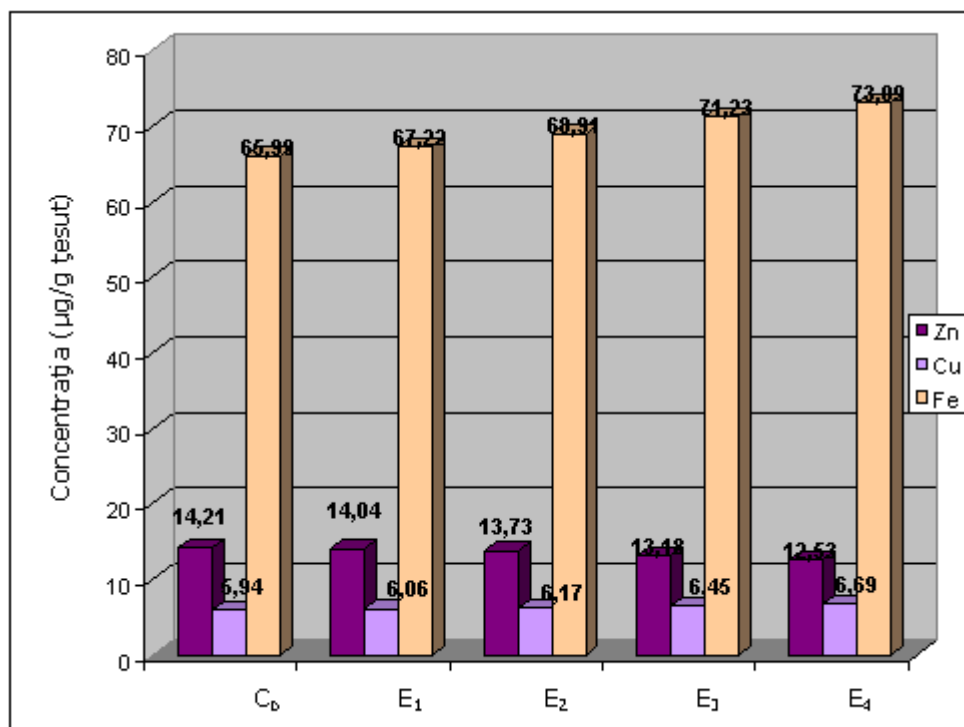


Fig. 6-7 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în cord

Unul dintre efectele majore ale cuprului este acela de a stabili proteinele țesutului conjunctiv. Astfel trebuie avută în vedere intervenția cuprului în menținerea integrității peretelui vascular. În urma administrării de cis-platină se poate observa o acumulare a cuprului la nivelul cordului, ceea ce duce la creșterea rezistenței la tensiune a elastinei și colagenului în urma stimulării sintezei de lanțuri polipeptidice[388].

Este cunoscut efectul protector al cuprului față de carcinogeneză [389]. Efectul favorabil al cuprului nu se limitează doar la potențarea acțiunii unor citostatice, acesta fiind implicat și în protecția față de inducerea unor stări tumorale [349].

La șobolani, carența de cupru determină modificarea compoziției țesutului adipos în sensul scăderii nivelului acizilor grași saturați și nesaturați și activității microzomilor hepatici, urmate de scăderea depunerilor de grăsimi subcutanate.

Astfel, din analiza datelor referitoare la cantumul fierului în cord după administrarea de cis-platină, se poate observa o creștere importantă a concentrației de fier, direct proporțională cu doza administrată la grupele experimentale comparativ cu grupul martor [390] .

Numeroase studii de specialitate arată că excesul de fier din țesuturi favorizează apariția bolilor coronariene, și activează unele forme latente de cancer sau unele infecții bacteriene.

Prin implicația sa în producerea de radicali liberi, fierul poate favoriza apariția bolilor cardiovasculare. Radicalii liberi pot oxida colesterolul din sânge, care în acest fel se depune mai ușor pe vasele de sânge, cu precădere la nivelul arterelor care transportă sânge și oxigen spre cord.

Depunerea de cantități mari de colesterol la acest nivel produce apariția plăcilor de aterom care subțiază vasele și duc la reducerea fluxului sanguin favorizând apariția de infarcte. Din analiza acestor date reiese că o cantitate ridicată de fier la nivel cordial favorizează riscul apariției bolilor cardiace.

Concluziile privind efectul cis-platinei asupra cordului la animale de laborator, pot fi redate astfel: la nivelul cordului se constată o depresie valorică a concentrației calciului și magneziului semnificativă la grupele E₃ și E₄ în raport cu grupa C_b. În cazul zincului a cărui concentrație scade, se manifestă o relație de antagonism în raport cu creșterea concentrația cuprului și a fierului. Valori semnificative sunt determinate de doze crescute de cis-platină.

6.9. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN SPLINĂ

La șobolani capsula splenică conține mușchi care sunt implicați în contracția acestui organ în urma stimulării de către sistemul nervos vegetativ simpatic. Prin inhibarea simpatică apare o creștere a volumului splinei, în acest fel fiind reținută o cantitate mare de sânge, care în condiții de stres este pompat în sistemul circulator.

Tabelul 6-9 prezintă valorile concentrațiilor unor bioelemente prezente în probele de splină prelevate de la șobolani linia Wistar după administrarea de cis-platină.

Variația cantumului de calciu în splină la șobolani linia Wistar după administrarea de cis-platină relevă o creștere a concentrației calciului la grupele

experimentale la care s-au administrat doze crescute de cis-platină. Există deci o directă proporționalitate în relația doză – efect.

Datele referitoare la variația concentrației magneziului în splină după administrarea de cis-platină sunt prezentate de asemenea în tabelul 6-9.

Tabel 6-9. Concentrația calciului și magneziului în splină

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	53,87 \pm 8,90	261,12 \pm 52,20
Grupa E ₁	10	55,08 \pm 10,81	266,03 \pm 44,17
$\Delta \bar{X}$		+1,21	+4,91
Grupa E ₂	10	56,80 \pm 9,26	270,98 \pm 44,83
$\Delta \bar{X}$		+2,93	+9,86
Grupa E ₃	10	58,71 \pm 9,45**	281,54 \pm 55,40*
$\Delta \bar{X}$		+4,84	+20,42
Grupa E ₄	10	60,33 \pm 11,58*	292,29 \pm 47,54*
$\Delta \bar{X}$		+6,46	+31,17

n – număr de animale

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Din analiza datelor se poate observa o creștere a concentrației magneziului în splină la grupele experimentale comparativ cu grupa de control.

Referitor la concentrația calciului, acesta înregistrează o creștere a valorilor la nivelul splinei comparativ cu grupa de control.

Atât în cazul magneziului, cât și al calciului, se constată că această augmentare a valorilor este direct proporțională cu doza de cis-platină administrată la grupele experimentale. Se constată creșteri semnificative în cazul grupelor experimentale E₃ și E₄ la care s-au administrat doze crescute de chimioterapic citostatic.

Modificarea cantumului unor oligoelemente din probe de splină este redată în tabelul 6-10.

Tabel 6-10. Concentrația zincului, cuprului și fierului în splină

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	17,37 \pm 4,34	6,24 \pm 1,25	670,18 \pm 111,70
Grupa E ₁	10	16,67 \pm 3,90	6,43 \pm 1,31	696,41 \pm 121,07
$\Delta\bar{X}$		-0,70	+0,19	+26,23
Grupa E ₂	10	16,18 \pm 3,72	6,56 \pm 1,34	714,32 \pm 124,10
$\Delta\bar{X}$		-1,19	+0,32	+44,14
Grupa E ₃	-3,21	15,94 \pm 3,50	6,70 \pm 1,37	731,93 \pm 125,32**
$\Delta\bar{X}$		-1,43	+0,46	+61,75
Grupa E ₄	10	15,31 \pm 3,35*	6,93 \pm 1,40*	750,33 \pm 129,90*
$\Delta\bar{X}$		-2,06	+0,69	+80,15

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

În ceea ce privește concentrația zincului în splină, din datele prezentate în fig. 6-8 se poate observa o scădere a concentrației acestuia la grupele experimentale comparativ cu grupa de control, care este invers proporțională cu doza de cis-platină administrată.

Zincul este cofactor enzimatic și intră în compoziția a numeroase metaloproteine. Zincul are un rol deosebit de important în sinteza proteinelor, această funcție a sa putându-se datora implicării sale majore în metabolismul acizilor nucleici. Activitatea unor enzime al căror cofactor enzimatic este zincul este afectată de nivelul scăzut al acestuia la nivel tisular [391]. Zincul intervine de asemenea în stabilizarea membranei celulare și în structura polinucleotidelor.

Concentrația cuprului în splină înregistrează o creștere la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Cuprul este un cofactor enzimatic

pentru un număr mare de enzime (e.g.: citocrom C oxidaza, lisiloxidaza). De asemenea, cuprul este esențial pentru absorbția fierului și sinteza hemoglobinei în care splina are un rol important [392] .

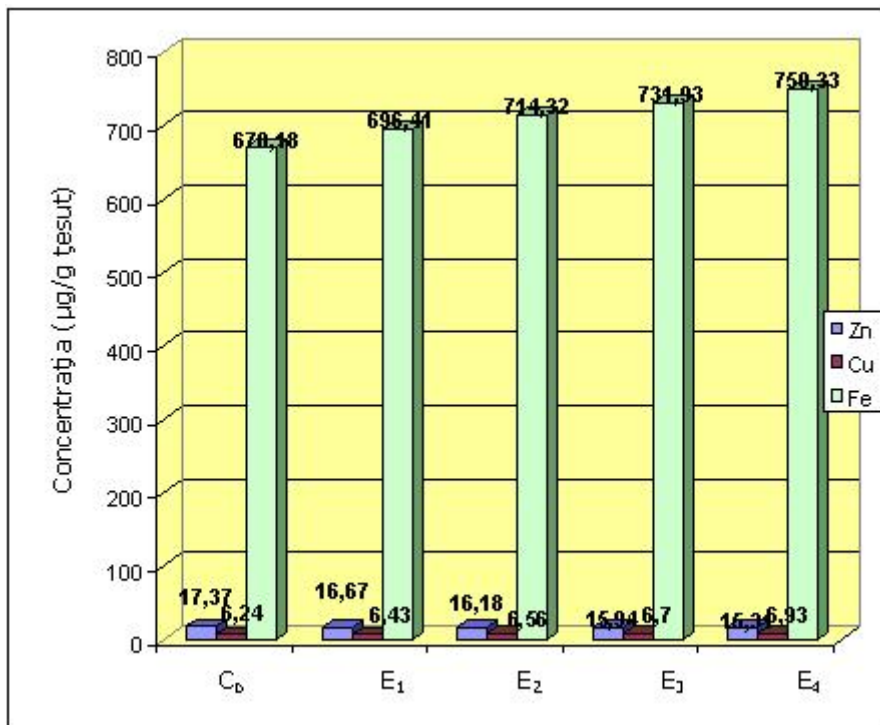


Fig. 6-8 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în splină

Din analiza datelor prezentate anterior, reiese o creștere a concentrației fierului în splină la grupele experimentale comparativ cu grupul de control, creștere care este proporțională cu doza administrată. Creșterea concentrației ionilor de fier din splină poate fi corelată și cu creșterea fierului din serul sanguin.

Fierul favorizează formarea radicalilor liberi, care conțin molecule de oxigen implicate în oxidarea DNA din celule. Rata de formare a radicalilor liberi este proporțională cu nivelul fierului din organism.

Fierul este un element prezent în numeroase enzime, majoritatea acestora participând în procesele de respirație celulară de care depinde furnizarea de energie necesară organismului. Fierul are rolul de a fixa reversibil oxigenul, iar fierul din hemoglobină poate capta oxigenul la nivelul plămânilor pentru a-l elibera ulterior în țesuturi.

Valoarea din sânge a fierului exprimă echilibrul existent între aportul exogen sau endogen și eliminarea fierului din organism [393-396].

La nivelul splinei se constată apariția unei stări hipersideremice. Aceasta poate fi cauzată de creșterea aportului de fier, eliberarea acestuia din depozite sau de imposibilitatea încorporării lui în hemoglobină. În cazul experimentului nostru, creșterea nivelului de fier la nivelul splinei se poate datora eliberării fierului din țesuturi, ca urmare a afectării funcției hepatice și renale în urma administrării de cis-platină.

Concluziile cu privire la afectarea splinei de către cis-platină pot fi rezumate astfel: concentrațiile calciului și magneziului sunt crescute la grupele experimentale. Concentrația fierului este mult crescută, concentrația cuprului prezintă creșteri nesemnificative la majoritatea grupelor, iar concentrația zincului este scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Ionii de fier sunt implicați în structura hemoglobinei, a transferinei dar și în structura unor enzime și proteine cu rol în transportul oxigenului.

6.10. ANALIZA BIOELEMENTELOR DIN MUȘCHI

Principiul de funcționare al mușchiului are la bază răspunsul mecanic (reflex) care este urmat de contracția musculaturii. Activitatea musculaturii scheletice este influențată de inserția acesteia la sistemul osos.

Hidroliza adenozintrifosfatului (ATP) furnizează energia necesară contracției musculare. Cantitatea de ATP hidrolizată în timpul procesului nu este constantă, aceasta depinde de durata contracției și de efortul făcut de musculatură. Siturile unde are loc hidroliza se află la nivelul legăturilor formate între actina și miozina din sarcomer, enzima ATP – ază fiind extrem de activă pe durata interacției dintre cele două proteine.

Relaxarea musculară este un process pasiv. Când nu are loc hidroliza ATP sub acțiunea complexului actină – miozină, sarcomerul se află în stare relaxată. Filamentele musculare revin la poziția inițială și mușchiul se alungește. Același principiu funcționează în cazul contracției musculaturii scheletice și cardiace [86]. Concentrația ionilor de Ca și Mg în mușchi la șobolanii din linia Wistar sunt prezentate în tabelul 6-11.

Tabel 6-11. Concentrația calciului și magneziului în mușchi

Specificare	n	Ca ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Mg ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	42,19 \pm 6,83	258,28 \pm 43,01
Grupa E ₁	10	40,87 \pm 6,71	248,56 \pm 41,42
$\Delta \bar{X}$		-1,32	-9,72
Grupa E ₂	10	39,85 \pm 6,59	246,14 \pm 39,62
$\Delta \bar{X}$		-2,34	-12,14
Grupa E ₃	10	39,01 \pm 6,39**	236,64 \pm 39,34*
$\Delta \bar{X}$		-3,18	-21,64
Grupa E ₄	10	37,13 \pm 6,18*	227,38 \pm 37,58*
$\Delta \bar{X}$		-5,06	-30,90

n – număr de animale

*p < 0,01; ** p < 0,05

Din analiza datelor obținute cu privire la concentrația calciului în mușchi, se poate observa că aceasta este mult mai scăzută la grupele experimentale (E₁-E₄) comparativ cu grupa de control (C_b), în raport de inversă proporționalitate cu doza administrată (fig. 6-9).

Concentrația calciului în organism este supusă mecanismelor homeostaziei și homeoreziei pe durata vieții, datorită implicării acestuia în menținerea structurii osoase, a danturii și a fanerelor, de aceea apar uneori variații ale cantumului acestuia [397].

Gradul de legare al calciului de proteine și procentul calciului ionizat depinde de pH-ul mediului și de prezența altor electroliți (e.g.: magneziu). Valoarea calciului ionizat este importantă în special pentru funcțiile legate de excitabilitatea neuromusculară. Orice scădere a fracțiunii ionizate duce la tetanie, în timp ce creșterea duce la insuficiență cardiacă și respiratorie.

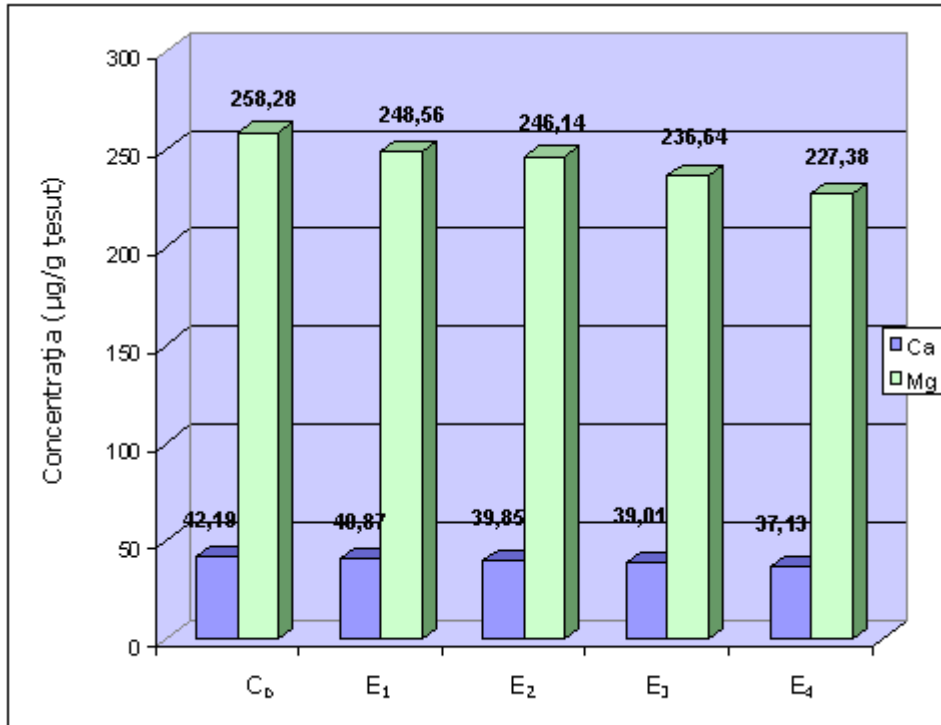


Fig. 6-9 Histograma de redare a valorii ionilor Ca și Mg în mușchi

După [398], excesul de calciu inhibă absorbția de magneziu și viceversa, iar alții cred că o concentrație crescută de calciu nu scade absorbția de magneziu. După [399], calciul este implicat și în procesele de stres oxidativ de la nivelul mitocondriei. În general, relația calciu – magneziu depinde de hormonii calcitonină și parathormon precum și de concentrația vitaminei D. Pe de altă parte, zincul intervine în secreția hormonilor adrenocorticoizi, în sensul inhibării acestora [400].

În ceea ce privește concentrația magneziului în mușchi, se poate observa scăderea concentrației de magneziu la grupele experimentale comparativ cu valorile obținute la grupa de control. Scăderile sunt semnificative ($p < 0,01$) la grupele experimentale E₃ și E₄. Magneziul are un rol structural și reglator în organismele vii [335, 401], acesta fiind implicat în activarea pompei Na-K, precum și a ATP-azei, intervenind în schimburile transmembranare. Scăderea concentrației magneziului conduce la o scădere a concentrației K la nivel celular, determinând o resorbție

hidro-sodică, care este reversibilă la administrarea de suplimente pe bază de magneziu.

Ionii de magneziu sunt necesari glicolizei anaerobe, ca și fosforilării oxidative. Ei intervin în activarea fosfatazei alcaline și acide, a pirofosfatazei și a ATP-azei, vitală pentru transferul de fosfat molecular. De asemenea magneziul reglează activitatea adenilciclazei care intervine în sinteza celui de-al doilea mesager ciclic adenozinmonofosfat, (AMP) implicat în contracția musculară.

Asupra musculaturii netede, magneziul intervine prin scăderea tonusului și peristaltismul intestinal. De asemenea relaxează musculatura vasculară având un efect hipotensor.

Magneziul ocupă un rol esențial în metabolismul mai multor minerale datorită rolului său de activator al sistemelor multienzimatice [402]. Deficitul de magneziu din organismul uman este legat de tulburări cardio-vasculare, renale, digestive, neurologice și mai ales musculare, el fiind implicat în creșterea randamentului muscular, și alături de potasiu în stocarea și utilizarea energiei. Concentrația magneziului variază în același sens cu potasiul la nivelul celulei musculare. Concentrația magneziului este influențată și de starea fiziologică a funcției renale, apărând o hipomagneziemie tranzitorie la o funcție renală afectată.

Un studiu efectuat de [403] a evaluat nivelul magneziului și potasiului în mușchii scheletici după administrarea de cis-platină. În urma tratamentului s-a remarcat o scădere a concentrației magneziului plasmatic care este însoțită de o scădere cu aproximativ 15% a magneziului muscular și cu 10% a potasiului muscular. Acestea sunt concretizate prin apariția fatigabilității.

Valorile concentrațiilor de zinc, cupru și fier din mușchi scheletici la șobolanii din linia Wistar decelate după administrarea de cis-platină sunt prezentate în tabelul 6-12.

Concentrația zincului este mai scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupa de control, iar în cazul grupelor experimentale E₃ și E₄ aceste diferențe sunt semnificative.

Administrarea cis-platinei poate afecta și musculatura scheletică, astfel apărând hiperzincuria care poate conduce la un deficit de zinc [404].

Zincul este un metal care intră în compoziția a peste 200 de enzime, dar și a unor proteine și polinucleotide. De asemenea, zincul este implicat în diviziunea și diferențierea celulară, în procesele de transcripție, apoptoză precum și în

funcționarea membranelor, fiind esențial pentru organism în toate etapele vieții, din primele zile de viață intrauterină până la senescență [391].

Se presupune că există o legătură între calciul din mușchi și concentrația zincului, distribuția intracelulară a calciului în mușchiul scheletic fiind influențată de concentrația zincului, care, fiind implicat în menținerea funcțiilor celulare, alterează distribuția musculară a calciului [402, 405, 406] .

Tabel 6-12. Concentrația zincului, cuprului și fierului în mușchi

Specificare	n	Zn ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Cu ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$	Fe ($\mu\text{g/g}$ țesut) $\bar{X} \pm DS$
Grupa C _b	10	12,98 \pm 3,25	1,62 \pm 0,32	19,70 \pm 3,30
Grupa E ₁	10	12,75 \pm 3,18	1,70 \pm 0,34	19,32 \pm 3,22
$\Delta \bar{X}$		-0,23	+0,08	-0,38
Grupa E ₂	10	12,33 \pm 3,08	1,73 \pm 0,35	18,64 \pm 3,10
$\Delta \bar{X}$		-0,65	+0,11	-1,06
Grupa E ₃	10	11,94 \pm 2,90**	1,76 \pm 0,39	18,05 \pm 4,43**
$\Delta \bar{X}$		-1,04	+0,14	-1,65
Grupa E ₄	10	11,36 \pm 2,60*	1,81 \pm 0,42*	15,54 \pm 2,78*
$\Delta \bar{X}$		-1,62	+0,19	-2,36

n – număr de animale

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Concentrația de zinc în mușchi variază puțin în funcție de activitatea musculară. În general concentrația de zinc în mușchi este stabilă fiind puțin afectată de depleția acestuia în sânge. Mușchii striati precum și cordul și creierul dispun de un număr limitat de „zone” de fixare a zincului, dar care îl fixează foarte bine, ca urmare concentrația de zinc în aceste țesuturi nu este afectată de carența sau excesul de zinc.

Depleția de proteine scade absorbția digestivă de zinc și crește excreția acestuia. Este posibil, prin urmare, ca una din consecințele depleției proteice să fie carența secundară de zinc.

Carența de zinc implică și reducerea sintezei de colagen muscular și cutanat. Încorporarea de timidină în macromolecula de DNA precursoră în biosinteza colagenului este redusă în cazul unei carențe de zinc. Deficiența de zinc crește de asemenea încorporarea glicinei în glutation (GSH) și stimulează oxidarea metioninei – metilate care este un precursor al cisteinei.

Efectul zincului asupra metabolismului proteic și asupra creșterii de exerciță prin intermediul enzimelor. Pornind de la faptul că creșterea se produce prin mărirea numărului de celule și prin mărirea dimensiunilor celulare, deficitul de zinc este implicat în inhibarea sintezei DNA sau în blocarea sintezei de DNA, și mai puțin în sinteza de proteine [349].

Legat de sinteza de proteine, trebuie reiterat efectul zincului asupra unor parametrii imunologici, și anume reducerea hidrolizei spontane a eritrocitelor și inhibarea hemolizei imunologice.

Prin influența sa asupra unor enzime care intervin în hemostază, zincul accelerează vindecarea rănilor. De asemenea contribuie la întărirea structurii membranelor celulare, protejând celulele de autooxidarea cu radicali liberi. S-a constatat că zincul deplasează diferite elemente, printre care și calciul de la locul de acțiune, fiind un cvasiantagonist al acestuia. Acest lucru se poate datora faptului că un exces de calciu influențează absorbția zincului la animale. O asociere a unui exces de calciu și fosfor determină o scădere a concentrației de zinc [349]. O inhibare a absorbției zincului o produce și excesul de cupru, aspect care sugerează că cele două oligoelemente au căi de absorbție comune.

Legat de efectul carcinogen sau anticarcinogen al zincului există rezultate contradictorii. Zincul protejează dezvoltarea anumitor tumori sau potențează dezvoltarea altora. Deoarece zincul este esențial pentru creșterea țesuturilor, diviziunea celulară, sinteza de proteine, replicarea DNA și RNA, el poate avea rol și în dezvoltarea tumorilor [349]. Inhibarea creșterii tumorale este un efect general al carenței de zinc. Date privind ipoteza vreunui efect favorabil al excesului de zinc asupra cancerogenezei mai există. Se poate sugera că prin „manipularea” concentrației de zinc, dar și a altor oligoelemente s-ar putea obține rezultate în diagnosticul și tratamentul tumorilor.

De asemenea, se observă că în cazul cuprului, concentrația acestuia crește la grupele experimentale, comparativ cu grupa de control (v. fig. 6-10).

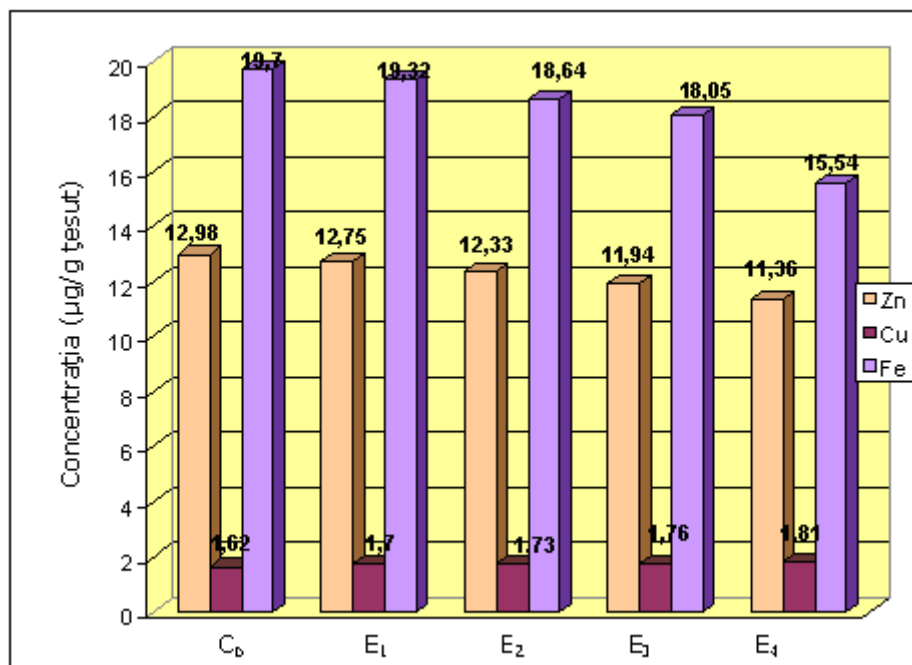


Fig. 6-10 Histograma de redare a valorii ionilor Zn, Cu și Fe în mușchi

Cuprul intră în constituția ceruloplasminei din sânge, precum și în structura diverselor metaloproteine, cum este hemocupreina și cerebropuceina, având rol catalitic în formarea hemoglobinei și citocromoxidazei. Cantități mari de cupru se găsesc în ficat, rinichi și pancreas [407].

Asemeni fierului, cuprul este important pentru sinteza de hemoglobină. Alte funcții ale cuprului includ rolul său în formarea măduvei și în menținerea structurii mielinei în sistemul nervos.

Cu excepția implicației cuprului în metabolismul hematiilor, acesta mai are și un rol adițional, legat de activitatea enzimelor din clasa oxido-reductazelor prezente în țesuturi. Există o strânsă legătură între metabolismul cuprului și fierului. În prezența unei deficiențe de cupru, deplasarea ionilor de fier de la țesuturi la plasmă este scăzută și generează o scădere a concentrației de fier (hipoferemie).

Fierul este un element important pentru procesele fiziologice, datorită prezenței în structura hemoglobinei și a implicării în transportul de oxigen [408].

În general între fier și zinc există un antagonism, astfel scăderea fierului în mușchi duce la creșterea concentrației zincului [409]. În cazul experimentului nostru, scăderea concentrației fierului este însoțită de o scădere a concentrației zincului, aceasta fiind probabil o altă consecință a administrării cis-platinei, care perturbă legarea zincului de proteinele musculare, deci există o relație de sinergism. Depresia concentrației de zinc scade sinteza colagenului, afectând metabolismul proteic și dezvoltarea celulară, implicit sinteza de DNA (Ghergariu, 1980).

În cazul fierului se poate observa din datele prezentate, o scădere a concentrației sale la grupele experimentale comparativ cu grupa de control, iar între grupele experimentale și grupa de control, aceste diferențe sunt semnificative la grupele experimentale E₃ și E₄.

Fierul are un rol deosebit de important în transportul oxigenului, este cofactor enzimatic în numeroase procese biochimice, și de asemenea intervine în metabolismul catecolaminelor și în biosinteza de acizi nucleici.

Sunt două căi prin care deficitul de fier poate afecta tonusul muscular: în primul rând scăderea valorilor hemoglobinei duce la reducerea consumului de oxigen și la încetinirea circulației acestuia prin fluidele biologice [410-413]. În al doilea rând, deficitul de fier duce la diminuarea consumului de oxigen la nivel muscular. Activitatea musculară intensă cu durată mai mare de câteva minute necesită consum de energie furnizată de ATP din mitocondriile celulelor musculare. Acest proces implică proteinele care conțin fier în moleculă (e.g.: transferina), precum și a citocromului P₄₅₀. În condițiile scăderii concentrației de fier la nivel muscular, acest proces este îngreunat, ducând la acumularea de acid lactic în mușchi, ca urmare a instalării fazei anabolice [414-416].

Concluziile asupra efectului produs în mușchi de administrarea unei soluții de cis-platină se prezintă astfel: concentrația magneziului și calciului relevă scăderi ale concentrației musculare în relație de inversă proporționalitate cu doza de cis-platină. De asemenea, fierul are o concentrație scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. În cazul cuprului și zincului se manifestă fenomenul de antagonism, concentrația zincului în mușchi este scăzută iar a cuprului ridicată la grupele experimentale. Astfel, la nivelul musculaturii scheletice apare o relație de sinergism între calciu și magneziu, și o relație de antagonism între cupru și zinc.

6.11. EFECTUL PRODUS DE CIS-PLATINĂ ASUPRA UNOR BIOMETALE PREZENTAT COMPARATIV PE DIFERITE ORGANE

Datele analitice obținute în urma experimentelor au fost transpuse și sub formă de histograme pentru a se putea observa cu ușurință comparativ cuantumul de biometal din părțile anatomice prelevate și ulterior supuse determinărilor analitice. Astfel în fig. 6-11 este prezentat conținutul de fier în unele organe.

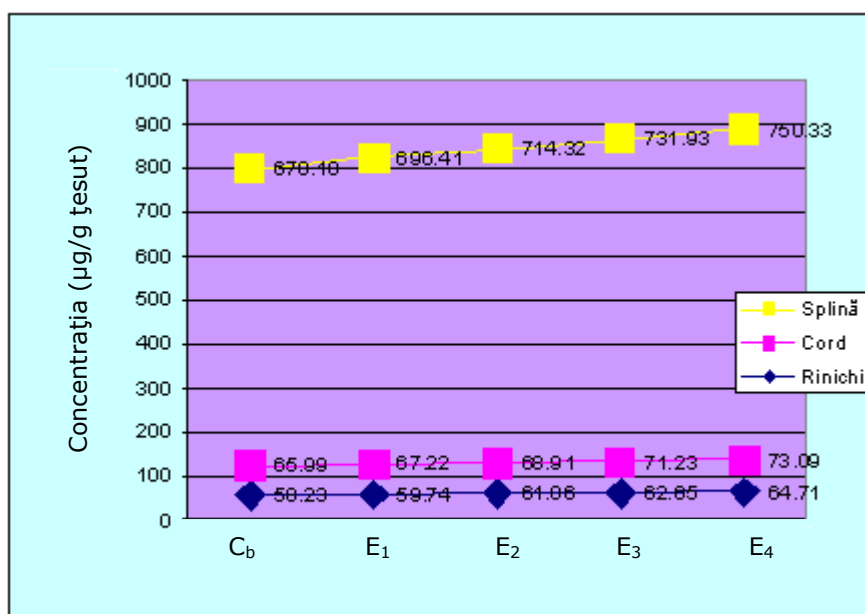


Fig. 6-11 Concentrația fierului în rinichi, cord și splină

Din analiza datelor se poate observa cum în cazul celor trei organe : rinichi, cord și splină, concentrația fierului la grupele experimentale crește comparativ cu grupa de control.

La polul opus se situează celelalte organe prelevate pentru efectuarea de analize, și anume: ficat, creier, și mușchi, la care concentrația fierului este mai scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupul de control (fig. 6-12).

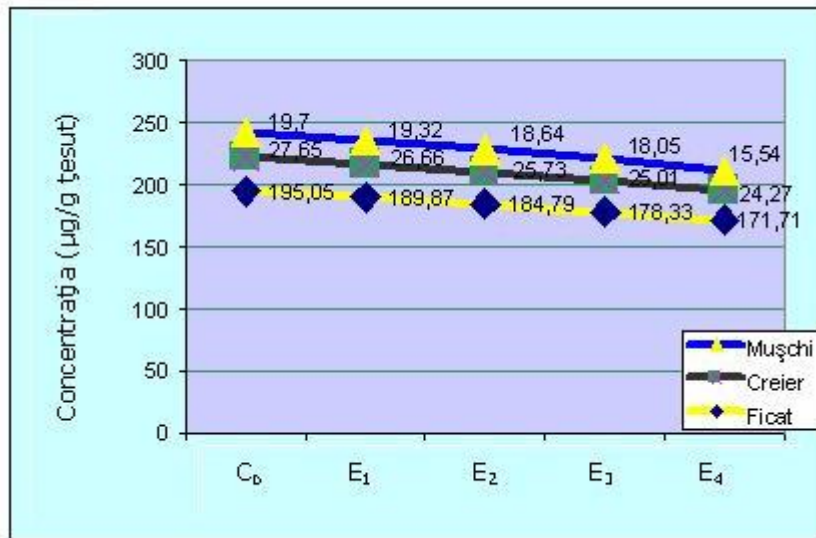


Fig. 6-12 Concentrația fierului în ficat, creier, mușchi

Un alt metal deosebit de implicat în procesele metabolice care însoțesc cis-platina este magneziul. Referitor la variația conținutului acestuia în diverse organe și în serul sanguin au fost prezentate următoarele histograme.

În fig. 6-13 este prezentat variația cantumului de magneziu în mușchii striați și cord.

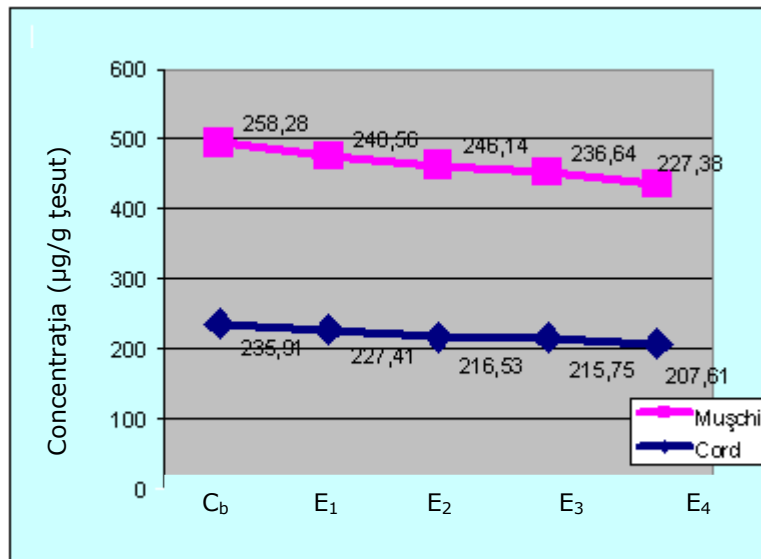


Fig. 6-13 Concentrația magneziului în mușchi și cord

În fig. 6-14 sunt prezentate date referitoare la cuantumul magneziului în unele țesuturi prelevate de la animalele de experiență.

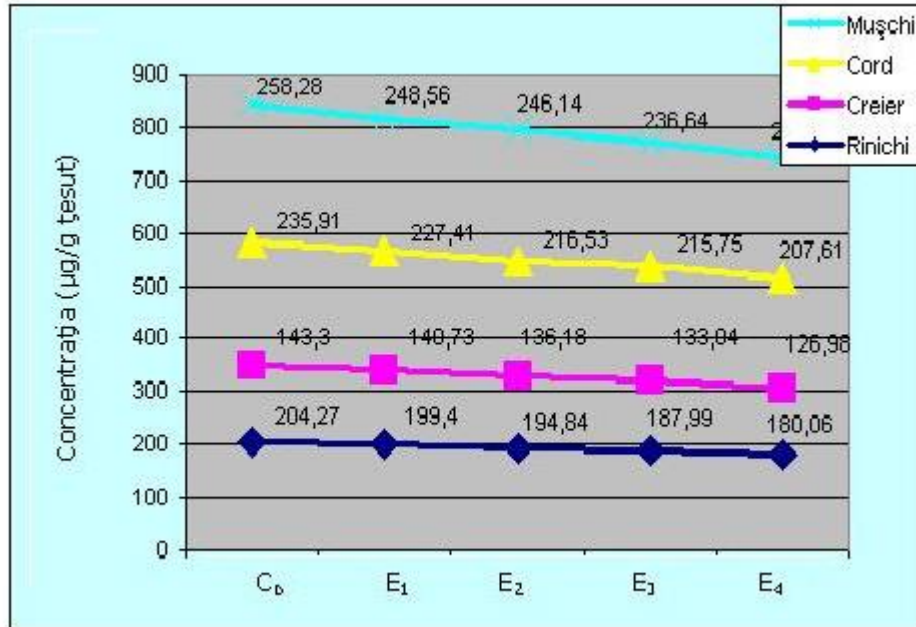


Fig. 6-14 Concentrația magneziului în mușchi, cord, creier

Cuantumul de magneziu în ficat și splină este prezentat în fig. 6-15. Din datele prezentate se poate observa că în aceste două organe prelevate, concentrația magneziului crește la grupele experimentale comparativ cu grupul de control.

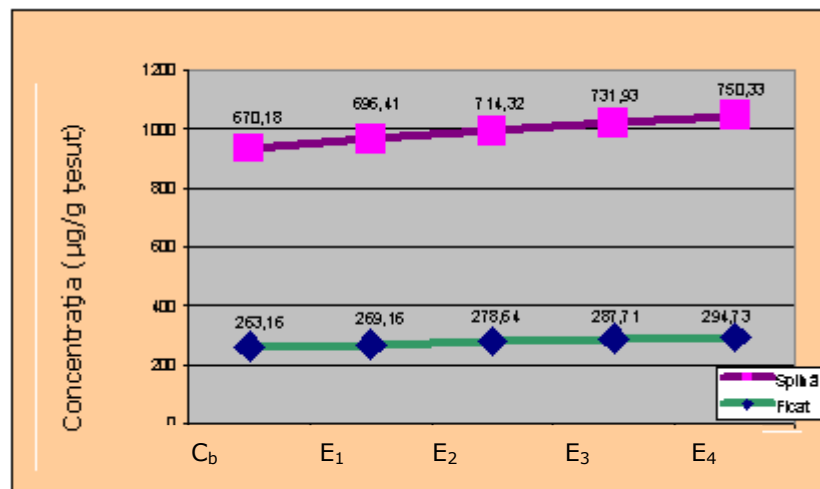


Fig. 6-15 Concentrația magneziului în ficat și splină.

Din fig. 6-15 se poate observa existența unei legături între concentrațiile crescute ale magneziului în ficat și splină. Acumularea de magneziu la nivelul celor două organe poate fi explicată și prin faptul că acesta este un important cofactor enzimatic, pentru numeroase enzime.

Este necesar să menționăm faptul că în cadrul acestei teze de doctorat se abordează aspecte referitoare metabolismul proteic și metabolismul hidro-electrolitic (cu particularizare pentru metale) în strânsă legătură cu biochimia și xenobiochimia.

Este general acceptat faptul că xenobiochimia este un domeniu de excelență al biochimiei care vizează atât biologia moleculară cât și patobiochimia.

Astfel, cis-platina, considerată ca și xenobiotic de interes farmaceutic interferă cu producția metabolismului, oferind prin aceasta o posibilă explicație a mecanismelor moleculare care pot modifica homeostazia biochimică.

CONCLUZII

1. Investigațiile bioanalitice întreprinse pe "modele experimentale animale" permit evidențierea efectelor induse de medicamente chimioterapice citostatice asupra homeostaziei biochimice și explicitarea diverselor mecanisme de acțiune. Datele astfel obținute – în cazul chimioterapicelor citostatice – au caracter informativ sub aspect teoretic și orientativ sub aspect aplicativ în dietoterapie și chimioterapie.
2. Efectele induse de cis-platină (cis-diaminodicloroplatină) asupra homeostaziei biochimice a acidului deoxiribonucleic (DNA) hepatic reprezintă o expresie a acțiunii la nivelul macromoleculei care conține informația genică. Experimental s-a decelat depresia concentrației DNA hepatic în condițiile creșterii dozei de cis-platină (cDDP). Această relație de inversă proporționalitate probează formarea unor aducți de tipul DNA – cDDP care acționează asupra biosintezei proteinelor.
3. Modificările induse de cis-platină asupra concentrației proteinelor serice și a fracțiunilor electroforetice sunt o consecință a acțiunii asupra succesiunii proceselor de replicare –transcripție–translație care vizează sinteza proteică. Datele obținute evidențiază următoarele aspecte:
 - 3.1. Concentrația proteinelor serice totale înregistrează o scădere direct proporțională cu doza de cis-platină administrată.
 - 3.2. Fracțiunile albuminice înregistrează o scădere la grupele experimentale comparativ cu grupa de control.
 - 3.3. Fracțiunile globulinice arată o creștere a valorilor globulinelor. Referitor la subfracțiunile globulinice apare o scădere a α_1 – globulinelor și o creștere a α_2 – și a β – și γ – globulinelor. Creșterea γ – globulinelor evidențiază o perturbare a sistemului imunitar.
4. Administrarea unor doze crescute de cis-platină influențează statusul homeostazic al metaboliților azotați neproteici, astfel:
 - 4.1. Concentrația ureei prezintă o augmentare progresivă, modificările apărute la grupele experimentale comparativ cu grupa de control

- fiind direct proporționale cu doza administrată. Valori semnificative la concentrații crescute de cis-platină.
- 4.2. În cazul creatininei serice apare o creștere a valorilor acesteia în urma administrării cis-platinei, modificările fiind semnificative în cazul grupelor experimentale la care s-au administrat cantități mai mari de cis-platină comparativ cu grupa de control, creșterea fiind direct proporțională cu doza de chimioterapic administrată.
 - 4.3. Creșterea concentrației acidului uric nesemnificativă la toate grupele experimentale poate fi explicată de legarea platinei la derivați purinici precursori în biogeneza acidului uric.
5. Concentrația unor biometalelor din sânge este influențată de administrarea de cis-platină, astfel:
- 5.1. În cazul sodiului apare o scădere la grupele experimentale, comparativ cu grupa de control. Având în vedere că valorile serice ale sodiului se află în echilibru cu cele provenite din lichidul interstițial, determinarea concentrației serice a sodiului poate fi reprezentativă și pentru concentrația acestuia în lichidul extracelular.
 - 5.2. În cazul potasiului, la grupele experimentale se observă apariția unei hiperpotasemii comparativ cu grupa de control după administrarea intraperitoneală de cis-platină.
 - 5.3. Din analiza datelor se poate observa o scădere a concentrației magneziului la grupele experimentale în comparație cu valorile obținute la grupa de control.
 - 5.4. Datele prezentate relevă o scădere a concentrației calciului la grupele experimentale în comparație cu valorile obținute la grupa de control.
6. Modificarea homeostaziei principalelor biometale din diverse organe este influențată specific de administrarea de cis-platină.
- 6.1. Analiza bioelementelor din ficat. Datele care ilustrează afectarea ficatului în urma administrării de cis-platină pot fi redate astfel: concentrațiile calciului și magneziului sunt crescute la grupele la care s-au administrat doze mai mari de cis-platină, existând valori semnificative. Cu referire la concentrația zincului și a cuprului se

remarcă că acestea sunt crescute în cazul ficatului, ceea ce arată apariția fenomenului de sinergism între cele două metale după administrarea de cis-platină. Concentrația ionilor de fier este scăzută, probabil datorită leziunilor hepatice.

- 6.2. Analiza bioelementelor din rinichi. Concentrațiile calciului și magneziului scad la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Scăderea este în raport de inversă proporționalitate cu doza de cis-platină administrată. Concentrația magneziului relevă o scădere marcată cauzată de prezența platinei, fapt observat și în cazul serului sanguin. În ceea ce privește cuprul și zincul, se observă creșterea concentrației acestora la grupele experimentale. Astfel, la nivelul rinichiului, între ionii de cupru și zinc, după administrarea cis-platinei se remarcă (similar ficatului) existența unei relații de sinergism. Apare de asemeni o acumulare a fierului la nivel renal concretizată în creșterea concentrației ionilor de fier.
- 6.3. Analiza bioelementelor din creier. Concentrațiile metalelor alcalinoteroase calciu și magneziu au valori scăzute la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Modificările homeostaziei tisulare sunt mai intense la magneziu. La oligoelementele investigate zinc, cupru, fier în toate situațiile s-au decelat valori mai scăzute la grupele experimentale. Depresia cuantumului la fier este importantă datorită prezenței acestuia în hemoglobină, în citocromi și a rolului în oxiforeză.
- 6.4. Analiza bioelementelor din cord. Cu privire la asupra metalogramei cordului, aceasta poate fi redată astfel: la nivel de cord se instalează depresia concentrației tisulare a calciului și magneziului, scăderi fiind semnificativă la grupele experimentale E₃ și E₄ comparativ cu grupa de control. Referitor la concentrația cuprului, zincului și fierului se evidențiază o relație de antagonism, caracterizată prin scăderea concentrației zincului și creșterea concentrației cuprului și a concentrației fierului. Valori semnificative se întâlnesc la doze crescute de cis-platină.
- 6.5. Analiza bioelementelor din splină. Rezultatele obținute relevă următoarele aspecte: concentrațiile calciului și magneziului sunt

crescute la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Augmentarea valorilor este direct proporțională cu doza de cis-platină administrată. La doze mari există valori semnificative. Concentrația oligoelementelor relevă antagonism în relația Zn, Cu, Fe și sinergism în relația Cu/Fe. Concentrația fierului este mult crescută, concentrația cuprului prezintă de asemeni creșteri, iar concentrația zincului este scăzută la grupele experimentale comparativ cu grupa de control. Ionii de fier prezenți în structura hemoglobinei, a transferinei dar și în structura unor enzime cu rol în transportul oxigenului și în procesele redox din organism.

- 6.6. Analiza bioelementelor din mușchi. Efectele induse de administrarea cis-platinei se caracterizează prin depresia concentrațiilor calciului și magneziului în țesutul muscular cu valori semnificative la grupele experimentale E₃ și E₄. Zincul și cuprul manifestă fenomenul de antagonism, concentrația zincului în musculatură fiind scăzută, iar a cuprului crescută la toate grupele experimentale. Fierul relevă valori în scădere în raport cu creșterea concentrației cis-platinei. Relațiile sunt de antagonism în cazul Zn-Cu și Fe-Cu și de sinergism în cazul Zn-Fe. Valorile sunt semnificative la concentrații crescute ale cis-platinei.
7. Datele analitice furnizate de investigațiile pe animale de laborator pot avea caracter predictiv pentru orientarea conduitei în nutriție, în chimioterapie, în instituirea dietei asociate acestora, în monitorizarea unor procese metabolice, în utilizarea de markeri, etc.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Muggia F.M., Carter S.K. – Malignant diseases, pp. 1023-1077, *Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3rd ed., (Speight T.M., ed.), Adis Press Limited, Baltimore, 1987;
2. Chiricuță I. (Ed.) – *Cancerologie*, Editura Medicală, București, 1988;
3. Berger A, Portenoy RK and Weissman DE, (eds.) - *Principles and Practice of Supportive Oncology*, Lippincott-Raven Books, Philadelphia, 1998;
4. Fisher D.S., Knobf M.T., Durivaje H.J. - *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 6th ed., Mosby – Year Book Inc., Philadelphia, 2003;
5. Upton A.C. - Physical carcinogenesis: radiation – history and sources, pp. 551-555 in *Cancer: a comprehensive treatise*, 2nd ed., Becker F.F. (ed.), Plenum Press, New – York, 1982;
6. Pazdur, R. - Response Rates, Survival, and Chemotherapy Trials, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92(14), 1552–1553;
7. Chabner B.A., Longo D.L. - *Cancer chemotherapy and biotherapy*, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001;
8. [http: // oncolink.upenn.edu/](http://oncolink.upenn.edu/), 2004;
9. Murphy G.P., Morris L.B., Lange D. – Informed decisions – *The complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment and Recovery*, Viking Penguin, New York, 1981;
10. Dorr R.T., Von-Hoff D.D. - Drug monographs. In *Cancer chemotherapy handbook*, (Dorr R, Von-Hoff D, eds.) 2nd ed., Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 1994;
11. Perry M.C. – *The Chemotherapy Source Book*, 2nd ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1996;
12. Alpers David H, William F. Stenson, Dennis M. Bier - *Manual of Nutritional Therapeutics*, 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002;
13. Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J., Thun M.J. - Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 2005, 55, 10-30;

14. Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA. - The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program, *Semin. Oncol.*, 1992, 19(6), 622-638;
15. Hanahan D, Weinberg RA. - The hallmarks of cancer, *Cell* 2000, 100(1), 57-70;
16. Becker F.F. (Editor) - *Cancer a Comprehensive Treatise Etiology: Chemical and physical Carcinogenesis*, Plenum Press, New York, 1973;
17. Baak J.P.A. (Editor) - *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis*, Springer Verlag, Berlin, 1991;
18. Rhoades R., Pflanzer R. - *Human Physiology*, 2nd ed., Saunders College Publishing, Forth Worth - Philadelphia - San Diego - New York - Orlando - Austin - San Antonio - Toronto - Montreal - London - Sydney - Tokyo, 1992;
19. Lemoine N.R., Wright N.A. (Eds.) - *The molecular pathology of cancer*, Vol. 16, Cold Spring Harbor Press, Plainview, 1993;
20. Brugge J (Ed.) - *The origins of human cancer*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, 1991;
21. de Duve C. - *Blueprint for a cell: The nature and origin of life*, Neil Patterson Publ., Burlington - North Carolina, 1991;
22. Souhami R., Tobias J. - *Cancer and its management*, 4th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2003;
23. *** - American Medical Association - The American Medical Association's Encyclopedia of Medicine, Ed. Clayman C.B. Random House, 1989;
24. Freeman H.P. - Poverty, culture and social injustice: determinants of cancer disparities, CA, *Cancer J. Clin.*, 2004, 54 (2), 72-77;
25. Mihich E. - *Drug resistance: Mechanism and reverse*, John Libbey & Co, New - York, 1990;
26. Cavenee, W.K., White R.L. - *The genetic bases of cancer*, Scientific American, 1995, 3, pp.72-79;
27. Foye W.O., Sengupta S.K. - Cancer chemotherapy, pp. 822-845 in Principles of Medicinal Chemistry, (Eds. Foye W.O., Lemke T.L., Williams D.A.), Lippincott Williams, Philadelphia PA, 1995;

28. Baguley B.C. – A brief history of cancer chemotherapy, pp. 1-11 in Anticancer Drug development, (Eds. Baguley B.C., Kerr D.J.), Academic Press San diego, CA, 2002;
29. Cionga G.E., Avram C.L. – *Medicamente chimioterapice*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1978;
30. Dollery C. (ed.) – *Therapeutic drugs*, vol. I-II, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New-York, Tokio, Madrid, 1991;
31. Cristea A.N. – *Farmacologie generală*, Editura Diddactică și Pedagogică, București, 1998;
32. Dobrescu D.- *Farmacoterapie practică*, Vol. I-II, Ed. Medicală, București, 1989;
33. Kobayashi K., Jodrell D.I., Ratain M.J. – Pharmacodynamic – pharmacokinetic relationships and therapeutic drug monitoring, *Cancer surv.*, 1993, 17, 51-57;
34. Smith C.M., Reynard A.M. (ed.) – *Textbook of Pharmacology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1992;
35. Stroescu, V.- *Bazele farmacologice ale Practicii medicale*, ed. a-IV-a, Ed. Medicală, București, 1998;
36. de Vita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.) – *Cancer: Principles of chemotherapy*, 5th ed., Lipincott - Raven, Philadelphia – New – York, 1997;
37. Price, P., Sikora K. (eds) - *Treatment of cancer*, 4th Ed., Arnold, London, 2002;
38. Ries F., Klasterski J. – Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity, *Am. J. Kidney Dis.*, 1986, 13, 368-378;
39. Haskell C.M. (Ed.) - *Cancer treatment*, 3rd ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1990;
40. Wright J.C. – Cancer chemotherapy: Past, present and future, *J. Natl. Med. Assoc.*, 2001, 76 (8), 773 – 876;
41. Adelstein, D. J. - An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamos cell head and neck cancer, *Clin. Oncol.*, 2003, 21(1), 92-98;
42. Baba Al. I. - *Oncologie comparată*, Ed. Academiei Române, București, 2002;

43. Hirschfeld S, Pazdur R. - Oncology drug development: United States Food and Drug Administration perspective, *Crit. Rev. Onco.l Hematol.*, 2002, 42(2),137-143;
44. Abeloff M.D., Armitage J.O., Niederhuber J.E., Kastan M.B., McKenna W.G. (Eds.) - *Clinical Oncology*, 3rd ed., Churchill Livingston Elsevier, New York, 2004;
45. Skeel R.T. (ed.) - *Handbook of cancer chemotherapy*, 7th ed., Lippincott Williams and Wilkins, 2007;
46. Reedjik J. - Significance for effectiveness as anticancer drugs, *Platinum Metals Rev.*, 2008, 52 (1), 2-11;
47. Farrell, N.- Inorganic Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents, pp. 809-840 in "*Comprehensive Coordination Chemistry, II*," (J.A. McCleverty and T.J. Meyer eds.), Elsevier Pergamon (Oxford, UK) 2004
48. Nieto Y., Jones R.B. - DNA-binding agents, *Cancer Chemother. and Biol. Response Modif.*, 2002, 20, 197 - 225;
49. Gârban Z. - *Biologie moleculară: Probleme fundamentale și aplicative*, Ed. Eurobit Timișoara, 1998a;
50. Feuer G., Iglesia F.A. - *Molecular Biochemistry of Human Diseases*, Vol. I-II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985;
51. Cooper G.M., Hausman R.E. - *The Cell: A molecular approach*, ASM Press and Sinauer Associates Inc, 2006;
52. Jones M.M., Basinger M.A., Holscher M.A. - Relative effectiveness of some compounds for the control of cisplatin-induced nephrotoxicity, *Toxicology* 1991,68(3),227-247;
53. Torricelli R., Kurer S:B:, Kroner T., Wuthrich B. - Delayed allergic reaction to Chlorambucil (Leukeran). Case report and literature review, *Schweiz Med Wochenschr*, 1995, 125,1870-1873;
54. Boulanger P., Polonovski J., Biserte G., Dautrevaux M. - *Biochimie médicale*, 2-eme ed., Masson, Paris, 1989;
55. Lee C.R., Faulds D. - Altretamine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cancer chemotherapy, *Drugs*, 1995, 49, 932-953;
56. Nissenkorn I., Herrod H., Soloway M.S. - Side effects associated with intravesica mitomycin, *J.Urol.*, 1981, 126, 596-597;

57. Ritch P.S., Louie A.C. – Skin rash following therapy with mitomycin C, *Cancer*, 1984, 54, 32-33;
58. Damia G., D'Incalci M. – Clinical Pharmacokinetics of altretamine, *Clin. Pharmacokinet.* 1995, 28, 439-448;
59. Coyle T., Bushunow P., Winfield J., Graziano S. – Hypersensitivity reactions to procarbazine with mechlorethamine, vincristine, and procarbazine chemotherapy in the treatment of glioma, *Cancer*, 1992, 69, 2532-2540;
60. Serrano G., Aliaga A., Febrer I., Pujol C., Camps C., Godes M. – Dacarbazine-induced Photosensitivity, *Photodermatol.*, 1989, 6, 140-141;
61. Haiduc I., Silvestru C. – *Organometallics in cancer chemistry*, CRC Press Boca Raton Vol I, Fl, 1989;
62. Reedjik J. - New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2003, 100 (7), 3611-3616;
63. Siddik Z.H., Newell D.R., Boxall F.E., Harrap K.R. - The comparative pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in mice and rats, *Biochem. Pharmacol.*, 1987, 36, 1925-1932;
64. Chu G., Mantin R., Shen Y.M., Baskett G., Sussman H. - Massive cisplatin overdose by accidental substitution for carboplatin. Toxicity and management, *Cancer*, 1993, 72, 3707-3714;
65. Kintzel P., Dorr R.T. – Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function, *Cancer Treat Rev.*, 1995, 21, 33-64;
66. Go R., Adjel A. - Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin, *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17(1), 409-422;
67. Zdravensky Z. Z., Mello J. A., Essigmann J. M., Marinus M. G. - Cisplatin over oxaliplatin modified DNA, *J. Biol., Chem.*, 2002, 277, 1255-1260;
68. Fondevila C., Milone G., Santiago P. – Cutaneous vasculitis after intermediate dose of methotrexate (IDMTX), *Br. J., Haematol.*, 1989, 72, 591-592;
69. Sridhar K.S. – Allergic reaction to 5-fluorouracil infusion, *Cancer*, 1986, 58, 862-864;
70. Williams S.F., Larson R.A. – Hypersensitivity reaction to high-dose cytarabine,, *Br.J.Haematol.*, 1989, 73, 274-275;

71. Collins J.A. – Hypersensitivity reaction to doxorubicin, *Drug Intell Clin.Pharmacol.*, 1984, 18, 402-403;
72. Wang H.J. – Structure-activity studies of anthracycline-DNA complexes, pp. 32-49 in *Molecular Aspects of anticancer drug DNA interaction. Topics on molecular and structural Biology*, vol. I (Neidle S., Waring M.J., Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, USA,2000;
73. Ogle K.M., Kennedy B.J. – Hypersensitivity reactions to etoposide. A case report and review of the literature, *Am.J.Clin.Oncol.*, 1988, 11, 663-665;
74. Hartley A. – Selectivity in alkylating agent DNA-interaction, pp.1-21 in *Molecular aspects of anticancer drug DNA interaction. Topics on molecular and structural Biology*, vol. I (Neidle S., Waring M.J., Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, USA,2000;
75. Baruah H., Barry C.G., Bierbach U. – Platinum-Intercalator conjugates: from DNA targeted cisplatin derivatives to adenine binding complexes as potential modulators of gene regulation, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2004, 4, 1537-1549;
76. Dy G.K., Adjei A.A. – Principles of Chemotherapy, pp.14-41 in *Oncology: an evidence –based approach*, (Chang A.E., Ganz P.A., Hayes D.F., Kinsella T., Pass H.I., Schiller J.H., Stone R.M., Strecher V., Eds.), Springer Science-Business Media Inc., New York, USA, 2006;
77. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. – Cells in their social context/Cancer, pp.1313-1362 in *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Publishing Inc., New York 2002;
78. Gordon J.A., Gattone V.H. - Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure, *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol)*, 1986, 19, 991- 998;
79. Lupuțiu G., Ghiran D. – *Medicația antiinfecțioasă. Chimioterapice cu specificitate limitată*, Ed. Sarmis, Cluj – Napoca, 1995;
80. Yarbro J.W.– Mechanism of action of hydroxyurea, *Semin. Oncol.*, 1992, 19 (3), 1-10;
81. Donehower R.C. – Hydroxyurea, pp. 253-261, in *Cancer chemotherapy and biotherapy*, (Chabner B.A. & Longo D.L.eds.), Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996;

82. Kennedy B.J. – The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia, *Semin. Oncol.*, 1992, 19, 21-26;
83. Rosenberg B.- Fundamental studies with cisplatin, *Cancer*, 1985, 55 (10), 2303-2315;
84. Kelland L.R. – Preclinical perspectives on platinum resistance, *Drugs*, 2000, 59 (4), 1-8;
85. Hammet L.P. – *Physical Organic Chemistry*, McGraw – Hill, New York, 1970;
86. Kaplan J.C., Pesce A.J. - *Clinical chemistry: theory, analysis and correlation*, 5C.V. Mosby Company, St. Louis – Toronto – Princeton, 1984;
87. Matsusaka S, Nagareda T, Yamasaki H. - Does cisplatin (CDDP) function as a modulator of 5-fluorouracil (5-FU) antitumor action? A study based on a clinical trial, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2005, 55, 387-92;
88. Hoffman K., Marten A., Lindel K., Frity S., Jager D., Buchler M.W., Schmidt J. - Major combined electrolyte deficiency during therapy with low-dose Cisplatin, 5-Fluorouracil and Interferon alpha: report on several cases and review of the literature, *BMC Cancer*, 2006, 6, 128 – 132;
89. Salmon S.E., Sartorelli, A.C. – Cancer Chemotherapy pp.881-911, in *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung B.G. Ed.), Appleton – Lange, East Norwalk, 1998;
90. Kaplan J.C., Delpech M. – *Biology moléculaires et médecine*, Medicine Sciences Flammarion, Paris, 1990;
91. O' Dwyer P.J., Johnson S.W., Hamilton T.C. – Cisplatin and its analogues, pp. 418-432, in *Cancer: Principles of chemotherapy*, 5th ed., (de Vita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., eds.), Lipincott - Raven, Philadelphia – New – York, 1997;
92. Reed E., Kohn K.W. – Platinum analogs, pp. 465-490 in *Cancer chemotherapy: Principles and Practice*, (Chabner B.A., Collins J.M., eds), J.B. Lipincott and Co, Philadelphia, 1990;
93. Lippert B. (Ed.) - *Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, 1999;
94. Stordal B., Davey M. – Understanding cisplatin resistance using cellular models, *IUBMB Life*, 2007, 59 (11), 696-699;
95. McKee Trudy, McKee J.J.R. – *Biochemistry – An Introduction*, Wm.C. Brown Publishers, Duque – Bogota – Boston – Buenos Aires – Caracas – Chicago-

- Guilford- London – Madrid – Mexico City – Seul – Singapore – Sydney – Taipei – Tokyo – Toronto, 1996;
96. Gârban Z., Nicola Tr., Daranyi Gabriela, Papadaki Artemisia, Moldovan I., Avacovici Adina - Specific mechanisms in the interaction of cis-platinum with deoxyribonucleic acid and their pharmacological implications, pp.549-558, in *Trace Elements in Human: New Perspectives*, (Ed. Ermidou-Pollet Sophie), Printed by O. Morogianni, Athens, 1997;
 97. Eastman A. - The mechanism of action of cisplatin:From adducts to apoptosis, pp 111-135, in: *Cisplatin:Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, (B. Lippert ed.), Wiley-VCH, New York, 1999;
 98. Levine J.S. and Lieberthal W. – Terminal pathways to cell death, pp. 30-59 in *Acute Renal Failure*, (Eds. Molitoris B:A:, și Finn W.F.), W.B. Saunders, Philadelphia, 2001;
 99. Gârban Z. – *Biologie moleculară*, ed.5-a, (LVI + 534 pag), Ed. Eurobit, Timișoara, 2005b (ISBN 973-620-159-7);
 100. Threlkeld D.S. (Ed.) - Antineoplastics, alkylating agents, cisplatin (CDDP). 652a–652d, in „*Facts and Comparisons Drug Information*”, St. Louis, 1999;
 101. Cohen S.M., Lippard S.J. - Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy, *Prog .Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, 67, 93-130;
 102. McEvoy G.K., - Cisplatin, pp. 816 – 818 in: *American Hospital Formulary Service Drug Information*, American Society of Health – Systems Pharmacists, Inc., Bethesda, MD, 1999;
 103. Andrews P.A., Albright K.D. – Role of membrane ion transport in cisplatin accumulation, pp. 151-159, in „*Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*”, (Howell S.B. ed.), Plenum Press, New York, 1991;
 104. Barry M. A., Behnke C. A., Eastman A.,- Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins, and hyperthermia, *Biochem. Pharm.*, 1990, 40, 2353 – 2362;
 105. Ueda N., Kaushal G.P., Shah S.V. - Apoptotic mechanisms in acute renal failure, *Am. J. Med.*, 2000, 108 (5), 403-415;
 106. Ishida S., Lee J., Thiele D.J., Herskowitz I. - Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2002, 99, 14298-14302;

107. Watson J.D., Crick F.H.C. – Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 1953, 171(4356), 737-738;
108. Gârban Z., Gârban Gabriela (Editori) – *Biochimie. Tratat comprehensiv*, vol.III, ed. 3-a (LV + 504 pag), Ed."Orizonturi universitare", Timișoara, 2005a (ISBN 973-638-248-6);
109. Goswami Niranjana, Bennett-Slavin, Lori L., Rathindra N. - New insight into the mechanism of the cis-Platin-Guanosine 5'-Monophosphate Reaction, *Journal of the Chemical Society, Chemical Engineering, Communications* 1989, 7, 432-433;
110. Beyersmann D. - *Interactions in metal carcinogenicity*, *Toxicol. Lett.*, 1994, 72, 333-338;
111. Fichtinger – Schepman A.M., van der Veer J.L., den Hartog J.H.J., Lohman P.H.M., Reedijk J. – Adducts of the antitumor drug cis-diamminodichloroplatinum (II) with DNA, Formation, Identification and Quantitation, *Biochemistry*, 1985, 24, 707-713;
112. Gârban Z., Gârban Gabriela, Velciov Ariana – Bianca, Ghibu G-D. – Interaction of Deoxyribonucleic acid with cis-platinum: structure – activity relationship, *Revue Roumaine de Chimie*, 2007, 52 (1-2), 207-213;
113. Gosland M., Lum B., Schimmelfennig J., Baker J., Doukas M. – Insights into mechanisms of cisplatin resistance and potential for its clinical reversal, *Pharmacotherapy*, 1996, 16, 16-39;
114. Bernal-Mendez E., Boudvillain M., Gonzalez-Vilchez F., Leng M. - Chemical Versatility of transplatin monofunctional adducts within multiple site-specific platinated DNA, *Biochemistry*, 1997, 24, 7281-7287;
115. Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. - Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, *Nature*, 1965, 205, 698-699.
116. Eastman A., Schulte N.- Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis – diamminedichloroplatinum (II), *Biochemistry*, 1988, 27, 4730-4734;
117. Jamieson R. Elizabeth, Lippard J.S. - Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chemical Reviews*, 1999, 99 (9), 2467-2498;
118. Atkins P.W. – *Physical Chemistry*, 4th ed., Vol.1, Oxford University Press, Oxford, 1990;

119. Huang H., Woo J., Ally S. C., Paul B. - DNA-DNA interstrand Cross-Linking by cis-Diamminedichloroplatinum(II): N₇(dG)-to-N₇(dG)Cross-Linking at 5'd(GC) in Syntetic Oligonucleotides, *Bioorganic and Medical Chemistry*, 1995, 3, 659-669;
120. Atkins P.W., Jones L. - *Chemistry: Molecules, Matter and Change*, 3rd ed. W.H. Freeman and Comp. New York, 1997;
121. Sadowitz P.D., Hubbard B.A., Dabrowiak J.C., Goodisman J., Tacka K.A., Aktas M.K., Cunningham J., Dubowy R.L., Souid A - K. - Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol - blocking agents and thiol drugs, *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30 (2), 183 - 190;
122. Farris FF, Dedrick RL, King FG - Cisplatin pharmacokinetics: applications of a physiological model, *Toxicol. Lett.*, 1988, 43(13), 117-137;
123. Andersson A., Fagerberg J., Lewensohn R. - Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in humans, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 824 - 827;
124. Altman P.L., Dittmer S. Doroty (Eds.) - *Metabolism*, Publ. By Federation of Amer. Soc. For Exp. Biol. Bethesda, 1968;
125. Eichhorn G.L. (Editor)- *Inorganic Biochemistry*, Vol.1, Elsevier Sci Publishing, Amsterdam, 1973;
126. Moller L. - *Environmental Medicine*, Karolinska Institute, Stockholm, Falth and Hassler AB, 2000;
127. Veal G. J., Dias C., Price L., Parry A., Errington J., Hale J., Pearson A.D.J., Boddy A. V., Newell D. R., Tilby M. J. - Influence of cellular factors and pharmacocynetics on the formation of platinum-DNA adducts in leucocytes of children receiveing cisplatin therapy, *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7 (8), 2205-2212;
128. Armstrong D.K., Bundy B., Wenzel L., Huang H.Q., Baergen R., Shashikant L., Copeland L.J., Walker J.L., Burger R.A. - Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer, *NEJM*, 2006, 354, 34-43;
129. Riley, C.M., Sternson L.A. - Cisplatin, *Analytical Profiles of Drug Substances*, 1985, 14, 77-82;
130. Alberts, D. S. - Carboplatin versus cisplatin in ovarian cancer, *Semin. Oncol.*, 1995, 22, (5), Suppl.12, 88-90;
131. Cirera L., Gay M., Tome T., Marti M., Huguet J., Pla R., - Administration of

- high doses of cisplatin in 20-minute infusions, *Rev. Clin. Esp.*, 1988, 182 (4), 192-195;
132. Daugaard G., Abildgaard U., Holstein-Rathlou N.H., Bruunshuus I., Bucher D., Leyssac P.P. - Renal tubular function in patients treated with high-dose cisplatin, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1988, 44 (2), 164-172;
133. Crown P. - The platinum agents: a role in breast cancer treatment?, *Semin. Oncol.* 2001, 28(1) Suppl. 3, 28-37;
134. McKeage M.J. - Clinical toxicology of platinum-based cancer chemotherapeutic agents, pp 251-275, In *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy*, (Kelland L.R., Farrell N.P. Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000;
135. Bertolero F., Litterst C.L.- Changes in renal handling of platinum in cisplatinum - treated rats following induction of metabolic acidosis or alkalosis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1982, 36, 279 - 285;
136. Appenroth D., Winnefeld K., Braunlich H.- Nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatinum in young and adult rats, *Biomed. Biochim. Acta*, 1988, 47, 791-797;
137. Pinzani V., Bressolle F., Haug I.J., Galtier M., Blayac J.P. - Cisplatin induced renal toxicity and toxicity - modulating strategies: a review, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 1994, 35, 1-9;
138. Nagai N., Kinoshita M., Ogata H., Tsujino D., Wada Y., Someya K., Ohno T., Masuhara K., Tanaka Y., Kato K., Nagai H., Yokoyama A., Kurita Y. - Relationship between pharmacokinetics of unchanged cisplatin and nephrotoxicity after intravenous infusions of cisplatin to cancer patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1996, 39, 131-137;
139. Gonzales-Vitale J.C., Hayes D.M., Cvitkovic E., Sternberg S.S. - The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride, *Cancer*, 1977, 39, 1362-1371;
140. Borch R.F., Katz J.C., Lieder P.H., Pleasants M.E. - Effect of diethyldithiocarbamate rescue on tumor response to cis- platinum in a rat model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1980, 77, 5441-5444;
141. Hostetter T.H., Brenner B.M. - Tubulointerstitial diseases of the kidney, pp. 1317-1320, in „*Harrison's principles of internal medicine*“, 13th ed.,

- (Isselbacher K.J., Braunwald E., Wilson J-D., Martin J.B., Fanci A.S., Kasper D.L., eds.), McGraw – Hill, New-York, 1994;
142. Yee S., Fazekas-May M., Walker E.M., Montague D., Stern S., Heard K.W. - Inhibition of cisplatin toxicity without decreasing antitumor efficacy. Use of a dithiocarbamate, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1994, 120, 1248-1252;
143. Conklin K.A. - Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects, *Nutrition and Cancer*, 2000, 37(1), 1-18;
144. Safirstein, R.L. - Renal diseases induced by anti-neoplastic agents, pp. 1175–1188, In *Diseases of the kidney and urinary tract*, (R.W. Schrier, ed.), Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2001;
145. El Daly E.S. – Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella Sativa* extract on cisplatin – induced toxicity in rats, *Journal of IAS*, 1996, 9 (4), 105-118;
146. Bolaman Z., Köseoğlu M. H., Demir S., Kadiköylü G., Barutca S., Atalay H. – Effect of α – tocopherol on lipid peroxidation caused by cisplatin in rat kids, *Turk. J. Haematol.*, 2003, 20(1), 35-38;
147. Kalkanis J.G., Whitworth C., Rybak L.P. – Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity, *Laryngoscope*, 2004, 114 (3), 538 – 542;
148. Pace A., Savarese A., Picardo M., Maresca V., Pacetti U., Del Monte G., Biroccio A., Leonetti C., Jandolo B., Cognetti F., Bove L. – Neuroprotective effect of vitamin supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy, *Journal Of Clinical Oncology*, 2003, 21 (5), 927-931;
149. Sahin A.A., Oysu C., Yilmaz H.B., Topak M., Kulekci M., Okar I. – Effect of oral magnesium supplementation on cisplatin ototoxicity, *J. Otolaryngol.*, 2006, 35 (2), 112-116;
150. Cotrău M., Popa L., Stan T., Preda N., Ajtay M. – *Toxicologie*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1991;
151. Daugaard G.K., Petrera J., Trojaborg W.- Electrophysiological study of the peripheral and central neurotoxic effect of cis-platin, *Acta Neurol. Scand.*, 1987, 76 (2), 86-93 ;

152. Gandara D.R., Perez E.A., Wiebe V., De Gregorio M.W. – Cisplatin chemoprotection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity, *Semin. Oncol.*, 1991, 18 (3), 49-55;
153. Grunberger D., Weinstein I.B. – Biochemical Effects of the Modification of Nucleic Acids by Certain Polycyclic Aromatic Carcinogens, pp. 105 – 149, in "Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology" (Cohn W.E., Ed.), Academic Press, New York, 1979;
154. Gârban Z., Daranyi Gabriela, Precob V., Miklos J, Maurer Ana, Prunkl Agneta, Mureșan Codruța, Perța Doina, Hațegan Maria - Homeostasis changes induced by the action of metal compounds in the materno-fetal complex. I. The action of cis-platinum in early development of rats, *Rev. roum. Morphol.-Embryol.*, 1987, 1, 4, 249-259;
155. Gârban Z., Daranyi Gabriela, Erdelean R., Nemeș Radița, Gergen I., Prunkl Agneta, Mureșan Codruța, Dop Beatrice - Homeostasis changes induced by the action of metal compounds in materno-fetal complex. III. The action of cis-platinum in rat conceptuses during advanced pregnancy, *Rev. roum. Biochim.*, 1988, 25 (2), 121-129;
156. Niedner H., Christen R., Lin X., Kondo A., Howell B.S. – Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin, *Mol. Pharmacology*, 2001, 60(6), 1153-1160;
157. Grecu, I., Neamțu, M., Enescu, L., *Implicatii biologice și medicale ale chimiei anorganice*, Editura Junimea, Iași, 1982;
158. Bertini I., Gray H.B., Lippard S.J., Valentine J.S. – *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, CA, 1994;
159. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. – Antineoplastic agents, pp. 1315-1405 in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics*, 11th Ed., McGraw - Hill Companies, USA, 2006;
160. Chu E., De Vita V.T.Jr., - *Cancer Chemotherapy Drug Manual*, 2007, (Jones and Bartlett Pubs.), BK&CD-ROM edition, 2007;
161. Schrauzer G.N. - The discovery of the essential trace elements. An outline of the history of biological trace element research, pp. 17-31, in : *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*, Ed. Frienden, Plenum Press, New York-London, 1984;

162. Manolescu N., Coicnitu V., Dimitriu C. – *Ultrastructura unor celule sanguine în microscopia electronică de baleiaj*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, 1979;
163. Haiduc I., Zuckermann J.J. – *Basic Organometallic Chemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, 1985;
164. Anke M., Meissner D., Mills C.F. – *Trace elements in Man and Animals*, Verlag Media Touristik, Gersdorf, 1993;
165. Silaghi-Dumitrescu L. – *Reactivi organometalici în sinteza organica. Principii și metode*, Ed. Sincron Cluj-Napoca, 1998
166. Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlfeld A.W. – Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, *Clin. Chem.*, 1978, 24 (1), 58 – 73;
167. Neamțu M., Grecu I., Enescu L. – *Implicații biologice și medicale ale chimiei anorganice*, Editura Junimea, Iași, 1982;
168. van't Sant P., Sleijfer D.T., Schraffordt Koops H., Suurmeijer A.J., Willemse P.H., De Bruijn H.W., Marinck J., Ockhuizen T. – The pattern of gamma – glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, serum glutamyl oxalate transaminase and serum glutamyl pyruvate transaminase in patients with disseminated non-seminomatous testicular tumours, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984, 20, (2), 209-215;
169. Rocsin M.A.- *Farmacotoxicologie practică*, Editura Imprimeriei de Vest, Oradea, 2001;
170. Avacovici Adina – Elena, Martău Ariana – Bianca, Gârban Zeno – *Biologie moleculară. Metode specifice și aplicații*, Ed. Eurobit Timișoara, 2003;
171. Malinowski E.R., Howery D.G. – *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley, New-York, 1980;
172. Cajal N. (Ed.) – *Tratat de virusologie medicală*, Vol.I, Editura Medicală, București, 1990;
173. Klein C. B., Frenkel K., Costa M.-. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, 4, 592-604;
174. Kroschwitz J.I. – *Encyclopedial of Chemical Technology*, vol. 5, John Wiley & Sons, New York, Vol.5, 1993;
175. Neamțu G.- *Biochimie alimentară*, Ed. Ceres, București, 1980;
176. Rawn J.D. – *Biochemistry*, Neil Patterson Publishers, Burlington – North

- Carolina, 1991;
177. Murray A., Hunt T. – *The cell cycle*, W.H. Freeman and Comp., New York, 1993;
178. Urai Z. – Ghid de date biologice ale animalelor de laborator, Cap. 5, pp. 111-149, în "*Biologia animalelor de laborator și oncologie comparată*", Colecția Enciclopedia oncologică, Vol. 19, (Eds. Chiricuță I., Bologa S., Rișcă R., Ghergariu S.), Imprimeria "Ardealul" Cluj-Napoca, 1992;
179. Șerban M., Câmpeanu G., Ionescu E. – *Metode de laborator în biochimia animală*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1993;
180. Falcă C. - *Semiologie medicală veterinară*, vol. II, Ed. Cosmopolitan - Art, Timișoara, 2004;
181. Boers, G.N., McComb R.B. – A continuous Spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase, *Clin. Chem.*, 1966, 12, 70 – 74;
182. Teodorescu – Exarcu I. (Ed.) – *Patologie biochimică*, Ed. Medicală, București, 1974;
183. Serway R.A. – *Principles of Physics*, 2nd ed., Harcourt Brace & Company, Fort Worth, 1998;
184. Howell S.B., Pfeifle L., Wong W.E., - Intraperitoneal cisplatinum with systemic thiosulphate protection, *Ann. Intern. Med.*, 1982, 97, 845 – 851;
185. Brohee D., Chalet J., Cornil Y., d'Inverno E. - Intraperitoneal haemorrhage during intraperitoneal cisplatin therapy and concomitant systemic heparin therapy, *Neth. J. Med.* 1987, 31 (5-6), 251-252;
186. Cucuianu M., Rus H.G., Niculescu D., Vonica A. – *Biochimie – Aplicații clinice*, Ed. Dacia, Cluj – Napoca, 1991;
187. Schneider J.G. – Intraperitoneal chemotherapy, *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 1994, 21, 195-212;
188. Helrich K. (Ed.) – *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15th edition, Publ. By Association of Official Analytical Chemists., Inc., Virginia, 1990;
189. Cotrău M., Proca M. – *Toxicologie analitică*, Ed. Medicală, București, 1988;
190. Gouge S.F., Tietjen D.P., Moore J. Jr. - Irreversible renal failure after intraperitoneal cisplatin administration. A case report., *J. Reprod. Med.*, 1989, 34 (11), 931-933;

191. Nuță Gh., Bușneag C. – *Investigații biochimice*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1977;
192. Mody E., Funduc I., Alexandrescu R., Dobreanu M. – *Biochimie clinică (Patobiochimie)*, Ed. All Educational, 2000;
193. Ogur M., Rosen C. – The nucleic acids of plant tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid (DNA) and pentose nucleic acid (PNA) from plant tissue, *Archives of Biochemistry*, 1950, 27, 260-276;; Olinescu Radu - *Metode biochimice de laborator clinic*, Ed. Cerna, București, 1993;
194. Spirin A.S. – Spectrophotometric determination of total nucleic acids, *Biokhimiya*, 1958, 23, 656-662;
195. Olinici C.D., Vaida M.F. – *Metode de analiză cantitativă și morfologică în biologie și medicină*, Ed. Tehnică, București, 1997;
196. Liberati T.A., Sansone S.R., Feuston M.H. – Hematology and clinical values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls, *Veterinary Clinical Pathology*, 2004, 33 (2), 68-73;
197. Wuyts B., Bernard D., van der Noortgate N., van de Walle J., - Reevaluation of formulas for predicting creatinine clearance in adults and children using compensated creatinine methods, *Clin .Chem.*, 2003, 49, 1011-1014;
198. Rock R.C., Walker W.G. Jennings C.D. – Nitrogen metabolites and renal function, pp. 669-704, in *Fundamentals of clinical Chemistry*, (Tietz N.W., Saunders W.B., Eds.), 3rd ed., Philadelphia, 1987;
199. Zawta B., Delanghe J., Taes Y., van der Noortgate N., Lemeire N., Engel W., - Arithmetic compensation for pseudo – creatinine interference of the creatinine Jaffe method and its effect on creatinine clearance results, *Clin. Chem Part 2, Suppl S June*, 2001, 46 (6), 487 - 492;
200. Essa M.M., Subramanian P. –Hibiscus sabdariffa affects ammonium chloride – induced hyperammonemic rats, *Evid. Based Compelement Alaternat Med.*, 2007, 4 (3), 321-325;
201. Bulger H.A., Johns H.E. – The determination of plasma uric acid, *J. Biol., Chem.*, 1941, 140, 427 – 429;
202. Brezeanu M., Cristureanu E., Antoniu A., Marinescu D., Andruh M. – *Chimia metalelor*, Ed. Academiei Române, București, 1990;

203. Ganong W.F. – *Review of Medical Physiology*, 17th ed., Lange Medical Book, Norwalk, CT, 1995;
204. Vogel, A., - *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, Pearson Education Ltd., Essex, 2000;
205. *** - WHO (World Health Organisation)- Principles and methods for the assessment of risk from essential trace elements, IPCS INCHEM, Geneva, 2002;
206. Versieck, J., Cornelis R.- *Trace elements in human plasma or serum*, CRC Press, Boca Raton, 1989;
207. Ciudin Elena, Marinescu D. – *Animale de laborator*, Vol. 1, Ed. All, București, 1996;
208. Cordoș E., Manoliu C. – *Spectrometria de absorbție și fluorescență atomică*, Ed. Tehnică, București, 1983;
209. Johnson H.L., Sauberlich H.E. – Trace elements analysis in biological samples, pp. 405 – 426, in "*Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*", (Prasad A.S., Ed.), Alan Liss Inc., New York, US, 1982;
210. Welz B. - *Atomic Absorption Spectrometry*, Third Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1998.
211. L'vov B. V. - Fifty years of atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Chem.*, 60, 382-392, 2005;
212. Broekaert J.A.C.- *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, Third Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1998;
213. Jăntschi L. – *Chimie fizică. Analize chimice și instrumentale*, Editura Academic Direct, 2004, ISBN 973-86211-7-8;
214. LeRoy A.F., Wehling M.L., Sponseller H.L. – Analysis of platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrophotometry, *Biochem. Med.*, 1977, 18, 184-191;
215. Williams B. – *Biostatistics*, Chapman & Hall, London, 1993;
216. Mărușteri M. – *Noțiuni fundamentale de biostatistică: note de curs*, Ed. Univ Press, Târgu Mureș, 2005, ISBN 973-7665-11-2;
217. Dean P.M. – *Molecular Foundations of Drug – Receptor Interactions*, Vol.1, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1987;

218. Davidson V.L., Sittman D.B. – *Biochemistry (National Medical Series)*, 3rd ed., Harwal Publishing, Philadelphia – Baltimore – Hong Kong – Munich – Sydney – Tokyo, 1994;
219. Israil A.M.- *Biologie moleculară. Prezent și perspective*, Editura Humanitas, 2000;
220. Ciudin Elena, Marinescu D. – *Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală*, Ed. Moldogrup, Iași, 1997;
221. Bernard C. – *Introducere în studiul medicinei experimentale* (traducere din lb. franceză), Ed. Științifică, București, 1958;
222. Manolescu N., Bârza H., Căprărin A., Sinchievici B. - *Ghid de hematologie a animalelor în creșterea intensivă*, Ed. Ceres, București, 1978;
223. Francks L.M., Teich N.M. – *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*, Oxford University Press, 1986;
224. Brody T. – *Nutritional biochemistry*, 2nd Edition. Ca: Academic Press, San Diego, 1994;
225. Lippard, S.J., Berg J.M. – *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994;
226. Pop P. - *Boli de nutriție și metabolism la animale*, Editura Mirton, Timișoara, 1999 ;
227. Gârban Z. – *Xenobiochimie: Tratat comprehensiv. Vol. IV (XLVI + 472 pag)*, Ed. Eurobit Timișoara, 2005c (ISBN 973- 620-020-5);
228. Post S.G. (Ed) - *Encyclopedia of Bioethics*, 3rd edition, 5 vol., Macmillan Reference, USA, 2004;
229. Khleif S.N., Curt G.A. - *Animal models in developmental therapeutics*, pp.573–584, in *Cancer Medicine*, (Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E Eds.), 5th ed. Hamilton, Ont.; Lewiston, NY: Decker, 2000;
230. Kohn D.F., Clifford C.B. - *Biology and diseases of rats*, pp. 121-167 In *Laboratory Animal Medicine*, (J.G. Fox, L.C. Anderson, F.M. Lowe eds.), 2nd ed., Academic Press, New York, 2002;
231. Pora E. – *Homeostazia*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, 1981 ;
232. Ensminger A.H., Ensminger M.E., Konlande J.E., Robson J.R.K. – *The concise Encyclopedia of Foods and Nutrition*, 2nd Ed., C.R.C. Press, Boca Raton, 1995;
233. Falcă C., Ciorbă Gh. – *Tehnici de examinare clinică și paraclinică la animale*,

- Ed. A 2-a, Timișoara, Ed. Mirton, 2005;
234. Trissel L. - *Handbook on Injectable Drugs*, 12th ed., American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda MD, 2003;
235. Bowen H.J.M. - *Trace elements in Biochemistry*, Academic Press, London and New York, 1966;
236. Devlin T.M. (Ed.) - *Textbook of chemistry with Clinical correlations*, 3rd ed., Wiley and Sons Inc., Publication, New - York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore, 1992;
237. Haiduc I. - Metals in medicine : past, present, future, pp. 35-42, in "*Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*", (Gârban Z., Drăgan P., Eds.), Publishing House "Eurobit", Timișoara, 1997;
238. Mogoș V.T. - *Alimentația în bolile de nutriție și metabolism*, Vol.1, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 1997 ;
239. Ghizdavu L. - *Chimie bioanorganică*, Editura Poliam, Cluj - Napoca, 2000;
240. Alderden R.A., Hall M.D., Hambley T.W. - The Discovery and development of Cisplatin, *Journal of Chemical Education*, 2006, 83, 728-734
241. Wozniak K., Blasiak J. - Recognition and repair of DNA - cisplatin adducts, *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49 (3), pp. 583-596;
242. Clarke PA, Poole R, Wooster R -. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential, *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 62(10), 1311-1336
243. Grover P.L. (Ed.) - *Chemical Carcinogenesis and DNA*, Vol. I -II, CRC Press Inc., Boca Raton, 1979;
244. Friedberg F.C., Walker G.C., Siede W. - *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington DC, 1995;
245. Mogoșanu D.G., Hîncu L., Mititelu M. - Complecși metalici utilizați în terapia antitumorală, *Gazeta Farmaciștilor*, 2002, 5, 23 - 27;
246. Zamble D.B., Lippard S.J. - Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy, *TIBS*, 1995, 20, 435-439;
247. Braadstad C.D., Zaidi S.K., Montecino M., Lian J.B., von Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S. - Architectural organisation of the regulatory machinery for transcription, replication and repair: dynamic-temporal-spatial parameters of cell cycle control, pp. 15-94 in *Cell cycle and growth control: biomolecular*

- regulation and cancer*, 2nd ed., John Wiley and sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2004;
248. Klukowska L., Nadulska A., Dyba S., Tychowska I. – The influence of cisplatin on blood, some blood enzyme activities, magnesium level in rat serum and oxygen consumption in liver and kidneys, *J. Surg. Oncol.*, 2005, 89 (1), 18 – 22;
249. Marshall W.J., Bangert S.K. – *Clinical chemistry*, 5th Edition, Edinburgh – London – New York Oxford – Philadelphia – St. Louis – Sydney – Toronto, Mosby, 2004;
250. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=3886121 |2000|
251. Gârban Z., Drăgan P., Daranyi Gabriela, Riviș I., Mareș A., Eremia Iulia – The effects of cis-platinum and cyclophosphamide on deoxyribonucleic acid, p.52, in "*XIth International Symposium on Medicinal Chemistry*", Abstracts Volume, Jerusalem, September 2-7, 1990;
252. <http://science.kennesaw.edu/>, 2001;
253. Chválová K., Brabec V., Kašpárková J. – Mechanism of the formation of DNA – protein cross – links by antitumor cisplatin, *Nucleic Acid Research*, 2007, 35 (6), 1812-1821;
254. Gârban Gabriela, Velcirov Ariana – Bianca, Velcirov P-R., Vaszilcsin C. – Cis-platinum administration effect on serum proteins and DNA biosynthesis, pp. 135-140 in "*Proceedings of the 7th International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*", Tome VII, (Gârban Z., Drăgan P., Eds.), Publ. House, Eurobit, Timișoara, 2006, ISSN 1583-4204;
255. Friedman H.S., Averbuch S.D., Kurtzberg J.- Non-classic alkylating agents, pp. 333-356, in *Cancer chemotherapy and biotherapy*, (Chabner B.A. & Longo D.L.eds.), Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996;
256. Gârban Z., Carțiș I., Avacovici A., Moldovan I. – Comparative aspects between the interactions of deoxyribonucleic acid with some cytostatic drugs: Particularisation for the action with cis.platinum and cyclophosphamide:1. Investigations in vivo on experimental animals, pp: 1118-1125, in "*Mengen- und Spurenelemente, 20. Arbeitstagung 2000*", Friedrich Schiller Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2000a;

257. Zlatanova J., Yaneva J., Leuba S.H. – Proteins that specifically recognize cisplatin damaged DNA; a clue to anticancer activity of cisplatin, *FASEB*, 1998, 12, 791-799;
<http://www.fasebj.org/cgi/content/full/12/10/791> |2001|
258. Perez R.P. - Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *Eur. J. Cancer*, 1998, 34 (10), 1535-1542;
259. Cummings B.S. and Schnellmann R.G. - Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, 302, 8-17;
260. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. – Biochemical mechanism of cisplatin cytotoxicity, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 2007, 7, 3-18;
261. Gârban Z., Moldovan I., Avacovici Adina, Daranyi Gabriela - Structure-activity relationships in case of interaction between cis-platinum and deoxyribonucleic acid., pp.517-522, *Current Problems in Cellular and Molecular Biology* (Eds. Crăciun C., Ardelean A.), Publishing House Risoprint, Cluj-Napoca, 2000b.
262. Johnson J.I., Decker S., Zaharevitz D., Rubinstein L.V., Venditti J.M., Schepartz S., Kalyandrug S., Christian M., Arbusk S., Hollingshead M., Sausville M.E.A. - Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials, *Br. J. Cancer*, 2001, 84 (10), 1424 – 1431;
263. Giaccone G. – *Clinical perspectives on platinum resistance*, *Drugs*, 2000, 59 (4), 9-17;
264. Gately D.P., Howell S.B. - Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review, *Br. J. Cancer*, 1993, 67, 1171-1176;
265. Fink D., Howell S.B. - How does cisplatin kill cells? pp. 149-167, in: *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy*, (Kelland LR, Favilli F eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000;
266. Chabner BA, Ryan DP, Raz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P - Antineoplastic agents. pp. 1389-1459, In (Goodman and Gilman's, editors), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Tenth Ed, McGraw – Hill, New-York; 2001, Champe C.P., Harvey R.A. – *Illustrated Reviews:*

- Biochemistry*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia – London – New York – Sao Paolo – Mexico City – Sydney, 1987;
267. Ramesh G., Reeves B.W. – TNFR2 – mediated apoptosis and necrosis in cisplatin – induced acute renal failure, *A.J. Physiol.*, 2003, 285, 610-618;
268. Curthoys N.P., Hughey R.P. – Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyl transpeptidase, *Enzyme*, 1979, 24, 383-403;
269. Teicher B.A. – Preclinical models for high-dose therapy, pp. 17-35 in *High-dose cancer therapy*, (Armitage O., Antman K.H., eds.), Williams & Williams, Philadelphia, 1995
270. Mares V., Lisá V., Malik R., Kozáková H., Sedo A. – Cisplatin induced gamma – glutamyltransferase up-regulation, hypertrophy and differentiation in astrocytic glioma cells in culture, *Histol. Histopathol.*, 2003, 18, 687-693;
271. Ivanov A.I., Christodoulou J., Parkinson J.A., Barnham K.J., Tucker A., Woodrow J., Sadler P.J. – Cisplatin Binding Sites on Human Albumin, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, (24), 14721-14730;
272. Hanigan M. H., Devarajan P. – Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms, *Cancer Therapy*, 2003, 1, 47-61;
273. Muldoon L.L., Pagel M.A., Kroll R.A., Brummett R.E., Doolittle N.D., Zuhowski E.G., Egorin R.E., Nuewelt E.A. – Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity, *Clinical Cancer Research*, 2000, 6, 309-315;
274. Tegeder I., Lutz B., Seegel M., Ahmed A., Turowski B., Geisslinger G., Kovacs A.- Cisplatin tumor concentration after intraarterial cisplatin infusion or embolization in patients with oral cancer, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 73 (5), 417-426;
275. Lebwohl D., Canetta R. – Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update, *Eur. J. Cancer*, 1998, 34, 1522-1534;
276. Velciov Ariana – Bianca, Gârban Gabriela, Popescu Georgeta – Sofia, Velciov Petru – Robert, Gârban Z. – Cis-platinum action on some metal elements and proteins concentration in laboratory animals, pp.549-553 in "5th International Symposium on trace elements in human: new perspectives", Athens, 2005b;

277. Khalaila I., Bergamo A., Bussy F., Sava G., Dyson P.J. - The role of cisplatin and NAMI-A plasma-protein interactions in relation to combination therapy, *International Journal Of Oncology*, 2006, 29 (1), pp. 261-268
278. Hrusheski W.J.M. - Selected aspect of cis-platin nephrotoxicity in the rat and man, *Devel. Oncol.*, 1984, 17, 165-186;
279. Velciov Ariana - Bianca, Gârban Gabriela, Velciov P.R., Ahmadi - Vincu Mirela, Pup Mihaela, Gârban Z. - Modification of enzymatic status induced by xenobiotic action of cis-platinum, in "Scientifical Researches" Agroalimentary Processes and Technologies, Timișoara, 2006a, XII (2), 513-520, ISSN 1453-1399;
280. Cascinu S., Cordella L., Del Ferro E.- Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin - based chemotherapy in advanced gastric cancer: a randomized double - blind - placebo - controlled trial, *J. Clin. Oncol.*, 1995, 13, 26 - 32;
281. El-Deiry W.S. - The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*, 2003, 22, 7486-7495;
282. Torigoe T., Izumi H., Ishiguchi H., Yoshida Y., Tanabe M., Takeshi Y., Igarashi T., Niina Y., Wakasugi T., Imaizumi T., Yasutomo M., Kuwano M., Kohno K. - Cisplatin resistance and transcription factors, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2005, 5, 15-27;
283. Brady H.R., Kone B.C., Stromski ME, Zeidel ML, Giebisch G, Gullans SR - Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules, *Am. J. Physiol.*, 1996, 258, 1181-1187
284. Yang Z., Schumaker L. M., Egorin M., J., Zuhowski E.J., GuoZ., Cullen K.J. - Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis, *Clinical Cancer Research*, 2006, 12, 5817-5825;
285. Vera G., Chiarlone A., Martin M.I., Abalo R. - Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats, *Autonomic Neuroscience*, 2006, 126 (7), 81-92;
286. Gârban Z., Dancău G., Daranyi Gabriela, Erdelean R., Văcărescu G., Precob V., Eremia Iulia, Udriște C. - Implication of chronobiochemistry-metabolism relationship in the induction of homeostasis changes. I. The action of cis-

- platinum on hepatic DNA biosynthesis and on some serum metabolites in rats, *Rev. roum. Biochim.*, 1989, 26(2), 107-117;
287. Darnell J., Lodish H., Baltimore D. – *Molecular Cell Biology*, Sci.Amer.Book Inc., New York, 1986;
288. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., - *Harper's Biochemistry*, 24th ed., Appleton and Linge, Stanford – Connecticut, 1996;
289. Chiricuță I. – *Cancerologie*, vol. 1, *Cancerologie generală*, Ed. Medicală, București, 1984;
290. Neidle S., Waring M. (Eds.) – *Molecular aspects of anticancer drug – DNA interaction Vol I* CRC Press, Boca Raton, 1993;
291. Gârban Z., Daranyi G., Avacovici A., Moldovan I., Cartîș I – Changes induced in homeostasis by the action of cisplatin on the materno-fetal complex, pp: 873-880, in "*Mengen- und Spurenelemente, 20. Arbeitstagung 2000*", Friedrich Schiller Universitat Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1998b;
292. Matsushima H., Yonemura K., Ohishi K., Hishida A. - The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats, *J. Lab. Clin. Med.*, 1998, 131, 518-526;
293. González R., Borrego A., Zamara Z., Romay C., Hernández F., Menéndez S., Montero T., Rojas E. – Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats, *Mediators Inflamm.*, 2004, 13(5), 307 – 312;
294. Zhou H., Kato A., Miyaji T., Yasuda H., Fujigaki Y., Yamamoto T., Yonemura K., Takebayashi S., Mineta H., Hishida A. – Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin – induced acute renal failure in rats, *Nephrol. Dial. Transplant*, 2006, 21 (3), 616 – 623;
295. Passmore A., Eastwood MA. - *Human nutrition and dietetics*. 8th ed., Churchill Living Stone Medical Division and Longman Group, UK, 1987;
296. Gardner G., Mesler D., Gitelman H.J. - Hemolytic uremic syndrome following cisplatin, bleomycin, and vincristine chemotherapy: a report of a case and a review of the literature, *Ren. Fail.*, 1989, 11 (2-3), 133-137;
297. Daley-Yates P.T., McBrien D.C.H. - Cisplatin metabolites in plasma, A study of their pharmacokinetics and importance in the nephrotoxic and antitumour activity of cisplatin, *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 3063-3070;

298. Jones J.B., Purdy C.Y., Bailey R.T.Jr., - Cyclophosphamide anaphylaxis, *DICP*, 1989, 23, 88-89;
299. Hamers F.P.T., Gispen W.H., Neijt J.P. - Neurotoxic side effects of cisplatin, *Eur. J. Cancer*, 1991, 27 (3), 372-376;
300. Hanigan M.H., Deng M., Zhang L., Taylor Jr. T., Lopus M.G. - Stress response inhibits the nephrotoxicity of cisplatin, *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 2005, 288 (1), 125 - 132;
301. Bogin E., Marom M., Levi Y. - Changes in serum , liver and kidneys of cisplatin - treatment rats: effects of antioxidants, *Eur. J. Chem. Biochem.*, 1994, 32, 843 - 851;
302. Gârban Z., Velciov Ariana - Bianca, Velciov P.R., Moldovan I., Avacovici Adina, Ahmadi-Vincu Mirela, Ghibu G.D. - Experimental Data Concerning Action Of Cis-platin On Metal Elements In Blood, in "*Scientifical Researches" Agroalimentary Processes and Technologies*, Universitatea "S.A.M.V.B." Timișoara, 2005d, XI (1), 147-153;
303. Weinblatt M.E., Kahn E., Scimeca P.G., Kochen J.A., - Hemolytic uremic syndrome associated with cisplatin therapy, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1987, 9(4), 295-298;
304. Munir S., Bhatti N., Almas K., Nawaz M., Manzoor F., Husain S.J. - Estimation of protein endogenous creatinine and urea in the blood of male volunteers, *Pakistan J.Med.Res.*, 2003, 42(4) , 91-96;
305. Myeck J.M., Harvey R.A., Champe P.C. - *Pharmacology*, 2nd ed., Lippin-Laven Publishers, New York, 1992;
306. Velciov Ariana-Bianca, Gârban Gabriela, Velciov P-R., Ahmadi - Vincu Mirela, Pup Mihaela, Gârban Z. - Concentration of some non - protein nitrogen metabolites in blood serum of experimental animals consecutive to cis-platinum administration, pp. 279-284 in "*Mengen- und Spurenelemente, 23. Arbeitstagung 2006*", Friedrich Schiller Universitat Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2006b, ISBN 3-929526-85-9;
307. Raj G.V., Iasonos A., Herr H., Dopnat S.M., - Formulas calculating creatinine clearance are inadequate for determining eligibility for cisplatin - based chemotherapy in bladder cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24 (19), 3095-3100;
308. Serrano A., Gerson R., Villela L. - Serum and urinary magnesium in patients treated with cisplatin, *An Med. Asoc. Hosp. ABC*, 1995, 40 (4), 145-151;

309. Weijl N.I., Cleton F.J., Osanto S. – Free radicals and antioxidants in chemotherapy – induced toxicity, *Cancer Treat. Rev.*, 1997, 23, 209 – 240;
310. Dobyán D.C., Levi J., Jacobs C., Kosek J., Weiner M.W. – Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: II. Morphological observations, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980, 213, 551-556;
311. Fleck Ch., Kretyschel I., Sperschneider T., Appenroth D. – Renal amino acid transport in immature and adult rats during chromate and cisplatin – induced nephrotoxicity, *Amino Acids*, 2001, 20, 201-215 ;
312. Abou - Seif M.A.M., El - Naggár M.M., El - Far M., Ramadan M., Salah N. - Prevention of biochemical changes in gamma-irradiated rats by some metal complexes, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, 41 (7), 926 – 933;
313. Hoffbrand A.V., Pettit J.E. - *Essential haematology*, 4th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2001;
314. Provan, D.(ed.) - *ABC of clinical haematology*, 2nd ed., BMJ Books,London, 2003;
315. Manolescu, N. - *Tratat de hematologie animală*, vol. I Ed. Fundației „România de mâine”, București, 1999;
316. Safaei R., Katano K., Samimi G., Naerdemann W., Howell S.B. – Cisplatin resistance is mediated by copper homeostasis mechanisms, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*,2002, 34, 423-426;
317. Tolonen M. – *Vitamins and minerals in health and nutrition*, Ellis Horwood Ltd., 1990;
318. Martău Ariana – Bianca, Gârban Gabriela, Gârban Zeno, Ahmadi – Vincu Mirela, Velciov Petru – *Metabolic and nutritional aspects following cytostatic chemotherapy*, pp. 424-430, in Anuarul “Cercetări științifice: Progrese și Tehnologii Agroalimentare”, Vol. X No.2, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara, Ed. Agroprint Timișoara, 2004;
319. Bissett D., Cornford E.J., Sokal M. - Hyponatraemia following cisplatin chemotherapy, *Acta Oncol.*, 1989, 28 (6), 823 - 825;
320. Townsend D.M., Hanigan M.H. – Inhibition of gamma – glutamyl transpeptidase or casein S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 2002, 300, 142-148;

321. Masubuchi Y., Kawasaki M., Horie T. - Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes associated with cisplatin-induced acute renal failure in male rats, *Arch. Toxicol.*, 2006, 80(6), 347-353;
322. Mariette X., Paule B., Bennet P., Clerc D., Bisson M., Massias P. - Cisplatin and hyponatremia, *Ann. Intern. Med.*, 1988, 108 (5), 770-771;
323. Fried L.F., P. M. Palevsky. - Hyponatremia and hypernatremia, *Medical Clinics of North America*, 1997, 81, 585-609;
324. Lajer H., Bundgaard H., Secher N.H., Hansen H.H., Kjeldsen K., Daugaard G. - Severe intracellular magnesium and potassium depletion in patients after treatment with cisplatin, *Br.J. Cancer*, 2003, 89 (9), 1633-1637;
325. Benga G. (ed.) - *Structure and Properties of Cell Membrane*, Vol.1-3, C.R.C. Press, Boca Raton, 1985;
326. Williams P.D., Hottendorf G.H. - Effect of cisplatin on organic ion transport in membrane vesicles from rats kidney cortex, *Cancer treatment Reports*, 1985, 69, (7/8), 875 -880;
327. van der Vijgh, Klein I. - Protein binding of five platinum compounds. Comparison of two ultrafiltration systems, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1986, 18, 129 - 132;
328. Kangarloo S.B., Gangopadhyay S.B., Glück S., Wolff J.E.A. - Bioassay for determination of cisplatin activity in serum and urine, *Turkish Journal of Cancer*, 2004, 34 (2), 71 - 74
329. Stewart J.D., Dulberg C.S., Mikhael N.Z., Redmond M.D., Montpetit V.A.J., Goel R.- Association of cisplatin nephrotoxicity with patient characteristics and cisplatin administration methods, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997,40(4), 293-308;
330. Elisaf M., Milionis H., Siamopoulos K.C. - Hypomagnesemic hypokalemia and hypocalcemia: clinical and laboratory characteristics. *Miner Electrolyte Metab* 1997, 23(2), 105-112;
331. Mavichak V., Wong N.L., Quamme G.A., Magil A.B., Sutton R.A., Dirks J.H. - Studies on the pathogenesis of cisplatin - induced hypomagnesemia in rats, *Kidney Int.*, 1985, 28 (6), 914-921
332. Klukowska L., Nadulska A., Dyba S. - The influence of cisplatin and goserelin on the magnesium and calcium level in rat serum, *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska*, 2001, 56, 486 - 486;

333. Velciov Ariana-Bianca, Ahmadi-Vincu Mirela, Pup Mihaela, Precob Victor, Velciov Petru-Robert – Influence of metallic compound cis-platinum on some haematological parameters in blood samples, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, Timișoara, 2008a, XIV (1), 71-75, ISSN 1453-1399;
334. Schrier R.W. – Cancer therapy and renal injury, *J.Clin.Invest.*, 2002,110, 743-745;
335. Seelig M. - Magnesium In Oncogenesis And In Anti-Cancer Treatment: Interaction With Minerals And Vitamins, pp: 238-316, in *Adjuvant Nutrition in Cancer Treatment*, (P. Quillan, R. M. Williams. Eds.), Cancer Treatment Research Foundation, Arlington Hts IL, 1993;
336. <http://northonline.sccd.ctc.edu/ntrresources/minerals.htm>,2004
337. Senra Varela A., Lopez Saez J.J., Quintela Senra D.- Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer, *Cancer Lett.*, 1997, 121(2), 139-145;
338. Velciov Ariana - Bianca, Gârban Gabriela, Gârban Z., Velciov P.R., Ahmadi Mirela, Pup Mihaela, Ghibu G.D. - Concentration of some metal elements in liver of laboratory animals after cis-platinum administration pp.237-241, in "*13th Symposium on Analytical and Environmental Problems*", Szeged, 2006c, ISBN 963-06-1205-4;
339. Nishikawa M., Nagatomi H., Chang B-J., Sato E., Inoue M. - Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, 387, 78-84;
340. Dejica D. – *Antioxidanți și terapie antioxidantă*, Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2001;
341. Pup Mihaela, Ahmadi-Vincu Mirela, Velciov Ariana - Bianca, Gârban Z., Dronca D. – The effect of zinc chloride administration on some trace metals in Wistar rats liver, in *Journal of Agroalimentary procesess and technologies*, Timișoara, 2006, XII (2), 521-527;
342. Naziroglu M., Karaoglu A., Aksoy A.O. – Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin – induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats, *Toxicology*, 2004, 195 (2-3), 221-230;
343. Antunes L.M., Darin J.D.C., Bianchi M.P. – Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin in vivo, *Genet. Mol. Biol.*, 1999, 22 (3), 415-417;

344. Sokol R.J.- Antioxidant defenses in metal-induced liver damage, *Semin. Liver Dis.*, 1996, 16(1), 39-46;
345. Dejica D. – *Stresul oxidativ in bolile interne*, Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000;
346. Riviș Adrian, Velciov Ariana – Bianca, Gârban Zeno, Costescu Corina, Nichita Ileana - Influence of cis-platinum administration at different doses on zinc, copper and iron concentration in hepatic tissue, *Rev. Chim.*, 2008, 59 (4), 388-391, ISSN 0034-7752;
347. Davis, G. K., Mertz W.- Copper, pp. 301-364, In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Vol. 1, (Mertz W., ed.), Academic Press, San Diego CA, USA, 1987;
348. Suzuki K., Oyama R., Hayashi E., Arakawa Y. – Liver diseases and essential trace elements, *NipponRinsho*, 1996, 54(1), 85-92;
<http://Truehealth.org/arefer02.html>; |2001|
349. Ghergariu S. - *Oligominerale și oligomineraloze*, Ed. Academiei RSR, București, 1980;
350. Soin K.S., Agarwal G.N. Dwivedi M., Tandon V.K., Dwivedi S., Sarkar S.S.- Assessment of renal biochemical and histopathological parameters in predicting reversibility of cis-platinum nephrotoxicity, *Indian J. Cancer*, 1986, 23 (4), 197-205 ;
351. Meyer K.B., Madias N.E. - Cisplatin nephrotoxicity, *Mineral Electrolyte Metab.*, 1994, 20 (4), 201-213
352. Kroning R., Katz D., Lichtenstein A.K., Nagami G.T. - Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines, *Br. J. Cancer*, 1999, 79, 293-299;
353. Velciov Ariana - Bianca, Velciov P.R., Garban Gabriela, Riviș A., Ahmadi Mirela - Changes of some metal elements concentration in the kidneys of laboratory animals after cis-platinum administration pp. 155-158 in "Proceedings of the 14th Symposium on Analytical and Environmental Problems ", Szeged, 2007, ISBN 978-963-87720-0-8;
354. Choie D.D., Longnecker D.S., del Campo A.A. – Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats, *Lab. Invest.*, 1981, 44, 397 – 402;

355. Levine B.S., Henry M.C., Port C.D., Richter W.R., Urbanek M.A. – Nephrotoxic potential of cis-diamminedichloroplatinum and four analogs in male Fisher 344 rats, *J Natl Cancer Inst*, 1981, 67, 210-206;
356. Mavichak V., Coppin C.M., Wong N.L., Dirks J.H., Walker V., Sutton R.A. - Renal magnesium wasting and hypocalciuria in chronic cis-platinum nephropathy in man, *Clin. Sci.*, 1988, 75 (2), 203-207 ;
357. Ariceta G., Rodriguez-Soriano J., Vallo A., Navajas A. - Acute and chronic effects of cisplatin therapy on renal magnesium homeostasis, *Med. Pediatr. Oncol.*, 1997, 28(1), 35-40;
358. Mistry P., Lee C., McBrien D.C. - Intracellular metabolites of cisplatin in the rat kidney, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989, 24, 73-79;
359. Bussieres L., Desmet A., Laborde K., Shahedi M., Dechaux M., Sachs C. – Effects of acute cisplatin administration on renal ATP-ase activities and magnesium excretion of rats, *Magnes Res.*, 1990, 3 (3), 179 – 185;
360. Cornelison T.L., Reed E. – Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin, *Gynecol. Oncol.*, 1993, 50, 147-158;
361. Sugiyama, M. - Role of cellular antioxidants in metal-induced damage, *Cell Biol. Toxicol.*, 1994, 10, 1-22;
362. Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. - Trace element in human physiology and pathology, *Copper. Biomed. Pharmacother*, 2003, 57 (9), 386-398;
363. Sadzuka Y., Shoji T., Takino Y. - Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.*, 1992, 43, 1872-1875;
364. Saktisekaran D., Sree S., Sriganth I.N.P. – Effect of cisplatin on renal free scavengers and lipid peroxidation studies in rats, *Med. Sci. Res.*, 1993, 21, 35-36;
365. Kato J., Kobune M., Kohgo Z., Sugawara N., Hisai H., Nakamura T., Sakamaki S., Sawada N., Niitsu Z. – Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long – Evans Cinnamon rats, *J. Clin Invest.*, 1996, 98 (4), 923-929;
366. Kasprzak, K.S., - Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis, *Free Rad. Biol. Med.*, 32, 958-967, 2002;
367. Sanchez – Morito N., Planells E., Moreno M.J., Lerma A., Aranda P., Llopis J. – Changes in bioavailability of iron caused by magnesium deficiency in rats,

- pp. 342 – 345, in „*Metal ions in biology and medicine*”, (Collery Ph., Corbella J., Domingo J.L., Etienne J.C., Llobet J.M., Eds), John Libbey, Paris, 1996;
368. Altura B., Burton M. - Magnesium: Growing in clinical importance, *Patient Care*, 1994, 28(1), 36-130;
369. Shils M.E. – Magnesium, pp. 307 – 319 in „*Present Knowledge in Nutrition*”, (Ziegler E.e Filer L.J., Eds), ILSI Press, Washington DC, 1996;
370. Hunger R.- Physico-chemical basics of the Ca/Mg antagonism, pp.420-422, in Proceedings of the 5th International Symposium: „*Trace Elements in Human: New Perspectives*”, Athens, 2005;
371. Barch, D. H., Iannaccone P. M. - Role of zinc deficiency in carcinogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986, 206, 517-527;
372. Bertholf, R.L. - Zinc, pp. 787-800 in: *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, (Eds. Sigel H. and Seiler H.G.), Marcel Dekker Inc., New York, 1988;
373. Baliga R., Ueda N., Walker P.D., Shah S.V. - Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure, *Am. J. Kid Dis.*, 1997, 29, 467-477;
374. Ahmadi-Vincu Mirela, Pup Mihaela., Gârban Z., Martău Ariana-Bianca- Distribution of some metals in rat brain after over-doses of manganese, pp. 1134-1139 in "Macro and Trace Elements, Mengen und Spurenelemente, 22 Workshop 2004, Main Friedrich - Schiller - Universität Jena, (Hsrg. Anke M. Et al.),Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2004b;
375. Ciubotariu D., Nechifor M., Chelarescu D., Cuciureanu M., Mândreci I. – Research about the influence of zinc on experimental induced morphine pharmacodependence, pp. 60-68, in Proceedings of the 5th International Symposium: „*Trace Elements in Human: New Perspectives*”, Athens, 2005;
376. Moazedi A., A., Ghotbeddin Y., Parham G.H. - Effect of zinc supplementation of pregnant rats on short-term and long-term memory of their offspring, *Pak.J. Med. Sci.*, 2007, 23 (3), 405-409;
377. Flinn J.M., Hunter D., Linkous D.H. – Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc, *J.Physiol.Behav.*, 2005, 83, 793-803;
378. Masuda H., Tanaka T., Takahama U. – Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell – free system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 203, 1175 – 1180;

379. Katano K., Kondo A., Safaei R., Holzer A., Samimi G., Mishima M., Kuo Y.M., Rochdi M., Howell S.B. - Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper, *Cancer Res.*, 2002, 62, 6559-6565;
380. O' Dell B.L. - Biochemical basis of the clinical effects of copper deficiency, pp. 301-313 in „*Current Topics in Nutrition and Disease*”, vol.6: Clinical Biochemical and Nutritional aspects of Trace Elements (Prasad A.S. Ed.), Alan R Liss Inc., New York, 1982;
381. Ajayi O., B. - Micronutrient changes in some tissues of copper deficient rats, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2005, 4 (2), 123-125;
382. Sathyaikumar K., Swapna I., Reddy P., Dutta Gupta A., Senthilkumaran B., Reddenna P. - Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla, *Neurochemical Research*, 2007, 32 (3), 517 - 524;
383. Oski F.A., Honig A.S.-The effects of therapy on the developmental scores of iron-deficient infants. *J Pediatr*, 1978; 92, 21-25;
384. Hu R, Wei M, Ding X. - Changes in brain monoamine neurotransmitter in iron deficiency nonanemic rats, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1999, 39(2), 131-148;
385. Ahmadi-Vincu Mirela, Pup Mihaela, Gârban Gabriela, Velciov Ariana Bianca - Metal concentration in hepatic tissue after administration of manganese and zinc chloride, pp. 377-381, in „*Proceedings of the 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems*”, (Ed. Galbàcs Z.), Publ. By SZAB Szeged, 2005;
386. Singh G. - A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity, *Toxicology*, 1989, 58, 71-80;
387. *** - ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) - Toxicological Profile for Zinc. Publ. by Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service, Atlanta, GA. 121, ATSDR/TP-89-25, 1989;
388. Kodavanti U.R., Mayer F.C., Ledbetter A.D., Schladweiler M.C., Costa D.L., Hauser R., Christiani D.C., Nyska A. - Inhaled environmental combustion particles caused myocardial injury in the Wistar Kyoto rats, *Toxicol. Sci.*, 2003, 71, 237-245;

389. *** - Copper, www.umm.edu, 2004;
390. Velciov Ariana-Bianca, Garban Gabriela, Ahmadi Mirela, Rivis A., Velciov P.-R. - Influence of cis-platinum on the distribution and accumulation of some metal elements in the heart tissue of wistar rats, in "Proceedings of the 15th Symposium on Analytical and Environmental Problems ", Szeged, 2008b – in press;
391. Maret W. – Zinc and health: current status and future directions. The function of zinc metallothionein. A link between cellular zinc and redox state, *J. Nutr.*, 2000, 1455S – 1458S.
392. Nitiss J.L. - A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2002, 99 (22), 13963-13965;
393. Gerson R., Serrano O.A., Villalobos A. – Anemia associated to cisplatin, *An. Med. Asoc. Hosp. ABC*, 1998, 43 (4), 141-145
394. Sartori S., Nielsen I., Masotti M., Malacarne P. – Early and late hyperferremia during cisplatin chemotherapy, *J. Chemother.*, 1991, 3(1), 45-50;
395. Serrano A., Gerson R., Villela L.- Anemia associated with cisplatin, *An Med. Asoc. Hosp. ABC*, 1998, 43(4), 141-145;
396. Gârban Zeno, Moldovan Ioan, Avacovici Adina, Martău Ariana-Bianca, Antal Diana, Velciov Petru - The action of cis-platinum administered to female rats in early pregnancy, pp. 584-588 in "Mengen- und Spurenelemente, 21. Arbeitstagung 2002", Friedrich Schiller Universitat Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2002;
397. Matkovic V. – Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modeling and consolidation of bone mass, *Am. J. Clin.Nutr.*, 1991, 54 (suppl.), 245-260;
398. Miu N., Drăgătoiu Gh. – *Magneziul în biologia și patologia umană*, Casa cărții de știință, Cluj, 2000;
399. Chinopoulos C., Adam-Vizi V.- Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme, *FEBS Journal*, 2006, 273, 433-450;
400. Brandao-Neto J., de Mendoca B.B., Shumama T.- Zinc acutely and temporarily inhibits adrenal cortisol secretion in humans, *Biol. Trace Element Res.*, 1990, 24, 83-89;

401. Buckley J.E., Clark V.L., Meyer T.J., Pearlman N.W. - Hypomagnesemia after cisplatin combination chemotherapy, *Arch. Intern. Med.*, 1984, 144, 2347 - 2352;
402. Velciov – Martau Ariana, Gârban Z., Gârban Gabriela, Ahmadi – Vincu Mirela, Velciov P.R., Popescu Georgeta – Sofia, Ghibu G.D. – Concentration of some metals in the muscles of experimental animals consecutive to cisplatin administration, pp.381-384, in "12th Symposium on Analytical and Environmental Problems ", Szeged, 2005a, ISBN 963-219-675-9;
403. Lajer H., Kristensen M., Hansen H.H., Christensen S., Jonassen T., Daugaard G. – Magnesium and potassium homeostasis during cisplatin treatment, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2005, 55 (3), 231-236;
404. Sweeney J.D., Ziegler P., Pruet C., Spaulding M.B. –Hyperzincuria and hypozincemia in patients treated with cisplatin, *Cancer*, 1989, 63(11), 2093-2095;
405. Ahmadi-Vincu Mirela, Pup Mihaela, Gârban Z., Martău Ariana-Bianca, Popescu Georgeta-Sofia - Metal elements concentration in heart of Wistar rats after action of manganese, "Cercetări Științifice: Progrese și tehnologii agroalimentare", Vol. IX, Universitatea "S.A.M.V.B." Timișoara, Ed. Agroprint, Timișoara, 2004a, IX, 417-423;
406. Itoh M., Oh-ishi S., Hatao H., Leeuwenburgh C., Selman C., Ohno H., Kizaki T., Nakamura H., Matsuoka T. -Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287, pp.R33-R38;
407. Linder M.C., Hazedh – Azam M. – Copper biochemistry and molecular biology, *A., J. Clin. Nutr.*, 1996, 63, 797-811
408. Links M., Lewis C., - Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy, *Drugs*, 1999, 57, 293-308;
409. Tuormaa T.E. – Adverse effects of zinc deficiency: A review from the literature, *Journal of Orthomolecular Medicine*, 1995, 10 (3-4), 149-165;
410. Gandara D.R., Perez E.A., Wiebe V., De Gregorio M.W. – Cisplatin chemoprotection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity, *Semin. Oncol.*, 1991, 18 (3), 49-55;

-
411. Halliwell, B, Gutteridge. J. M. C.- Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.*, 1990, 186, 1-85;
 412. Kelland L. – The resurgence of platinum – based cancer chemotherapy, *Nature reviews*, 2007,7,573-584;
 413. Mathe M., Muggia F.M. - *Cancer chemo- and Immunopharmacology. Results in cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1980;
 414. Sanchez – Morito N., Planells E., Aranda P., Llopis J.- Magnezium–manganese interactions caused by magnezium deficiency in rats, *Journal of the American College of Nutrition*, 1999, 18 (5), 475 – 480;
 415. Klukowska L., Nadulska A., Dyba S., Tychowska I. – The influence of cisplatin on blood, some blood enzyme activities, magnesium level in rat serum and oxygen consumption in liver and kidneys, *J. Surg. Oncol.*, 2005, 89 (1), 18 – 22;
 416. ***- Oncolink - Cisplatin aids radiotherapy for head and neck cancer.