



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ,
FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE”
DIN TÂRGU MUREȘ

Pseudoparkinsonismul iatrogen – un model animal de stres oxidativ pentru evaluarea strategiilor de neuroprotecție farmacologică

Conducător de doctorat

Prof. dr. Maria Titica Dogaru

Doctorand

George Jîtcă

**Târgu Mureș
2022**



Introducere

Efectele secundare ale antipsihoticelor din prima generație sunt bine cunoscute. Compușii mai noi, deși au un profil farmacotoxicologic îmbunătățit, au un cost de achiziție mai mare, astfel că utilizarea antipsihoticelor clasice rămâne ca primă opțiune în multe cazuri. Studiile de până acum au urmărit eficacitatea tratamentului și stabilirea profilului farmacotoxicologic al compușilor din cele două clase de antipsihotice, fără a se concentra pe posibilitățile de diminuare a efectelor toxice centrale a celor din prima generație (simptome extrapiramidale, diskinezie, efecte anticolinergice). Orice intervenție care ar putea diminua aceste efecte secundare ale antipsihoticelor clasice este binevenită deoarece crește complianța și aderența pacienților la tratament, fără a afecta efectul terapeutic.

Obiective

Obiectivul general al prezentei teze este acela de a concepe, implementa și analiza prin prisma stresului oxidativ, un model de pseudoparkinsonism iatrogen, indus prin tratament cronic cu haloperidol, antipsihotic clasic, în monoterapie sau în asociere cu metformin. Pornind de la premisa că efectele benefice ale terapiei cu metformin, prezentate în diverse studii din literatura de specialitate, se extind dincolo de sfera afecțiunilor metabolice explicate prin proprietățile sale antioxidante mediate molecular prin activarea AMPK, terapia combinată ar trebui să reducă efectele secundare motorii ale haloperidolului.

Pentru a verifica ipoteza formulată anterior au fost efectuate următoarele studii:

- Crearea unui model animal de pseudoparkinsonism iatrogen prin administrare de haloperidol. Studiarea efectului neuroprotector al metforminei;
- Realizarea unor teste comportamentale (catalepsie, rotarod, open field) pentru confirmarea inducerii pseudoparkinsonismului, respectiv pentru evaluarea efectului benefic al tratamentului concomitent cu metformin;
- Evaluarea funcției cognitive (prin intermediul testului de recunoaștere a obiectului nou (*Novel object recognition*) și testul labirintului acvatic Morris (*Morris Water Maze*) în vederea evaluării gradului de afectare produsă de haloperidol, respectiv a influenței metforminei asupra memoriei de lucru;
- Determinarea markerilor stresului oxidativ (MDA, GSH/GSSG) și BDNF din probe biologice (creier respectiv plasmă). Au fost dezvoltate metode analitice HPLC/DAD pentru determinarea cantitativă a MDA, GSH și GSSG, iar BDNF a fost determinat printr-o metodă ELISA;
- Analiza histopatologică a probelor de creier pentru a corela gradul de distrucție neuronală cu valorile biochimice ale stresului oxidativ;

Material și metodă

Animale și tratament

Haloperidol (Haloperidol Richter 2 mg/ml, Gedeon Richter, Târgu Mureș, România), metformina (Glucophage 500 mg, Merck Santé, Semoy, Franța) au fost achiziționate de pe piața farmaceutică din România. Stratul de protecție al tabletelor a fost îndepărtat și tabletele au fost triturate. Pulberea a fost apoi adăugată peste apa distilată care a avut rol de mediu de dispersie, rezultând o suspensie *extemporae*.

Rozătoarele au fost împărțite aleatoriu în 4 grupuri: CTR (martor, apă distilată, n=10), HAL (haloperidol, n=10), METF (metformin, n=10), HALMETF (haloperidol+metformin, n=10). Tratamentul a fost administrat pentru o perioadă de 34 de zile, zilnic, între orele 8:00 și 10:00, cu ajutorul unei canule de hrănire orală, într-un volum de 1 ml/kg, într-o cameră separată. Dozele de administrare, calea de administrare și durata tratamentului au fost stabilite pe baza constatărilor din literatură. De asemenea, dimensiunea eșantionului



pentru fiecare grup a fost aleasă prin consultarea altor experimente similare pe șobolani din literatura de specialitate.

La sfârșitul experimentului, toate animalele au fost decapitate sub anestezie cu ketamină/xilazină într-un amestec de ketamină (100 mg/kg) și xilazină (10 mg/kg), în vederea colectării de probe biologice (sânge și creier).

2.1. Realizarea modelului animal de pseudoparkinsonism. Studii comportamentale și motorii

Scopul acestui studiu a fost de a investiga influența metforminei asupra modificărilor comportamentale induse de haloperidol și a capacității sale de a preveni sau întârzia apariția simptomelor parkinsoniene induse de medicația neruoleptică la șobolani, prin efectuarea unei baterii de teste comportamentale care să vizeze activitatea motorie a animalelor de experiență.

Animalele au fost aleator împărțite în 4, durata totală a experimentului fiind de 34 de zile, conform Tabelului I. Dozele utilizate în cadrul acestui studiu (Tabelul I) au fost calculate luând în considerare atât masa corporală cât și raportul suprafețelor corporale, pentru realiza o mai bună corelare cu subiecții umani.

Tabelul I. Loturile de animale și dozele administrate

Abreviere lot	Lot	Doza administrată
CTR	Control (n=10)	Apă distilată
METF	Metformin (n=10)	500 mg/kg corp
HAL	Haloperidol (n=10)	2 mg/kg corp
HAL+METF	Haloperidol+Metformin (n=10)	2 mg/kg corp+500 mg/kg corp

2.2. Evaluarea capacităților cognitive și de memorare în relație cu stresul oxidativ

Acest studiu a fost conceput pentru a evalua și corela efectele pe termen lung ale utilizării haloperidolului în tratament concomitent cu metformin, asupra abilităților cognitive, de memorare și învățare. Pentru a evalua abilitățile cognitive, capacitatea de memorare și învățare, s-a recurs la efectuarea testului labirintului acvatic Morris (*Morris Water Maze*) și testul Recunoașterii Obiectului Nou (*Novel Object Recognition*). Aceste metode de evaluare au fost alese deoarece necesită o funcție hipocampală intactă, implicând mai multe procese importante pentru memorare și învățare (codificarea informațiilor, consolidare, conservare și reutilizarea acestora). Toate testările au fost analizate cu ajutorul software-ului EthoVision XT (Noldus IT, Wageningen, Olanda, versiunea 11.5), prin monitorizarea distanței parcurse, viteza de înot, latența până la atingerea platformei, timpul petrecut în fiecare cadran etc.

2.3. Determinarea markerilor statusului oxidativ (MDA, GSH/ GSSG) și BDNF din probe biologice (creier respectiv plasmă)

Metoda de determinare a markerilor statusului oxidativ din creier presupune cuantificarea nivelului de MDA respectiv raportul GSH/GSSG (glutation redus/glutation oxidat). Pentru acest lucru două metode HPLC/DAD au fost validate utilizând un sistem Merck HPLC. În prezentul studiu, metodele de validare au fost realizate în conformitate cu ghidurile de reglementare (FDA 2018). Parametrii de validare urmăriți au fost linearitatea, selectivitatea, acuratețea, precizia, limita inferioară de cuantificare, stabilitatea și robustețea.

Metodele au fost validate, astfel încât să poată fi utilizate pentru determinarea stresului oxidativ în matricea neuronală, având în vedere că majoritatea datelor din literatură se raportează la o metodă de determinare spectrofotometrică, care prezintă unele neajunsuri în ceea ce privește specificitatea.

Totodată, studiul oferă o perspectivă despre potențialului neurotrofic al metforminei prin intermediul BDNF. Cuantificarea BDNF din plasmă a fost efectuată folosind tehnica ELISA sandwich tip convențională,



conform instrucțiunilor producătorului (0266F0750, Sigma-Aldrich), utilizând un analizor automat Elisa Dynex DSX.

În vederea evaluării morfologice a hipocampului, în urma tratamentelor aplicate, s-a efectuat o analiză histopatologică a secțiunilor în cauză pentru a corela gradul de distrucție neuronală cu valorile biochimice ale stresului oxidativ.

Concluzii generale

Prin prisma studiilor efectuate în prezenta teză de doctorat, am reușit să creionăm o imagine a statusului oxidativ la nivel central, precum și asupra modului în care acesta poate fi influențat de administrarea unor antagoniști dopaminergici (haloperidol), respectiv substanțe considerate neuroprotectoare (metformina). Acest lucru a fost posibil ca urmare a dezvoltării unor metode de determinare a principalilor markeri ai stresului oxidativ, precum MDA și GSH, respectiv GSSG. Studiile descrise au adus informații noi despre posibilele intervenții antioxidante la nivel central. Totodată, prin intermediul testelor diagnostice comportamentale am obținut rezultate care confirmă influența stresului oxidativ asupra funcțiilor motorii și cognitive.

Originalitatea tezei

Subiectul prezentei teze pune în prim plan problema uneia dintre cele mai întâlnite reacții adverse ale tratamentului cu antipsihotice clasice, însă de această dată din perspectiva stresului oxidativ indus de medicație. Totodată, privind raportările cu referire la efectele neuroprotectoare ale metforminei, s-a dorit dezvoltarea unui model de pseudoparkinsonism indus de tratamentul cu haloperidol și evaluarea principalilor parametri ai stresului oxidativ, respectiv evaluarea comportamentală și cognitivă în cazul co-administrării metforminei.

Lucrarea reprezintă o sinteză a modului prin care stresul oxidativ influențează activitatea cerebrală, în principal neurotransmisia dopaminergică în contextul medicației neuroleptice. Teza dezvăluie aspecte legate de farmacologie, biochimie, toxicologie și chimie analitică, informații care pot fi utilizate pentru design-ul viitoarelor studii și pentru cercetarea altor compuși cu efect neuroprotector.