

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie



**MUDr. Denisa Petrušková**

**Problematika lokálních a celkových vedlejších účinků  
cytostatik při jejich experimentálním intraokulárním a periokulárním podání**

Issues in local and systemic side effects of chemotherapeutics after their experimental  
intraocular and periocular delivery

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/školitel: prof. MUDr. Dagmar Dotřelová, CSc., FEBO

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.08.2013

MUDr. Denisa Petrušková ( Darsová )

Podpis

Tato Ph.D. disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a kombinovaného postgraduálního studia biomedicíny na Oční klinice dětí a dospělých 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Motole.

Doktorský studijní program v biomedicíně: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Uchazeč: MUDr. Denisa Petrušková

Školitel: Prof. MUDr. Dagmar Dotřelová, CSc., FEBO

Datum zahájení studia: 7.11.2005

## Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala za vedení a podporu v průběhu celého mého postgraduálního studia paní prof. MUDr. Dagmarě Dotřelové, CSc., FEBO.

Dále bych ráda poděkovala panu doc. MUDr. Luděkovi Vajnerovi, CSc., přednostovi Ústavu histologie a embryologie, a panu MUDr. Jiřímu Uhlíkovi, Ph. D., akademickému pracovníkovi Ústavu histologie a embryologie za podporu a dlouhodobou pomoc v mém studiu.

Poděkování patří rovněž as. MUDr. Pavlovi Pochopovi, Ph.D. za jeho významnou pomoc a cenné připomínky při zpracování dat ke grantu GA UK, NR 63008: Sledování intraokulární koncentrace a toxicity Hycamtinu ve sklivcovém prostoru králičího bulbu po intravitreální a subkonjunktivální aplikaci, které byly podkladem této disertační práce.

Ráda bych také poděkovala svým kolegům z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK Ing. Evě Klapkové, Ph.D. a MUDr. Hundie Tesfayovi, Ph.D. za velmi cenné rady z oblasti metod kvalitativní analýzy, dále také prim. MUDr. Daniele Kodetové z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK za zpracování histologických preparátů a v neposlední řadě také MUDr. Jánou Lešťákovi, Ph.D. za technickou pomoc při elektrofyziologickém vyšetřování králičích očí.

### **Identifikační záznam**

PETRUŠKOVÁ, Denisa. *Problematika lokálních a celkových vedlejších účinků cytostatik při jejich experimentálním intraokulárním a periokulárním podání. [Issues in local and systemic side effects of chemotherapeutics after their experimental intraocular and periocular delivery]*. Praha, 2013. 56 s., 7 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Oční klinika dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol. Vedoucí práce Dotřelová, Dagmar.

# Obsah

1. Úvod .....	8
1.1. Retinoblastom.....	8
1.2. Problematika následků léčby retinoblastomu.....	8
1.3. Karboplatina .....	15
1.3.1. Metalothionein .....	16
1.4. Topotecan .....	17
2. Hypotézy a cíle disertační práce.....	18
3. Materiál a metodika.....	19
3.1. In vivo experiment .....	19
3.2. Stanovení aplikovaného množství karboplatiny a topotecanu pro testování jejich koncentrace ve sklivci a pro testování vedlejších účinků těchto cytostatik na organismus laboratorního králíka .....	19
3.2.1. Stanovení objemu aplikované látky .....	19
3.2.2. Stanovení koncentrace aplikované látky:.....	20
3.3. Technika lokální oční aplikace karboplatiny a topotecanu .....	21
3.4. Aplikace karboplatiny .....	22
3.4.1 Stanovení koncentrace karboplatiny a stanovení metalothioneinu .....	23
3.5. Aplikace topotecanu .....	24
3.5.1. Stanovení koncentrace topotecanu .....	24
3.6. Zhodnocení toxicity na základě klinického vyšetření .....	25
3.7. Zhodnocení funkce sítnice .....	26
3.8. Histologické vyšetření.....	27
4. Výsledky.....	28
4.1. Vedlejší účinky karboplatiny po její experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 1, č.2, č.3) .....	28
4.1.1. Hmotnost králíků.....	28
4.1.2. Koncentrace karboplatiny v plasmě .....	28
4.1.3. Koncentrace karboplatiny ve sklivci .....	29
4.1.4. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci karboplatiny.....	31
4.1.5. Změny koncentrace metalothioneinu v plasmě .....	33
4.2. Vedlejší účinky topotecanu po jeho experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č.4).....	34
4.2.1. Hmotnosti králíků.....	34
4.2.2. Koncentrace topotecanu v plasmě a ve sklivci.....	35
4.2.3. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci topotecanu .....	39
4.3. Komplikace transkorneální intravitreální injekce .....	42

4.4. Změny ERG po opakované intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu (publikace č.5, č.6) .....	42
5. Diskuze.....	43
5.1. Vedlejší účinky karboplatiny po její experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 1, č.2, č.3) .....	44
5.2. Vedlejší účinky topotecanu po jeho experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 4).....	47
5.3. Bezpečnost nového způsobu aplikace chemoterapeutik cestou transkorneální intravitreální (publikace č.1, č.2, č.4, č.5, č.6) .....	50
5.4. Rozsah vedlejších účinků po opakované intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu ve stanovené optimální dávce (publikace č.5, č.6).....	50
6. Závěr.....	51
7. Summary .....	54
8. Použitá literatura .....	56
9. Přílohy - publikace uchazeče vztahující se k tématu disertační práce .....	63

# 1. Úvod

## 1.1. Retinoblastom

Retinoblastom představuje v průměru 3 % všech dětských tumorů a je nejčastějším maligním nitroočním tumorem dětského věku. V České Republice je každý rok diagnostikováno 5-8 nových případů retinoblastomu (Autrata R. et al., 2010, Řehůřek J., 2002), zatímco celosvětově se vyskytuje ročně 5000 nových případů. Většinou vzniká jednostranně, obvykle následkem somatické mutace obou kopií RB1 genu (tzv. retinoblastomový gen, lokalizace: 13q14.1-q14.2). Asi v 50 % případů bývá oboustranný, kdy je zděděna jedna mutovaná alela genu *RB1* a k mutaci druhé dochází v průběhu života (germinální + somatická mutace). Nejčastějším zevním příznakem retinoblastomu je strabismus a leukokorie. Typickým nálezem při vyšetření očního pozadí jsou solitární či mnohočetné žlutobělavé retinální tumory s dilatovanými přívodnými cévami, často s křídově bílými ložisky kalcifikace na svém povrchu a subretinální tekutinou v jejich okolí. Pokročilý stupeň retinoblastomu je charakteristický přítomností vitreálního či subretinálního seedingu. Jedná se o nádorové partikule, volně plovoucí ve sklivcovém prostoru či lokalizované v subretinálním prostoru (Shields J.A., Shields C.L., 2008). Ve vyspělých zemích přežívá tuto malignitu přibližně 95 % těchto dětí, kdežto celosvětově je to pouze 50 % dětí. Průměrný věk v době stanovení diagnózy je 25 měsíců v Brazílii, ve srovnání s 18 měsíci ve Spojených státech amerických (Shields C.L., Mashayekhi A. et al., 2004). Vysoká mortalita dětí s retinoblastomem v rozvojových zemích je způsobena pozdním stanovením diagnózy retinoblastomu, který se prezentuje invazí do orbity a metastázami, a také obtížnou dostupností účinné léčby.

## 1.2. Problematika následků léčby retinoblastomu

Léčba retinoblastomu je individualizovaná pro každého jednotlivého pacienta a závisí na několika faktorech: mono- či bilaterálním výskytu tumoru, četnosti a velikosti primárních ložisek, přítomnosti vitreálního a subretinálního seedingu, vztahu retinoblastomu k makule, očnímu nervu, cévnatce, sklěře, duhovce a orbitě, na věku dítěte a na jeho celkovém zdravotnímu stavu. Cílem léčby retinoblastomu je na prvním místě záchrana života, na druhém místě anatomické zachování postiženého oka včetně zrakové funkce. S rostoucí úspěšností anatomické záchrany oka, postiženého retinoblastomem, se současně vyskytují



nepříznivé oční a systémové komplikace léčby (Tawansy K.A. et al., 2006), které mohou zastínit úspěšnost léčby retinoblastomu. Léčba retinoblastomu prošla v posledních desetiletích výrazným vývojem. V roce 1903 byla poprvé uvedena do praxe externí radioterapie jako alternativa k enukleaci. Retinoblastom je vysoce radiosenzitivní tumor, avšak některé studie prokázaly, že v případech bilaterálního retinoblastomu s masivním vitreálním seedingem externí radioterapie pouze enukleaci oddálila (Abramson D.H. et al., 1981). Navíc byla spojena se signifikantní morbiditou dětí, které podstoupily tuto léčbu. Vedlejší účinky zahrnují vznik sekundární katarakty, vitreální hemoragie, postiradiační retinopatie, hypoplasie obličejové části a vznik sekundárních malignit, zejména u dětí s hereditární formou retinoblastomu (Abramson D.H., Frank C.M., 1998). Celková radioterapeutická dávka při léčbě retinoblastomu je 40 – 50 Gy, rozdělená do frakcí po 1,8 Gy s užitím techniky chránící čočku.

Ve snaze ovlivnit vitreální seeding a vznik implantačních metastáz retinoblastomu se začala indikovat brachyterapie. Brachyterapie spočívá ve fixaci radioaktivního implantátu zevně na skléru v oblasti baze retinoblastomu. Metoda je však limitována velikostí tumoru: retinoblastom by měl mít průměr baze do 16 mm a tloušťku do 8 mm. Tato léčba tedy ovlivňuje spíše vitreální a subretinální seeding lokalizovaný v okolí retinoblastomu. Brachyterapie se dále indikuje také u rekurence solidního retinoblastomu po proběhlé chemoterapii, kdy se dosahuje úplné kontroly nad malignitou v přibližně 92 % případů (Shields C.L., Meadows A.T. et al., 2004). Brachyterapie má ale, stejně jako externí radioterapie, vysokou pravděpodobnost rekurencí u masivního subretinálního a vitreálního seedingu (Shields C.L. et al., 2001). Další komplikací této léčby je vznik postradiační retinopatie a neuropatie, výrazně ovlivňující výslednou zrakovou funkci (Shields C.L., Meadows A.T. et al., 2004).

V devadesátých letech minulého století byla uvedena do léčby retinoblastomu metoda tzv. chemoredukce ve snaze vyhnout se externí radioterapii a enukleaci (Shields C.L. et al., 1996, Shields C.L. et al. 1997). V současné léčbě retinoblastomu zaujímá hlavní úlohu. Princip chemoredukce spočívá v intravenózní aplikaci šesti cyklů chemoterapeutik, vedoucí ke zmenšení objemu tumoru ( tzv. parciální redukce ). Po druhém cyklu chemoterapie, tj. po dvou měsících od zahájení chemoredukce, se léčba současně kombinuje s lokálními léčebnými metodami ( transpupilární termoterapií, kryoterapií a brachyterapií ) k dosažení úplné eradikace reziduálního tumoru ( tzv. kompletní regrese ). Současný chemoterapeutický režim byl vyvinut empiricky a využívá intravenózně aplikované kombinace karboplatiny, etopozidu a vinkristinu (VEC protokol) (Tabulka1).

**Tabulka 1. Chemoterapeutický protokol intravenózní léčby retinoblastomu (VEC protokol)**

<b>RETINOBLASTOM - INTRAVENÓZNÍ CHEMOTERAPIE VEC</b>			
<b>Den aplikace</b>	<b>Vinkristin</b>	<b>Etopozid</b>	<b>Karboplatina</b>
1	X	X	X
2		X	
<b>Dávka intravenózně aplikovaných chemoterapeutik</b>			
Vinkristin	1,5 mg/m <sup>2</sup> (0.05mg/kg u dětí ≤ 36 měsíců, maximum ≤ 2mg)		
Etopozid	150 mg/m <sup>2</sup>	(5 mg/kg u dětí ≤ 36 měsíců)	
Karboplatina	560 mg/m <sup>2</sup>	(18.6 mg/kg u dětí ≤ 36 měsíců)	

Šest cyklů tohoto tradičně podávaného chemoterapeutického režimu má četné nežádoucí účinky, které vyplývají ze systémového účinku na celý organismus, na buněčné populace všech anatomických lokalizací, zvláště pak na buněčné populace proliferující. Nejzávažnějšími vedlejšími účinky jsou např. cytopenie, neutropenie, transientní suprese kostní dřeně, následné infekce, febrilie či gastroenterální toxicita s dehydratací a neprospíváním dítěte. Méně vážnými komplikacemi jsou nauzea, zvracení a ztráta vlasů. Z dlouhodobých nežádoucích účinků se mohou projevit zejména ototoxicita a nefrotoxicita, způsobená podáním karboplatiny. Etopozid může u dětí indukovat leukémii (Van Quill K.R. et al. 2005). Použití systémové chemoterapie v léčbě retinoblastomu je spojeno vzácně i s projevy oční toxicity v oblasti očních adnex, oka a zrakové dráhy (al-Tweigeri T., 1996). Například po systémové aplikaci vinkristinu byla zaznamenána paréza hlavových nervů s externí oftalmoplegií, po systémové aplikaci karboplatiny potom makulopatie, neuritida zrakového nervu, glaukom uzavřeného úhlu, uveální efuze, kortikální slepota a orbitocelulitida (al-Tweigeri T. et. al., 1996, Rankin E. M., Pitts J.F., 1993, O'Brien M. E. et. al., 1992, Lauer A. K. et. al., 1999). Nicméně tyto projevy oční toxicity u systémově aplikovaných chemoterapeutik jsme, od roku 1999 u našich 70 dětí léčených VEC protokolem, nepozorovali.

Obvykle mezi druhým a třetím cyklem chemoredukce dochází k největšímu úbytku objemu retinoblastomu s resorpcí subretinální tekutiny. V tomto okamžiku je možné nastolit permanentní regresí retinoblastomu pomocí lokálních konsolidačních metod. Retinoblastomy, lokalizované posteriorně od ekvátoru, jsou obvykle léčeny transpupilární termoterapií, zatímco retinoblastomy, lokalizované anteriorně od ekvátoru, jsou léčeny kryoterapií.

Cílem transpupilární termoterapie je zahřátí tumoru na rozmezí teplot 42 °C až 60 °C, tedy na teplotu pod koagulačním bodem bílkovin, čímž jsou šetřeny retinální cévy. Po transpupilární termoterapii získává retinoblastom šedavou barvu a postupně se mění v jizvu. Nevýhodou metody je nutnost jejího častého opakování, a tím i nárůst rizika komplikací. Vlivem působení tepla může docházet k retinálním trakcím, transientnímu seróznímu odchlípení sítnice a k transientnímu edému terče zrakového nervu. Tepelná energie diodového laseru bývá během léčby absorbována pigmentovým listem duhovky, čímž navozuje ložiskovou atrofii duhovky, za kterou často vzniká opacita čočky (Shields C.L., Meadows A.T. et al., 2004).

Kryoterapie metodou trojnásobného mražení je nejvíce účinná u malých, periferně lokalizovaných retinoblastomů o průměru do 3,5 mm a o tloušťce do 3 mm, a při přítomnosti subretinálního seedingu. Komplikace léčby zahrnují transientní serózní odchlípení sítnice, vznik preretinální fibrózy, retinálních trhlin a kombinovaného trakčního a rheimatogeního odchlípení sítnice (Shields C.L., Meadows A.T. et al., 2004).

Subretinální a vitreální seeding obecně reaguje dobře na iniciální chemoredukci regresí a kalcifikací nádorových partikulí. V prvním až druhém roce po ukončení chemoredukce ve spojení s lokálními konsolidačními metodami však téměř v polovině případů recidivuje a bývá obvykle lokalizován dále od primárního ložiska retinoblastomu (Shields C.L., Meadows A.T. et al., 2004). U pokročilého retinoblastomu s masivním seedingem nepostačuje k dosažení kontroly nad tumorem ani intravenózně aplikovaná chemoterapie, pravděpodobně pro nedostatečný průnik chemoterapeutik hematookulární bariérou a pro nepřítomnost cév ve sklivci. Přesto zavedení chemoredukce do léčby retinoblastomu zlepšilo úspěšnost léčitelnosti tumoru a ovlivnilo i jeho klasifikaci.

Klasická Reese-Ellsworth klasifikace retinoblastomu, založená v roce 1963 z nutnosti předvídat záchranu oka po externí radioterapii, byla od roku 2005 nahrazena Mezinárodní klasifikací pro retinoblastom (ICRB). Tato nová klasifikace lépe predikuje úspěch chemoredukce (Tabulka 2). Na základě této ICRB dochází ke 100 % úspěšnosti chemoterapie u Stupně A retinoblastomu, dále k 93 % úspěšnosti u Stupně B, 90 % úspěšnosti u Stupně C a 47 % úspěšnosti u Stupně D (Shields C.L. et al., 2006).

**Tabulka 2. Mezinárodní klasifikace pro retinoblastom (ICRB)**

Stupeň	Rychlé hodnocení	Specifické rysy
A	malý tumor	retinoblastom $\leq$ 3mm*
B	větší tumor makula juxtapapilární lokálice subretinální tekutina	retinoblastom $>$ 3mm* nebo lokálice retinoblastomu v makule( $\leq$ 3mm k foveole) lokálice retinoblastomu juxtapapilárně( $\leq$ 1,5mm od terče n.II) subretinální tekutina( $\leq$ 3mm od marga retinoblastomu)
C	lokální seeding	▪ subretinální seeding $\leq$ 3mm od retinoblastomu ▪ vitreální seeding $<$ 3mm od retinoblastomu ▪ subretinální a vitreální seeding $\leq$ 3mm od retinoblastomu
D	difúzní seeding	▪ subretinální seeding $>$ 3mm od retinoblastomu ▪ vitreální seeding $>$ 3mm od retinoblastomu ▪ subretinální a vitreální seeding $\geq$ 3mm od retinoblastomu
E	rozsáhlý retinoblastom	▪ vyplňující $>$ 50% bulbu ▪ neovaskulární glaukom ▪ opákní média pro hemoragie v přední komoře, sklivci či v subretinálním prostoru ▪ invaze za lamina cribrosa zrakového nervu, do choroidey( $>$ 2mm), skléry, orbity, přední komory

\* vztahuje se k 3mm v rozměrech baze nebo v tloušťce

U očí s retinoblastomem Stupně E se primárně přistupuje buď k enukleaci nebo k chemoterapii. V případě unilaterálního retinoblastomu je enukleace nutná přibližně u 75 % postižených dětí a konzervativní léčba je možná u 25 % z nich (Epstein J. et al., 2003). Vedení léčby u bilaterálního retinoblastomu se obvykle řídí podle oka s nálezem vyššího stupně retinoblastomu podle ICRB klasifikace. V případě diagnózy bilaterálního retinoblastomu se přistupuje k chemoterapii a k lokální konsolidační léčbě pomocí kryoterapie a transpupilární termoterapie. Přesto dochází u přibližně 60 % takto postižených dětí k enukleaci jednoho oka pro pokročilou a na léčbu refrakterní formu retinoblastomu (Shields C. L., Meadows A. T. et. al., 2001). Enukeace obou očí je nutná jen v 1 % případů (Epstein J. et al., 2003).

V praxi je tedy zpravidla nutné kombinovat a v pravidelných měsíčních intervalech opakovat dvě a více konsolidačních metod léčby retinoblastomu. Tím však stoupá riziko vitreoretinálních komplikací. Incidence vzniku vitreoretinálních komplikací po intenzivní konzervativní léčbě retinoblastomu se pohybuje kolem 7% (Tawansy K.A. et al., 2006).

Nejčastěji se jedná o retinální trhliny, kombinované trakční a rhegmatogenní odchlípení sítnice, komplikované těžkou proliferativní vitreoretinopatií.

Vitreální a subretinální seeding u Stupně C, D a E retinoblastomu je jedním z nejdůležitějších limitujících faktorů jeho konzervativní léčby, směřující k záchraně oka a v současné době i k záchraně zrakových funkcí. Ačkoli je v léčbě retinoblastomu užíváno množství léčebných metod, je nutné téměř u poloviny očí, postižených retinoblastomem s vitreálním či subretinálním seedingem, přistoupit k enukleaci.

Ve snaze zachovat zrakové funkce i u očí s pokročilým stupněm retinoblastomu jsou stále hledány a testovány nové léčebné metody. Cílem současných trendů v léčbě retinoblastomu je dosáhnout co nejvyšší možné koncentrace chemoterapeutik v blízkosti retinoblastomu a zároveň minimalizovat vedlejší účinky chemoterapeutik na co nejnižší možnou úroveň. Toho můžeme dosáhnout buď intenzifikací intravenózně aplikované chemoterapie, čímž ovšem vzrostou systémové nežádoucí účinky chemoterapeutik na dětský organismus, nebo lokální aplikací chemoterapie, a to buď periokulárně, intravitreálně či kanylací arteria oftalmica.

Suzuki a Kaneko (Suzuki S., Kaneko A., 2004) poprvé uvedli metodu aplikace chemoterapeutik intraarteriálně přímou kanylací oftalmické arterie s distální balónkovou okluzí. Tento postup je technicky velmi náročný a může mít četné komplikace, zejména krvácení, cévní mozkovou příhodu, bradykardii či smrt dítěte. Autoři však nepopsali žádnou specifickou komplikaci. V roce 2008 vylepšil techniku kanylace oftalmické arterie spolu se svými kolegy Abramson (Abramson D. H. et. al., 2008) použitím přímé kanylace arterie oftalmica, bez balónkové okluze, se zavedením infuze melphalanu, karboplatiny či topotecanu. Z devíti takto léčených očí byly dvě oči enukleovány pro perzistující odchlípení sítnice. Dlouhodobější studie (Gobin P. Y. et. al., 2011, Shield C. L., Shields J. A., 2010) však upozorňují na vážné vedlejší účinky, zastiňující benefit z lokální aplikace chemoterapeutik. Komplikací samotné procedury intraarteriální chemoterapie je tranzitní okluze superficiální femorální tepny, mozkové krvácení, trombóza či embólie tepen s následnou infekcí a riziko vzniku endoteliální toxicity. Z nutnosti nejméně dvou až tří opakování této procedury dochází k mikroembolizacím do oka charakteru transientní ischemie až úplné obstrukce oftalmické arterie. Z dalších citovaných komplikací procedury je zejména závažný pravidelný vznik bradykardie a systémové arteriální hypotenze a dále bronchospasmu. Přesnost kanylace si vyžaduje fluoroskopickou kontrolu katetru a tedy i expozici radiačnímu záření. Maximální radiační dávka, kterou během procedury absorbuje nitrooční čočka, se blíží dávce kataraktogenní. Opakováním procedury se radiační dávka směřující k nitrooční čočce

akumuluje, čímž po dvou až třech letech roste riziko vzniku radiační katarakty a pravděpodobného karcinogenního účinku u pacientů s germinální mutací RB1 genu (Vijayakrishnan R. et al., 2010). Méně vážnou oční komplikací metody je rozvoj tranzientního, ipsilaterálního edému a erytému víček, blefaroptózy a u melphalanu dekolorace kůže ve frontální oblasti a dočasná ztráta řas. U 4% očí byla popsána avaskulární retinopatie (Gobin P. Y. et al., 2011) vedoucí k amauróze. Nežádoucím systémovým vedlejším účinkem je vznik neutropenie (Gobin P. Y. et al., 2011) a transientní pancytopenie (Shields C. L., Shields J. A., 2010) nevyžadující transfuzi. Problémem této nové neuroinvazivní metody léčby retinoblastomu je, stejně jako u chemoredukce, rekurence vitreálního seedingu a chronické sklivcové hemoragie (Shields C. L., Shields J. A., 2010). Ze 78 očí Stupně D a E retinoblastomu se u dvou očí po ukončení intraarteriální chemoterapie vyvinuly metastázy (Gobin P. Y. et al., 2011). Intraarteriální chemoterapie se tedy zdá být alternativní metodou léčby pokročilého stupně retinoblastomu, která však nepostačuje k zabránění možné systémové diseminace u Stupně E.

Pro dosažení stálých terapeutických koncentrací chemoterapeutik ve sklivcovém prostoru oka s minimalizováním systémových nežádoucích účinků se po sporných výsledcích s intraarteriální chemoterapií obrátil zájem očních onkologů k lokální periokulární a intravitreální aplikaci chemoterapeutik. Dále jsou zkoumána nová, méně toxická chemoterapeutika, která svými nežádoucími vedlejšími účinky negativně neovlivní výsledek léčby retinoblastomu (Kivelä T. et al., 2011, Ghassemi F., Shields C. L., 2012, Carcaboso et al., 2007). Současná chemoterapie je založena převážně na empirických zkušenostech a aplikaci výsledků rozsáhlých klinických studií, aniž by respektovala individualitu nemocného a biologickou odlišnost každého tumoru. Je více než pravděpodobné, že zohlednění těchto faktorů v léčbě může do značné míry optimalizovat výběr protinádorových farmak i jejich dávky, což ve svých důsledcích příznivě ovlivní výsledný terapeutický efekt a sníží riziko nežádoucích účinků. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je snaha o výběr cytostatik s maximální účinností pro daný tumor za současné eliminace vážných nežádoucích účinků.

V naší práci jsme se zaměřili na nežádoucí vedlejší účinky karboplatiny a topotecanu po jejich periokulárním a intravitreálním podání. Chemoterapeutika, které se zkoumají pro lokální oční podání, zahrnují metotrexát (Kivelä T. et al., 2011), cisplatinu (Gilbert J. A. et al., 2003), karboplatinu (Abramson D. H. et al., 1999, Hayden B. C. et al., 2003, Pochop P. et al., 2010), paclitaxel (Suárez F. et al., 2007), etopozid (Mao Y. et al., 2005) a topotecan (Chantada G. L., 2009, Mallipatna A. C. et al., 2011, Darsova D. et al., 2012). Vinkristin

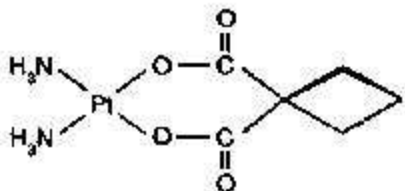
jsme z našich pokusů vyloučili vzhledem k tomu, že má vysokou aktivitu vázat se na proteiny sklivce. Z toho důvodu je potřeba relativně dlouhé doby k usmrcení retinoblastomových buněk (Mendelsohn M. E. et. al., 1998, Laurie N. A. et al., 2005). Topotecan je novým, nadějným kandidátem v léčbě retinoblastomu. Karboplatina byla jako jediná z testovaných chemoterapeutik již dříve používána v lokální aplikaci při léčbě retinoblastomu. Navíc byl na zvířecích studiích prokázán synergní účinek karboplatiny a topotecanu. Kombinace karboplatiny a topotecanu, aplikovaná intravenózně myším s retinálně implantovanými buňkami lidského retinoblastomu, byla u těchto myší nejvíce účinnou léčbou oproti kombinaci etopozid+karboplatina, etopozid+karboplatina+vinkristin, topotecan+vinkristin (Laurie N. A., 2005).

### **1.3. Karboplatina**

Cis-diamminkyklobutandikarboxyplatnatý komplex (Obrázek 1) je jedním z přímých analog cisplatiny. Nahrazením chloridových ligandů v cisplatině více stabilními ligandy, které pomaleji podléhají hydrataci, se docílilo snížení toxicity tohoto léčiva, aniž by byla ovlivněna jeho protinádorová aktivita. Přesto byly po podání karboplatiny v léčbě dětských tumorů popsány vážné vedlejší účinky charakteru ztráty sluchu, vzrůstu rizika vzniku leukémie a osteosarkomu, útlumu krvetvorby, nevolnosti, ztráty vlasů, změny chuti, zánětů kůže a sliznic, svědění kůže a alergická reakce (Van Quill K. R. et. al., 2005, Canetta R. et. al., 1985). Léčba komplexy platiny je především vysoce neurotoxická (Donzelli E., 2004). Neurotoxická je tedy určující pro stanovení maximální tolerované dávky karboplatiny v prevenci život ohrožujících komplikací. Velké množství experimentálních důkazů jednoznačně určilo za hlavní farmakologické místo působení karboplatiny DNA v jádru buněk (Jamieson E. R., Lippard S. J., 1999, Rešlová S., 1971). Karboplatina se váže s DNA za vzniku interkalačních vazeb, znemožňujících replikaci a reparační pochody DNA. Působí tak po celou dobu buněčného cyklu. K léčbě retinoblastomu byla poprvé karboplatina použita při intravenózním podání tříložkového chemoterapeutického režimu v polovině 90. let. Ve Spojených státech amerických je nyní používána periokulární aplikace 20 mg bolusu karboplatiny v kombinaci se systémovou chemoredukcí (VEC protokol) v léčbě pokročilého retinoblastomu Stupně C a D (Abramson D. H. et. al., 1999). Navzdory lokálním toxickým vedlejším účinkům karboplatiny se rozšířila její periokulární aplikace v klinické oftalmologické praxi. Sem patří omezení hybnosti oka, vznikem orbitální fibrózy (ztěžující

případnou enukleaci oka) a atrofie zrakového nervu s následnou slepotou (Schmack I. et. al., 2006, Mulvihill A. et. al., 2003, Kiratli H. et. al., 2007, Darsová D. et. al., 2011).

### **Obrázek 1. Karboplatina, cis-diamminkyklobutandikarboxyplatnatý komplex**



#### **1.3.1. Metalothionein**

Jedním z faktorů, které ovlivňují účinnost léčby karboplatinou, je hladina metalothioneinu (MT). Jedná se o malý, termostabilní protein s velikostí 6 – 10 kDa. Díky vysokému obsahu cysteinu (okolo 30%) je MT schopen vázat ve své struktuře až sedm dvojmocných a až dvanáct jednomocných atomů těžkého kovu. Ačkoli MT vykazuje nejvyšší afinitu k  $\text{Cu}^+$ , za fyziologických podmínek nejčastěji váže  $\text{Zn}^{2+}$ , čímž se významně podílí na udržování jejich homeostasy. Ionty toxických těžkých kovů (např.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ) jsou schopny vytěsnit  $\text{Zn}^{2+}$ . Molekuly MT s navázanými ionty toxického kovu jsou transportovány do ledvin, kde pravděpodobně probíhá jejich vyloučení z organismu.

Role metalothioneinu v nádorové tkáni není zcela objasněna. Zvýšená exprese MT v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s proliferací nádorových buněk, vyšší intenzitou jejich metabolismu a invazivitou nádoru (Adam V. et. al., 2007). Zvýšená hladina MT v nádorových buňkách může být také spojena se vznikem tzv. mnohočetné rezistence k chemoterapeutikům, především k chemoterapeutikům na bázi těžkého kovu, např. cisplatinu a její deriváty nebo sloučeniny arsenu a ruthenia. Zvýšená exprese MT v nádoru je také spojována s jeho rezistencí k radioterapii (Heffeter P. et. al., 2008).

Na mechanismu ochrany nádorových buněk před působením cytostatik se podílí:

1. nedoručení cytostatika k cílovým strukturám, např. z důvodu snížené vaskularizace,
2. aktivní transport cytostatika z nádorové buňky (eflux),
3. metabolizace chemoterapeutika a jeho interakce s detoxikačními proteiny,



4. snížení cytostatického účinku, např. díky zvýšené aktivitě DNA reparačních mechanismů nebo vlivem prevence apoptosy (Borst P. et. al., 2008).

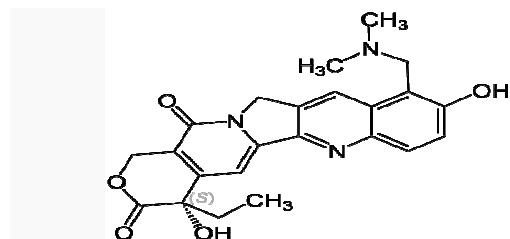
Rezistence k cytostatiku (chemorezistence) je nejčastější komplikací protinádorové terapie. MT je schopen vázat platinová cytostatika a tím snižovat jejich terapeutické koncentrace (Frabrik I. et. al., 2008).

## 1.4. Topotecan

(S)-10-[(dimethylamino)methyl]-4-ethyl-4,9-dihydroxy-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione monohydrochloride (Obrázek 2) je ve vodě rozpustným syntetickým derivátem alkaloidu camptothecinu, extraktu z rostliny *Camptotheca acuminata*. V průběhu S fáze buněčného cyklu specificky inhibuje topoizomerázu I, čímž vznikají letální poškození buněk v průběhu DNA replikace (Burriss H. A. et. al., 1992, Slichenmyer W. J. et. al., 1993). Topotecan se ukázal být slibným chemoterapeutikem v léčbě solidních pediatrických tumorů, zejména neuroblastomu a rhabdomyosarkomu, a v léčbě leukémie (Furman W. L. et. al., 2002, Chantada G. L. et. al., 2004, Santana V. M. et. al., 2003). K léčbě retinoblastomu byl topotecan poprvé použit počátkem 21. století, a to při intravenózní léčbě jeho extraokulárních a intrakraniálních metastáz (Chantada G. L. et. al., 2004). Topotecan může navozovat hematologickou toxicitu, především anémii, neutropénii a trombocytopenii, která však bývá zpravidla reverzibilní, krátkého trvání a dobře zvladatelná. Vedlejší příznaky toxicity topotecanu je obvykle mírná nevolnost, zvracení, kožní vyrážka a únava (Tubergen D. G. et. al., 1996, Kakolyris S. et. al., 2001, Santana V. M. et. al., 2003). Od roku 2009 se začínají objevovat pilotní klinické studie referující o periokulární aplikaci topotecanu u dětí s pokročilým stupněm retinoblastomu (Chantada G. L. et. al., 2009, Mallipatna A. C. et. al., 2011). Ačkoli jsou dosud referovány jen mírné vedlejší účinky po periokulárním podání topotecanu, není tato léčba zatím v klinické oční onkologické praxi rozšířena.

## **Obrázek 2. Topotecan,**

**(S)-10-[(dimethylamino)methyl]-4-ethyl-4,9-dihydroxy-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione monohydrochloride**



## **2. Hypotézy a cíle disertační práce**

**Hypotéza:** Periokulárně a intravitreálně aplikovanou karboplatinou a topotecanem je možné zvýšit jejich koncentraci v avaskulárním sklivci se současným snížením jejich vedlejších účinků na organismus.

### **Cíle disertační práce:**

1. Zhodnotit lokální oční toxicitu karboplatiny na modelu králičího oka.
2. Zhodnotit lokální oční toxicitu topotecanu na modelu králičího oka.
3. Zhodnotit klinickou použitelnost nového způsobu intravitreální aplikace chemoterapeutik transkorneální cestou.

## **3. Materiál a metodika**

### **3.1. In vivo experiment**

In vivo experiment probíhal na modelu Novozélandských bílých králíků mužského pohlaví prostých specifických patogenů (Anlab, Praha, Česká Republika) v souladu s vyhláškou č. 207/2004 Ministerstva zemědělství České Republiky. Veškeré pokusy byly prováděny na základě protokolu schváleného odbornou komisí pro ochranu zvířat 2. lékařské fakulty Karlovy University. Králíci byli chováni ve standardních laboratorních podmínkách (teplota 22 °C až 25 °C, vlhkost 55% až 65%) po celou dobu experimentu. Před začátkem každého experimentu byli laboratorní králíci uvedeni do celkové anestezie disociativního typu intramuskulární injekcí ketaminu v dávce 50 mg/kg (Narketan 10 a.u.v.inj., Vétoquinol, Lure Cedex, Francie) ve směsi s xylazinem v dávce 5mg/kg (Rometar 2% a.u.v.inj., Spofa, Praha, Česká republika). V případě nutnosti prodloužení celkové anestezie byla intramuskulární injekce ketaminu a xylazinu opakována po 30 min v poloviční dávce. Před aplikacemi chemoterapeutik a odběry sklivce byla použita lokální anestezie povrchu oka oxybuprocainem 0,4% (Benoxi 0.4% Unimed Pharma 1X10mL, Bratislava, Slovenská republika) a spojivkový vak byl desinfikován 3 ml 1% roztoku providon-iodinu (Betadine 10%, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapešť, Maďarsko). Karboplatina a topotecan byly v různých dávkách aplikovány vždy do pravých očí. Do levých očí byl vpraven stejný objem sterilní vody (Aqua pro injectione Braun, Melsungen, Německo). Levé oči sloužily jako kontrola.

### **3.2. Stanovení aplikovaného množství karboplatiny a topotecanu pro testování jejich koncentrace ve sklivci a pro testování vedlejších účinků těchto cytostatik na organismus laboratorního králíka**

#### **3.2.1. Stanovení objemu aplikované látky**

- a) Maximální bezpečný objem látky aplikované periokulárně u dětí s retinoblastomem je na základě empirické zkušenosti 2,0 ml, zvýšením objemu aplikované látky by mohlo docházet k elevaci nitroočního tlaku a k výrazné chemóze spojivky (Abramson D. H. et. al., 1999). Pro periokulární podání všech cytostatik u laboratorního králíka jsme proto zvolili jednotný objem 1,5 ml.

- b) Při intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu jsme použili jednotný objem 0,1 ml, který byl na králičím modelu aplikován ve všech předchozích experimentech (Harbour J. W. et al., 1996, Buitrago E. et. al., 2010). Aplikovaný objem je 15x menší než objem sklivce králíka, který je přibližně 1,5 ml (Leeds J. M., 1997), rozmezí 1 – 2 ml. Námi spočtený průměrný objem sklivce Novozélandského bílého králíka byl 1,3 ml.

### 3.2.2. Stanovení koncentrace aplikované látky:

#### A) Karboplatina

- a) Periokulárně aplikovaná dávka 20 mg karboplatiny ve 2 ml sterilního roztoku je podle dřívějších klinických studií (Schmack I. et. al., 2006, Mulvihill A. et. al., 2003, Kiratli H. et. al., 2007) riziková ze vzniku vážných vedlejších účinků, proto byla zvolena dávka 15 mg karboplatiny periokulárně.
- b) Dvacet miligramů karboplatiny je výrobcem doporučeno jako maximální možná stálá dávka v objemu 2 ml (Abramson D. H. et. al., 1999). Vyšší dávka 30 mg v 1,5 ml byla vybrána právě pro zhodnocení toxického efektu periokulárně aplikované karboplatiny.
- c) Na základě publikovaných dat o retinální toxicitě karboplatiny u intravitreální dávky vyšší než 10 µg (Harbour J. W. et. al., 1996) jsme se rozhodli zhodnotit koncentrace karboplatiny a vedlejší účinky po jednorázové intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny a následně ověřit funkci sítnice u opakované intravitreální dávky 0,05 mg karboplatiny.
- d) Dávku 0,08 mg karboplatiny pro opakovanou intravitreální aplikaci jsme zvolili empiricky na základě námi dosažených výsledků v průběhu této experimentální práce.

#### B) Topotecan

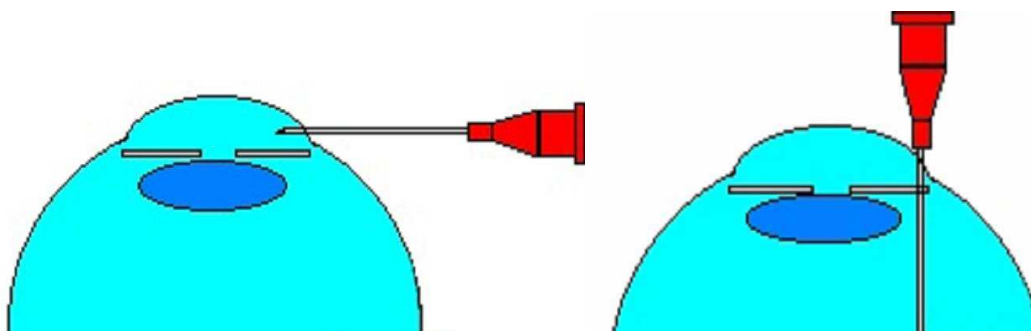
- a) Periokulárně aplikovaná dávka 2 mg topotecanu byla zvolena na základě dříve publikované studie o lokálních vedlejších účincích a intravitreálních koncentracích po periokulární injekci 1 mg topotecanu (Carcaboso A. M. et. al., 2007) a na základě systémově užívané dávky topotecanu 2 mg/m<sup>2</sup>/den, přičemž povrch těla králíka zaujímá 1 m<sup>2</sup>.

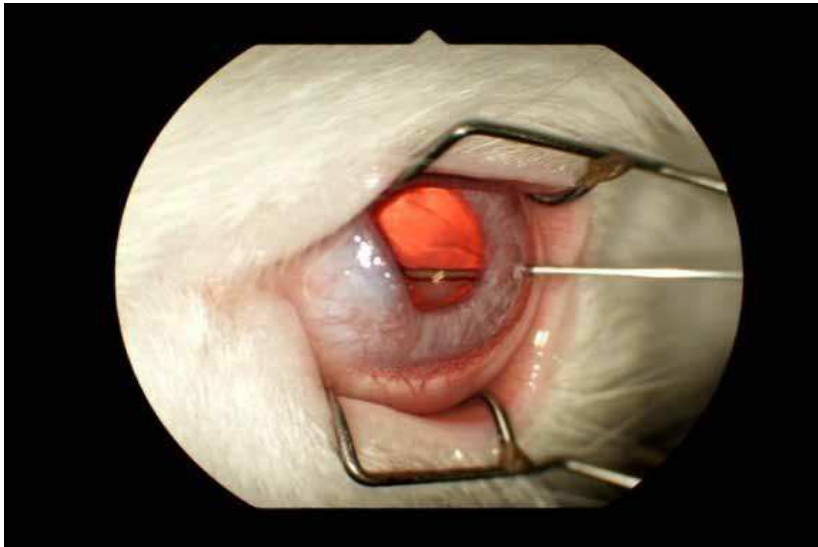
- b) Intravitreální dávky 1  $\mu\text{g}$  a 2  $\mu\text{g}$  topotecanu byly zvoleny nižší oproti publikované studii o 5  $\mu\text{g}$  intravitreálně aplikovaného topotecanu (Buitrago E. et. al., 2010). V této studii bylo po intravitreální aplikaci 5  $\mu\text{g}$  topotecanu dosaženo jeho vysoké koncentrace ve sklivci po dobu 6 hod. V našem experimentu jsme ověřovali, zda může nižší dávka intravitreálně aplikovaného topotecanu také dosáhnout terapeutické hladiny topotecanu ve sklivci.

### 3.3. Technika lokální oční aplikace karboplatiny a topotecanu

Periokulární injekce karboplatiny a topotecanu byla aplikována do horních zevních kvadrantů pravých králičích očí pod Tenonovu membránu s použitím jehly 25 gauge. Pro intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu byl námi nově použit přístup transkorneální cestou. Tento přístup se dosud využíval pouze při aspirační biopsii tenkou jehlou pro suspektní malignitu v zadním segmentu očním, avšak nebyl nikdy použit v léčbě (Karcioglu Z. A., 2002, Pochop P. et. al., 2010). Výhodou transkorneální cesty je eliminace možného rizika rozsevu volných nádorových partikulí, plovoucích ve sklivcovém prostoru, do orbity. Karboplatina a topotecan byly aplikovány 29 gauge inzulínovou jehlou, která byla zaváděna paralelně s limbem v rozmezí 1 mm až 2 mm, následně stočena o 90° do polohy kolmé ke kořenu duhovky a poté vpravena přes přední komoru, kořenem duhovky a zonulou mimo čočku do sklivcového prostoru králičího oka (Obrázek 3, viz. článek 1). Hlavním rizikem tohoto manévru je možnost poškození čiré čočky při nepřesném zavádění aplikační jehly.

**Obrázek 3. Technika transkorneální intravitreální injekce**





### 3.4. Aplikace karboplatiny

V experimentech byla použita komerční Carboplatina-Teva (Pharmachemie B. V., Swensveg 5, Haarlem, Nizozemsko). Jedná se o bezbarvý roztok obsahující přídatné látky Mannitol a sterilní vodu pro injekce. K naředění karboplatiny do požadovaných koncentrací (10 mg/ml, 20 mg/ml a 0,5 mg/ml) byl použit 5% roztok glukózy. Třicet Novozélandských bílých králíků bylo zavzato do experimentu a rozděleno do 5 skupin o 6 králících.

Skupina 1 o šesti králících byla léčena jednou periokulární injekcí o dávce 15 mg karboplatiny.

Skupina 2 o šesti králících jednou periokulární injekcí o dávce 30 mg karboplatiny. V obou případech byla dávka ředěna sterilním roztokem pro injekce do objemu 1,5 ml.

Skupina 3 obdržela jednu transkorneální intravitreální dávku o 0,05 mg karboplatiny v 0,1 ml sterilního roztoku. U těchto tří skupin byly v pravidelných intervalech 0 hod, 1 hod, 2 hod, 6 hod, 24 hod, 48 hod, 168 hod a za dva týdny (Skupina 1 a 3) a tři týdny (Skupina 2) odebírány vzorky periferní krve a sklivce. Odběry vzorků sklivce byly prováděny z protilehlé limbální strany ke straně, kde došlo k aplikaci chemoterapeutika, jako prevence získání vzorků sklivce s pravděpodobnou vyšší koncentrací karboplatiny. Při každém odběru jehlou 25 gauge bylo transkorneální intravitreální cestou aspirováno 150  $\mu$ l až 400  $\mu$ l sklivce ze sklivcového prostoru králičího oka. Odebraný sklivce byl umístěn do plastových zkumavek a zmražen na  $-80$  °C. Vzorky krve byly odebrány z periferní aurikulární vény králíka a umístěny do zkumavek potažených amoniem-heparinátem. Takto upravené vzorky krve byly centrifugovány při 300 rpm po dobu 10 min k izolaci krevní plasmy.

Skupině 4 o šesti králících jsme podali transkorneálně intravitreálně čtyřikrát ve dvou-týdeních intervalech dávku 0,05 mg karboplatiny v 0,1 ml sterilního roztoku.

Poslední Skupině 5 jsme aplikovali množství 0,008 mg karboplatiny v 0,1 ml sterilního roztoku.

Na začátku a na konci experimentu se skupinou 4 a skupinou 5 jsme navíc provedli elektoretinografické (ERG) vyšetření. Dosaženou koncentraci karboplatiny ve sklivci králíčího oka jsme změřili 1 h po aplikaci 0,008 mg karboplatiny na konci experimentu Skupiny 5.

### **3.4.1 Stanovení koncentrace karboplatiny a stanovení metalothioneinu**

Dosažené koncentrace karboplatiny ve sklivci a v plasmě byly stanoveny metodou atomové absorpční analýzy. Celkem 100  $\mu\text{l}$  homogenizovaného sklivce nebo plazmy jsme ředili 700  $\mu\text{l}$  0,2% vodního roztoku Tritonu X-100, antifoamu A (0.2 vol %) a deionizované vody v poměru 1:14. Takto upravené vzorky byly analyzovány v Zeemanově grafitové peci atomovým absorpčním spektrometrem (SpectrAA 220Z; Varian, Austrálie). Určení koncentrace platiny ve vzorcích bylo uskutečněno metodou standardního přídávku. Koncentrace karboplatiny byla spočtena z koncentrace platiny a molekulové hmotnosti. Hodnoty AUC (Area-under-the-concentration-versus-time-curve) jsme počítali standardní trapezoidální metodou. Takto získané výsledky byly verifikovány programem pro AUC kalkulaci (MW/PHARM verze 3.60 Mediware NL). Hodnoty byly vyjádřeny průměrnou směrodatnou odchylkou (SD) a rozdíl hodnot byl považován za signifikantní při  $p < 0,05$ .

K měření metalothioneinu byla použita adsorptivní přenosová technika s diferenční pulsní voltametrií ve spojení s Brdičkovou reakcí (AdTS DPV). Vzorky plazmy a sklivce byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4  $\text{mm}^2$ , referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitovou elektrodou. Základní elektrolyt (1  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  a 1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  amonný pufr  $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma Aldrich, ACS),  $\text{pH} = 9,6$ ) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál  $-0,6$  V, konečný potenciál  $-1,6$  V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV,  $E_{\text{ads}} = 0$  V, teplota  $0^\circ\text{C}$  (Husa D. et. al., 2005, Fabrik I. et. al., 2008).

Získaná data byla zpracována pomocí programu MICROSOFT EXCEL® (USA) and STATISTICA.CZ Version 8.0 (Czech Republic).

Hodnoty byly vyjádřeny průměrnou směrodatnou odchylkou (SD) a rozdíl hodnot byl považován za signifikantní při  $p < 0,05$ .

### **3.5. Aplikace topotecanu**

Dvacet čtyři zdravých bílých Novozélandských králíků bylo rozděleno do čtyř skupin o šesti králících.

Skupině A byly aplikovány 2 mg topotecanu (Hycamtin, GlaxoSmithKline Beecham Plc., Brentford, United Kingdom) v 1,5 ml sterilního roztoku periokulárně jehlou 25 gauge.

Skupina B získala dávku 1  $\mu\text{g}$  topotecanu transkorneální intravitreální injekcí s inzulinovou jehlou 29 gauge.

Skupině C byla dána transkorneální intravitreální injekcí stejného typu dávka 2  $\mu\text{g}$  topotecanu. Vzorky sklivce a krve byly sbírány do 168 hod po aplikaci, v intervalech 1 hod, 2 hod, 6 hod, 24 hod, 48 hod, 168 hod. Způsob odběru a zpracování vzorků byl stejný jako při pokusu s karboplatinou (viz. kapitola 3.3). U Skupiny C bylo na začátku a na konci experimentu natočeno ERG vyšetření.

Skupině D o šesti králících byl čtyřikrát v pravidelných dvou-týdeních intervalech injektován topotecan o dávce 2  $\mu\text{g}$  transkorneálně intravitreálně a na začátku a na konci experimentu jsme rovněž provedli ERG vyšetření.

#### **3.5.1. Stanovení koncentrace topotecanu**

Koncentrace topotecanu v odebraných vzorcích sklivce a plasmy byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Objem o 100  $\mu\text{l}$  sklivce či plasmy byl odpipetován do 1,5 ml polypropylenových zkumavek, do nichž bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  metanolu z důvodu nutnosti precipitace proteinů. Zkumavky byly 10 s míchány a poté centrifugovány po dobu 5 min na 14 000 rpm (4 °C). Množství 100  $\mu\text{l}$  čistého supernatantu bylo aplikováno do mikrozkušavek, a z nich bylo 50  $\mu\text{l}$  nastříkováno na chromatografickou kolonu. Detekce topotecanu probíhala při 267 nm, teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Mobilní fáze byla připravena z 0,01 M dihydrogenfosfátu draselného, korigovaného na pH 3,0, a z acetonitrilu



(85:15). Rychlost průtoku mobilní fáze byla  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . K analýze vzorků byla použita chromatografická kolona Inertsil ODS velikosti 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ . V průběhu analýzy nebyla pozorována žádná interference. Hodnoty AUC (Area-under-the-concentration-versus-time-curve) jsme počítali standardní trapezoidální metodou. Za signifikantní byly považovány  $p < 0,05$ .

### 3.6. Zhodnocení toxicity na základě klinického vyšetření

Při každém odběru vzorků podstoupili králíci klinické oční vyšetření předního segmentu očního a vyšetření očního pozadí s fotodokumentací. Zjištěné anatomické změny očních adnex i bulbu jsme porovnávali s normálním očním nálezem Novozélandského bílého králíka. Spojivka Novozélandského bílého králíka obsahuje epitelové buňky a pod nimi ležící bazální membránu, pokrývající sklěru. U těchto králíků je patrna spojivková injekce s maximem perilimbálně. Rohovka je hladká, lesklá a transparentní. Barva duhovky je bílo-růžová pro nedostatek pigmentu. Čočka je bikonvexní, transparentní, podobná čočce lidské. Velký, oválný terč zřetelně nervu je v nazální části fundu. Retina má pro nedostatek pigmentového epitelu viditelné choroidální cévy. Normální nitrooční tlak králíčích oka se pohybuje mezi 8 - 10 torr.

Toxicita byla klasifikována do čtyř stupňů podle závažnosti poškození anatomických struktur očních adnex a oka králíka.

Stupeň 1, periokulární toxicita, zahrnoval morfologické změny, způsobené aplikací chemoterapeutik v oblasti víček a orbitálního prostoru. Vyšetřovali jsme přítomnost edému víček, proptózy králíčích bulbu, přítomnost zánětlivých a fibrotických změn a ztrátu řas.

Stupeň 2 byl charakterizován jako sklerální toxicita. Do tohoto stupně jsme řadili toxické změny, postihující spojivku, sklěru a rohovku. Zjišťovali jsme přítomnost toxické konjunktivitidy, charakterizované difúzní hyperemií spojivky spolu s papilární reakcí v horní i dolní tarzální spojivce nebo folikulární reakcí prominující ve spojivce dolního fornixu. Zánět nebo nekróza sklěry představovali také tento stupeň toxicity. Dále jsme testovali přítomnost jakéhokoli epiteliálního defektu rohovky barvením fluoresceinem (Thilorbin, fluorescein natrium 0,8%, Alcon, Německo), jakýkoli edém buněk rohovky, rohovkové infiltráty, ztráta normálního lesku rohovky a subepiteliální vrstvy fibrovaskulární tkáně z limbu rohovky.

Stupeň 3, oční toxicita, byl charakterizován ostatními klinickými známkami toxicity. Sem patří jakékoli známky nitroočního zánětu, krvácení a odchlípení sítnice.

Stupeň 4, systémová toxicita, zahrnoval klinické známky systémového toxického účinku karboplatiny a topotecanu na králičí organismus. Zkoumali jsme úbytek váhy králíků, změny v chování králíků a, pokud bylo nezbytné, jsme vyšetřili králíka po usmrcení z hlediska patologicky-anatomického.

Přítomnost Stupně 1 a 2 toxicity nepokládáme za dávku limitující. Lokální léčba karboplatinou či topotecanem by nemusela v těchto případech být přerušena pro minimální vliv na zrakové funkce. Známky Stupně 3 a 4 toxicity jsme pokládali za dávku limitující.

Před a po aplikaci chemoterapeutik byl dále měřen nitrooční tlak přístrojem TONO-PEN XL Applanation Tonometer.

### **3.7. Zhodnocení funkce sítnice**

U králíků Skupiny C po transkorneální intravitreální aplikaci topotecanu v dávce 2 µg bylo provedeno elektrofyziologické vyšetření sítnice před a po skončení experimentu. U králíků s opakovanou transkorneální intravitreální aplikací, tj. u Skupiny 3 (0,05 mg karboplatiny), Skupiny 4 (0,008 mg karboplatiny) a Skupiny D (2 µg topotecanu), byl zaznamenán elektroretinogram (ERG) před zahájením pokusů a 14 dní po poslední čtvrté aplikaci dávky. Vyšetření ERG bylo prováděno po uvedení laboratorních králíků do celkové anestezie disociativního typu (Narketan 10 a.u.v.inj., Vétoquinol, Lure Cedex, Francie 50 mg/kg ve směsi s 5mg/kg Rometaru 2% a.u.v.inj., Spofa, Praha, Česká republika). Zornice králíků byla před vyšetřením uvedena do maximální arteficiální mydriasy pomocí instilace 0,5% tropicamidu (Mydrum Chauvin Ankerpharm GmbH, Německo). Rohovky králičích očí byly znecitlivěny lokální anestezií oxybuprocainem 0,4% (Benoxi 0.4% Unimed Pharma 1X10mL, Bratislava, Slovenská republika). Vyšetření ERG probíhalo podle standardního protokolu ISCEV. Ke snímání elektrických potenciálů byly zavedeny tři elektrody: akční ERG-Jet elektroda ve formě kontaktní čočky byla umístěna přímo na rohovku králičího oka, referenční kožní elektroda byla umístěna 1 cm horizontálně zevně od zevního koutku oka v temporální oblasti a zemnicí kožní elektroda byla umístěna uprostřed čela. Elektrofyziologické vyšetření se sestávalo ze série elektroretinografických záznamů (ERGs) prováděných za fotopických i za skotopických podmínek v perimetrické kouli (Ganzfeld).

Adaptace na tmu trvala vždy 30 minut. Po ní následoval skotopický (tyčinkový) ERG záznam vyprodukovaný stimulací sítnice pomocí pětimilisekundového záblesku o intenzitě  $0,01 \text{ cd} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$  a pro získání maximální skotopické odpovědi zábleskem o intenzitě  $3,0 \text{ cd} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ . V další fázi vyšetření se králíci pět minut adaptovali na světlo. Poté byl snímán ftopický (čípkový) elektroretinogram pětimilisekundovým zábleskem o intenzitě  $3,0 \text{ cd} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$  za běžného osvětlení o intenzitě  $30 \text{ cd} / \text{m}^2$  k určení odpovědi čípků. Vše bylo realizováno na elektrofyziologickém přístroji Roland Consult (Brandenburg, Německo).

Rozptyl průměrných hodnot byl uveden jako směrodatná odchylka průměru. Významnost rozdílu hodnot byla počítána t-testem pro nezávislé skupiny (Graph Pad Prism 5.03 pro topotecan, Statistika 9.0 WAN Statsoft, Tulsa, USA pro karboplatinu). Data byla pokládána za statisticky signifikantní při  $p < 0,05$  a za velmi signifikantní při  $p$  hodnotě  $< 0,01$ .

### **3.8. Histologické vyšetření**

Všech 54 králíků bylo na konci experimentu usmrceno exsanguinací z karotické arterie při celkové anestezii. Králíčí oči byly enukleovány spolu s víčky a retrobulbární tkání a fixovány v 10% formalinu. Vzorky byly dehydrovány etanolem a zality parafínem. Řezy o  $5 \mu\text{m}$  tloušťky byly obarveny hematoxylin & eosinem a vyšetřeny zkušeným patologem.

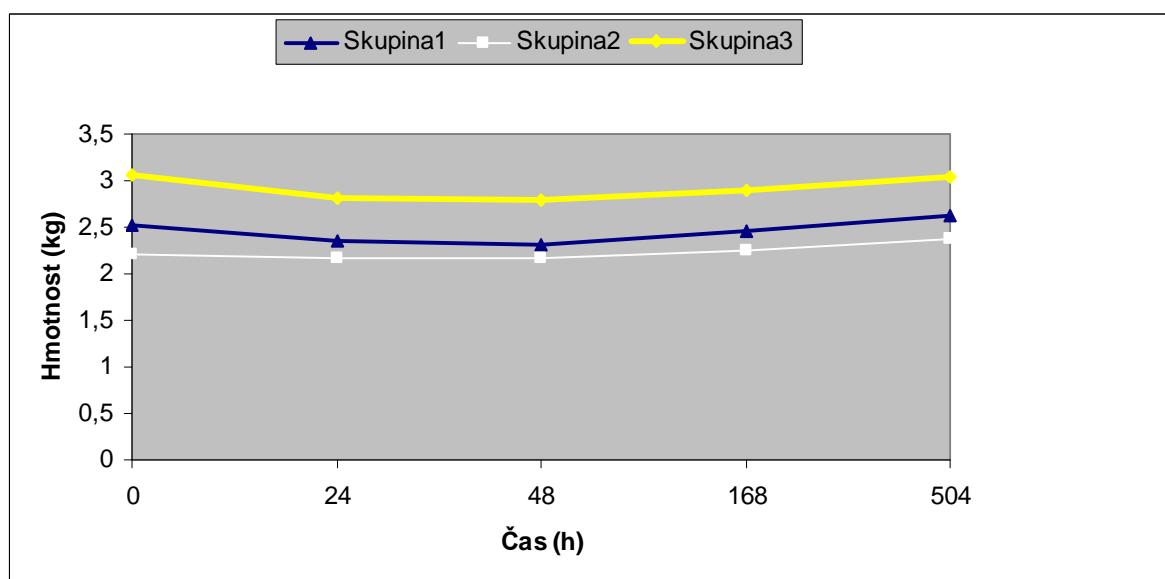
## 4. Výsledky

### 4.1. Vedlejší účinky karboplatiny po její experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 1, č.2, č.3)

#### 4.1.1. Hmotnost králíků

V průběhu experimentů jsme u žádné z pozorovaných skupin králíků nezaznamenali statisticky významný pokles tělesné hmotnosti a změny v chování (Graf 1). Nejvýznamnější úbytek tělesné hmotnosti králíků u všech skupin byl patrný během prvních 48 hod experimentu, poté jsme do ukončení experimentu pozorovali její postupný nárůst. Žádný z králíků neztratil více než 10% své tělesné hmotnosti, s výjimkou jednoho králíka v každé ze skupin, který ztratil během prvních 48 hod do 15% své tělesné hmotnosti ( $p > 0,05$ ).

**Graf 1.** Průměrné tělesné hmotnosti králíků po lokálních jednorázových aplikacích karboplatiny

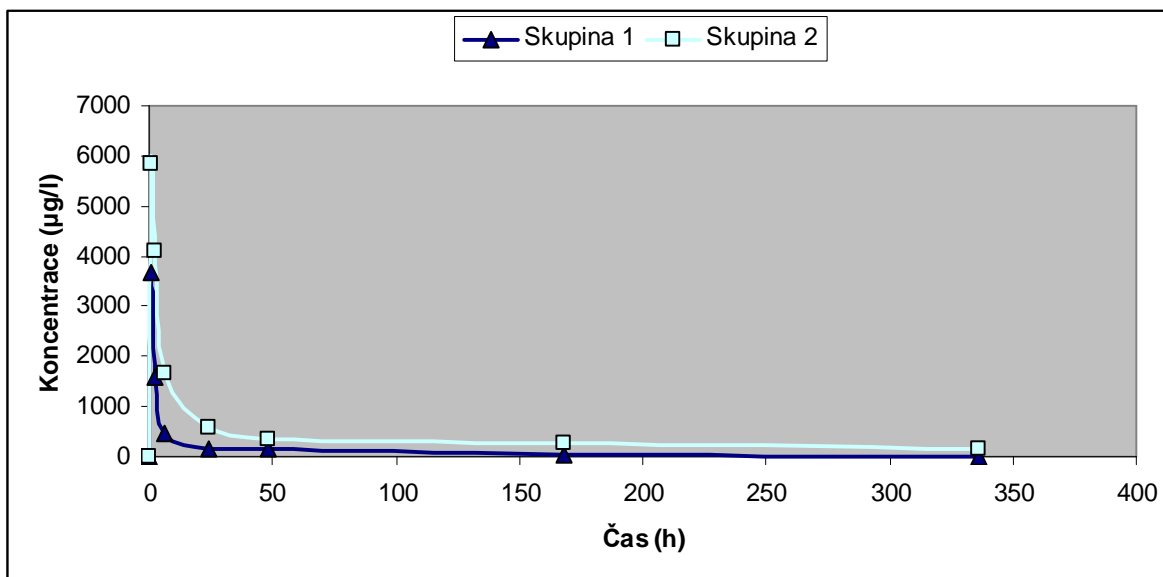


#### 4.1.2. Koncentrace karboplatiny v plasmě

Dosažená průměrná koncentrace karboplatiny v plasmě byla po její periokulární aplikaci v dávce 15 mg čtyřikrát vyšší oproti její průměrné koncentraci ve sklivci. Po periokulárním podání 30 mg karboplatiny byla v plasmě měřena průměrně osmkrát vyšší koncentrace než ve sklivci. Maximální koncentrace karboplatiny v plasmě byla u obou dávek

měřena 1 hod po periokulární injekci a následně do 336 hod strmě klesala (Graf 2). Po transkorneální intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny byly její koncentrace v plasmě pod hladinou detekce.

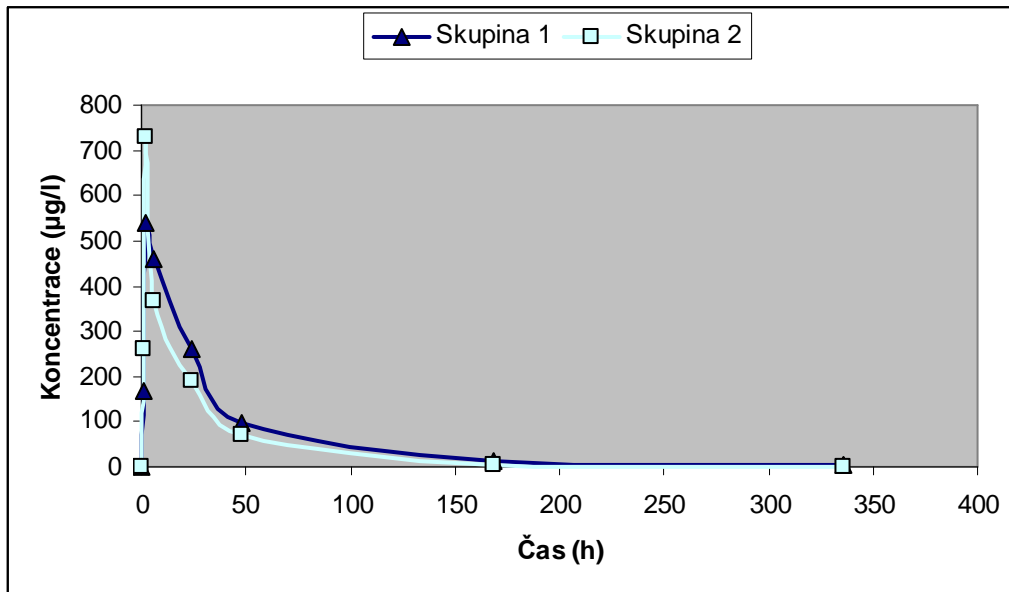
**Graf 2. Průměrné dosažené koncentrace karboplatiny v plasmě po periokulární aplikaci 15 mg karboplatiny (Skupina 1) a 30 mg karboplatiny (Skupina 2)**



#### 4.1.3. Koncentrace karboplatiny ve sklivci

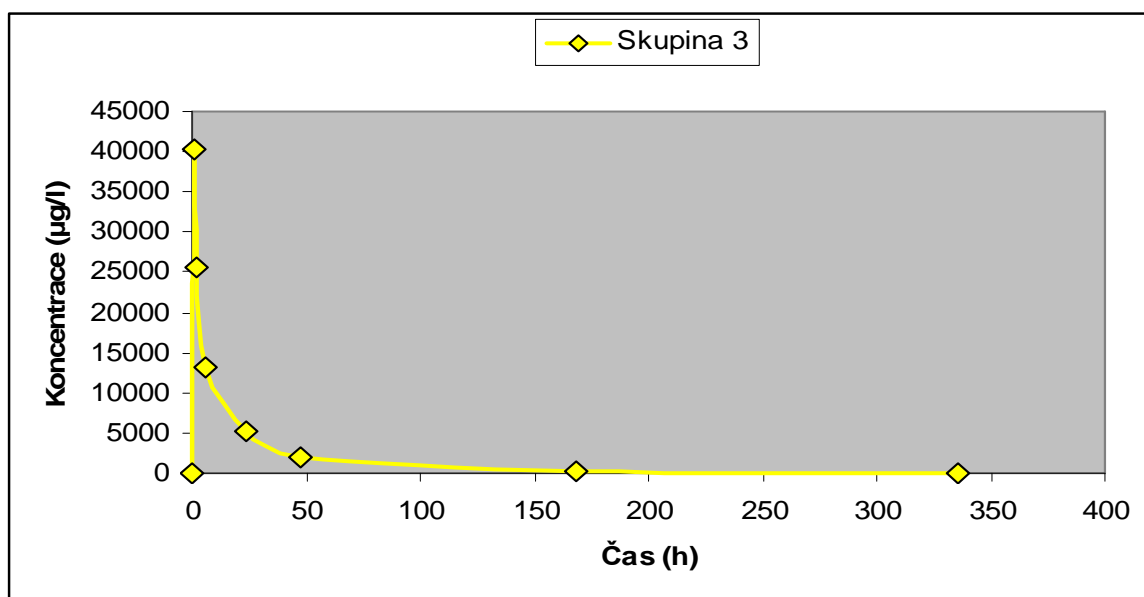
Periokulární aplikace karboplatiny dosáhla u Skupiny 1 a Skupiny 2 svého maxima ve sklivci 2 hod po injekci, hladiny však byly oproti intravitreálnímu podání nízké a po 7 dnech na hranici detekce (Graf 3).

**Graf 3. Průměrné dosažené koncentrace karboplatiny ve sklivci po periokulární aplikaci 15 mg karboplatiny (Skupina 1) a 30 mg karboplatiny (Skupina 2)**



Naopak po transkorneální intravitreální aplikaci karboplatiny u Skupiny 3 bylo dosaženo vysokých koncentrací karboplatiny ve sklivci v 1 hod po injekci a tyto koncentrace v následujících hodinách klesaly, nicméně se udržely nad hodnotou 1 mg/l po dobu 7 dní (Graf 4).

**Graf 4. Průměrné dosažené koncentrace karboplatiny ve sklivci po transkorneální intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny (Skupina 3)**



#### 4.1.4. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci karboplatiny

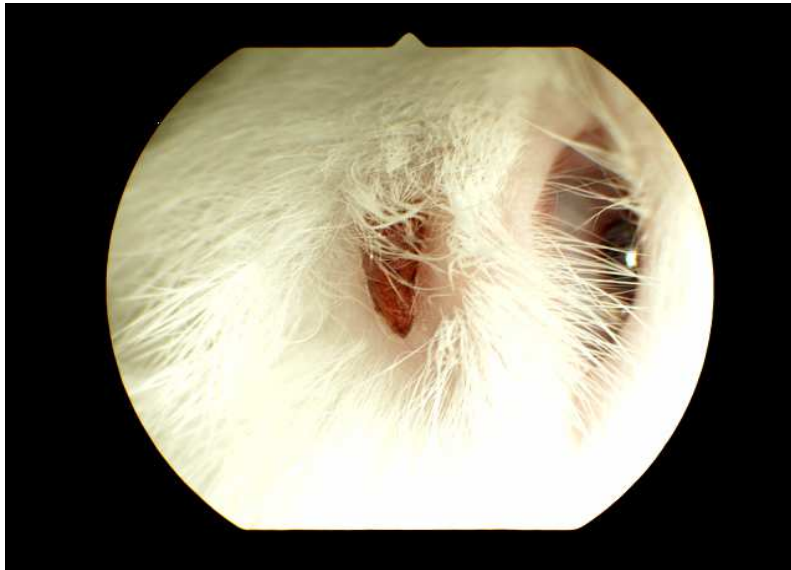
Periokulárně aplikovaná karboplatina vyvolala klinické změny zejména na předním segmentu očním a periokulárně, zatímco intravitreálně aplikovaná karboplatina způsobila ložiskové změny sítnice (Tabulka 3). Nejzávažnějším nálezem je vznik nekrózy horního víčka u dvou králíků Skupiny 2 a ztráta řas u tří králíků této skupiny 7 dní po aplikaci 30 mg karboplatiny periokulárně (Obrázek 4).

**Tabulka 3. Klinicky pozorované a histologické změny po periokulární aplikaci 15 mg karboplatiny (Skupina 1) a 30 mg karboplatiny (Skupina 2) a intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny (Skupina 3)**

Vedlejší účinky	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
<b>Stupeň 1 - periokulární toxicita</b>			
Edém víček	6	3	0
Ztráta řas	0	3	0
Nekróza víček	0	2	0
<b>Stupeň 2 - sklerální toxicita</b>			
Vaskularizace rohovky	1	2	0
Podspojivkové krvácení	2	2	0
<b>Stupeň 3 - oční toxicita</b>			
Hyféma	4	3	3
Traumatická katarakta	5	1	1
Hemoftalmus	3	3	5
Ložisková atrofie sítnice	0	1	5
<b>Stupeň 4 - systémová toxicita</b>	0	0	0

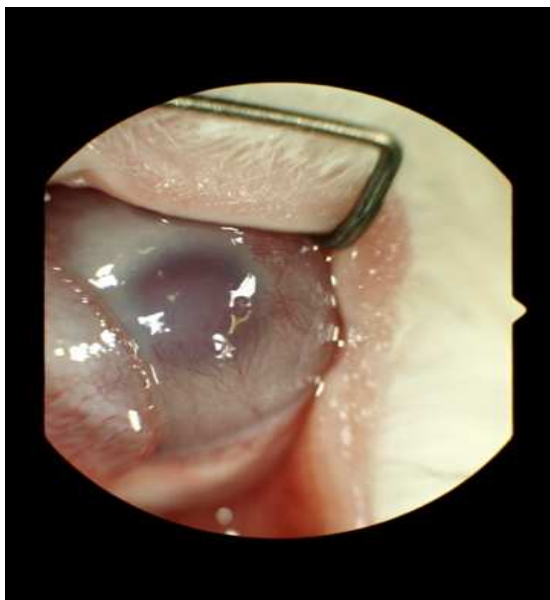
U všech šesti králíků Skupiny 1 byl pozorován mírný, transientní periokulární edém, který se do 2 hod po aplikaci spontánně rezorboval. Na druhou stranu se u Skupiny 2 rozvinul periokulární edém pouze u tří králíků, ale tento edém byl výraznější a přetrvával 48 hod po aplikaci 30 mg karboplatiny.

#### **Obrázek 4. Ložisková nekróza horního víčka**



U jednoho králíka Skupiny 1 a dvou králíků Skupiny 2 byla zaznamenána povrchová vaskularizace rohovky, která se rozvinula nejen v okolí místa vpichu, ale i po celé dolní polovině rohovky. U těchto očí rohovka ztratila pro edém ve stromatu lesk a transparentnost (Obrázek 5).

#### **Obrázek 5. Povrchová vaskularizace rohovky**

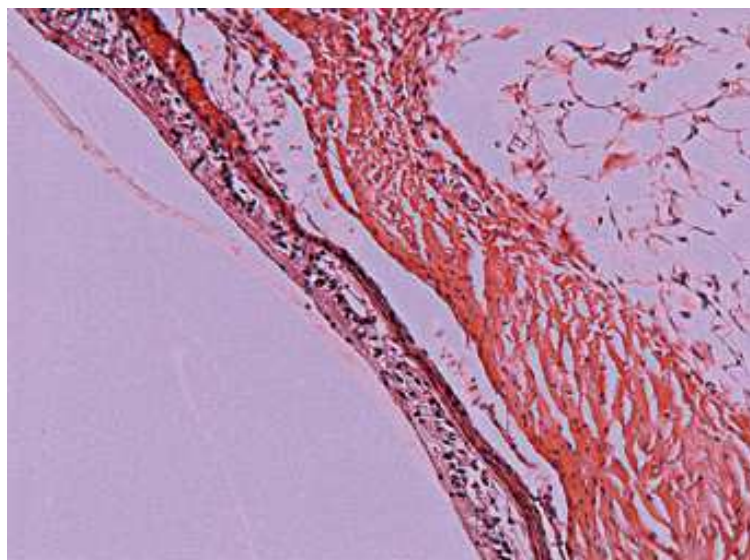


Podspojivkové krvácení, stejně jako hyféma, traumatická katarakta a hemoftalmus, řadíme ke komplikacím, spojeným s technikou transkorneální intravitreální injekce.



Dalším závažným nálezem byla ložisková atrofie sítnice u pěti králíků Skupiny 3 a (Obrázek 6) jednoho králíka Skupiny 2. Histopatologické vyšetření prokázalo ložiskové ztenčení vrstev sítnice s porušením stavby, zejména zevní nukleární a zevní plexiformní vrstvy. V těchto vrstvách byly pozorovány prázdné cystoidní prostory, které zasahovaly i do vrstvy fotoreceptorů, a jádra buněk zevních vrstev sítnice byla nepravidelně uspořádána (Obrázek 6).

#### **Obrázek 6. Ložisková atrofie sítnice**

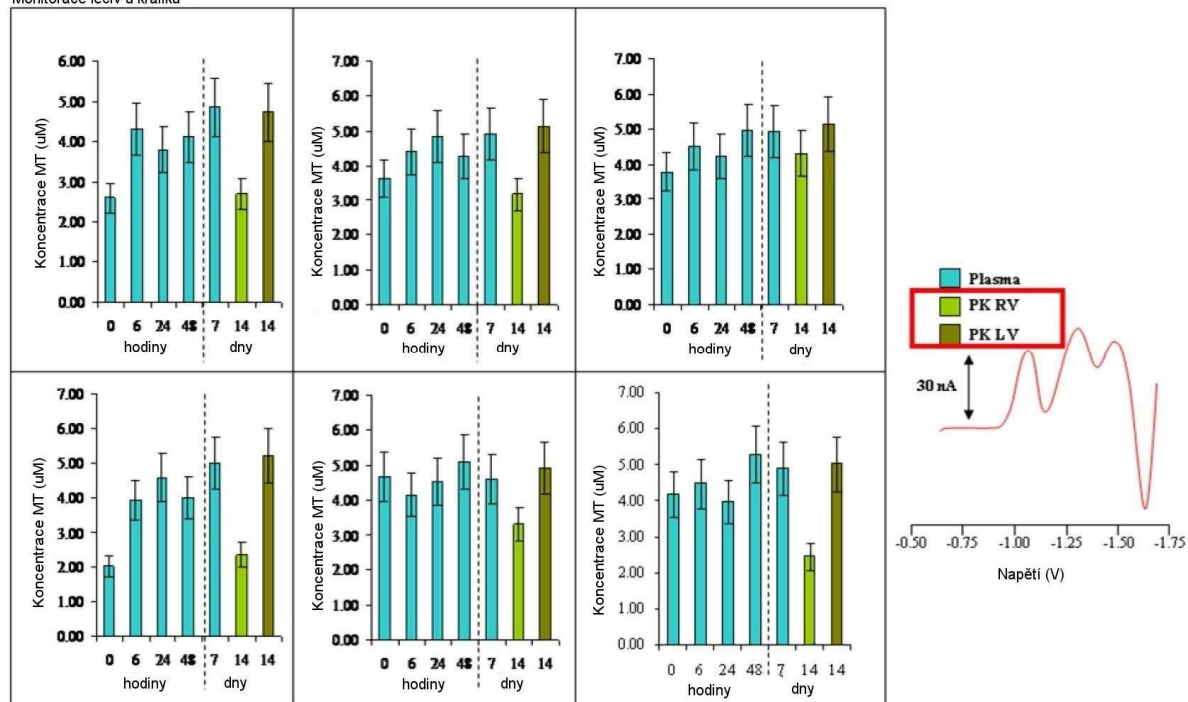


#### **4.1.5. Změny koncentrace metalothioneinu v plasmě**

Hladina metalothioneinu ve sklivci před aplikací karboplatiny činila v průměru 3.5  $\mu\text{M}$ . V průběhu 7 dnů po aplikaci narůstala hladina až na průměrně 5  $\mu\text{M}$  a zvýšené hladiny MT byly detekovány po dobu následujících 7 dnů. Mírný pokles hladiny MT nastal za 14 dní od intravitreální aplikace karboplatiny (Graf 5).

## Graf 5. Změny koncentrace metalothioneinu (MT) ve sklivci v závislosti na čase u králíků

Monitorace léčiv u králíků

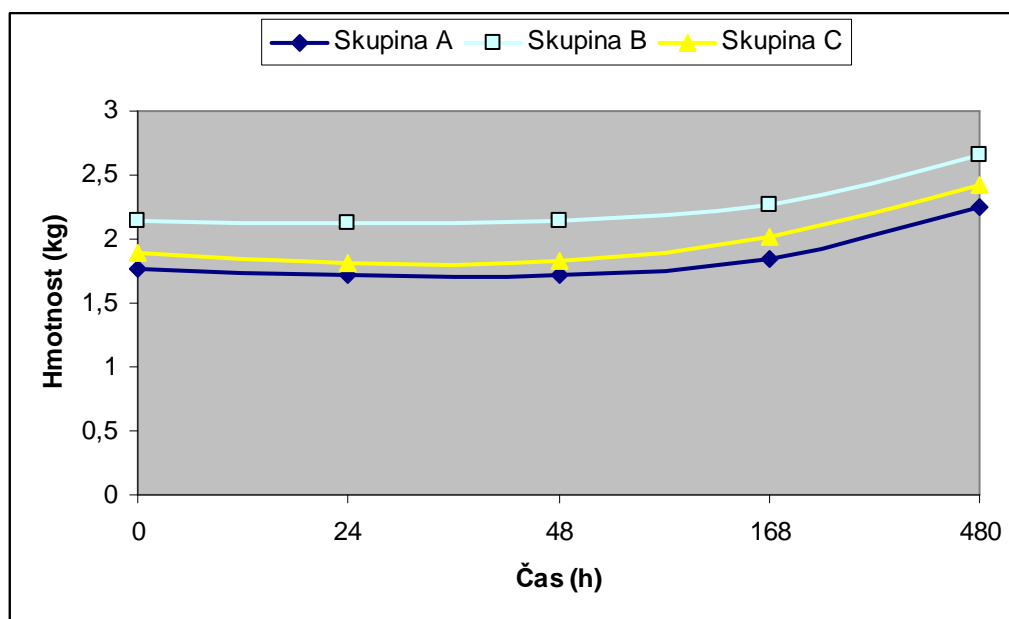


## 4.2. Vedlejší účinky topotecanu po jeho experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č.4)

### 4.2.1. Hmotnosti králíků

V průběhu experimentů přibírali všichni králíci pravidelně na váze (Graf 6) a průměrná hmotnost králíků se vzájemně signifikantně nelišila.

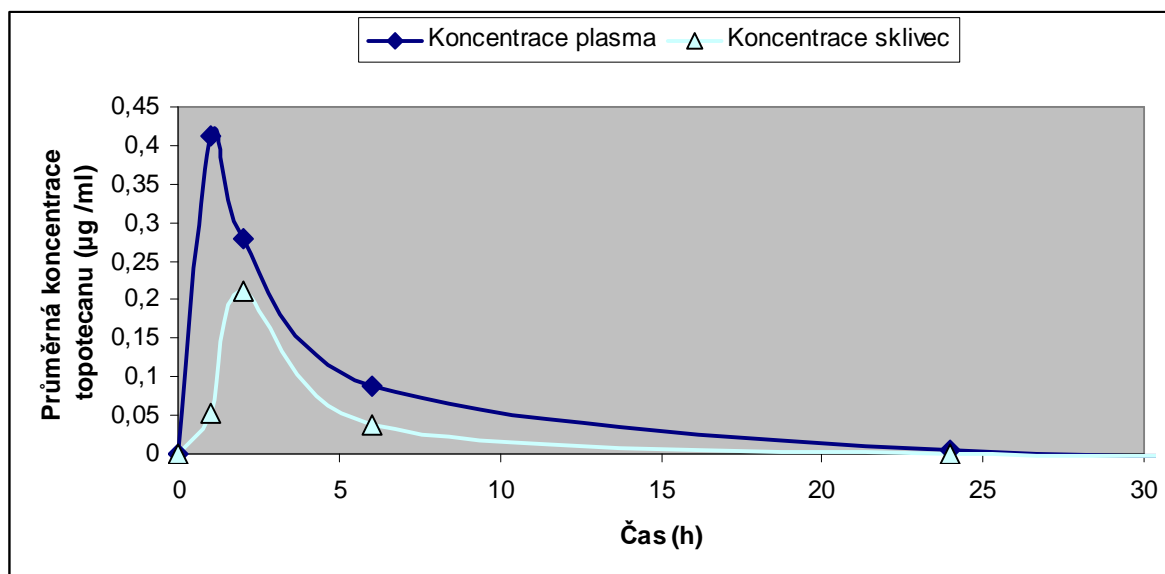
**Graf 6. Průměrné tělesné hmotnosti králíků po lokálních aplikacích topotecanu**



#### 4.2.2. Koncentrace topotecanu v plasmě a ve sklívci

Zjistili jsme, že periokulární injekce 2 mg topotecanu vyvolala v průměru dvojnásobně vyšší koncentrace v plasmě oproti dosaženým koncentracím ve sklívci (Graf 7, nepublikovaná data). Po periokulární aplikaci však bylo dosaženo kolem 2 hod po injekci cytotoxické koncentrace ve sklívci a požadovaná cytotoxická koncentrace následně opět rychle klesala a 6 hod od injekce již byla pod hladinou cytotoxického účinku.

**Graf 7. Porovnání dosažených průměrných koncentrací topotecanu v plasmě a ve sklivci po periokulární aplikaci 2 mg topotecanu (Skupina A) ve vodném roztoku**



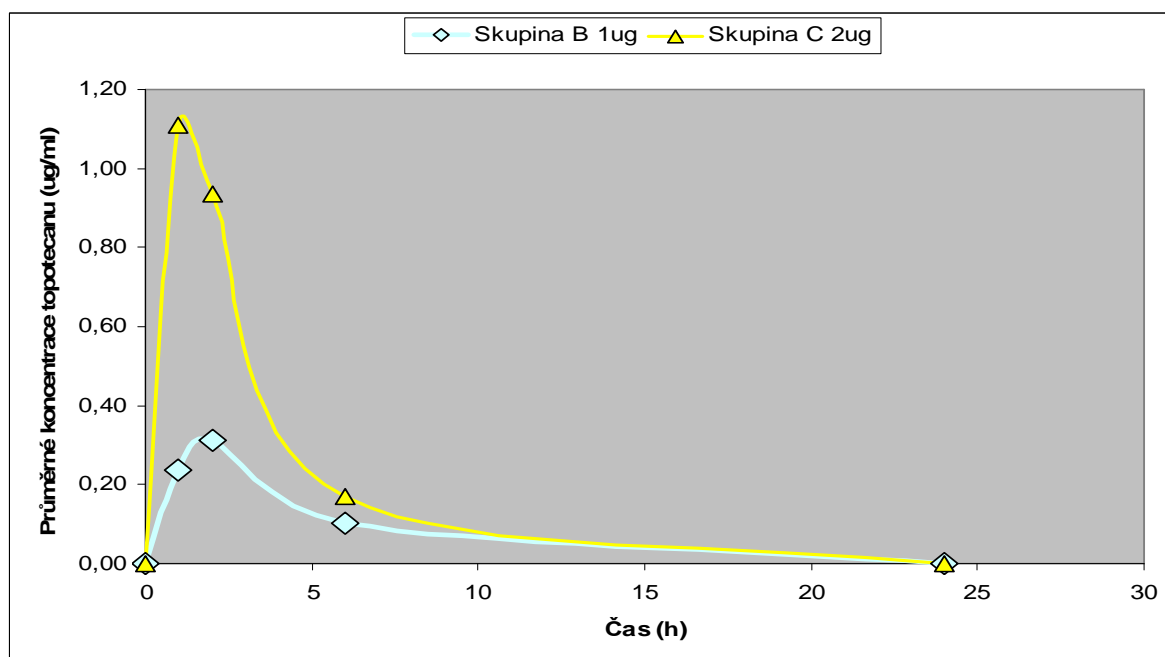
Topotecan jsme změřili i ve vzorcích sklivce levého kontrolního oka po dobu 6 hod od jeho periokulární aplikace vpravo (Tabulka 4, nepublikovaná data).

**Tabulka 4. Koncentrace topotecanu ve sklivci levého oka (µg/ml) po aplikaci 2 mg topotecanu periokulárně (Skupina A)**

	Králík	Králík	Králík	Králík	Králík	Králík	Průměr
Čas (h)	č.1	č.2	č.3	č.4	č.5	č.6	koncentrací
2h	0,08	0,15	0,05	0,18	0,1	0,11	0,11
6h	0,02	0,03	0,04	0,01	0,07	0,08	0,04

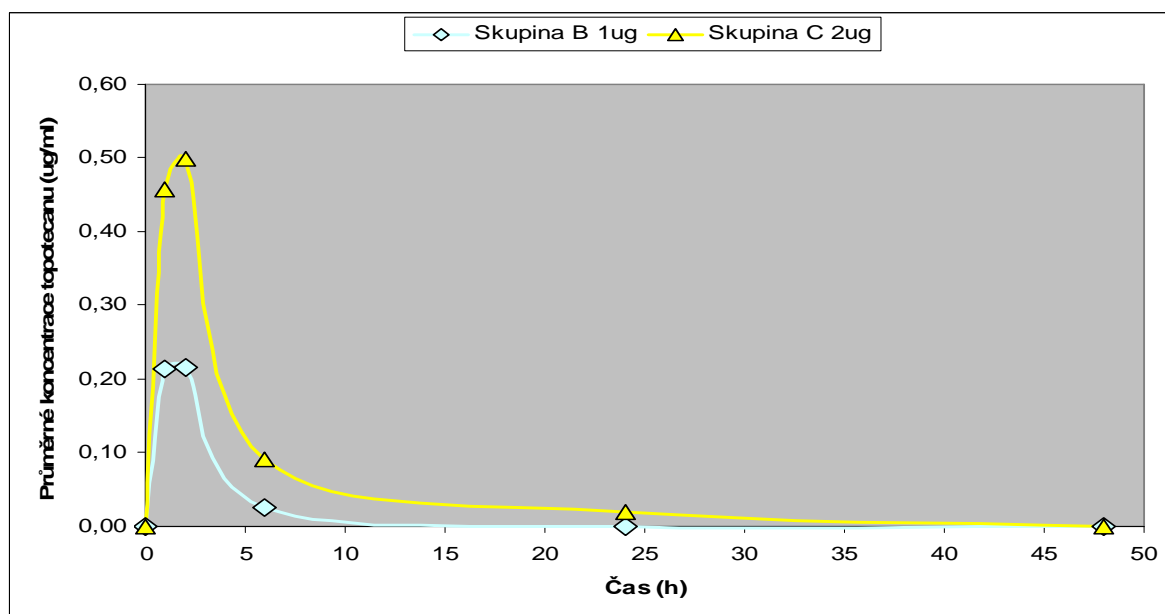
Po intravitreální aplikaci 1 µg topotecanu bylo dosaženo jeho maximální intravitreální koncentrace za 2 hod po injekci, kdežto po intravitreální aplikaci 2 µg topotecanu již za 1 hod po aplikaci (Graf 8). Průměrná intravitreální koncentrace topotecanu ve 2 hod po aplikaci u Skupiny B byla 0,31 µg/ml a u Skupiny C 0,94 µg/ml. Tyto hodnoty se liší signifikantně ( $p=0,0006$ ). Průměrné intravitreální koncentrace topotecanu se naopak za 6 hod po aplikaci signifikantně neliší ( $p=0,0664$ ) a za 24 hod po aplikaci jsou u obou skupin pod hladinou detekce.

**Graf 8. Dosažené průměrné koncentrace topotecanu ve sklivci v čase po transkorneální intravitreální aplikaci 1  $\mu\text{g}$  (Skupina B) a 2  $\mu\text{g}$  (Skupina C) topotecanu.**



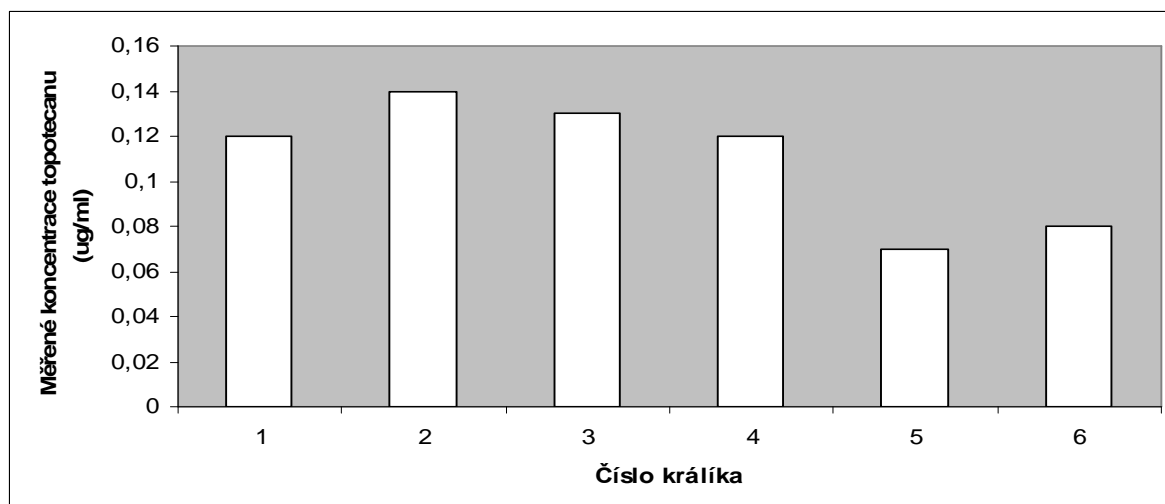
V tomto experimentu jsme měřili účinné koncentrace topotecanu v plasmě do 6 hod po jeho intravitreální aplikaci (Graf 9). Koncentrační křivky v plasmě měly stejný charakter jako koncentrační křivky ve sklivci u obou skupin. Dosažené koncentrace v plasmě byly nižší než ve sklivci.

**Graf 9.** Dosažené průměrné koncentrace topotecanu v plasmě v čase po transkorneální intravitreální aplikaci 1  $\mu\text{g}$  (Skupina B) a 2  $\mu\text{g}$  (Skupina C) topotecanu.



U Skupiny C byly měřeny účinné koncentrace topotecanu i v levých očích v čase 6 hod (Graf 10).

**Graf 10.** Koncentrace topotecanu ve sklivci levých očí v 6 hod po transkorneální intravitreální injekci 2  $\mu\text{g}$  (Skupina C) topotecanu.



### 4.2.3. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci topotecanu

Přestože jsme po periokulární aplikaci 2 mg topotecanu ve Skupině A měřili dvojnásobně vyšší koncentrace v plasmě oproti sklivci, nepozorovali jsme ztrátu chlupů či změnu chování. Stupeň 4 - systémové toxicity nebyl dosažen ani u testované Skupiny B a C králíků, tj. po intravitreální injekci topotecanu.

Vedlejší účinky periokulární a intravitreální aplikace topotecanu shrnuje následující tabulka (Tabulka 5).

**Tabulka 5. Klinicky pozorované a histologické změny po periokulární aplikaci 2 mg topotecanu (Skupina A) a intravitreální aplikaci 1 µg topotecanu (Skupina B) a 2 µg topotecanu (Skupina C)**

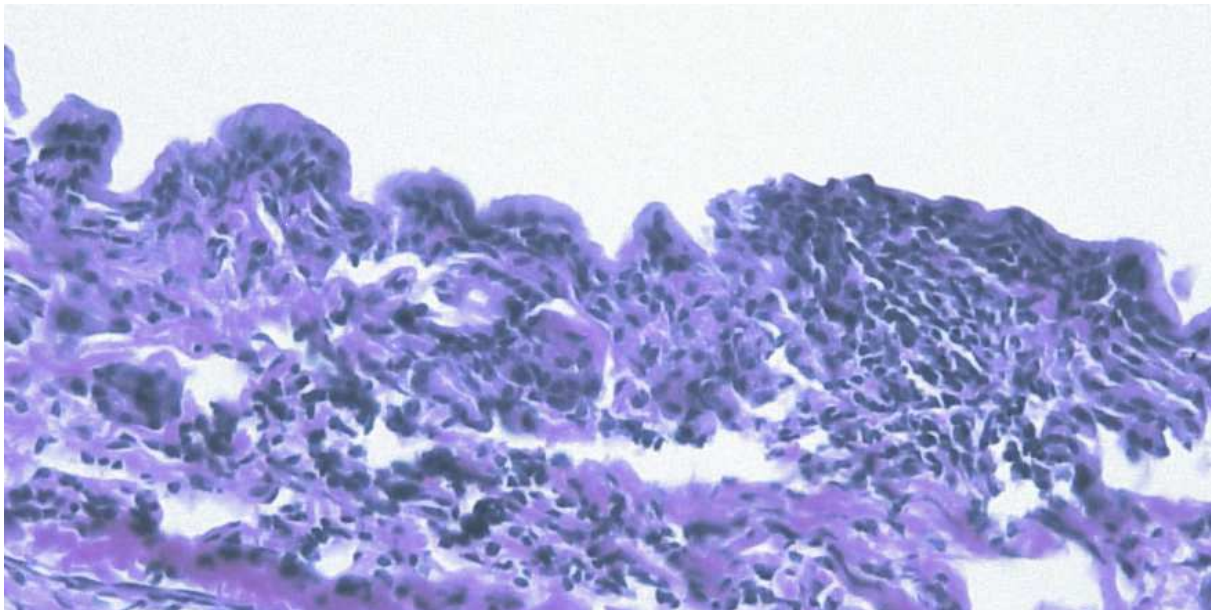
<b>Vedlejší účinky</b>	<b>Skupina A</b>	<b>Skupina B</b>	<b>Skupina C</b>
<b>Stupeň 1 - periokulární toxicita</b>			
Chemoso spojivky	6	0	0
<b>Stupeň 2 - sklerální toxicita</b>			
Lymfocytární infiltrace	6	4	0
Vaskularizace rohovky	0	6	6
Podspojivkové krvácení	2	0	0
<b>Stupeň 3 - oční toxicita</b>			
Edém cévnatky	4	3	4
Traumatická katarakta	2	2	2
Hemoftalmus	0	1	1
Ložisková atrofie sítnice	0	0	4
<b>Stupeň 4 - systémová toxicita</b>	0	0	0

Lokální oční vedlejší účinky periokulárně aplikovaného topotecanu byly mírné. U všech králíků jsme po aplikaci 2 mg topotecanu pozorovali žlutě pigmentovanou chemosu spojivky (Obrázek 7, nepublikovaná data). Do dvou hodin od aplikace se edém spojivky rezorboval, žlutavá ložiska perzistovala po dobu týdne. U jednoho králíka Skupiny A jsme zaznamenali mírnou fibrinovou reakci subkonjunktiválně. Ostatní králíci byly bez následných komplikací. Histopatologické vyšetření králíčích očí odhalilo lymfocytární infiltraci v periokulární tkáni léčených očí šesti králíků Skupiny A a neléčených očí čtyř králíků Skupiny B (Obrázek 8, nepublikovaná data). Nepozorovali jsme žádnou poruchu v motilitě králíčích očí.

**Obrázek 7. Žlutavě zabarvená chemosa spojivky ve Skupině A**



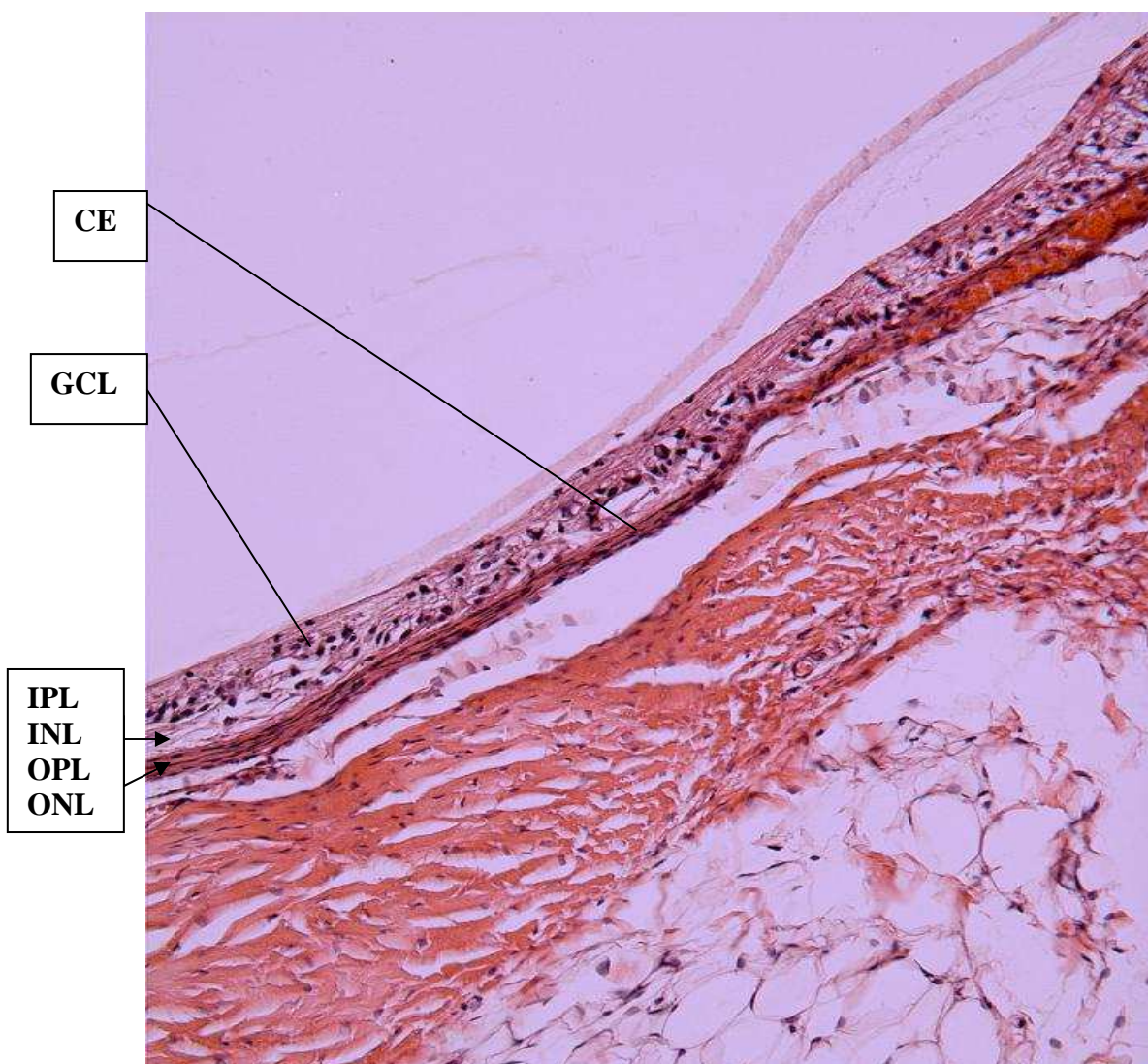
**Obrázek 8. Histopatologický nález ve Skupině A lymfocytární reakce v řezu orbitální tkání po obarvení hematoxylin&eosinem (černé tečky).**





U dvou léčených očí a dvou neléčených očí Skupiny C (2  $\mu$ g topotecanu intravitreálně) jsme při následném histopatologickém vyšetření objevili redukci gangliových buněk sítnice, snížení velikosti všech retinálních buněk a ztrátu jejich uspořádání v sítnicových vrstvách a přítomnost choroidálního edému (Obrázek 9).

**Obrázek 9.** Histologický řez sítnicí Skupiny C barvený hematoxylin & eosinem. Redukce počtu gangliových buněk (GCL), edém cévnatky (CE), vnitřní plexiformní vrstva (IPL), vnitřní nukleární vrstva (INL), vnější plexiformní vrstva (OPL), vnější nukleární vrstva (ONL).



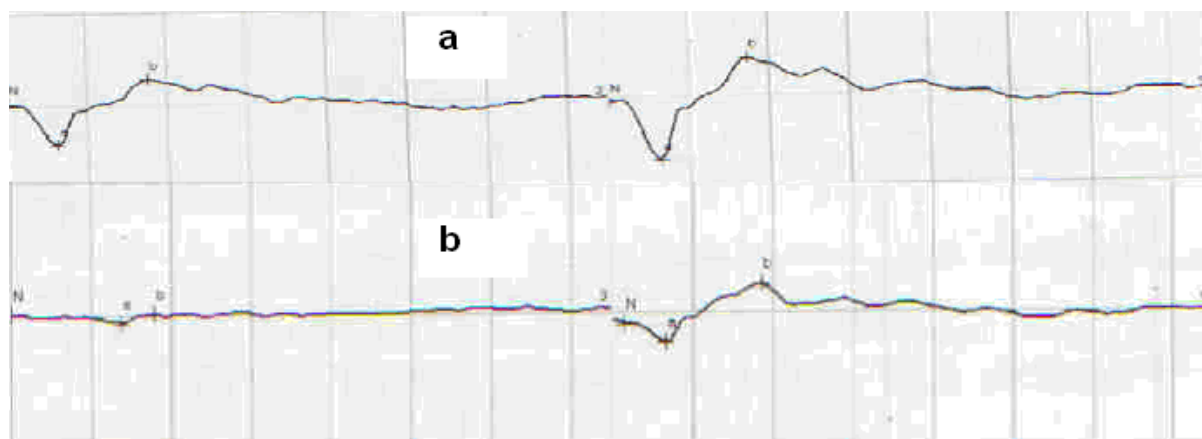
### 4.3. Komplikace transkorneální intravitreální injekce

Komplikace, spojené s transkorneální intravitreální injekcí, zahrnovaly vaskularizaci rohovky v místě vpichu (n=36, 100%), kataraktu (n=5, 14%) a krvácení do sklivce (n=6, 17%). Dalšími komplikacemi intravitreální léčby mohou být vznik endoftalmitidy, amoce sítnice a trhliny v pigmentovém epitelu, které jsme však po intravitreální injekci nepozorovali.

### 4.4. Změny ERG po opakované intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu (publikace č.5, č.6)

Po opakované intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny prokázalo konečné ERG v porovnání s počátečním ERG redukcí velikosti amplitud na světlo adaptované a-vlny i b-vlny a na tmě adaptované b-vlny. To odpovídá poškození synapsí ve vnější plexiformní vrstvě sítnice. ERG změny při dávce 0,05 mg však nezprogredovaly do ploché křivky ERG (Obrázek 10).

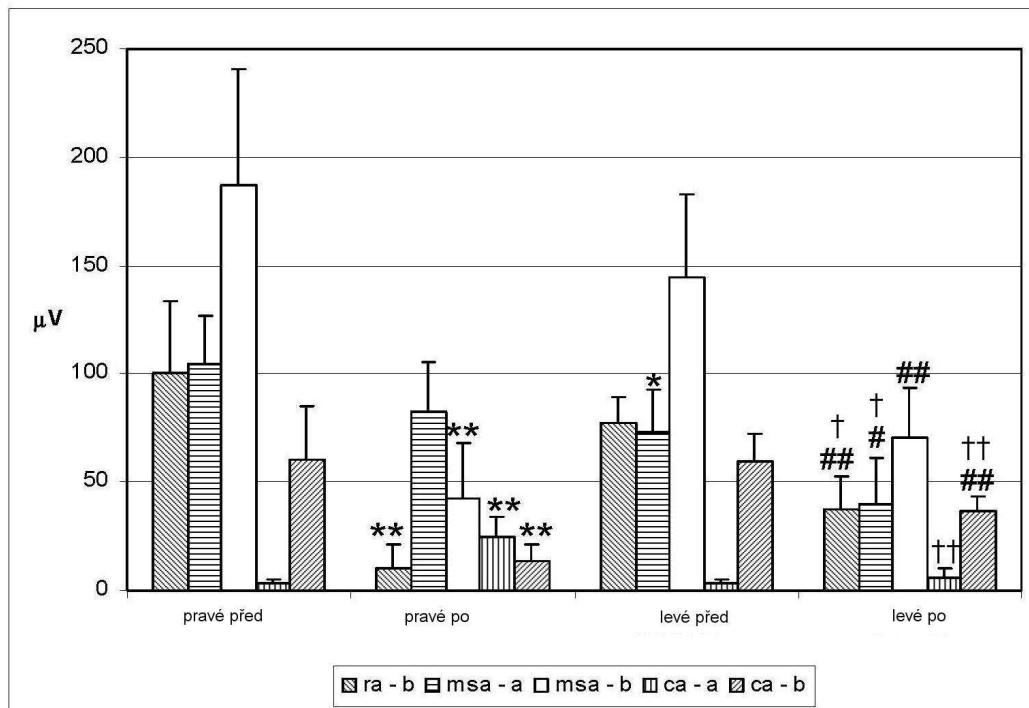
**Obrázek 10.** ERG pravého oka králíka č. 3 před (a) a po (b) aplikací karboplatiny.



U pravých očí jsme po opakované intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny zaznamenali ložiskovou atrofii sítnice, stejně jako u pravých očí po jedné injekci 0,05 mg karboplatiny.

Po opakované transkorneální intravitreální aplikaci 0,008 mg karboplatiny jsme na ERG zjistili signifikantní redukcí v amplitudách b-vlny po skotopické adaptaci ( $p=0,00042$ ), a-vlny ( $p=0,00065$ ) i b-vlny ( $p=0,0042$ ) po fotopické adaptaci a po maximální skotopické odpovědi v b-vlně ( $p=0,00066$ ). Při klinickém, ani při histopatologickém vyšetření jsme nezaznamenali přítomnost atrofie sítnice či jiných strukturálních změn (Graf 10).

**Graf 10. Změny v ERG záznamech pravých a levých očí před a po opakované intravitreální aplikaci 0,008 mg karboplatiny.**



průměr ± SD

\*\* $P < 0.01$  ve srovnání s pravým okem před aplikací

\* $P < 0.05$  ve srovnání s pravým okem před aplikací

## $P < 0.01$  ve srovnání s levým okem před aplikací

# $P < 0.05$  ve srovnání s levým okem před aplikací

†† $P < 0.01$  ve srovnání s pravým okem po aplikaci

† $P < 0.05$  ve srovnání s pravým okem po aplikaci

Po opakované intravitreální aplikaci topotecanu v dávce 2  $\mu\text{g}$  bylo ERG vyšetření u všech očí králíků s normální velikostí amplitud ( $p > 0,05$ ). Zjistili jsme pouze málo signifikantní pokles amplitudy b-vlny po fotopické adaptaci ( $p = 0,023$ ). Tudíž jsme při ERG vyšetření králičích očí po čtyřnásobné aplikaci 2  $\mu\text{g}$  topotecanu ve dvoutýdenních intervalech neprokázali žádnou retinální toxicitu po sledovací dobu dvou měsíců od první dávky (nepublikovaná data).

## 5. Diskuze

Navzdory procentuelnímu zlepšení vyléčitelnosti retinoblastomového onemocnění v závislosti na zavedení karboplatiny do chemoterapeutického protokolu (Shields C. L. et al., 2006) se nedosáhlo pouhým užitím systémové chemoterapie úplné kontroly nad pokročilým stupněm retinoblastomu. Neúplná kontrola nad pokročilým stupněm retinoblastomu může

být způsobena:

1. neadekvátní penetrací karboplatiny přes hemato-okulární bariéru do tkání oka
2. dosažením nízkých intracelulárních hladin karboplatiny uvnitř retinoblastomových buněk

Na pravděpodobný vznik nízkých intracelulárních hladin karboplatiny v retinoblastomových buňkách může mít vliv:

1. jejich nízká koncentrace ve sklivcovém prostoru oka
2. rezistence retinoblastomových buněk ke karboplatině

Vysoká intracelulární koncentrace karboplatiny uvnitř retinoblastomových buněk by tedy mohla zvýšit kontrolu nad pokročilým stupněm retinoblastomu, proto je vhodné zvýšit koncentraci karboplatiny v blízkosti oka s ohledem na možný vznik toxických vedlejších účinků.

### **5.1. Vedlejší účinky karboplatiny po její experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 1, č.2, č.3)**

Lokálně aplikovaná karboplatina dosáhla v předchozích experimentech vyšší koncentrace ve sklivci oproti jejímu systémovému podání (Mendelsohn M. E. et. al., 1998, Abramson D. H. et. al., 1999, Hayden B. C. et. al., 2004). Stejně výsledky byly dosaženy i v našich experimentech. Rozdílné je však dosažení nižších vitreálních koncentrací karboplatiny po jejím periokulárním podání v obou dávkách, tj. 15 mg a 30 mg, oproti jmenovaným studiím. Dosažené intravitreální hladiny karboplatiny byly nestejněměrné a po periokulární aplikaci 15 mg karboplatiny zůstala hladina AUC (průměr 0,35 mg/l.min  $\pm$  0,17SD) pod cílovou hladinou, která byla stanovena v rozmezí 3 – 8 mg/l.min (Alberts D. S., Dorr R. T., 1998). Z toho důvodu je pro dosažení vyšších koncentrací karboplatiny ve sklivci a posléze v retinoblastomových buňkách výhodnější aplikace vysoké koncentrace karboplatiny periokulárně, tj. v dávce 30 mg. Přesto se po podání dvojnásobné dávky karboplatiny její intravitreální koncentrace významně lineárně nezvýšily. Naopak jsme zaznamenali výrazné toxické účinky na struktury králičího oka.

U této Skupiny 2 vznikla u dvou králíků po 168 hod od aplikace 30 mg karboplatiny periokulárně nekróza horního víčka, která byla navržena jako dávku limitující toxicita. U těchto dvou očí Skupiny 2 byl také v průběhu 48 hod pozorován periorbitální edém.

Transientní mírná chemosa spojivky byla zaznamenána u všech králíků Skupiny 1 v prvních dvou hodinách po aplikaci 15 mg karboplatiny periokulárně. Předpokládáme, že periokulárně aplikovaná karboplatina ve vodném roztoku může rychle pronikat sub-Tenonovým prostorem do intrakonálního a extrakonálního orbitální prostoru. Tak může vystavit extraokulární tkáň vysokým transientním koncentracím karboplatiny, použitým u Skupiny 1 a 2. Absence velkého množství orbitálního tuku u králičího oka (Davis F. A., 1929), na rozdíl od oka lidského, byla pravděpodobně příčinou, proč jsme při histopatologickém vyšetření nezaznamenali přítomnost nekrózy tukové tkáně na králičím modelu, oproti pozorování na lidském oku (Abramson D. H. et. al., 1999, Kiratli H. et. al., 2006, Schmack I. et. al., 2006). Nekróza tukové tkáně způsobená karboplatinou následně spouští zánětlivou reakci v orbitě (Kiratli H. et. al., 2006, Mulvihill A. et. al., 2003). Ačkoli je orbitální prostor u králíků také tvořen extraokulárními svaly (Davis F. A., 1929), nevyvinula se během sledovacího období porucha motility, jako bylo dříve publikováno u dvanácti dětských očí (Mulvihill A. et. al., 2003) po opakované periokulární aplikaci 20 mg karboplatiny ve 2 ml vodného roztoku. U sledovaných skupin králíků nevznikl po dobu dvou a třech týdnů tak výrazný zánětlivý proces v orbitě iniciovaný nekrózou tukové tkáně, který by vedl k následnému hojení fibrózou a možné poruše oční motility. Periorbitální jizvení po periokulární aplikaci karboplatiny je vážným vedlejším účinkem. V případě nutnosti indikovat enukleaci oka stoupá riziko peroperační ruptury bulbu s následnou diseminací retinoblastomu.

U jednoho králíka Skupiny 1 a dvou králíků Skupiny 2 jsme po periokulární aplikaci karboplatiny zdokumentovali vznik rohovkové vaskularizace po celé dolní polovině rohovky, nikoli jen v místě vpichu. Tyto vedlejší účinky jsme navrhli do Stupně 2 – sklerální toxicity, kterou nepokládáme za dávku limitující vzhledem k minimálnímu eventuelnímu vlivu na zrakovou ostrost. Předpokládáme, že s injekcí do horního zevního kvadrantu sub-Tenonova prostoru dochází vlivem mrkání a gravitace k rozšíření vodného roztoku s aplikovaným chemoterapeutikem do dolních partií periokulárního prostoru. Po periokulární injekci vodného roztoku chemoterapeutika může docházet k jeho částečnému úniku v místě spojivkového vpichu na povrch spojivkové tkáně či rohovky. Tento postulát spolu se zvýšeným periferním průtokem krve v cévnatce mohl spolupůsobit ve snížení aplikovaného množství karboplatiny periokulárně, a tedy k měření nižších intravitreálních koncentrací, stejně jako k pozorování vedlejšího účinku vaskularizace rohovky.

Intravitreální aplikace 10 µg, 100 µg a 1000 µg karboplatiny cestou pars plana vyvolala v dřívějším experimentu vznik retinální atrofie (Harbour J. W. et. al., 1996). U pěti ze šesti králíků Skupiny 3 v našem experimentu byla také pozorována po aplikaci transkorneální intravitreální dávky o 0,05 mg karboplatiny v 0,1 ml sterilního roztoku retinální atrofie, ale oproti jmenovanému experimentu se nejednalo o atrofii celé sítnice, pouze o ložiskovou retinální atrofii. Předpokládáme, že náš výsledek koreluje s anatomí králičí sítnice, která je, oproti lidské sítnici, vaskularizovaná řídce a její vaskularizace nedosahuje za ekvátor oka ((Davis F. A., 1929). Z toho důvodu jsme pravděpodobně zachytili atrofii sítnice v ložiscích. Překvapením bylo zastižení ložiska sítnicové atrofie u jednoho z šesti králíků Skupiny 2.

U léčených i kontrolních očí se při histopatologickém vyšetření objevil v různé intenzitě edém cévnatky. Je vyústěním opakovaných odběrů sklivce, způsobujícím hypotonii králičích očí. Nitrooční tlak byl za 6 hod od experimentu neměřitelný.

Lokální aplikace karboplatiny o dávkách 10 mg periokulárně a 1 µg, 10 µg, 100 µg a 1000 µg intravitreálně nevyvolala podle dříve publikovaných studií klinické známky systémových toxických účinků (Mendelsohn M. E. et. al., 1998, Abramson D. H. et. al., 1999, Hayden B. C. et. al., 2004), zejména infekci, ztrátu ochlupení, alergickou reakci, úbytek váhy a změny chování, jako je popisována při intravenózní aplikaci karboplatiny. Naše výsledky po periokulární aplikaci 15 mg a 30 mg karboplatiny a po její intravitreální aplikaci 0,05 mg jsou v souladu s těmito experimenty. Na rozdíl od zmiňovaných autorů jsme v našem experimentu dosáhli po periokulární aplikaci karboplatiny v dávce 15mg její až čtyřikrát vyšší koncentrace v plasmě a po periokulární aplikaci karboplatiny v dávce 30 mg dokonce její šestkrát vyšší koncentrace. Vysvětlením tohoto rozdílu by mohla být technika periokulární aplikace. Pokud periokulární injekce nepronikne pod Tenonovu membránu nad stěnu skléry, může se aplikovaná karboplatina ve vodném roztoku snáze rezorbovat do okolního orbitálního prostoru a prostoupit spíše do venózního sinu než přes stěnu skléry. Karboplatina, uvolněná z injekce aplikované k zadnímu segmentu králičího oka, může narazit, na rozdíl od oka opice či oka lidského, na vyšší rychlost průtoku krve choroideou, čímž by se mohla podpořit tendence karboplatiny i jiného chemoterapeutika k systémové absorpci (Nork M. T. et. al., 2006). Přesto jsme po periokulární aplikaci karboplatiny dosáhli v plasmě pouze v průměru do 10% koncentrace karboplatiny, vyskytující se v plasmě po jejím intravenózním podání (Hayden B. C. et. al., 2004). Po transkorneální intravitreální aplikaci karboplatiny jsme toto chemoterapeutikum v plasmě nedetekovali. Periokulární i intravitreální aplikace karboplatiny

v daných dávkách tedy minimalizovala systémovou expozici chemoterapeutika u laboratorních králíků.

Dalším faktorem, který ovlivňuje účinnost léčby karboplatinou, je hladina metalothioneinu (MT). Hladina metalothioneinu před aplikací karboplatiny činila v průměru 3.5  $\mu\text{M}$ . V průběhu 7 dnů po aplikaci narůstala hladina až na průměrně 5  $\mu\text{M}$  a zvýšené hladiny MT byly detekovány po dobu následujících 7 dnů. Mírný pokles hladiny MT nastal za 14 dní od intravitreální aplikace karboplatiny. Z těchto výsledků je zjevně patrné, že hladiny MT byly indukovány přímou aplikací karboplatiny do sklivcového prostoru králičího oka a mohly by být spojeny se vznikem rezistence tumoru na léčbu. V průběhu cytostatické léčby karboplatinou by se původně citlivé retinoblastomové buňky mohly stát rezistentními. Frekventní aplikace karboplatiny periokulárně či intravitreálně by tak nemusela přinést očekávaný efekt.

## **5.2. Vedlejší účinky topotecanu po jeho experimentální periokulární a intravitreální aplikaci (publikace č. 4)**

Je známo, že přestupu lokálně aplikovaných léků do sklivce je bráněno přirozenou okulární bariérou, která chrání oko před potenciálně toxickými xenobiotiky (Hughes P. M. et al., 2005). Topotecan by měl po periokulárním podání penetrovat přes skléru, cévnatku a pigmentový epitel sítnice. Permeabilita stěny skléry klesá s rostoucí velikostí prostupující molekuly, přesto zůstává skléra poměrně permeabilní i pro velké molekulové komplexy (Ambati J. et al., 2000). Vysoká permeabilita skléry je zapříčiněna její strukturou, podobnou rohovkovému stromatu. Dalším faktorem, který by mohl ovlivnit permeabilitu molekul sklérou, je její tloušťka. Skléra je nejtenčí v oblasti úponu přímých očních svalů (0,3 mm) a v oblasti ekvátoru (0,4 mm až 0,5 mm) (Vlková E., Horáčková M., 2007). Pro velkou molekulu, jakou je topotecan, by místo aplikace vzhledem k tloušťce skléry mohlo mít význam. Hydrofilní sloučenina topotecanu přestupuje snáze vodným médiem interfibrilárního prostoru proteoglykanů stěny skléry, než buněčnými membránami, stejně jako ostatní hydrofilní molekuly (Unlu N., Robinson J. R., 1998). Výraznější překážkou pro hydrofilní molekuly je přechod cévnatka - pigmentový epitel sítnice, oblast Bruchovy membrány. Pigmentovým epitelem sítnice potom prochází hydrofilní sloučeniny cestou zonulae occludentes.

V našem experimentu vyvolala periokulární injekce 2 mg topotecanu v průměru dvojnásobně vyšší koncentrace v plasmě oproti dosaženým koncentracím ve sklivci. Topotecan jsme změřili i ve vzorcích sklivce levého oka po dobu 6 hod od jeho periokulární aplikace vpravo. Průměrné koncentrace dosáhly  $0,072 \mu\text{g/ml} \pm 0,047\text{SD}$  (nepublikovaná data). Většina množství periokulárně aplikovaného topotecanu mohla spíše penetrovat do systémové cirkulace krve králíka než přes stěnu skléry do sklivce. Tím vzrůstá riziko vzniku toxických systémových účinků. Přesto jsme nepozorovali signifikantní úbytek váhy králíků, ztrátu chlupů či změnu chování. Stupeň 4 systémové toxicity nebyl dosažen ani u testované Skupiny B a C králíků, tj. po intravitreální injekci topotecanu. Dávku limitující toxicitou je po intravenózní aplikaci topotecanu myelosuprese (Tubergen D. G. et. al., 1996, Kakolyris S. et. al., 2001, Santana V. M. et. al., 2003). Nicméně kumulativní systémová expozice topotecanu získaná v průběhu pětidenní krátkodobé (30 min) infúze topotecanu (Tubergen D. G. et. al., 1996, Santana V. M. et. al., 2003) a v průběhu třídní krátkodobé (30 min) infúze topotecanu (Kakolyris S. et. al., 2001) v rozmezí dávky  $1,1 \text{ mg} - 2 \text{ mg/m}^2$  u lidí je vyšší, než jaké můžeme dosáhnout po jedné periokulární dávce topotecanu 2 mg na průměrně  $1 \text{ m}^2$  povrchu králíka.

Lokální oční vedlejší účinky periokulárně aplikovaného topotecanu byly v našem experimentu mírné, charakteru transientní chemosy spojivky. Dále jsme prokázali, že periokulárně aplikovaný topotecan může vyvolávat lokální zánětlivou odpověď. Mírný, transientní, periorbitální edém byl popsán dříve u všech 30 králíků po periokulární injekci 1 mg topotecanu (Carcaboso A. M. et. al., 2007), stejně jako u šesti ze sedmi očí dětských pacientů po opakované periokulární aplikaci 0,5 mg až 2 mg topotecanu (Chantada G. L. et. al., 2009).

Z důvodu opakovaných odběrů sklivce a způsobeném kolísání nitroočního tlaku byla při histopatologickém vyšetření zjištěna přítomnost edému cévnatky u jednoho léčeného oka a tří neléčených očí Skupiny A (nepublikovaná data) a dále u třech léčených očí Skupiny B a čtyř léčených očí Skupiny C. Opakované odběry sklivce vedly k poklesu jeho objemu ve sklivcovém prostoru králičího oka a k jeho postupnému nahrazení tekutinou, produkovanou výběžky řasnatého tělíska.

V poslední době bylo prokázáno, že k 50% redukci retinoblastomových linií Weri nebo Y79 u myši postačuje relativně nízká koncentrace topotecanu ( $0,0087 - 0,013 \mu\text{g/ml}$ ) v blízkosti retinoblastomových buněk po dobu 15 min (Laurie N. A. et. al., 2005). Na základě našich experimentů můžeme prohlásit, že jak po periokulární aplikaci topotecanu v dávce



2 mg, tak po jeho intravitreální injekci v dávkách 1  $\mu\text{g}$  a 2  $\mu\text{g}$  jsme dosáhli potenciálně cytotoxických sklivcových koncentrací. Po periokulární aplikaci však bylo dosaženo cytotoxické koncentrace až kolem 2 hod po injekci a požadovaná cytotoxická koncentrace následně opět rychle klesala a 6 hod od injekce již byla pod hladinou cytotoxického účinku. Oproti periokulární aplikaci byly po intravitreálních aplikacích dosaženy vyšší účinné koncentrace topotecanu ve sklivci po dobu 24 hod. Nicméně dvojnásobné zvýšení intravitreálně podané dávky topotecanu signifikantně neprodloužilo čas expozice topotecanu. Naše výsledky naznačují, že topotecan ukazuje nelineární farmakokinetiku po aplikaci jedné intravitreální dávky v rozmezí 1  $\mu\text{g}$  – 2  $\mu\text{g}$ . V souladu s první publikovanou studií (Buitrago E. et. al., 2010), testující intravitreální aplikaci 5  $\mu\text{g}$  topotecanu cestou pars plana, jsme získali dostačující koncentrace topotecanu i v plasmě.

Zajímavým a neočekávaným zjištěním bylo měření účinných koncentrací topotecanu v kontralaterálních, neléčených očích po aplikaci 2  $\mu\text{g}$  topotecanu po dobu 6 hod. Na rozdíl od karboplatiny, nejvíce využívaného chemoterapeutika v léčbě retinoblastomu, se topotecan ireverzibilně neváže na lokální proteiny a nevytváří tak inaktivní komplexy, které by mohly vést k rezistenci retinoblastomových buněk a k selhání chemoterapie (Slichenmyer W. J. et. al., 2006). Tato vlastnost spolu s jeho hydrofilním uspořádáním by mohla usnadnit i přestup topotecanu přes okulární bariéru.

U dvou léčených očí a dvou neléčených očí Skupiny C (2  $\mu\text{g}$  topotecanu intravitreálně) jsme při následném histopatologickém vyšetření objevili redukci gangliových buněk sítnice, snížení velikosti všech retinálních buněk a ztrátu jejich uspořádání v sítnicových vrstvách a přítomnost choroidálního edému. Tyto výsledky mohou být iniciálním projevem nejen hypoxie, způsobené kolísáním nitroočního tlaku při opakovaných odběrech, ale i projevem počátečních degenerativních změn sítnice vlivem intoxikace. Tomuto nálezu odpovídaly zjištěné nesignifikantní elevace amplitudy a-vlny i b-vlny při ERG vyšetření. V neposlední řadě je třeba zmínit metodiku experimentu. Studovaná toxicita karboplatiny a topotecanu byla prováděna na králičích očích opakovaně traumatizovaných transkorneální intravitreální injekcí ke studiu farmakokinetiky. To mohlo způsobit změny ve struktuře sklivce, který byl postupně nahrazován nitrooční tekutinou, a ovlivnit tak změny ve strukturách oka.

Toxický profil topotecanu po obou aplikacích se zdá být na základě dosažených výsledků příznivý. Výhodou topotecanu je, že není, na rozdíl od karboplatiny, užíván v tradičním intravenózním chemoterapeutickém protokolu pro léčbu retinoblastomu, tudíž

vzniká menší riziko vzniku specifické sekundární rezistence, pokud by byl použit v léčbě retinoblastomu u pacientů po předchozím selhání intravenózní terapie.

### **5.3. Bezpečnost nového způsobu aplikace chemoterapeutik cestou transkorneální intravitreální (publikace č.1, č.2, č.4, č.5, č.6)**

Volně plovoucí retinoblastomové partikule ve sklivcovém prostoru oka u pokročilého stupně retinoblastomu představují největší překážku v úspěšné léčbě tohoto intraokulárního tumoru.

Dosavadní intravitreální aplikace cestou pars plana (Buitrago E. et. al., 2010, Harbour J. W. et. al., 1996) přináší riziko diseminace retinoblastomových buněk do orbity porušením anatomické integrity stěny oka v oblasti skléry. Námi použitý přístup transkorneální intravitreální se z tohoto úhlu pohledu zdá být bezpečnějším (Karcioglu Z. A., 2002). Na druhou stranu je na základě pozorovaných vedlejších účinků náročnější na techniku provedení. Komplikace, spojené s transkorneální intravitreální injekcí, se v našich experimentech vyskytovaly v malém počtu.

Po překonání okulární bariéry intravitreální injekcí chemoterapeutikum pravděpodobně cirkuluje v souladu s tokem nitrooční tekutiny a může být částečně drénován z oka trámčinou, umístěnou v předněkomorovém úhlu. Výsledky, měřené v přední komoře po intravitreální injekci 5 µg topotecanu cestou pars plana (Buitrago E. et. al., 2010), podporují tuto hypotézu. Také distribuce chemoterapeutika sklivcem může být nestejněměrná v závislosti na jeho složení, které je např. ovlivněno věkem.

### **5.4. Rozsah vedlejších účinků po opakované intravitreální aplikaci karboplatiny a topotecanu ve stanovené optimální dávce (publikace č.5, č.6)**

Funkční vyšetření sítnice bylo navrženo po opakovaných intravitreálních injekcích ve dvoutýdenních intervalech ve smyslu napodobit klinickou praxi vzhledem k charakteru průběhu dosažených koncentračních křivek. Změny v zaznamenaném ERG po opakované intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny odpovídaly poškození synapsí ve vnější plexiformní vrstvě sítnice. Na základě tohoto našeho pozorování a publikovaným datům o retinální toxicitě karboplatiny u intravitreální dávky vyšší než 10 µg (Harbour J. W. et. al.,

1996) jsme se rozhodli zhodnotit funkci sítnice u opakované intravitreální dávky 0,008 mg karboplatiny.

Po opakované transkorneální intravitreální aplikaci 0,008 mg karboplatiny jsme na ERG zjistili signifikantní redukci v amplitudách b-vlny po skotopické adaptaci ( $p=0,00042$ ), a-vlny ( $p=0,00065$ ) i b-vlny ( $p=0,0042$ ) po fotopické adaptaci a po maximální skotopické odpovědi v b-vlně ( $p=0,00066$ ). Při klinickém, ani při histopatologickém vyšetření jsme nezaznamenali přítomnost atrofie sítnice či jiných strukturálních změn. Předpokládáme, že intravitreální karboplatina by tak mohla mít selektivní toxický efekt na bipolární buňky, které produkují b-vlnu. Podobný ERG nález byl dosažen 7 dní po intravitreální aplikaci 10  $\mu\text{g}$  karboplatiny a přetrvával 21 dní po injekci (Harbour J. W. et. al., 1996). Vzhledem k tomu, že pokles retinální funkce v našem experimentu neměl korespondující histopatologický nález atrofie či jiných anatomických změn ve struktuře retiny, předpokládáme, že by tyto změny mohly být přechodné. Po injekci 0,008 mg karboplatiny bylo dosaženo účinné intravitreální koncentrace karboplatiny ve srovnání s dříve publikovanou studií (Laurie N. A., 2005).

Opakovaná intravitreální aplikace topotecanu by mohla vést k nahromadění chemoterapeutika ve sklivcovém prostoru. Nicméně dřívější farmakokinetická studie topotecanu po jeho intravitreální aplikaci v dávce 5  $\mu\text{g}$  (Buitrago E. et. al., 2010) prokázala, že eliminační poločas topotecanu ze sklivce je u této dávky roven 2,5 hod. Pokud jsme tedy topotecan aplikovali ve dvoutýdenních intervalech, nemohlo být očekáváno žádné jeho nahromadění ve sklivci, tudíž i zvýšená toxicita ke strukturám oka. Dalším vedlejším účinkem při intravitreální aplikaci by mohlo být transientní zvýšení nitroočního tlaku v době aplikace chemoterapeutika, které jsme krátce po intravitreální injekci v tomto experimentu změřili (rozmezí 21-42 torr, nepublikovaná data).

## 6. Závěr

Léčba retinoblastomu s vitreálním seedingem zůstává výzvou do budoucna. Intravitreální injekce chemoterapeutik je slibnou cestou k dosažení maximální biologické dostupnosti léčiva do sklivce. Vyžaduje však přesně definovanou dávku k dosažení cytostatického účinku na retinoblastom při co nejmenší toxicitě s ohledem na nitrooční struktury.

U všech testovaných dávek karboplatiny i topotecanu jsme, jak po periokulární, tak po intravitreální aplikaci dosáhli lepší penetrace těchto léků do sklivce i vyšších sklivcových koncentrací při minimalizování systémové expozice chemoterapeutik a systémových vedlejších účinků chemoterapeutik.

Zjistili jsme, že po periokulární aplikaci karboplatiny i topotecanu vzniká významná lokální expozice vůči těmto chemoterapeutikům. Za předpokladu zjištění nekrózy víček po periokulární injekci 30 mg karboplatiny a přítomnosti lymfocytární reakce ve víčkách po periokulární aplikaci 2 mg topotecanu se domníváme, že periokulárně aplikovaná karboplatina a topotecan by mohly spustit periokulární a orbitální zánětlivou reakci. Navíc by mohlo následné jizvení fibrovaskulární orbitální tkáně učinit následnou enukleaci obtížnou a zároveň riskantní z důvodu možného rozsevu na terapii rezistentního retinoblastomu.

Odpovědi na cíle disertační práce:

1. Po transkorneální intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny se vyvinuly strukturální i funkční změny sítnice charakteru fokální retinální atrofie a redukce amplitud obou ERG vln. Předpokládáme, že jsme aplikováním dávky 0,05 mg karboplatiny intravitreálně dosáhli dávky limitující toxicity.

Oproti tomu byly po transkorneální intravitreální aplikaci 0,008 mg karboplatiny zaznamenány pouze funkční ERG změny. Tyto změny by mohly být, z důvodu negativního oftalmoskopického a histopatologického nálezu na sítnici, přechodné.

Karboplatina je v současné době využívána ve většině chemoterapeutických protokolů. Zjistili jsme, že karboplatina indukuje produkci metalothioneinu v plasmě, což by mohlo vést k lékové rezistenci a opakovaná aplikace karboplatiny by nemusela mít účinný efekt.

2. Po transkorneální intravitreální aplikaci 1 µg topotecanu nebyly pozorovány žádné oftalmoskopické a histopatologické vedlejší účinky.

Naopak po transkorneální intravitreální aplikaci 2 µg topotecanu byla zjištěna u dvou léčených očí a dvou kontrolních očí fokální retinální atrofie sítnice.

Nicméně při funkčním ERG vyšetření byl prokázán nesignifikantní nárůst amplitudy a-vlny i b-vlny, svědčící i o možném vlivu hypoxie. Funkční ERG vyšetření po opakované transkorneální intravitreální aplikaci 2  $\mu$ g topotecanu ukázalo nesignifikantní minimální změny b-vlny bez odpovídajícího histopatologického nálezu.

Na základě zjištěných vedlejších účinků se topotecan zdá mít lepší toxický profil ve srovnání s karboplatinou.

3. Na základě našich zkušeností se domníváme, že transkorneální intravitreální přístup je bezpečnější než transsklerální přístup, vzhledem k tomu, že eliminuje možnost intraorbitální diseminace retinoblastomu v průběhu intravitreální aplikace chemoterapeutika.

Technika transkorneálního intravitreálního přístupu je však obtížná a patří do rukou zkušeného oftalmologa v onkologickém centru a v budoucnu ji doporučujeme používat.

## 7. Summary

Treatment of intraocular retinoblastoma with vitreous seeding remains a challenge for the future. Intravitreal drug injection is a promising route for maximum bioavailability to the vitreous. However, it requires a well defined dose for achieving retinoblastoma control while limited toxicity to the intraocular structures.

All tested doses of periocular and transcorneal intravitreal carboplatin and topotecan achieved better ocular penetration of drugs into the vitreous and higher vitreous concentrations while minimizing systemic exposure to chemotherapeutics and systemic side effects of these chemotherapeutics.

We found that systemic carboplatin and topotecan exposure would be significant after periocular delivery. Assuming the findings of eyelid necrosis after periocular injection of 30 mg of carboplatin and the presence of lymphocytic reaction in the eyelids after periocular injection of 2 mg of topotecan, we suppose that the applied periocular carboplatin and topotecan could run periocular and orbital inflammatory reaction. Furthermore, possible scarring of the fibrovascular orbital tissues could than make subsequent enucleations risky because of potential seeding in therapy-resistant retinoblastoma.

Answers the objectives of dissertation thesis:

1. Transcorneal intravitreal delivery of 0,05 mg of carboplatin developed retinal functional and structural changes of focal retinal atrophy and reductions of a-waves and b-waves amplitudes in ERG examination. We assume achieving dose limited toxicity after transcorneal intravitreal delivery of 0,05 mg of carboplatin.

Compared to this finding, only functional ERG changes were seen after transcorneal intravitreal injection of 0,008 mg of carboplatin. These changes might be transient according to negative ophthalmoscopic and histopathological retinal finding.

Carboplatin is currently used in most chemotherapeutic protocols. We proved carboplatin to induce production of metallothionein in plasma, which could lead to drug resistance, and repeated delivery of carboplatin would not have an effect.

2. No serious ophthalmoscopic and histopathological side-effects were noted after transcorneal intravitreal delivery of 1  $\mu\text{g}$  of topotecan.

Conversely, focal retinal atrophy in two treated and two control eyes was observed after transcorneal intravitreal delivery of 2  $\mu\text{g}$  of topotecan.

Nevertheless, the functional ERG displayed a nonsignificant increase in a-wave and b-wave amplitudes, indicating also the possible effects of hypoxia. Consequently, eyes injected with repeated transcorneal intravitreal injection of 2  $\mu\text{g}$  of topotecan showed nonsignificant minimal changes in b-wave amplitude without a corresponding histopathological findings.

Based on the observed side effects, topotecan seems to have better toxic profile compared with carboplatin.

3. Based on our experiences, we suppose that transcorneal intravitreal approach is safer than transscleral approach, since it eliminates the possibility of intraorbital dissemination of retinoblastoma during intravitreal injection of chemotherapeutic agents.

Method of transcorneal intravitreal approach is difficult and belongs in the hands of an experienced ophthalmologist in oncology center and in the future it is recommended to use.

## 8. Použitá literatura

- Abramson D. H., Dunkel I. J., Brodie S. E., Kim J. W., Gobin Y. P.: A phase I/II study of direct intraarterial (Ophthalmic Artery) chemotherapy with Melphalan for intraocular retinoblastoma <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642007013590> - [item1](#): Initial results. *Ophthalmol*, 2008, roč. 115, č. 8, s. 1398 – 1404.
- Abramson D. H., Ellsworth R. M., Tretter P., Adams K., Kitchin F. D.: Simultaneous bilateral radiation for advanced bilateral retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 1981, roč. 99, č. 10, s. 1763 - 1766.
- Abramson D. H., Frank C. M.: Second nonocular tumors in survivors of bilateral retinoblastoma: A possible age effect on radiation-related risk. *Ophthalmol*, 1998, roč. 105, č. 4, s. 573 – 580.
- Abramson D. H., Frank C. M., Dunkel I. J.: A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmol*, 1999, roč. 106, č. 10, s. 1947 – 1950.
- Adam V., Krizkova S., Fabrik I., Zitka O., Horakova Z., Binkova H., Hrabeta J., Eckschlager T., Kukacka J., Prusa R., Sykorova E., Kizek R.: Metallothioneins as a new potential tumour marker. *Tumor Biol*, 2007, roč. 28, suppl. 1, s. 43 - 43.
- Alberts D. S., Dorr R. T.: New perspectives on an old friend: Optimizing carboplatin for the treatment of solid tumors. *Oncologist*, 1998, roč. 3, č. 1, s. 15 - 34.
- al-Tweigeri T., Nabholz J. M., Mackey J. R.: Ocular toxicity and cancer chemotherapy: a review. *Cancer*, 1996, roč. 78, č. 7, s. 1359 – 1373.
- Ambati J., Canakis C. S., Miller J. W., Gragoudas E. S., Edwards A., Weissgold D. J., Kim I., Delori F. C., Adamis A. P.: Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, roč. 41, č. 5, s. 1181 - 1185.
- Autrata R., Kepák T., Krejčířová I.: Retinoblastom. In Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. et al.: Speciální onkologie- příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob. Praha: Galén, 2010, s. 371-376.
- Borst P., Rottenberg S., Jonkers J.: How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell Cycle*, 2008, roč. 7, č. 10, s. 1353 - 1359.



- Buitrago E., Höcht C., Chantada G., Fandiño A., Navo E., Abramson D. H., Schaiquevich P., Bramuglia G. F.: Pharmacokinetic analysis of topotecan after intravitreal injection. Implications for retinoblastoma treatment. *Exp Eye Res*, 2010, roč. 91, č. 1, s. 9 - 14.
- Burris H. A., Hanauske A. R., Johnson R. K., Marshall M. H., Kuhn J. G., Hilsenbeck S. G., Von Hoff D. D.: Activity of topotecan, a new topoisomerase I inhibitor, against human tumor colony-forming units in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 1992, roč. 84, č. 23, s. 1816 - 1820.
- Canetta R., Rozencweig M., Carter S. K.: Carboplatin: the clinical spectrum to date. *Cancer Treat Rev*, 1985, roč. 12, č. A, s. 125 – 136.
- Carcaboso A. M., Bramuglia G. F., Chantada G. L., Fandiño A. C., Chiappetta D. A., de Davila M. T. G., Rubio M. C., Abramson D. H.: Topotecan vitreous levels after periocular or intravenous delivery in rabbits: an alternative for retinoblastoma chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, roč. 48, č. 8, s. 3761 - 3767.
- Darsova D., Pochop P., Uhlík J., Klapkova E., Tesfaye H., Kodetova D., Lestak J., Malis J., Vajner L.: Topotecan vitreous and plasma levels and retinal toxicity after transcorneal intravitreal delivery in healthy albinorabbits: alternative retinoblastoma treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2012, roč. 156, č. 4: 318 - 323.
- Darsova D., Pochop P., Vajner L., Kodetova D., Uhlík J., Kukačka J., Dotřelová D.: Evaluation of toxicity after periocular and intravitreal administration of carboplatin in rabbit eyes. *Acta Vet*, 2011, roč. 80, č. 4, s. 385 – 390.
- Davis FA: The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1929, roč. 27, s. 400 – 441.
- Donzelli E., Carfi M., Miloso M., Strada A., Galbiati S., Bayssas M., Griffon-Etienne G., Cavaletti G., Petruccioli M. G., Tredici G.: Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol*, 2004, roč. 67, č. 1 – 2, s. 65 - 73.
- Epstein J., Shields C. L., Shields J. A.: Trends in the management of retinoblastoma: Evaluation of 1,196 consecutive eyes during 1974 to 2001. *J Pediat Ophth Strab*, 2003, roč. 40, č. 4, s. 196 – 203.
- Fabrik I., Krizkova S., Huska D., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Eckschlager T., Kukačka J., Prusa R., Kizek R.: Employment of electrochemical techniques for

metallothionein determination in tumor cell lines and patients with a tumor disease. *Electroanal*, 2008, roč. 20, č. 14, s.1521 – 1532.

- Fabrik I., Kukacka J., Adam V., Prusa R., Eckschlager T., Kizek R.: Metallothionein and its relation to anticancer treatment by platinum complexes. *Prakt lek*, 2008, roč. 88, č. 2, s. 90 - 93.
- Furman W. L., Stewart C. F., Kirstein M., Kepner J. L., Bernstein M. L., Kung F., Vietti T. J., Steuber C. P., Becton D. L., Baruchel S., Pratt C. H.: Protracted intermittent schedule of topotecan in children with refractory acute leukemia: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol*, 2002, roč. 20, č.6, s. 1617 - 1624.
- Ghassemi F., Shields C. L.: Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 2012, roč. 130, č. 10, s. 1268 – 1271.
- Gilbert J. A., Simpson A. E., Rudnick D. E., Geroski D. H., Aaberg T. M., Edelhauser H. F.: Transscleral permeability and intraocular concentrations of cisplatin from a collagen matrix. *J Control Release*, 2003, roč. 89, č. 3, s. 409 – 417.
- Gobin P. Y., Dunkel I. J., Marr B. P., Brodie S. E., Abramson D. H.: Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 2011, roč. 129, č. 6, s. 732 – 737.
- Harbour J. W., Murray T. G., Hamasaki D., Cicciarelli N., Hernández E., Smith B., Windle J., O'Brien J. M.: Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, roč. 37, č. 9, s. 1892 – 1898.
- Hayden B. C., Jockovich M. E., Murray T. G., Voigt M., Milne P., Kralinger M., Feuer W. J., Hernandez E., Parel J. M.: Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in the rabbit eye: Possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, roč. 45, č. 10, s. 3644 - 3649.
- Heffeter P., Jungwirth U., Jakupec M., Hartinger C., Galanski M., Elbling L., Micksche M., Keppler B., Berger W.: Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities. *Drug Resist Updat*, 2008, roč. 11, č. 1 - 2, s. 1 - 16.
- Hughes P. M., Olejnik O., Chang-Lin J. E., Wilson C. G.: Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, roč. 57, č. 14, s. 2010 - 2032.
- Huska D., Fabrik I., Baloun J., Adam V., Masarik M., Hubalek J., Vasku A., Trnkova L., Horna A., Zeman L., Kizek R.: Study of interactions between metallothionein and

cisplatin by using differential pulse voltammetry brdicka's reaction and quartz crystal microbalance. *Sensors*, 2009, roč. 9, č. 3, s. 1355 – 1369.

- Chantada G. L., Fandiñ A. C., Casak S. J., Mato G., Manzitti J., Schwartzman E.: Activity of topotecan in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet*, 2004, roč. 25, č. 1, s. 37 - 43.
- Chantada G. L., Fandino A. C., Carcaboso A. M., Lagomarsino E., de Davila M. T. G., Gutter M. R., Rose A. B., Manzitti J., Bramuglia G. F., Abramson D. H.: A phase I study of periocular topotecan in children with intraocular retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, roč. 50, č. 4, s. 1492 – 1496.
- Jamieson E. R., Lippard S. J.: Structure, recognition, and processing of cisplatin DNA adducts. *Chem Rev*, 1999, roč. 99, č. 9, s. 2467 - 2498.
- Kakolyris S., Kouroussis C., Souglakos J., Mavroudis D., Agelaki S., Kalbakis K., Androulakis N., Vardakis N., Vamvakas L., Georgoulas V.: A phase I clinical trial of topotecan given every 2 weeks in patients with refractory solid tumors. *Oncol*, 2001, roč. 61, č. 4, s. 265 – 270.
- Karcioğlu Z. A.: Fine needle aspiration biopsy (FNAB) for retinoblastoma. *Retina*, 2002, roč. 22, č. 6, s. 707 – 710.
- Kiratli H., Kocabeyoğlu S., Bilgiç S.: Severe pseudo-preseptal cellulitis following sub-Tenon's carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *J AAPOS*, 2007, roč. 11, č. 4, s. 404 – 405.
- Kivelä T., Eskelin S., Paloheimo M.: Intravitreal methotrexate for retinoblastoma. *Ophthalmol*, 2011, roč. 118, č. 8, s. 1689.
- Lauer A. K., Wobig J. L., Shults W. T., Neuwelt E. A., Wilson M.W.: Severe ocular and orbital toxicity after intracarotid etoposide phosphate and carboplatin therapy. *Am J Ophthalmol*, 1999, roč. 127, č. 2, s. 230 – 233.
- Laurie N. A., Gray J. K., Zhang J., Leggas M., Relling M., Egorin M., Stewart C., Dyer M. A.: Topotecan combination chemotherapy in two new rodent models of retinoblastoma. *Clin Cancer Res*, 2005, roč. 11, č. 20, s. 7569 – 7578.
- Leeds J. M., Henry S. P., Truong L., Zutshi A., Levin A. A., Kornbrust D.: Pharmacokinetics of a potential human cytomegalovirus therapeutic, a phosphorothioate oligonucleotide, after intravitreal injection in the rabbit. *Drug Metab Dispos*, 1997, roč. 25, č. 8, s. 921 – 926.
- Mao Y., Zhongyao W., Huasheng Y., Zheng J., He J., Li W.: The experiment research

of subconjunctival injections with etoposide for the treatment of retinoblastoma mice. Yan Ke Xue Bao, 2005, roč. 21, č. 3, s. 169 – 174.

- Mallipatna A. C., Dimaras H., Chan H. S. L., Héon E., Gallie B. L.: Periocular topotecan for intraocular retinoblastoma. Arch Ophthalmol, 2011, roč. 129, č. 6, s. 738 – 745.
- Mendelsohn M. E., Abramson D. H., Madden T., Tong W., Tran H. T., Dunkel I. J.: Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. Arch Ophthalmol, 1998, roč. 116, č. 9, s. 1209 – 1212.
- Mulvihill A., Budning A., Jay V., Vandenhoven C., Heon E., Gallie B. L., Chan H. S. L.: Ocular motility changes after subtenon carboplatin chemotherapy for retinoblastoma. Arch Ophthalmol, 2003, roč. 121, č. 8, s. 1120 – 1124.
- Nork M. T., Kim C. H. B. Y., Shanmuganayagam D., Van Lysel M. S., Ver Hoeve J. N., Folts J. D.: Measurement of regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys using fluorescent microspheres. Arch Ophthalmol, 2006, roč. 124, č. 6, s. 860 – 868.
- O'Brien M. E., Tonge K., Blake P., Moskovic E., Wiltshaw E.: Blindness associated with high-dose carboplatin [letter]. Lancet., 1992, 339558.
- Pochop P., Darsova D., Kukacka J., Tesfaye H., Vajner L., Uhlik J., Kodetova D., Malis J., Dotrelova D.: Intravitreal carboplatin concentration and area under concentration versus time curve after intravitreal and periocular delivery. Europ J Ophthalmol, 2010, roč. 20, č. 4, s. 745 – 751.
- Rankin E. M., Pitts J. F.: Ophthalmic toxicity during carboplatin therapy. Ann Oncol, 1993, roč. 4, č. 4, s. 337 – 338.
- Rešlová S.: The induction of lysogenic strains of Escherichia coli by cisdichlorodiammineplatinum (II). Chem Biol Interactions, 1971, roč. 4, č.1, s. 66 - 70.
- Řehůřek J.: Nitrooční nádory dětského věku. In Baráková D: Nádory oka. Praha: Grada, 2002, s.132 – 149.
- Santana V. M., Zamboni W. C., Kirstein M. N., Tan M., Liu T., Gajjar A., Houghton P. J., Stewart C. F.: A pilot study of protracted topotecan dosing using a pharmacokinetically guided dosing approach in children with solid tumors. Clin Cancer Res, 2003, roč. 9, č. 2, s. 633 - 640.

- Shields C. L., Mashayekhi A., Au A. K., Czyns C., Leahey A., Meadows A. T., Shields J. A.: The International Classification of Retinoblastoma Predicts Chemoreduction Success. *Ophthalmol*, 2006, roč. 113, č. 12, s. 2276 – 2280.
- Shields C. L., Mashayekhi A., Cater J., Shelil A., Meadows A. T., Shields J. A.: Chemoreduction for retinoblastoma. Analysis of tumor control and risks for recurrence in 457 tumors. *Am J Ophthalmol*, 2004, roč. 138, č. 3, s. 329 – 337.
- Shields C. L., Meadows A. T., Leahey A. M., Shields J. A.: Continuing challenges in the management of retinoblastoma with chemotherapy. *Retina*, 2004, roč. 24, č. 6, s. 849 – 862.
- Shields C. L., Meadows A. T., Shields J. A., Carvalho C., Smith A. F.: Chemoreduction for Retinoblastoma May Prevent Intracranial Neuroblastic Malignancy (Trilateral Retinoblastoma). *Arch Ophthalmol*, 2001, roč. 119, č. 9, s. 1269 - 1272.
- Shields C. L., de Potter P., Himelstein B. P., Shields J. A., Meadows A. T., Maris J. M.: Chemoreduction in the Initial Management of Intraocular Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 1996, roč. 114, č. 11, 1330 - 1338.
- Shields C. L., Shields J. A.: Retinoblastoma management: advances in enucleation, intravenous chemoreduction, and intra-arterial chemotherapy. *Curr Opin Ophthalmol*, 2010, roč. 21, č. 3, s. 203 – 212.
- Shields J. A., Shields C. L.: Retinoblastoma: introduction, genetics, clinical features, classification. In Shields J A, Shields C L: *Intraocular tumors: an atlas and text book*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2008, s. 294 – 319.
- Shields C. L., Shields J. A., Cater J., Othmane I., Singh A. D., Micaily B.: Plaque radiotherapy for retinoblastoma: Long-term tumor control and treatment complications in 208 tumors. *Ophthalmol*, 2001, roč. 108, č. 11, s. 2116 – 2121.
- Shields C. L., Shields J. A., Needle M., de Potter P., Kheterpal S., Hamada A., Meadows A. T.: Combined chemoreduction and adjuvant treatment for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmol*, 1997, roč. 104, č. 12, s. 2101 - 11.
- Schmack I., Hubbard G. B., Kang S. J., Aaberg T. M., Grossniklaus H. E.: Ischemic necrosis and atrophy of the optic nerve after periocular carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*, 2006, roč. 142, č. 2, s. 310 - 15.

- Slichenmyer W. J., Rowinsky E. K., Donehower R. C., Kaufmann S. H.: The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst*, 1993, roč. 85, č. 4, s. 271 - 291.
- Suárez F., Jockovich M. E., Hernandez E., Feuer W., Parel J. M., Murray T. G.: Paclitaxel in the treatment of retinal tumors of LH beta-Tag murine transgenic model of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, roč. 48, č. 8, s. 3437 – 3440.
- Suzuki S., Kaneko A.: Management of intraocular retinoblastoma and ocular prognosis. *Int J Clin Oncol*, 2004, roč. 9, č. 1, s. 1 – 6.
- Tawansy K. A., Samuel M. A., Shammam M., Murphree A. L.: Vitreoretinal complications of retinoblastoma treatment. *Retina*, 2006, roč. 26, č. 7, s. 47 – 52.
- Tubergen D. G., Stewart C. F., Pratt C. B., Zamboni W. C., Winick N., Santana V. M., Dryer Z. A., Kurtzberg J., Bell B., Grier H., Vietti T. J.: Phase I trial and pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamics (PD) study of topotecan using a five-day course in children with refractory solid tumors: a pediatric oncology group study. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1996, roč. 18, č. 4, s. 352 - 361.
- Unlu N., Robinson J. R.: Scleral permeability to hydrocortisone and mannitol in the albino rabbit eye. *J Ocul Pharmacol Ther*, 1998, roč. 14, č. 3, s. 273 – 281.
- Van Quill K. R., Dioguardi P. K., Tong C. T., Gilbert J. A., Aaberg T. M., Grossniklaus H. E., Edelhauser H. F., O'Brien J. M.: Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Ophthalmol*, 2005, roč. 112, č. 6, s. 1151 – 1158.
- Vijayakrishnan R., Shields C. L., Ramasubramanian A., Emrich J., Rosenwasser R., Shields J. A.: Irradiation toxic effects during intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma. Should we be concerned?. *Arch Ophthalmol*, 2010, roč. 128, č. 11, s. 1427 – 1431.
- Vlková E., Horáčková M.: Skléra. In Kuchynka P.: *Oční lékařství*. Praha: Grada, 2007, s. 245 – 252.

## 9. Přílohy - publikace uchazeče vztahující se k tématu disertační práce

### Publikace č. 1

7 stran textu přílohy



# Intravitreal carboplatin concentration and area under concentration versus time curve after intravitreal and periocular delivery

Pavel Pochop<sup>1</sup>, Denisa Darsova<sup>1</sup>, Jiri Kukacka<sup>2</sup>, Hundie Tesfaye<sup>2</sup>, Ludek Vajner<sup>3</sup>, Jiri Uhlík<sup>3</sup>, Daniela Kodetová<sup>4</sup>, Josef Malis<sup>5</sup>, Dagmar Dotrelova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology for Children and Adults, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>2</sup>Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, Division of Clinical Pharmacy, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>3</sup>Department of Histology and Embryology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>4</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>5</sup>Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague - Czech Republic

**PURPOSE.** To determine platinum (Pt) concentrations and area under the concentration versus time curve (AUC) of the vitreous humor after periocular or transcorneal intravitreal administration of carboplatin in rabbits.

**METHODS.** Eighteen albino rabbits were included in an *in vivo* experiment. Each animal received a single dose of either 30 mg of carboplatin by periocular injection (POI30 group: n=6) or 15 mg by periocular injection (POI15 group: n=6), or 0.05 mg by transcorneal intravitreal injection (TII group: n=6), respectively, into the right eye. Vitreous humor from the right eyes and plasma samples were collected post dose at 1, 2, 6, 24, 48, 168, and 336 hours or 448 hours, respectively. Flameless atomic absorption spectroscopy was employed to analyze total platinum concentrations in blood and vitreous humor. AUC was calculated using the trapezoidal rule.

**RESULTS.** Pt concentration was mostly <1 mg/L (0–3.15 mg/L) in the vitreous humor samples and  $\geq 2$  mg/L (2.33–7.3 mg/L) in the blood samples 1 hour after administration in POI groups. Markedly higher Pt concentrations were found 1 hour after intravitreal (TII) administration (10.285–66.759 mg/L) and decreased below 1 mg/L no less than 168 hours after administration. The mean AUC for Pt in vitreous humor was significantly lower ( $p=0.0001$ ) after both POI30 and POI15 administration compared to TII route ( $8.955 \pm 2.464$  mg/L/min).

**CONCLUSIONS.** These findings proved that intravitreal carboplatin delivery enables the achievement of relatively stable concentrations and AUC of platinum in the rabbit vitreous humor. This moreover suggests that transcorneal intravitreal delivery of carboplatin aiming to treat retinoblastoma vitreous seeding is a promising mode of chemotherapy. (*Eur J Ophthalmol* 2010; 20: 745-51)

**KEY WORDS.** AUC, Carboplatin concentration, Local treatment, Intravitreal seeding, Periocular injection, Rabbit, Retinoblastoma, Transcorneal

Accepted: January 16, 2010

## INTRODUCTION

Vitreous seeding is an important factor limiting eye-preserving treatment of retinoblastoma, usually due to the low

attained intravitreal concentrations of chemotherapeutics. Focal carboplatin chemotherapy in rabbit eyes was found to be effective in reaching higher intravitreal concentration levels than those achieved by systemic chemotherapy.



Notwithstanding this purported benefit, even these intravitreal concentrations did not reach therapeutic levels, and moreover were irregular (1). Intravitreal concentrations of carboplatin varied after peribulbar administration in primate eyes as well (2). Other modalities to enhance intravitreal concentrations of carboplatin were evaluated. One such modality was cryotherapy. This was used 1 day before administering intravenous carboplatin with or without cyclosporine, and before subconjunctival injection of carboplatin. Cryotherapy was proven to increase intraocular penetration of carboplatin in rabbits in this experiment (3). This conclusion was not supported from the results of carboplatin therapy combined with cryotherapy in the treatment of transgenic murine retinoblastoma (4). Another treatment possibility is Coulomb-controlled iontophoresis (1). However, no significantly higher regular intravitreal concentrations than those after subconjunctival administration were reached. Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant was also evaluated in the treatment of transgenic murine retinoblastomas (5). Fibrin sealant was sufficient to induce complete or near complete regression of tumors in 91% of eyes, but there were no reports concerning treatment after intravitreal seeding. Another described modality was intravitreal transscleral injection of chemotherapeutic agents (6, 7). No serious complications were found.

Tumor dissemination in human retinoblastoma was demonstrated by subsequent fine needle biopsy or pars plana vitrectomy (8). According to this reasoning, some authors used a more difficult approach through the limbus, anterior chamber, and peripheral iris for fine-needle aspiration biopsy to avoid seeding of tumor cells to the orbital tissues (9, 10). The aforementioned approach was also used in this experiment.

In our experiment, we attempted to assess the most suitable and simple approach to reach therapeutic AUC of carboplatin in the vitreous body.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental design*

Rabbits were divided into 3 groups. The first 6 animals received a periocular injection of 15 mg of carboplatin ( $POI_{15}$ ) in 1.5 mL of sterile water injected transconjunctivally into the temporal peribulbar space of the right eye. Vitreous humor and blood samples were taken transcorneally at 1, 2,

6, 24, and 48 hours after administration, and then at 1 and 2 weeks after administration. Control samples from the contralateral eye were taken for the zero time point before administration. In the second group, 6 animals received 0.1 mL of 0.5 mg/mL carboplatin injected transcorneally into the vitreous cavity (TII) of the right eye. Sampling schedules were the same as in the first group. Samples of vitreous humor were taken from the opposite side of the eyeball. The third group of rabbits received a periocular injection of 30 mg of carboplatin ( $POI_{30}$ ) in 1.5 mL of sterile water (the highest soluble concentration) into the temporal peribulbar space (like a first group). The last samples in this group were taken 3 weeks after the administration.

### *Animals*

New Zealand albino male specified pathogen-free (SPF) healthy rabbits (Anlab, Prague, Czech Republic) were included in the *in vivo* experiments and handled according to the ethics committee for animal welfare. The weight of animals ranged from 2.52 kg ( $SD \pm 0.22$ ) for  $POI_{15}$  group to 2.21 kg ( $SD \pm 0.14$ ) for  $POI_{30}$  group to 3.06 kg ( $SD \pm 0.13$ ) for TII group throughout the experiment. Rabbits were kept in standard laboratory cages and supplied with granulated food and water *ad libitum*. Measured environmental temperatures were between 22°C and 25°C, and the relative air humidity varied between 55% and 65%. Rabbits were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (50 mg/kg, Narketan 10 a.u.v. inj, Vétcoquinol, Lure Cedex, France) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg, Rometar 2% a.u.v. inj, Spofa, Prague, Czech Republic) administered intramuscularly before the intervention. Half-doses of these anesthetics were repeated every 30 minutes when necessary. At the completion of experiments, the rabbits were killed by exsanguinations through the carotid arteries under general anesthesia.

### *Administration and sampling*

Carboplatin administration was performed on right eyes only. Left eyes served as controls and received only sterile water. Topical oxybuprocaine anesthetic eyedrops (0.4%, Benoxi gtt., Unimed Pharma, Bratislava, Slovakia) were instilled into the conjunctival sacs and the eyelids were fixed with a sterile speculum. A total of 3 mL of 1% povidone-iodine solution (10% Betadine, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Hungary) was used for disinfection and

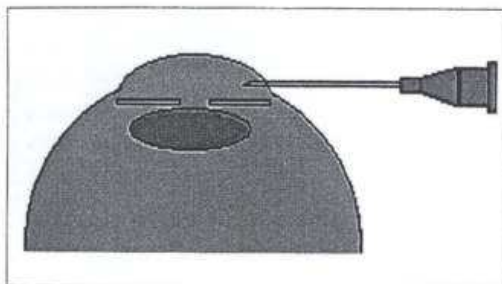


Fig. 1 - Penetration of the cornea through the limbus.

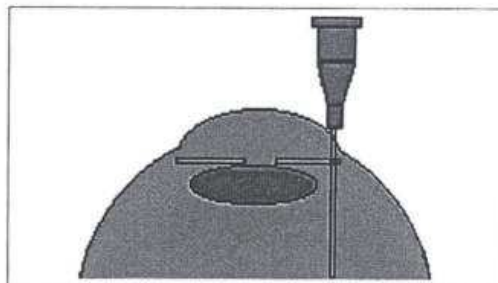


Fig. 2 - Rotation of the needle and penetration of the iris basis.

25-gauge needles connected to 2-mL syringes were used for administration of carboplatin into the temporal peribulbar space in the first and third (POI<sub>15</sub> and POI<sub>30</sub>) groups. In the second (TII) group, carboplatin was administered intravitreally by insulin syringe 1 mL U-100 with a 29-gauge needle. The cornea was penetrated tangentially through the limbus. After a rotation, the needle reached the vitreous cavity through the iris base (Figs. 1 and 2). Sampling was done in the same way using 25-gauge needles.

#### Carboplatin concentration measurement

The platinum concentration was measured by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry with Zeeman background correction (Varian 220 Z, Australia). Amounts of 100 µL plasma or vitreous humor were diluted at a ratio of 1:14 with a solution containing Triton X-100 (0.2 Vol %), antifoam A (0.2 Vol %), and deionized water. A programmable sample dispenser piped the samples and calibration standard into the furnace. Platinum determination was carried out by the standard additions method. Carboplatin

concentration was calculated from platinum concentration and molecular weights.

AUC was calculated from 0 – last sampling times for all subjects including all data points. AUC values were calculated by the trapezoidal method. The results found according to the trapezoidal rule formula were verified by computer-assisted noncompartmental model AUC calculation on MW/PHARM version 3.60 Mediware NL. Values were expressed as mean ± SD and differences were considered significant at values of  $p < 0.05$ .

#### RESULTS

Carboplatin concentrations in the vitreous humor samples were mostly less than 1 mg/L (Tabs. I and III) for the POI<sub>15</sub> and POI<sub>30</sub> groups after administration. However, relatively high concentrations were found in subject samples of blood (Tabs. II and IV). It was not technically possible to take all samples of blood at the second hour after administration in the POI<sub>15</sub> group. The measured intravitreal concentrations

TABLE I - PLATINUM CONCENTRATION IN VITREOUS IN THE POI<sub>15</sub> GROUP (µg/L)

	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h	168 h	336 h
Rabbit 1	248	371	320	144	80	15	1
Rabbit 2	30	146	80	54	32	11	7
Rabbit 3	200	871	823	511	174	3	1
Rabbit 4	141	300	133	80	48	7	8
Rabbit 5	286	737	642	361	97	29	15
Rabbit 6	110	812	762	408	159	24	6

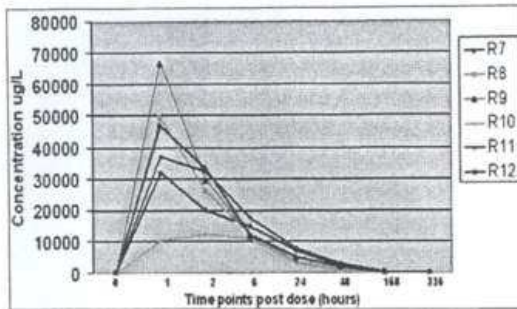


Fig. 3 - Carboplatin concentrations in aires of samples post intravitreal application in rabbits (R7-12).

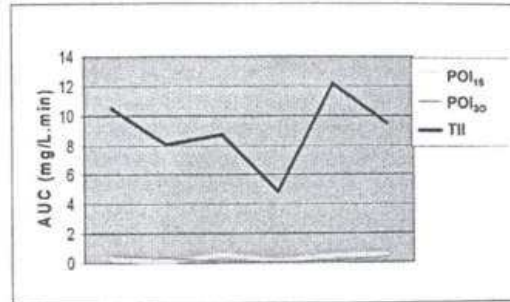


Fig. 4 - Carboplatin intravitreal AUC comparison post periocular (POI<sub>15</sub>, POI<sub>30</sub>) and transcorneal intravitreal (TII) administration in rabbits.

TABLE II - PLATINUM CONCENTRATION IN BLOOD IN THE POI<sub>15</sub> GROUP (µg/L)

	1 h	2 h	6 h	48 h	168 h	336 h
Rabbit 1	2331	1161	249	173	39	5
Rabbit 2	2607	1180	246	81	15	2
Rabbit 3	3493	2453	519	111	38	12
Rabbit 4	4300	—	255	140	44	6
Rabbit 5	6708	—	1192	289	100	19
Rabbit 6	2591	—	229	87	14	2

TABLE III - PLATINUM CONCENTRATION IN VITREOUS IN THE POI30 GROUP (µg/L)

	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h	168 h	448 h
Rabbit 13	525	3150	719	289	85	14	0
Rabbit 14	70	370	447	235	112	0	0
Rabbit 15	103	125	166	109	43	0	0
Rabbit 16	28	60	165	97	10	0	0
Rabbit 17	110	163	212	89	27	0	0
Rabbit 18	722	503	501	334	148	12	0

of carboplatin in the TII group (Tab. V, Fig. 3) corresponded to carboplatin concentrations that were calculated according to the globe diameter (Tab. VI). Relatively high concentrations were also measured at 24 (2.862–7.697 mg/L) and 48 hours (0.535–2.378 mg/L), respectively. The mean AUC (mg/L/min) (Tab. VII) was significantly lower after both the POI<sub>15</sub> (0.255±0.193) (mean ± SD) and POI<sub>30</sub> (0.245±0.227) administrations compared to TII (8.955±2.464) route ( $p=0.0001$ ) as results given as mean ± SD (Fig. 4). Transient chemosis in the POI15 and POI30 groups was found in all right rabbit eyes during the first 2 days after administration. Small intravitreal hemorrhages were noted

several times during sampling. Focal necrosis of upper eyelid (Fig. 5) was revealed in the POI<sub>30</sub> group the third week after administration of carboplatin (rabbits 2 and 3). In the same group, lack of pills of upper eyelid occurred (rabbits 2, 3, and 6). Only focal chorioretinal atrophy was found as an adverse side effect of therapy in the TII group (Fig. 6).

## DISCUSSION

Very high concentrations (4560.0±1053.5 mg/L) in vitreous humor of rabbit eyes were found 1 hour after the subcon-

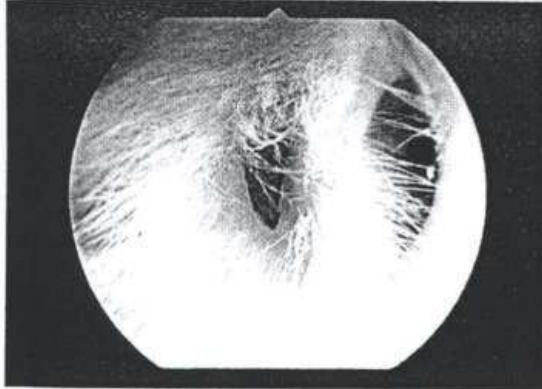


Fig. 5 - Focal necrosis of upper eyelid.

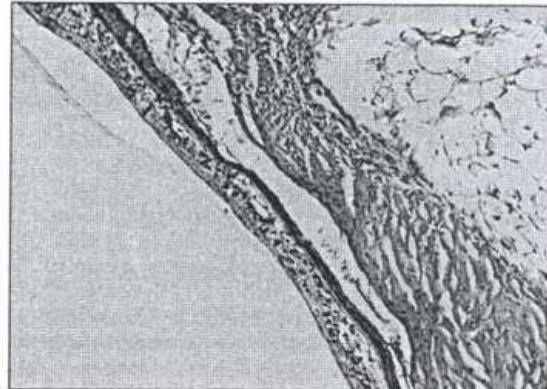


Fig. 6 - Reduction of ganglion cells with small cystoid spaces in the inner nuclear layer of the retina.

TABLE IV - PLATINUM CONCENTRATION IN BLOOD IN THE POI30 GROUP (µg/L)

	1 h	2 h	6 h	24 h	48h	168 h	448 h
Rabbit 13	6131	4180	1314	618	382	300	260
Rabbit 14	7327	5706	2909	589	276	149	130
Rabbit 15	3732	2536	944	214	234	235	58
Rabbit 16	5148	2817	968	408	129	235	83
Rabbit 17	6800	5136	2094	789	585	313	126
Rabbit 18	5862	4117	1770	866	594	445	217

TABLE V - PLATINUM CONCENTRATION IN VITREOUS IN THE TII GROUP (µg/L)

	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h	168h	336 h
Rabbit 7	31,785	19,835	14,927	7044	2378	385	84
Rabbit 8	49,122	26,041	11,854	3393	1557	339	91
Rabbit 9	66,759	29,593	11,573	4711	1891	136	0
Rabbit 10	10,285	12,513	11,230	2862	533	201	0
Rabbit 11	37,104	32,084	17,740	7697	3160	201	0
Rabbit 12	46,657	33,235	11,851	4895	2061	327	112

TABLE VI - CALCULATED PLATINUM CONCENTRATION IN THE VITREOUS ACCORDING TO MEASURED GLOBE DIAMETER BY THE INTRAVITREAL APPLICATION OF 0.05 MG CARBOPLATIN

	Volume of globe space (mL)	Calculated concentration (µg/L)
Rabbit 7	1.028	48,638
Rabbit 8	1.337	37,397
Rabbit 9	1.180	42,372
Rabbit 10	1.164	42,955
Rabbit 11	1.303	38,373
Rabbit 12	1.215	41,152

junctional administration of 5.0 mg carboplatin and relatively low (but still 20 times higher than in our study) concentrations in blood ( $182 \pm 452.1$  mg/L) were found (1). We did not find any explanation of these differences. Practically the same concentrations in the vitreous humor of *Macaca fascicularis*, like in our study, were demonstrated at the first hour after the peribulbar and episcleral administration of 10 mg carboplatin by Mendelsohn et al. Intravitreal concentrations varied from 0.14 to 3.97 µg/ml (2). These irregularities may be influenced by many factors, such as contamination of the vitreous humor by blood during sampling, like in the POI<sub>30</sub> group. Complications after periocular carboplatin injection

**TABLE VII** - CARBOPLATIN AUC 0–336 H AFTER PERI-OCULAR ROUTES (POI15, POI30) AND TRANSCORNEAL INTRAVITREAL INJECTION (TII) AND ADMINISTRATION IN 3 GROUPS OF HEALTHY RABBITS (6 SUBJECTS PER GROUP CODED BY NUMBERS)

POI 15 mg	
Subject no.	AUC mg/L/min
1	0.26
2	0.11
3	0.58
4	0.15
5	0.48
6	0.57
Mean AUC	0.358
±SD	0.211

TII 0.05 mg	
Subject no.	AUC mg/L/min
7	10.45
8	8.07
9	8.71
10	4.87
11	12.17
12	9.46
Mean AUC	8.955
±SD	2.464

POI 30 mg	
Subject no.	AUC mg/L/min
13	0.5
14	0.3
15	0.1
16	0.07
17	0.1
18	0.46
Mean AUC	0.255
±SD	0.193

were described (11, 12). Similar changes after periocular carboplatin injection also were found in our experiment.

Serial transscleral intravitreal injections of methotrexate and single injection of fluorouracil and dexamethasone were administered in the rabbit eyes for studying their pharmacokinetics and toxicity (7). Long-term electroretinogram following administrations and histopathologic examination showed no photoreceptor or ganglion cell layer damage. We considered the transcorneal approach safer for the treatment of retinoblastoma from the point of view of possible intraorbital spreading. This more complicated procedure results in minimal bleeding, even after repeated sampling in several cases.

Intravitreal administration of 0.05 mg of carboplatin rather resulted in higher than therapeutic concentrations in the vitreous humor. Changes in retinal tissue correlated with the earlier described disruptions of the outer retina after administration of more than 0.001 mg of carboplatin (13).

## CONCLUSIONS

Although peribulbar balloon administration of carboplatin resulted in higher vitreous concentrations than after intravenous administration, the levels are irregular and usually stay under the therapeutic level. Intravitreal concentrations of carboplatin were low in the POI<sub>30</sub> and POI<sub>15</sub> groups. A two-fold higher dose of carboplatin did not result in higher concentrations in the vitreous humor. Relatively high concentrations were found in blood in the POI<sub>30</sub> and POI<sub>15</sub> groups. These findings suggest the possibility of attaining high concentrations of carboplatin in blood after subconjunctival or periocular administration in children less than 1 year of age. We found regular concentrations of carboplatin above the therapeutic level in the TII group. Our findings prove that intravitreal carboplatin delivery enables us to achieve relatively stable concentrations and AUC of carboplatin in the rabbit vitreous body, suggesting that local delivery of carboplatin aiming to treat metastatic retinoblastoma (seeding) may be promising. Transcorneal administration seems to be safer than transscleral administration.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by a grant of the Ministry of Health No. 9532-3/2007.

Presented as a poster at the 17th Congress of SOE; Amsterdam; June 13–16, 2009.

None of the authors have a proprietary interest in this manuscript.

Address for correspondence:  
 Pavel Pochop, MD  
 Department of Ophthalmology for Children and Adults  
 Faculty Hospital Motol  
 2nd Faculty of Medicine  
 Charles University Prague  
 V Uvalu 84  
 150 06, Prague 5, Czech Republic  
 pavel.pochop@gmail.com

## REFERENCES

1. Hayden BC, Jockovich ME, Murray TG, et al. Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in rabbit eyes: possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3644-9.
2. Mendelsohn ME, Abramson DH, Madden T, et al. Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 1209-12.
3. Wilson TW, Chan HSL, Moselhy GM, et al. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by cryotherapy and cyclosporine in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1390-5.
4. Murray TG, Ciciarelli N, O'Brien JM, et al. Subconjunctival carboplatin therapy and cryotherapy in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1286-90.
5. Van Quill KR, Dioguardi PK, Tong CZ, et al. Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Ophthalmology* 2005; 112: 1151-8.
6. Kaneko A, Suzuki S. Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 601-7.
7. Velez G, Yuang P, Sung C, et al. Pharmacokinetics and toxicity of intravitreal chemotherapy for primary intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1518-24.
8. Shield JA, Shields CL. *Intraocular Tumors: A Text and Atlas*. Philadelphia: WB Saunders; 1992: 305-91.
9. Cohen VML, Shields CL, Fruta M, et al. Vitreous seeding from retinal astrocytoma in three cases. *Retina* 2008; 28: 884-8.
10. Karcioğlu ZA. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) for retinoblastoma. *Retina* 2002; 22: 707-10.
11. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJA. Phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1999; 106: 1947-50.
12. Schmack I, Hubbard GB, Kang SJ, et al. Ischemic necrosis and atrophy of the optic nerve after periocular carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 310-5.
13. Harbour JW, Murray TG, Hamasaki D, et al. Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1892-8.

## Publikace č.2

7 stran textu přílohy



## Evaluation of toxicity after periocular and intravitreal administration of carboplatin in rabbit eyes

Denisa Darsova<sup>1</sup>, Pavel Pochop<sup>1</sup>, Luděk Vajner<sup>2</sup>, Daniela Kodetová<sup>3</sup>, Jiří Uhlík<sup>2</sup>, Jiří Kukačka<sup>4</sup>, Dagmar Dotfelová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology for Children and Adults, Charles University  
2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine,  
Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, <sup>4</sup>Department of Clinical Biochemistry and  
Pathobiochemistry, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital,  
Prague, Czech Republic

Received September 14, 2010

Accepted December 14, 2011

### Abstract

The aim of this study was to characterize the extent of toxicity of focal carboplatin administration and to identify the dose limiting toxicity in rabbit eyes depending on administered concentrations. New Zealand white male rabbits (n = 18) were treated with 1 of 3 regimens: a single periocular injection of 15 mg of carboplatin (group I), a single periocular injection of 30 mg of carboplatin (group II) and a single transcorneal intravitreal injection of 0.05 mg of carboplatin (group III). Ophthalmologic examinations and vitreous samplings were performed under dissociative anaesthesia at regular intervals during next 2 (groups I and III) or 3 (group II) weeks. Carboplatin concentrations in vitreous samples were assessed by atomic absorption spectroscopy. At the end of experiments, all rabbit eyes were obtained for histopathologic examination. Clinical and histological evidence of toxicity was graded into four grades according to anatomical structures of the rabbit eye. The dose limiting toxicity was reached in group II after periocular injection of 30 mg of carboplatin and in group III after intravitreal injection of 0.05 mg of carboplatin. No systemic toxicity was observed in any group. Focal carboplatin administration may decrease systemic exposure to this cytotoxic drug in the retinoblastoma treatment. This moreover suggests that focal carboplatin administration is a promising approach and challenge for advanced retinoblastoma chemotherapy.

*Carboplatin chemotherapy, New Zealand White Rabbits, intravitreal treatment, periocular toxicity, retinoblastoma*

Carboplatin is now routinely administered in the treatment of intraocular retinoblastoma as a part of systemic chemotherapy. Although retinoblastoma is the most common primary intraocular malignancy in children, it has seldom been reported in animals. Two cases were reported in dogs (Syed et al. 1997; Jensen et al. 2003), one in a llama (Fugaro et al. 2005) and one in a gelding (Knottenbet al. 2007). Enucleation of the affected eye was used in these cases due to large tumours. To overcome this, systemic carboplatin chemotherapy may be used in large tumours with diffuse vitreous and subretinal seeds (Reese-Ellsworth group 4 and 5 tumours). This would lead to significant morbidity and potential mortality through drug-related toxicities including neutropenia and bacterial infections, anaemia, thrombocytopenia and organ toxicities including ototoxicity, nephrotoxicity and hepatotoxicity (Benz et al. 2000). Local administration of chemotherapeutics may be an option to minimize these side effects. Carboplatin is one of the few chemotherapeutic agents used as an alternative to systemic chemotherapy for retinoblastoma. *In vivo* studies in primates (*Macaca fascicularis*) and in New Zealand white rabbits treated by subconjunctivally administered injections of carboplatin at doses of 10 mg or lower indicated

#### Address for correspondence:

MUDr. Denisa Darsova  
Dept. of Ophthalmology for Children and Adults  
Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital  
V Úvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic

Phone: +420-2-24432701  
Fax: +420-2-24432720  
E-mail: denisa.darsova@centrum.cz  
<http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>



no evidence of toxic effects or changes of behaviour (Mendelsohn et al. 1998; Hayden et al. 2004). Rabbits treated with unilateral subconjunctival injection of  $12.2 \pm 1.0$  mg/ml of carboplatin (Paraplatin) in saline solution or with  $25.1 \pm 7.7$  mg/ml of subconjunctival carboplatin in fibrin sealant also induced no tissue damage and no abnormal findings on electroretinography after three weeks (Pardue et al. 2004). Nevertheless, most of these studies described short-term toxicity occurring up to 48 h after treatment. *In vivo* studies using LH $\beta$ -Tag transgenic mice showed that low-dose sealant-treated group (0.66 mg of carboplatin) with a single subconjunctival injection of carboplatin resulted in mild transient periorbital oedema but with no evidence of toxicity. High-dose sealant-treated eyes of transgenic mice (1.23 mg of carboplatin) induced significant local toxicities, including severe periorbital inflammation, enophthalmia and cataract (Van Quill et al. 2005). Another described modality was intravitreal transscleral injection of chemotherapeutic agents (Kaneko and Suzuki 2003). Transient increase in intraocular pressure without any serious toxic damages was observed.

The aim of this study was to use a non-tumour-bearing rabbit's model to determine the extent of long-term toxicity of focal carboplatin administration and to identify the dose-limiting toxicity depending on used carboplatin concentrations.

We hypothesized that a very low dose of carboplatin administered intravitreally may result in higher concentrations of carboplatin in the vitreous humour with no extraocular toxicity than periocular administration of a higher dose.

### Materials and Methods

#### Animals and treatment

Male New Zealand white rabbits (Anlab, Prague, Czech Republic) were handled according to the regulation Nr. 207/2004 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic regarding the use of animals in experiments. *In vivo* experiment was approved by the ethics committee for animal welfare of Charles University, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine. The animals were anaesthetized intramuscularly with a mixture of ketamine hydrochloride (30-50 mg/kg, Narketan 10 a.u.v. inj., Vétroquinol, Lure Cedex, France) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg, Rometar 2% a.u.v. inj., Spofa, Prague, Czech Republic) throughout the experiment. Before the treatment and sampling, conjunctival sacks were disinfected by 3 ml of 1% Povidone-Iodine solution (Betadine, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Hungary) and anaesthetized by topical oxybuprocaine eye drops (0.4%, Benoxi gtt., Unimed Pharma, Bratislava, Slovakia).

For the *in vivo* studies, 18 rabbits were included and divided into six animals per group. Groups I and II received a single periocular injection of carboplatin (15 mg in 1.5 ml solution and 30 mg in 1.5 ml solution, respectively) with a 25-gauge needle in the superior temporal quadrant of the right eye. Group III received a single transcorneal intravitreal injection of carboplatin (0.05 mg in 0.1 ml solution). Absence of leakage from the injection sites was verified. Left eyes were not injected as being control eyes.

Commercial Carboplatin-Teva (Pharmachemie B.V, Haarlem, Netherlands) is a colourless fluid containing the additional substances mannitol and sterile water for injection. Glucose 5% was added to prepare concentrations of 10 mg/ml, 20 mg/ml and 0.5 mg/ml.

#### Sampling schedule

Vitreous and blood samples were taken at 0, 1, 2 and 6 h, in 1, 2 and 7 days and in 2 (groups I and III) or 3 (group II) weeks after the injection. We have extended the period of observation in group II due to evaluating the occurrence of retinal toxicity that developed gradually. After 2 weeks, no histopathological evidence of retinal toxicity was found in group I. At each withdrawal, 150  $\mu$ l to 400  $\mu$ l of vitreous humour were aspirated from the vitreous chamber with a 25-gauge needle inserted transcorneally by the limbus through the anterior chamber and the base of the iris. Samples of vitreous humour were placed in plastic tubes and frozen at -80 °C until analysis. Blood samples were drawn from the peripheral auricular vein and placed in tubes with ammonium heparinate. The blood was centrifuged at 10 868 g for 10 min (Centrifugal Machine Eppendorf 5810R) to isolate blood plasma.

At each sampling time, the rabbit's eyes underwent microscopic and indirect fundoscopic examinations to observe any signs of inflammation, media opacification and toxicity. Intraocular pressure was measured by TONO-PEN XL Applanation Tonometer.

#### Electrothermal atomic absorption spectroscopy

Carboplatin, platinum metabolites and protein conjugates were determined in ocular fluids and plasma as total soluble platinum (Pt) by electrothermal atomic absorption spectrometry as described previously (Kukacka et al. 2008; Pochop et al. 2010).

### Histological examination

After euthanasia, performed by exsanguination from the carotid arteries, eyes were enucleated together with eyelids and retrobulbar tissues and fixed in 10% formalin. The specimens were dehydrated by a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu\text{m}$  in thickness) were stained with haematoxyline and eosin and examined by an experienced pathologist.

### Toxicity grading

Clinical evidence of toxicity was classified into four grades according to the anatomical structure of the rabbit eye. Grade 1 included signs of periocular toxicity, regarding to eyelids and periocular orbital contents. We searched for periorbital and lid oedema, proptosis, any inflammatory and fibrotic changes and loss of lashes. Grade 2 was designed as scleral toxicity. Carboplatin toxicity affecting the conjunctiva, the sclera and the cornea was grouped in this grade. The signs of toxic conjunctivitis or widespread inflammation or necrosis involving any part of sclera presented also this grade of toxicity. Further, we searched for any depressed epithelial defects which stain with fluorescein, any swollen epithelial cells seen unstained, any corneal infiltrates, loss of normal corneal lustre and subepithelial ingrowth of fibrovascular tissue from the limbus. Remaining substructures of the rabbit's eye with clinical evidence of carboplatin toxicity formed grade 3. We searched for any inflammatory changes, hyphema and retinal detachment. Grade 4, systemic toxicity, included all clinical and histological evidence of systemic carboplatin toxicity on rabbits. We searched for any loss of the rabbit's weight, changes of the rabbit's behaviour and if necessary we examined the whole body histopathologically. Grades 1 and 2 were usually not considered for dose limiting toxicity. Local carboplatin treatment should not be broken in these cases because of the minimal effect on visual function. Grades 3 and 4 were designed as dose limiting toxicity.

## Results

The maximum achieved vitreous and plasma concentrations of carboplatin in each group are listed in Tables 1 and 2. Plasma concentrations of carboplatin in group III were not measurable. Assessment of carboplatin concentrations in plasma and vitreous

Table 1. Maximal achieved platinum concentration and time of its achievement in the vitreous humour of rabbits after periocular and intravitreal administration of carboplatin

Treatment modality	Time (h)	Vitreous platinum ( $\mu\text{g/l}$ )
Periocular group I	2	539.5 $\pm$ 278.0
Periocular group II	6	368.3 $\pm$ 109.0
Intravitreal group III	1	40285.3 $\pm$ 7436.0

Data are mean  $\pm$  SD

Table 2. Maximal achieved platinum concentration in plasma of rabbits after periocular and intravitreal administration of carboplatin

Treatment modality	Time (h)	Plasma platinum ( $\mu\text{g/l}$ )
Periocular group I	1	3668.3 $\pm$ 120.0
Periocular group II	1	5833.3 $\pm$ 134.5
Intravitreal group III	non-measurable	

Data are mean  $\pm$  SD

humour by electrothermal atomic absorption spectroscopy revealed higher concentrations of carboplatin in the vitreous humour after the transcorneal intravitreal injection of carboplatin compared to the periocular administrations. In case of the periocular carboplatin administrations, achieved concentrations in the vitreous humour were lower than the achieved concentrations in plasma.

A healthy New Zealand white rabbit's eye is covered by a clear conjunctiva consisting of epithelial cells and underlying basement membrane that overlays the sclera (white part of the eye). In albino rabbits, the conjunctival injection is visible, mainly along the limbus. The cornea is the transparent, lustrous and smooth front part of the eye. The iris colour is pinkish-white due to lack of pigmentation. The lens is a transparent, biconvex structure in the rabbit eye similar to the human lens. The retina lacks pigment and contains conspicuous choroidal vessels and large, oval optic nerve papilla in its nasal part. Clinical findings are summarized in Table 3. Grade 1 periocular toxicity was observed after periocular carboplatin injection. All rabbits in group I developed mild, transient periorbital oedema that disappeared spontaneously in 2 h. Besides, only three rabbit's eyes demonstrated

Table 3. Occurrence and type of observed ocular toxicity in rabbits after periocular and intravitreal administration of carboplatin

	Group I (n = 6)	Group II (n = 6)	Group III (n = 6)
Grade 1 - periocular toxicity			
Periorbital edema	6	3	0
Eyelid necrosis	0	2	0
Grade 2 - scleral toxicity			
Corneal vascularisation	1	2	0
Subconjunctival haemorrhage	2	2	0
Grade 3 - ocular toxicity			
Hypheema	4	3	3
Traumatic cataract	5	1	1
Haemophthalmus	3	3	5
Focal retinal atrophy	0	1	5

periorbital oedema in group II, but this kind of oedema was marked and disappeared within 48 h after injection.

Clinical evidence of more significant local toxicity was observed among rabbits treated with 30 mg of carboplatin periocularly. Two in this group II developed eyelid necrosis 7 days after injection, which was designated as dose limiting toxicity (Plate XY, Fig 1a,b). The right eyes of these two rabbits also developed periorbital oedema during the first 48 h. Two eyes in group I and one eye in group II manifested grade 2 scleral toxicity in corneal vascularization that was observed mostly in the inferior half of the cornea and not only in the region of the puncture. We observed subconjunctival haemorrhage in two of 6 eyes of both groups I and II. This is in compliance with periocular administration, which exposes the conjunctiva and the cornea to a high concentration of carboplatin.

Hypheema, traumatic cataract (Plate IV, Fig. 1c) and haemophthalmus occurred in all groups after repeated sampling. Repeated sampling of 150 µl to 400 µl of vitreous humour from the vitreous chamber can cause hypotonia of the rabbit's eyes. Normal intraocular pressure of the rabbit's eye is 8–10 torr, measured by TONO-PEN XL Applanation Tonometer. After 6 h, intraocular pressure was non-measurable in rabbits.

There was no evidence of grade 4 systemic toxicity in any group as measured by weight loss. Mean body weight loss among rabbits was manifested during the first 48 h of the experiment but we observed gradual body weight gain in all rabbits until 2 weeks (group I and III) and until 3 weeks (group II). No rabbit lost more than 10% of body weight, with the exception of one in each group which lost less than 15% of body weight over the first 48 h.

No evidence of toxicity was verified on histopathological examination of group I (Table 3). In contrast to group I, one of 6 eyes in group II and five of 6 eyes in group III manifested histopathological evidence of toxicity. We observed focal retinal atrophy in these cases (Plate IV, Fig. 1d).

## Discussion

To date, there are no reports of retinal toxicity in an animal model induced by periocular carboplatin therapy. Focal retinal atrophy in group II probably accords with the anatomy of the rabbit retina. Rabbit retinal vasculature emerges from the large, oval disc into nasal and temporal branches, extending until a short distance behind the equator. Outside this area the retina is avascular (Davis 1929). Lesser amount of blood vessels could induce higher sensitivity of metabolic active retinal cells to carboplatin. Repeated sampling caused short-term hypotony of rabbit's eyes in this study. This intraocular pressure fluctuation could

contribute to reduce the ganglion cell layer and to develop the focal retinal atrophy. A limitation of this study is the fact that we did not perform a functional examination of the retina.

Higher carboplatin concentrations achieved in plasma compared to vitreous humour could be related with anatomical-physiological differences between rabbit and primate eye and orbit. The orbital contents in rabbits are constituted of the venous sinus, surrounding the alkaline Harder's gland, that serves to lubricate the third eyelid, and of the extra-ocular muscles (Davis 1929). Periocular carboplatin injected in aqueous solution could diffuse quickly into the surrounding orbital space and penetrate the venous sinus rather than the sclera. Differences in the regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys contribute to this hypothesis. Peripheral choroidal blood flow is greater in rabbits than in monkeys, by which central choroidal blood flow is preferred, conversely (Nork 2006). Greater peripheral choroidal blood flow could induce a bias toward systemic absorption in the rabbit model. Although we used high concentrations of periocular injected carboplatin, we observed no systemic toxicity.

Periocular administration of carboplatin exposed particularly extraocular tissues to high transient concentrations of carboplatin. The absence of a large mass of fat around the globe was the reason for observing no evidence of fat necrosis in rabbit model as it was observed and published by Abramson (1999) and by Mulvihill (2003). Although the rabbit orbital space is made up largely of the extra-ocular muscles (Davis 1929), no decreased ocular motility was noted during the period of 2 and 3 weeks. Contrary to described findings in an animal model, periocular carboplatin injection induced orbital fibrosis, fat necrosis and atrophy of the optic nerve in children with retinoblastoma (Schmack et al. 2006; Kim et al. 2010). Different anatomical and physiological findings in children orbit and eye may lead to higher depot of periocular injected carboplatin, inducing toxic side-effects.

In group III, 0.05 mg of carboplatin developed histopathological evidence of retinal toxicity. This is equivalent to vitreous concentrations of 36 µg/ml related to 1.4 ml of rabbit vitreous volume (Kane et al. 1981). We used previously proven approach through the limbus, anterior chamber and iris root (Pochop et al. 2010) that seems to be safer than the traditionally used injection through the posterior part of the ciliary body. There may be a smaller risk of clusters of tumour cells implanted through the eye wall extraocularly.

Other observed findings like corneal vascularization, hyphema, cataractous changes and vitreous haemorrhage may be the result of repeated mechanical irritation and incautious puncture than carboplatin toxicity and cannot be identified as grade 3 ocular toxicity.

The dose limiting toxicity was reached in groups II and III. In group I no evidence of local or fundoscopic toxicity was found 2 weeks after carboplatin injection. Local carboplatin administration led to no evidence of systemic side effects in rabbits. Carboplatin administered intravitreally resulted in higher concentrations of carboplatin in the vitreous humour compared to periocular administration, which may be promising in the treatment of "seeding retinoblastoma". We proved higher sensitivity of the retina compared to other periocular tissues to the toxic effects of carboplatin.

#### Acknowledgment

This study was supported by the Grant No. 9532 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and by the Grant No. 63008 of the Grant Agency of Charles University.

#### References

- Abramson DH, Frank ChM, Dunkel IJ 1999: A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmol* **106**: 1947-1950  
 Abramson DH, Scheffler AC 2004: Update on retinoblastoma. *Retina* **24**: 828-848  
 Benz MS, Scott IU, Murray TG, Kramer D, Toledano S 2000: Complications of systemic chemotherapy as treatment of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* **118**: 577-578

- Brouwers EE, Tibben MM, Joerger M, van Tellingen O, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH 2005: Determination of oxaliplatin in human plasma and plasma ultrafiltrate by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **382**: 1484-1490
- Davis FA 1929: The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc* **27**: 400-441
- Fugaro MN, Kiupel M, Montiani-Ferreira F, Hawkins JF, Janovitz EB 2005: Retinoblastoma in the eye of a llama (*Llama glama*). *Vet Ophthalmol* **8**: 287-290
- Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E 2000: Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Can Res* **6**: 1205-1218
- Hayden BC, Jockovich ME, Murray TG, Voigt M, Milne P, Kralinger M, Feuer WJ, Hernandez E, Parel JM 2004: Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in the rabbit eye: possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3644-3649
- Jensen OA, Kaarsholm S, Prause JU, Heegaard S 2003: Neuroepithelial tumor of the retina in a dog. *Vet Ophthalmol* **6**: 57-60
- Kane A, Barza M, Baum J 1981: Intravitreal injection of gentamicin in rabbits. Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **20**: 593-597
- Kaneko A, Suzuki S 2003: Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol* **33**: 601-607
- Kim JW, Yau JW, Moshfeghi D, Fishman M 2010: Orbital fibrosis and intraocular recurrence of retinoblastoma following periocular carboplatin. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* **47**: 1-4
- Knottenbelt DC, Hetzel U, Roberts V 2007: Primary intraocular primitive neuroectodermal tumor (retinoblastoma) causing unilateral blindness in a gelding. *Vet Ophthalmol* **10**: 348-356
- Kukacka J, Tesfaye H, Malis J, Adam V, Fabrik I, Kotaska K, Stary J, Kizek R, Prusa R 2008: Carboplatin monitoring by flameless atomic absorption spectrophotometry and metallothionein levels in pediatric patients with solid tumors. *Clin Chem* **54**, A11
- Mendelsohn ME, Abramson DH, Madden T, Tong W, Tran HT, Dunkel IJ 1998: Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol* **116**: 1209-1212
- Mulvihill A, Budning A, Jay V, Vandenhoven C, Heon E, Gallie BL, Chan HSL 2003: Ocular motility changes after subtenon carboplatin chemotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* **121**: 1120-1124
- Nork MT, Kim CHBY, Shanmuganayagam D, Van Lysel MS, Ver Hoeve JN, Folts JD 2006: Measurement of regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys using fluorescent microspheres. *Arch Ophthalmol* **124**: 860-868
- Pardue MT, Hejny CH, Gilbert JA, Phillips MJ, Geroski DH, Edelhofer HF 2004: Retinal function after subconjunctival injection of carboplatin in fibrin sealant. *Retina* **24**: 776-782
- Pochop P, Darsova D, Kukacka J, Tesfaye H, Vajner L, Uhlík J, Kodetová D, Malis J, Dotrelova D 2010: Intravitreal carboplatin concentration and area under concentration versus time curve after intravitreal and periocular delivery. *Europ J Ophthalmol* **20**: 745-751
- Schmack I, Hubbard GB, Kang SJ, Aaberg TM Jr, Grossniklaus HE 2006: Ischemic necrosis and atrophy of the optic nerve after periocular carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* **142**: 310-315
- Shields CL, Shields JA, Cater J, Othmane I, Singh AD, Micaily B 2001: Plaque radiotherapy for retinoblastoma: long-term tumor control and treatment complications in 208 tumors. *Ophthalmol* **108**: 2116-2121
- Shields CL, Honavar SG, Meadows AT, Shields JA, Demirci H, Singh A, Friedman DL, Naduvilath TJ 2002: Chemoreduction plus focal therapy for retinoblastoma: factors predictive of need for treatment with external beam radiotherapy or enucleation. *Am J Ophthalmol* **133**: 657-664
- Syed NA, Nork TM, Poulsen GL, Riis RC, George C, Albert DM 1997: Retinoblastoma in a dog. *Arch Ophthalmol* **115**: 758-763
- Van Quill K, Dioguardi P, Tong C, Gilbert J, Aaberg T Jr, Grossniklaus H, Edelhofer H, O'Brien J 2005: Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Ophthalmol* **112**: 1151-1158

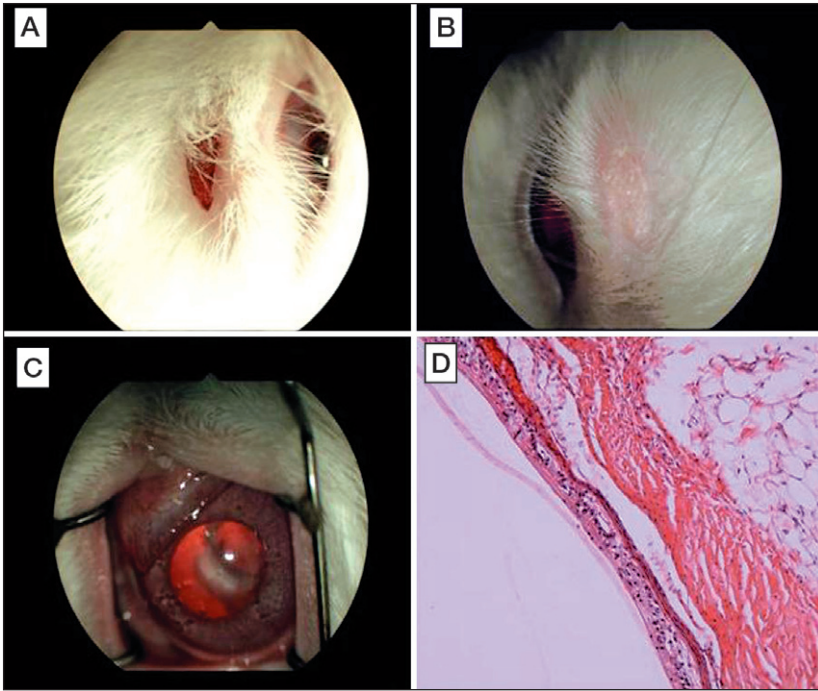


Fig. 1. Carboplatin side effects on the rabbit eye after intravitreal and periocular administration

A, B - eyelid necrosis after periocular administration of 30 mg of carboplatin, C - traumatic cataract after repeated sampling (rabbit after intravitreal injection of carboplatin), D - reduction of ganglion cells with small cystoid spaces in the inner nuclear layer of the retina after intravitreal injection of carboplatin

**Publikace č.3**

17 stran textu přílohy



**International Journal of**  
***Molecular Sciences***

Article

## An Adsorptive Transfer Technique Coupled with Brdicka Reaction to Reveal the Importance of Metallothionein in Chemotherapy with Platinum Based Cytostatics

Sona Krizkova <sup>1</sup>, Ivo Fabrik <sup>1</sup>, Dalibor Huska <sup>1</sup>, Vojtech Adam <sup>1</sup>, Petr Babula <sup>2</sup>, Jan Hrabeta <sup>3</sup>, Tomas Eckschlager <sup>3</sup>, Pavel Pochop <sup>4</sup>, Denisa Darsova <sup>4</sup>, Jiri Kukacka <sup>5</sup>, Richard Prusa <sup>5</sup>, Libuse Trnkova <sup>6</sup> and Rene Kizek <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, CZ-612 42 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University and Teaching Hospital Motol, 2nd Faculty of Medicine, V Uvalu 84, CZ-150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Ophthalmology for Children and Adults, Charles University and Teaching Hospital Motol, 2nd Faculty of Medicine, V Uvalu 84, CZ-150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, Charles University and Teaching Hospital Motol, 2nd Faculty of Medicine, V Uvalu 84, CZ-150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>6</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, CZ-611 37 Brno, Czech Republic

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: kizek@sci.muni.cz;  
Tel.: +420-5-4513-3350; Fax: +420-5-4521-2044.

Received: 11 October 2010; in revised form: 10 November 2010 / Accepted: 24 November 2010 /  
Published: 26 November 2010

---

**Abstract:** The drugs based on platinum metals represent one of the oldest, but also one of the most effective groups of chemotherapeutic agents. Thanks to many clinical studies it is known that resistance of tumor cells to drugs is a frequent cause of chemotherapy failure. With regard to platinum based drugs, multidrug resistance can also be connected with increased expression of low-molecular weight protein metallothionein (MT). This study aimed at investigating the interactions of MT with cisplatin or carboplatin, using the adsorptive transfer technique coupled with differential pulse voltammetry Brdicka reaction (AdTS DPV Brdicka reaction), and a comparison of *in vitro* results with results obtained *in*



*vivo*. The results obtained from the *in vitro* study show a strong affinity between platinum based drugs and MT. Further, we analyzed extracts of neuroblastoma cell lines treated with cisplatin or carboplatin. It is clear that neuroblastoma UKF-NB-4 cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive cell lines unlikely respond to the presence of the platinum-based cytostatics cisplatin and carboplatin. Finally, we determined the level of MT in samples from rabbits treated with carboplatin and patients with retinoblastoma treated with the same drug.

**Keywords:** tumor disease; metallothionein; platinum based anticancer drugs; anticancer therapy; resistance; retinoblastoma

---

## 1. Introduction

From a contemporary point of view, the process of the origin of malignant tumors is complex and multifactorial, comprising changes in expression of individual genes, physical factors and exposure to different chemical and biological impulses. Research and development in the field of tumor diagnostics and prevention, as well as methods of modern therapeutic approaches, belong to the priorities of all European Union countries. Individual tumor treatment strategies result from a number of treatment protocols combining an economic point of view and maximum benefit for the patient. One of the most important parts of the therapy is an efficacious chemotherapy application connected with the individualization of the therapy [1–10].

### 1.1. Cisplatin Based Chemotherapeutics

Drugs based on platinum metals represent one of the oldest, but also one of the most effective groups of chemotherapeutic agents [11–21]. Platinum-complex based chemotherapeutics are presently used in the therapy of a broad-spectrum of malignancies. The biological activity of the first-time-used platinum-based cytostatic agent, cisplatin, was discovered in 1965 by Rosenberg during research of the electric current influence on bacteria growth [22]. Since then, hundreds of platinum complexes have been synthesized and verified as anticancer chemotherapeutics, such as cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, lobaplatin and ormaplatin, belonging to the best known. Though cisplatin has been successfully used in the therapy of malignant tumors for more than 25 years, its biochemical mechanism of action is still not clear. The cytotoxic effect of cisplatin consists in DNA adducts formation, especially to guanine and adenine, which causes DNA strands crossing and thereby inhibition of DNA synthesis and consequently mitosis. The therapeutic effect of platinum-based therapeutics is permanently irreplaceable and brings considerable benefits to patients [23–30].

### 1.2. Tumor Therapy Resistance

Thanks to many clinical research studies, it is known that resistance of tumor cells to drugs is a common cause of chemotherapy failure. This resistance develops via various mechanisms and the whole process is multifactorial at the cell level. Treatment of complications caused by multidrug

resistance (MDR) is particularly difficult. One of the causes of tumor cell resistance is lowered therapeutic concentration of the cytostatic agent(s) in the target site. Membrane proteins such as Pgp, MRP and LRP participate in decreasing the cytostatics level in tumor cells. The complexity of MDR origination is also supported by changes in expression of genes participating in apoptosis or tumor suppressor genes. Cytostatics detoxification can be another factor leading to MDR, in which an increased activity of enzymes involved in oxidation or conjugation of xenobiotics with endogenic agents are most frequently found. In addition to these mechanisms, MDR can be also connected with the increased expression of low-molecular weight protein metallothionein (MT) [12,17–20,23,24,26,27,30–36].

### 1.3. Metallothionein Significance

Metallothionein (MT) belongs to the group of intracellular, cysteine-rich proteins (Cys content up to 30% of the molecule) with a molecular weight of 6–10 kDa. The MT molecule consists of two binding domains composed of two cysteine clusters. The N-terminal part of the protein ( $\beta$ -domain) has three binding sites for divalent ions and the C-terminal protein part ( $\alpha$ -domain) is able to bind four divalent metal ions. One MT molecule is able to bind 12 univalent and/or seven divalent metal ions. However, it is known that single MT molecules differ in their metal ions content and, thus, heavy metal binding sites in the MT molecule are not saturated under physiological conditions [37,38]. This is important for MT biological function (heavy metals homeostasis and detoxification, immunomodulation and regulation functions) [35,36,39,40]. One of the most important MT feature is its ability to interact with metal-containing therapeutics, such as platinum-based cytostatics. This ability can result in a decrease of the free cytostatic agent therapeutic level and thereby increase the resistance of tumor cells against cytostatic agent therapeutic concentrations. A review in Current Protein and Peptide Science aimed at clarifying the relationship between MT and tumor diseases was recently published [35]. Figure 1 shows a simplified scheme of interaction between MT and platinum-based cytostatics. Platinum-based therapeutic agents are probably able to bind to metal transcription inhibitor (MTI) that consequently releases the metal transcription factor-1 (MTF-1). Herewith, the MT biosynthesis is initiated and biosynthesized MT can interact with platinum-based cytostatic agent molecules. Thanks to inactivation of executive free therapeutic molecules by MT, the cytostatic agent therapeutic concentrations decreases and this leads to the growth of new cell subpopulations resistant to tumor therapy. The mechanisms of this process are still not clear [11,30,31,35,41–53]. This present study is aimed at studying interactions of metallothionein and cisplatin or carboplatin using the adsorptive transfer technique coupled with differential pulse voltammetry Brdicka reaction (AdTS DPV Brdicka reaction). We also aim to compare *in vitro* results with results obtained *in vivo*. Particularly, attention is paid to analysis of *in vitro* experiments, neuroblastoma cell line extracts, blood from rabbits treated with carboplatin, and patients with retinoblastoma treated with the same drug.

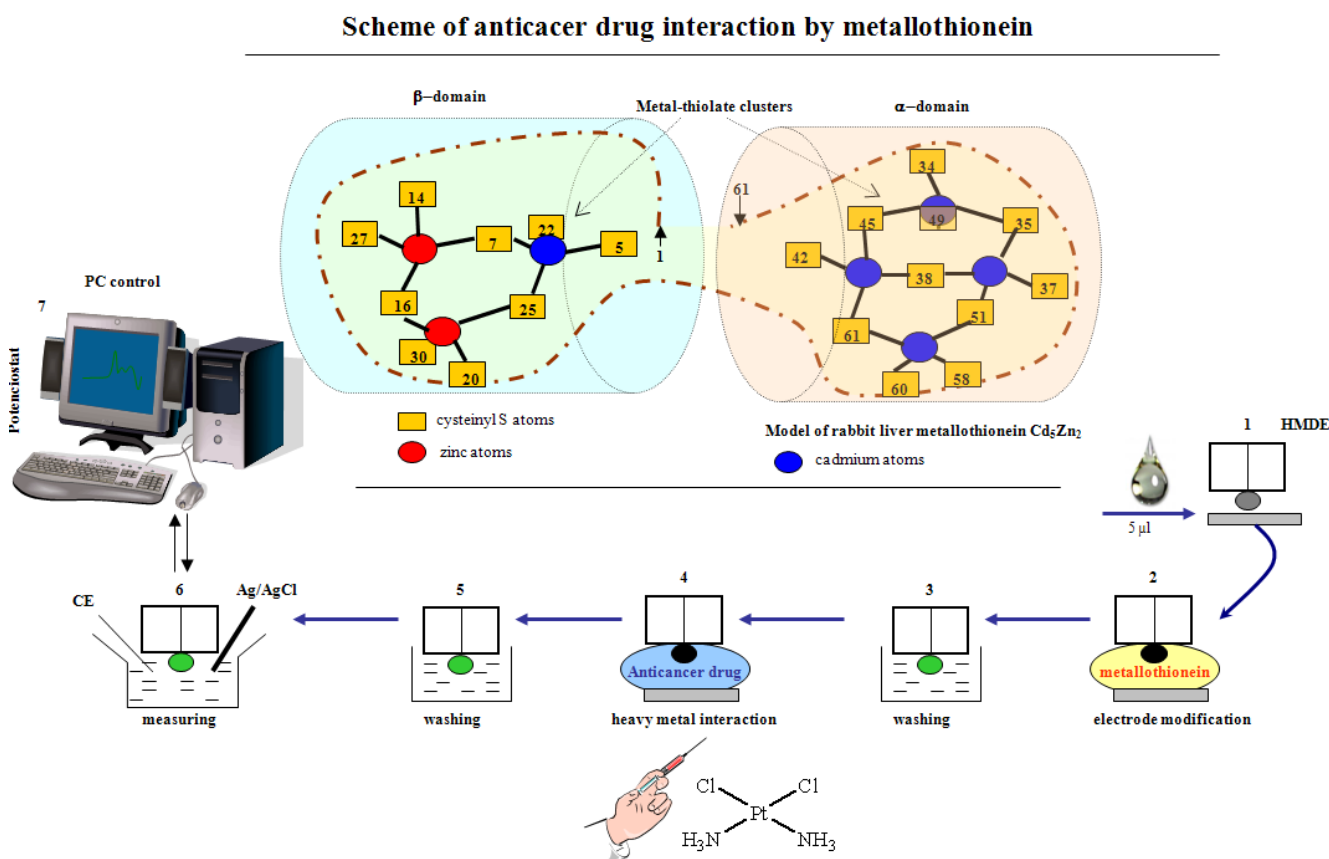


electrochemical technique enabling direct MT detection in blood serum. This method is based on removal of interfering proteins by heat treatment and consequent adsorption of metallothionein to the surface of the working electrode [56,57].

2.2. Study of Platinum-Based Therapeutics Interactions with Metallothionein Modified Electrode

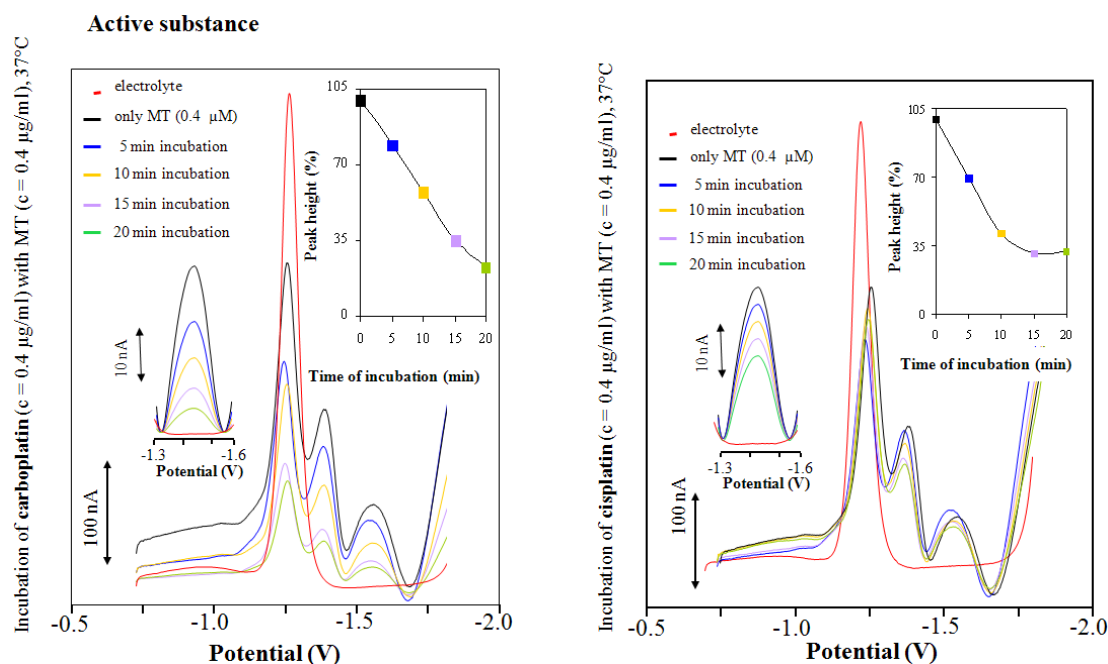
In the first *in vitro* experiment, we targeted the monitoring of cisplatin and carboplatin interactions with MT. We utilized an adsorptive transfer technique differential pulse voltammetry coupled Brdicka reaction (AdTS DPV Brdicka reaction) for this purpose. This technique has been successfully used for MT determination in numerous samples [57–60] and excellent correlation between immunochemical techniques was found [55,61]. The scheme of the experimental arrangement for the interaction studies is shown in Figure 2. A hanging mercury drop electrode (HMDE) was immersed in a 5 μL drop of MT for 120 s (point 1 and 2), after unbound molecules were released (3), the modified HMDE was immersed into a drop with a cytostatic agent (4). Then the electrode was carefully rinsed with water and analyzed (6) with computer treatment of the data obtained (7). Modification of the electrode and other experimental conditions were optimized in our previously published paper [62].

**Figure 2.** Scheme of study of the interaction between platinum-based cytostatics and MT. The MT molecule is composed of two domains containing cysteine clusters capable of binding metal ions. The hanging mercury drop electrode (HMDE) was immersed in a 5 μL drop of MT for 120 s (1 and 2), and after release of unbound molecules (3), modified HMDE was immersed into a drop of cytostatic agent (4), then carefully rinsed with water. Electrochemical measurements followed (6) with computer processing of the data (7).



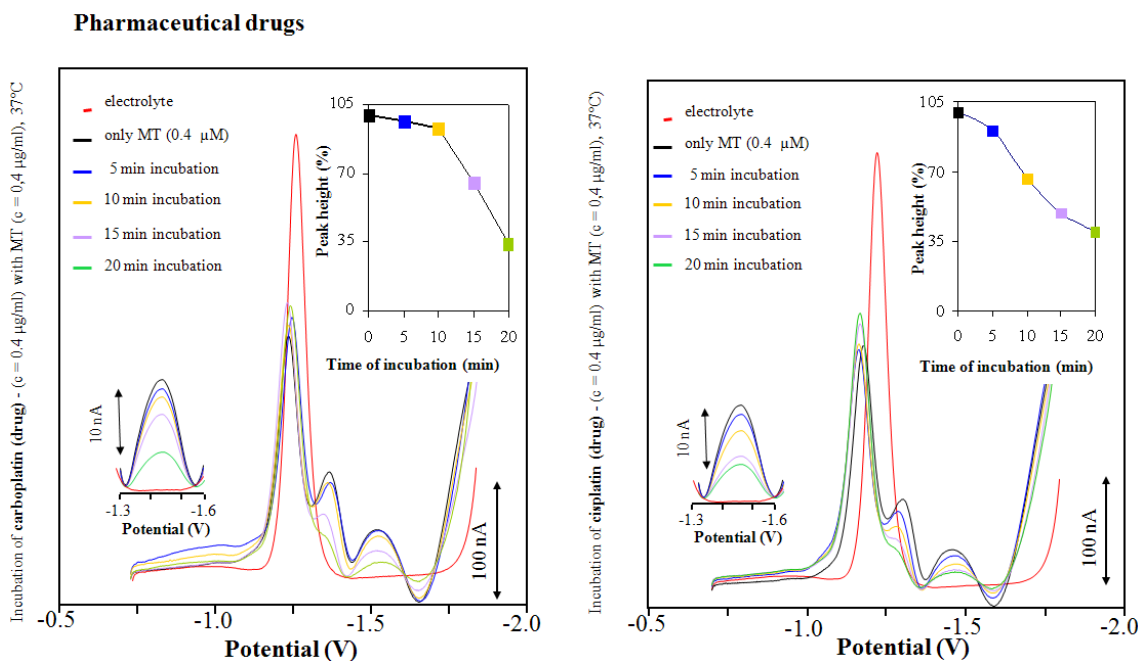
MT (0.4  $\mu\text{g/mL}$ ) modified HMDE was utilized for studying its interactions with cisplatin and carboplatin. For both compounds we obtained characteristic voltammograms (Figure 3). It clearly follows from the obtained results that the catalytic signal Cat2 diminished with increasing interaction time. After 20 min, the Cat2 signal decreased by more than 60% for both cytostatics. With increasing interaction times, no decrease of the signal was observed. For both drugs similar results were obtained, but the decrease of the signal was more rapid for cisplatin; where after 15 min interaction no further decrease of the signal was observed. For carboplatin, the decrease of the signal was slower and the lowering of the signal was complete after 20 min interaction. Similar results were obtained for interactions between cisplatin or carboplatin drugs, but a more distinct Cat2 signal decrease was observed after 10 min interaction for carboplatin and after 5 min for cisplatin (Figure 4).

**Figure 3.** AdTS DP voltammograms of MT modified HMDE in the presence of the active cytostatic substances carboplatin (left panel) and cisplatin (right panel). MT and platinum-based cytostatics concentration 0.4  $\mu\text{g/mL}$ ; interaction time of MT with HMDE 120 s.



The observed differences in the Cat2 signal decrease indicate that the studied compounds have different affinities for MT, probably due to their chemical structures. Differences between active substances and pharmaceutical drugs are probably caused by the presence of adjuvants in pharmaceutical drugs that significantly change their physicochemical properties (ionic strength, pH). Some of these parameters were investigated in our previous experiments [48], the obtained knowledge is possible to utilize for MT detection via hydrogen evolution. We can assume which platinum-based therapeutics (cisplatin, carboplatin) were captured by MT anchored onto HMDE surface and we were able to observe only changes directly connected with MT - drug interactions. In addition, El-Hourch *et al.* published the utilization of cisplatin for hydrogen evolution from supporting electrolyte [63]. However, platinum ions were not in the supporting electrolyte, thus they could not influence the catalytic reaction. The arrangement of the experiment also unambiguously points at the fact that carboplatin and cisplatin were strongly bound to the MT structure.

**Figure 4.** AdTS DP voltammograms of MT modified HMDE in the presence of pharmaceutical therapeutics containing cytostatic substances carboplatin (left panel) and cisplatin (right panel). MT and platinum-based cytostatics concentration 0.4  $\mu\text{g/mL}$ ; time of interaction MT with HMDE 120 s.



### 2.3. Changes in Cell Cultures

As it was demonstrated in our previous experiment *in vitro*, MT very rapidly and effectively binds platinum-based cytostatics (cisplatin and carboplatin). However, experiments carried out *in vitro* do not show the behavior of the analyzed compounds in an organism. Therefore, experiments *in vivo* were carried out to elucidate the significance of MT for resistance origination after the treatment by platinum-based therapeutics.

### 2.4. Automated Detection of Metallothionein

For routine analysis of larger sets of samples, an automated electroanalytical method for MT determination was found [48]. Reproducibility of determination varied within the range of 96 to 99% ( $n = 30$ ). Dependence of studied MT signal height was linear in the concentration interval 0.1–5  $\mu\text{M}$ . In our preliminary experiment, we demonstrated that the MT level increases in the presence of platinum-based cytostatics according to the applied concentration. Differences between cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive tumor cell lines were also determined [48,55].

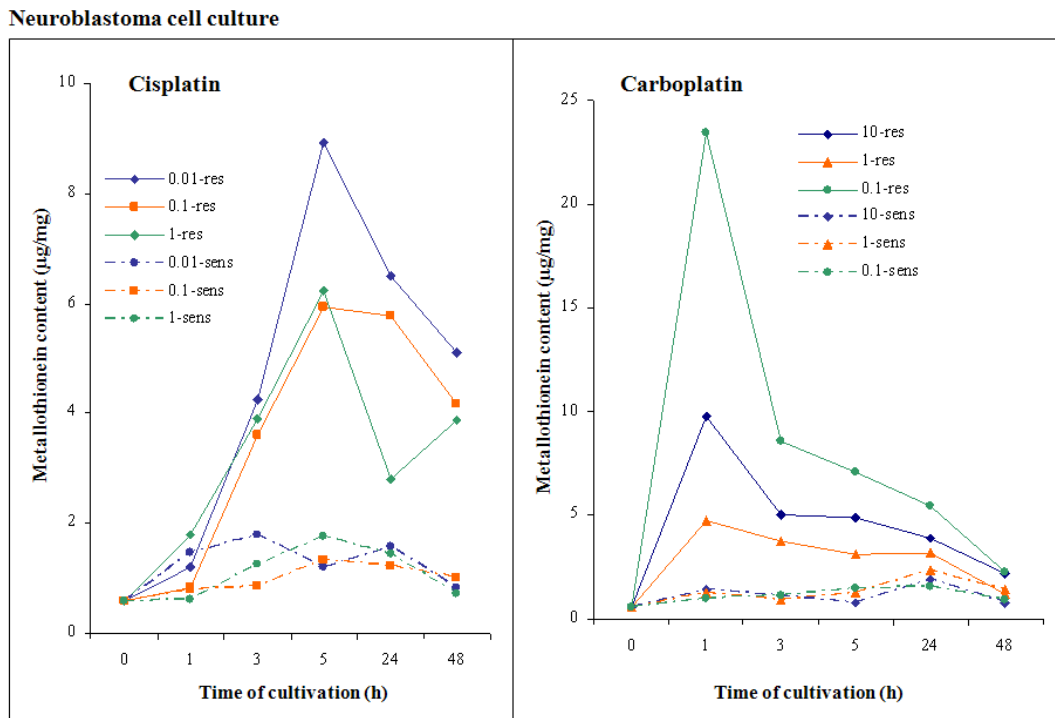
We were further interested in studying the time-dependence of these changes in greater detail. We compared the effect of cisplatin and carboplatin in concentrations of 0.01, 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  on resistant and sensitive tumor cell lines derived from neuroblastoma - UKF-NB-4. Cell lines were cultivated for 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h in the presence of platinum-based cytostatic drugs such as cisplatin and carboplatin. At the end of the experiment, cells were homogenized and consequently MT level was determined in cell lysates using the procedure shown in [48].

Sensitive cell lines demonstrated a significant growth depression in the presence of cytostatic agents. MT level was significantly increased in all sensitive tumor cell lines by about 50–90% in comparison with the control cell line. As it is well evident from Figure 5, the MT level increased in resistant tumor cell lines compared to sensitive cells. In the resistant tumor cell lines, the increase of MT level was dependent on the cytostatic agent used and its concentration. With carboplatin, changes in MT level were observable from the beginning of the experiment, whereas under the two highest carboplatin concentrations the MT level was significantly increased in resistant tumor cells compared to sensitive ones. In the case of the cisplatin-resistant tumor cell line, the MT level increase was firstly observable after six hours of treatment. This increase was consequently followed by a moderate decrease in comparison with the resistant tumor cell line, whose maximum MT level was well evident already in the first hours of the experiment. Then, MT level relatively rapidly decreased to that of the values of sensitive tumor cell lines. Fluctuation in MT after cisplatin as well as carboplatin exposition with a similar development in the presence of all applied concentrations can be interpreted by initiatory free MT saturation by cytostatic agent and its resulting elimination from cells, which results in a decrease of MT level in cells. Resistant tumor cell lines, in contrast to the sensitive ones, responded to the cytostatic agent presence by significantly enhancing MT expression, which was well evident as a rapid increase of the MT level. Determined differences in MT levels during platinum-based cytostatics treatment are in good agreement with our knowledge about cytostatics detoxification via thiol compounds that increase the ability of these tumor cell lines to survive in the presence of platinum-based therapeutics. From the obtained results, it clearly follows that neuroblastoma UKF-NB-4 cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive cell lines unlikely respond to the presence of platinum-based cytostatics cisplatin and carboplatin.

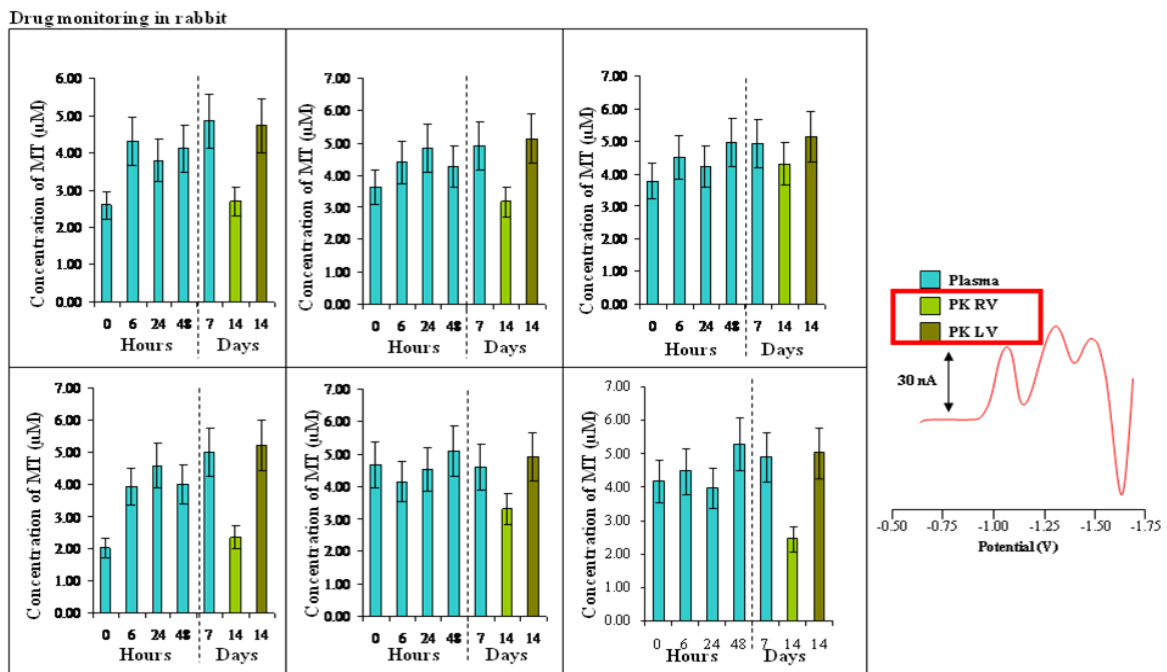
### *2.5. Changes of MT Level in Rabbits after Intravitreal Carboplatin Administration*

Retinoblastoma is one of the most frequent intraocular malignant tumors and it is the malignancy with the highest incidence in children. Retinoblastoma genesis is connected with gene mutation of both alleles of the retinoblastoma gene RB1 localized on chromosome 13q1.4. Its therapy is still very difficult, thus, new therapeutic possibilities as well as new ways of cytostatics application are intensively searched. One of these applications is direct injection of cytostatics—in this case especially carboplatin—into the eye. For this purpose, carboplatin was applied to experimental animals and consequently MT level was determined using automated electrochemical detection. Figure 6 shows the changes in MT levels according to the length of the carboplatin treatment. At the beginning, the MT level was about 3.5  $\mu\text{M}$  in healthy rabbits. After carboplatin application, a significant increase in the MT level was determined in all experimental animals up to 5  $\mu\text{M}$ . An enhanced MT level was detected for the following seven days in all experimental animals. A slight decrease in MT level was observed 14 days after carboplatin application. From the obtained results, it clearly follows that MT level was induced by carboplatin application directly into the eyes and can be probably connected with the resistance origination.

**Figure 5.** Neuroblastoma cell culture. Dependence of MT level in cell lines on the length of the cultivation. Prior to use in this experiment, all cell lines were cultivated for five sub-cultivations without cytostatics addition. Then, neuroblastoma cell cultures were exposed to cisplatin (left) or carboplatin (right).



**Figure 6.** Time-dependent changes in concentrations of MT in the plasma of rabbits treated with carboplatin. The increase of MT levels is observed after injection of drug. PK RV (peripheral blood from right ventricle) has always higher MT concentration than PK LV (peripheral blood from left ventricle). Typical DP voltammogram of plasma analysis is shown on the right side.

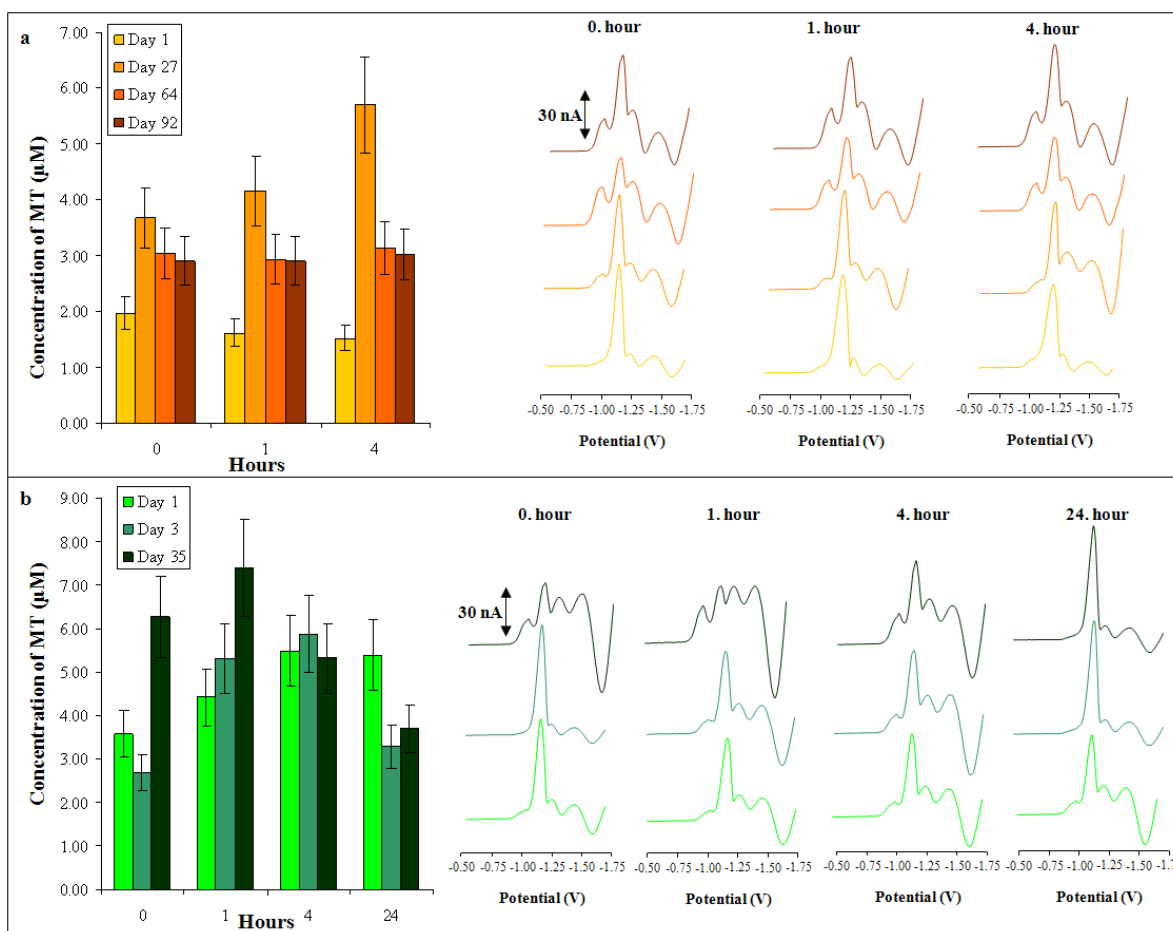




2.6. MT Changes in Retinoblastoma Patients

Retinoblastoma is a very rare malignant disease in the Czech Republic. Its treatment is centralized into a specialized workplace: FN Motol, Prague. Samples of retinoblastoma patients (n = 2) treated long-term with carboplatin were analyzed. Figure 7 shows the changes in MT level during long-term therapy in relation to the time-dependent changes after cytostatic agent application. MT levels were monitored 4 or 24 hours after application of the drug and the same procedure was repeated after a few days during the next treatment with carboplatin. In short-time monitoring of MT concentrations, a higher increase was observed with each dose of carboplatin; nevertheless, long periods had a stabilization effect on MT levels in the plasma after carboplatin application.

**Figure 7.** Time-dependent changes in the concentration of MT in the plasma of two patients (a, b) with retinoblastoma. MT levels were monitored 4 or 24 hours after application of the drug and the same procedure was repeated after a few days during the next treatment with carboplatin. DP voltammograms are shown on the right.



Immediately after carboplatin application, no MT level increase was detected; only in the first minutes after application a moderate MT level decrease was determined. This is probably connected with the interaction with carboplatin and free MT. Three days after the first application of carboplatin, a moderate MT level decrease (about 9%) was observed in comparison with the first application. Application after 27 days since the first application led to a significant MT level enhancement (165%)

compared to the first day. Maximal MT levels were determined between the 30<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> day after initial carboplatin application. After the 60<sup>th</sup> day after the first carboplatin application, MT levels slowly decreased. Figure 7 shows characteristic voltammetric records of individual samples with well distinguishable signals.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Chemicals and pH Measurements

Rabbit liver MT (MW 7143), containing 5.9% Cd and 0.5% Zn, was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) was produced by Molecular Probes (Eugen, Oregon, WI, USA). Other chemicals used were purchased from Sigma Aldrich. The stock standard solutions of MT at 10 µg/mL with 1 mM TCEP were prepared with ACS water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stored in the dark at -20 °C. Working standard solutions were prepared daily by dilution of the stock solutions. The pH was measured using pH meter WTW inoLab (Weilheim, Germany). The pH-electrode (SenTix-H, pH 0–14/3M KCl) was regularly calibrated by a set of WTW buffers (Weilheim, Germany).

#### 3.2. Tumor Cell Lines

The following cell lines obtained from the Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University, Prague, Czech Republic were used: UKF-NB4—cisplatin or carboplatin sensitive (prepared from recurrence of neuroblastoma into bone marrow, with MYCN amplification, del 1p34.2ter, del 13iso 17q) and UKF-NB4—cisplatin or carboplatin resistant (the line derived from the previous line—UKF-NB4 with *in vitro* induced resistance to cisplatin or carboplatin). The cell lines were prepared by cultivation with increasing concentration of cisplatin or carboplatin. The cells were cultivated in IMDM medium with 10% fetal calf serum at 37 °C, the chemoresistant cell lines were cultivated in medium with cisplatin or carboplatin added.

#### 3.3. Human Blood Serum

The samples of blood were obtained using vein tapping to the closed tapping units without another reagent during medical treatment of two patients with malignancies at Teaching Hospital Motol, Czech Republic. All patients subscribed to informed consent with utilization of their blood samples for the research.

#### 3.4. Preparation of the Samples for Electroanalytical Determination of Metallothionein

##### 3.4.1. Human Blood Serum

Human blood serum samples were prepared by heat treatment and solvent precipitation. Briefly, samples were kept at 99 °C in a thermomixer (Eppendorf 5430, USA) for 15 min with occasional stirring, and then cooled to 4 °C. The denatured homogenates were centrifuged at 4 °C, 15,000 × g for 30 min (Eppendorf 5402, USA). Heat treatment effectively denatures and removes high molecular

weight proteins from samples [56]. Determination of MT in the human blood serum samples was performed by differential pulse voltammetry Brdicka reaction. Analyzed sample volume was 5  $\mu$ L.

### 3.4.2. Tumor Cell Lines

The harvested cells were transferred to a test tube and deep frozen in liquid nitrogen to disrupt the cells. The frozen cells were mixed with extraction buffer (100 mM potassium phosphate, pH 8.7) to a final volume of 1 mL and homogenized using hand-operated homogenizer ULTRA-TURRAX T8 (IKA, Germany) placed in an ice bath for 3 min at 25,000 rpm. The homogenate was centrifuged at 10,000  $\times$ g for 15 min and at 4  $^{\circ}$ C (Eppendorf 5402, USA) [64]. The supernatant were processed in the same way as the human blood serum samples mentioned in Section 3.4.1. The processed samples were measured by adsorptive transfer stripping technique coupled with chronopotentiometric stripping analysis.

### 3.4.3. Intravitreal Administration of Carboplatin in Rabbits

Administration of carboplatin was performed according to data which indicate that periocular or intravitreal (transcorneal) carboplatin injections rather than systematically administrated carboplatin can effectively treat children with intraocular retinoblastoma. Six adult New Zealand White Rabbits (Anlab, Czech Republic) with an average weight of 2.45 kg (SD  $\pm$ 0.38) were handled according to the statement Nr.207/2004 s.11 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for the use of animals in experiments. *In vivo* experiments were further approved by the ethical committee for animal welfare of Charles University, 2nd Faculty of Medicine. The animals were kept at 22–25  $^{\circ}$ C room temperature, at 55–65% relative air humidity, and on a 12 h light/dark cycle, and were provided with tap water and rabbit chow TM MaK 1 (Bergman, Kocanda, Czech Republic) *ad libitum*. The rabbits were anesthetized intramuscularly with a mixture of 30–50 mg/kg of ketamine hydrochloride (Narketan 10, V $\acute{e}$ oquinol, France) and 5 mg/kg of xylazine hydrochlorid (Rometar 2%., Spofa, Czech Republic) throughout the experiment. Topical oxybuprocaine eye drops (0.4%, Benoxi, Unimed Pharma, Slovakia) were used to anesthetize the ocular surface before intravitreal puncture.

Carboplatin (Carboplatin, TEVA, Netherlands) solution was prepared immediately before injection by dissolving carboplatin in sterile water with mannitol to the final used concentrations. A single transcorneal intravitreal injection of carboplatin (0.05 mg in total volume of 0.1 mL) was applied with a 25-gauge needle into the right eye; the left eye of all animals served as uninjected controls. Blood samples were taken at 0, 6, 24 and 48 h, 7 and 14 days after injection. Blood samples were drawn from the peripheral auricular vein and collected in tubes with ammonium heparinate. The blood was centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes to separate blood plasma.

## 3.5. Electrochemical Measurements

### 3.5.1. Electroanalytical Determination of Metallothionein

An adsorptive transfer stripping technique (AdTS) coupled with DPV Brdicka reaction was employed for the determination of metallothionein in the cell lines extracts. The electrochemical measurements were performed using an AUTOLAB analyzer (EcoChemie, The Netherlands)

connected to VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland), using a standard electrochemical cell with a classical three-electrode connection. The three-electrode system consisted of a hanging mercury drop electrode as the working electrode, an Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode and a glassy carbon auxiliary electrode. For smoothing and baseline correction, the software GPES 4.9 supplied by EcoChemie was employed. The Brdicka supporting electrolyte (1 mM  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  in 1 M ammonia buffer ( $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ , pH = 9.6) was used; no surface-active agent was added. AdTS DPV Brdicka reaction parameters were as follows: initial potential of  $-0.6$  V, end potential  $-1.6$  V, modulation time 0.057 s, time interval 0.2 s, step potential of 1.05 mV, modulation amplitude of 250 mV,  $E_{\text{ads}} = 0$  V. Temperature of the supporting electrolyte was 4 °C.

### 3.5.2. Automated Electroanalytical Determination of Metallothionein

Differential pulse voltammetric Brdicka's reaction measurements were performed with 747 VA Stand instrument connected to 746 VA Trace Analyzer and 695 Autosampler (Metrohm, Switzerland), using a standard cell with three electrodes and a cooled sample holder (4 °C). A hanging mercury drop electrode (HMDE) with a drop area of  $0.4 \text{ mm}^2$  was the working electrode. An Ag/AgCl/3M KCl electrode was the reference and glassy carbon electrode was the auxiliary electrode. The software GPES 4.9 supplied by EcoChemie was employed for smoothing and baseline correction of the raw data. The analyzed samples were deoxygenated prior to measurements by purging with argon (99.999%), saturated with water for 120 s. The Brdicka's supporting electrolyte containing 1 mM  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  and 1 M ammonia buffer ( $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ , pH = 9.6) was used and after each measurement the supporting electrolyte was exchanged. The parameters of the measurement were as follows: initial potential of  $-0.7$  V, end potential of  $-1.75$  V, modulation time 0.057 s, time interval 0.2 s, step potential 2 mV, modulation amplitude  $-250$  mV,  $E_{\text{ads}} = 0$  V. All experiments were carried out at 4 °C employing thermostat Julabo F12 (Labortechnik GmbH, Germany). One hundred-times diluted sample with 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (20  $\mu\text{L}$ ) was used.

### 3.6. Descriptive Statistics

Data were processed using MICROSOFT EXCEL® (USA) and STATISTICA.CZ Version 8.0 (Czech Republic). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) unless otherwise noted (EXCEL®). Statistical significance of the differences between MT levels and rat weight were determined using STATISTICA.CZ. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant and were determined using one way ANOVA test (particularly Scheffe test), which was applied for means comparison.

## 4. Conclusions

Adsorptive transfer technique differential pulse voltammetry coupled with Brdicka reaction presents a unique possibility for studying interactions between proteins and cytostatics. Catalytic signals are very sensitive and enable the study of interactions at the nanomolar level. In addition, our *in vivo* experiments verify the hypothesis that MT levels significantly increase after platinum-based therapeutic application. In the case of platinum-resistant tumor cell lines, the MT level significantly

increases. Thus, MT can act as one of the factors of tumor therapy resistance. For understanding these mechanisms, experiments on experimental animals were carried out and in addition MT levels were monitored in patients with a rare malignant disease—retinoblastoma—after platinum-based cytostatics treatment.

### Acknowledgements

This work was supported by grants: GA AV IAA401990701, IGA MZ Czech Republic NR/9532-3/2007, IGA MZ 10200-3, INCHEMBIOL MSM0021622412 and LPR 2011.

### References

1. Bosetti, C.; Bertuccio, P.; Levi, F.; Lucchini, F.; Negri, E.; La Vecchia, C. Cancer mortality in the European Union, 1970–2003, with a joinpoint analysis. *Ann. Oncol.* **2008**, *19*, 631–640.
2. Levi, F.; Ferlay, J.; Galeone, C.; Lucchini, F.; Negri, E.; Boyle, P.; La Vecchia, C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int.* **2008**, *101*, 949–958.
3. Ferlay, J.; Randi, G.; Bosetti, C.; Levi, F.; Negri, E.; Boyle, P.; La Vecchia, C. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int.* **2008**, *101*, 11–19.
4. Zatonski, W.A.; Manczuk, M.; Powles, J.; Negri, E. Convergence of male and female lung cancer mortality at younger ages in the European Union and Russia. *Eur. J. Public Health* **2007**, *17*, 450–454.
5. Black, R.J.; Bray, F.; Ferlay, J.; Parkin, D.M. Cancer incidence and mortality in the European Union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 1075–1107.
6. Boyle, P.; Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 481–488.
7. Levi, F.; Lucchini, F.; Negri, E.; Boyle, P.; La Vecchia, C. Cancer mortality in Europe, 1995–1999, and an overview of trends since 1960. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 155–169.
8. Levi, F.; Lavecchia, C.; Lucchini, F.; Negri, E. Cancer Mortality in Europe, 1990–92. *Eur. J. Cancer Prev.* **1995**, *4*, 389–417.
9. Levi, F.; Lucchini, F.; Negri, E.; La Vecchia, C. Trends in mortality from major cancers in the European Union, including acceding countries, in 2004. *Cancer* **2004**, *101*, 2843–2850.
10. Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E.; Lucchini, F. Childhood cancer mortality in Europe, 1955–1995. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 785–809.
11. Okazaki, Y.; Namikawa, K.; Minami, T. Studies of metals and metallothionein in tissue. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2000**, *120*, 282–289.
12. Sakai, W.; Swisher, E.M.; Karlan, B.Y.; Agarwal, M.K.; Higgins, J.; Friedman, C.; Villegas, E.; Jacquemont, C.; Farrugia, D.J.; Couch, F.J.; Urban, N.; Taniguchi, T. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* **2008**, *451*, 1116–1119.
13. Cavaletti, G. Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 1.
14. Damsma, G.E.; Alt, A.; Brueckner, F.; Carell, T.; Cramer, P. Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1127–1133.

15. Loehrer, P.J.; Einhorn, L.H. Drugs 5 years later - cisplatin. *Ann. Intern. Med.* **1984**, *100*, 704–713.
16. Sancar, A. DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 43–81.
17. Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1295–1302.
18. Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J. The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1999**, *1461*, 347–357.
19. Siddik, Z.H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
20. Gately, D.P.; Howell, S.B. Cellular Accumulation of the Anticancer Agent Cisplatin - a Review. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1171–1176.
21. Prestayko, A.W.; Daoust, J.C.; Issell, B.F.; Crooke, S.T. Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatinum-II). *Cancer Treat. Rev.* **1979**, *6*, 17–39.
22. 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.
23. Fink, D.; Aebi, S.; Howell, S.B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 1–6.
24. Raymond, E.; Chaney, S.G.; Taamma, A.; Cvitkovic, E. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Ann. Oncol.* **1998**, *9*, 1053–1071.
25. Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307–320.
26. Kartalou, M.; Essigmann, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2001**, *478*, 23–43.
27. Weiss, R.B.; Christian, M.C. New cisplatin analogs in development - a review. *Drugs* **1993**, *46*, 360–377.
28. Go, R.S.; Adjei, A.A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 409–422.
29. Cohen, S.M.; Lippard, S.J. Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Academic Press Inc: San Diego, CA, USA, 2001; Volume 67, pp. 93–130.
30. Krizkova, S.; Adam, V.; Petrlova, J.; Zitka, O.; Stejskal, K.; Zehnalek, J.; Sures, B.; Trnkova, L.; Beklova, M.; Kizek, R. A suggestion of electrochemical biosensor for study of platinum(II)-DNA interactions. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 331–338.
31. Sato, M.; Suzuki, S. Endoplasmic reticulum stress and metallothionein. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 703–708.
32. Kerbel, R.S. Molecular origins of cancer: Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2039–2049.
33. Adam, V.; Fabrik, I.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Trnkova, L.; Kizek, R. Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TRAC-Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 409–418.
34. Adam, V.; Petrlova, J.; Wang, J.; Eckschlager, T.; Trnkova, L.; Kizek, R. Zeptomole electrochemical detection of metallothioneins. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11441.

35. Eckschlager, T.; Adam, V.; Hrabeta, J.; Figova, K.; Kizek, R. Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10*, 360–375.
36. Krizkova, S.; Fabrik, I.; Adam, V.; Hrabeta, J.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl. Med. J.-Bratisl. Lek. Listy* **2009**, *110*, 93–97.
37. Bell, S.G.; Vallee, B.L. The metallothionein/thionein system: An oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 55–62.
38. Haase, H.; Maret, W. Partial oxidation and oxidative polymerization of metallothionein. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4169–4176.
39. Li, Y.; Maret, W. Human metallothionein metallomics. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *23*, 1055–1062.
40. Pedersen, M.O.; Larsen, A.; Stoltenberg, M.; Penkowa, M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.* **2009**, *44*, 29–64.
41. Miura, N.; Koizumi, S. Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 665–673.
42. Otsuka, F.; Ohno, S.; Suzuki, K.; Takahashi, K.; Ohsawa, M.; Koizumi, S. Mechanism of metallothionein gene activation mediated by heavy-metal dependent transcription factor MTF-1. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 675–684.
43. Itoh, N.; Kimura, T. Cytokine-induced metallothionein expression and modulation of cytokine expression by metallothionein. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 685–694.
44. Min, K.S. The physiological significance of metallothionein in oxidative stress. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 695–702.
45. Satoh, M. Analysis of toxicity using metallothionein knockout mice. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 709–717.
46. Ohashi, T.; Satoh, T.; Kuwata, M.; Fujimura, T.; Taketani, S. Visualization and evaluation of the promoter activities of genes for stress-inducible proteins in response to environmental pollutants. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2007**, *127*, 757–764.
47. Kaji, T. Cell biology of heavy metal toxicity in vascular tissue. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2004**, *124*, 113–120.
48. Fabrik, I.; Krizkova, S.; Huska, D.; Adam, V.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Eckschlager, T.; Kukacka, J.; Prusa, R.; Kizek, R. Employment of electrochemical techniques for metallothionein determination in tumor cell lines and patients with a tumor disease. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1521–1532.
49. Adam, V.; Baloun, J.; Fabrik, I.; Trnkova, L.; Kizek, R. An electrochemical detection of metallothioneins at the zeptomole level in nanolitre volumes. *Sensors* **2008**, *8*, 2293–2305.
50. Adam, V.; Hanustiak, P.; Krizkova, S.; Beklova, M.; Zehnalek, J.; Trnkova, L.; Horna, A.; Sures, B.; Kizek, R. Palladium biosensor. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1909–1914.
51. Adam, V.; Krizkova, S.; Zitka, O.; Trnkova, L.; Petrlova, J.; Beklova, M.; Kizek, R. Determination of apo-metallothionein using adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 339–347.
52. Petrlova, J.; Potesil, D.; Mikelova, R.; Blastik, O.; Adam, V.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Prusa, R.; Kukacka, J.; Kizek, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5112–5119.

53. Adam, V.; Petrlova, J.; Potesil, D.; Zehnalek, J.; Sures, B.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Kizek, R. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1649–1657.
54. Hou, X.F.; Fan, Q.X.; Wang, L.X.; Lu, S.X. Role of metallothionein1h in cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells. *Chin. J. Cancer Res.* **2009**, *21*, 247–254.
55. Krizkova, S.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Using of chicken antibodies for metallothionein detection in human blood serum and cadmium-treated tumor cell lines after dot- and electroblotting. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 3726–3735.
56. Erk, M.; Ivankovic, D.; Raspor, B.; Pavicic, J. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* **2002**, *57*, 1211–1218.
57. Adam, V.; Beklova, M.; Pikula, J.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Kizek, R. Shapes of differential pulse voltammograms and level of metallothionein at different animal species. *Sensors* **2007**, *7*, 2419–2429.
58. Adam, V.; Blastik, O.; Krizkova, S.; Lubal, P.; Kukacka, J.; Prusa, R.; Kizek, R. Application of the Brdicka reaction in determination of metallothionein in patients with tumours. *Chem. Listy* **2008**, *102*, 51–58.
59. Diopan, V.; Shestivska, V.; Adam, V.; Macek, T.; Mackova, M.; Havel, L.; Kizek, R. Determination of content of metallothionein and low molecular mass stress peptides in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2008**, *94*, 291–298.
60. Fabrik, I.; Ruferova, Z.; Hilscherova, K.; Adam, V.; Trnkova, L.; Kizek, R. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using Brdicka reaction. *Sensors* **2008**, *8*, 4081–4094.
61. Krizkova, S.; Blahova, P.; Nakielna, J.; Fabrik, I.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Beklova, M.; Svobodova, Z.; Horak, V.; Kizek, R. Comparison of metallothionein detection by using brdicka reaction and enzyme-linked immunosorbent assay employing chicken yolk antibodies. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2575–2583.
62. Huska, D.; Fabrik, I.; Baloun, J.; Adam, V.; Masarik, M.; Hubalek, J.; Vasku, A.; Trnkova, L.; Horna, A.; Zeman, L.; Kizek, R. Study of interactions between metallothionein and cisplatin by using differential pulse voltammetry brdicka's reaction and quartz crystal microbalance. *Sensors* **2009**, *9*, 1355–1369.
63. El Hourch, M.; Dudoit, A.; Amiard, J.C. An optimization procedure for determination of metallothionein by square wave cathodic stripping voltammetry: Application to marine worms. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 776–781.
64. Supalkova, V.; Petrek, J.; Baloun, J.; Adam, V.; Bartusek, K.; Trnkova, L.; Beklova, M.; Diopan, V.; Havel, L.; Kizek, R. Multi-instrumental investigation of affecting of early somatic embryos of Spruce by cadmium(II) and lead(II) ions. *Sensors* **2007**, *7*, 743–759.



## Publikace č.4

6 stran textu přílohy



# Topotecan vitreous and plasma levels and retinal toxicity after transcorneal intravitreal delivery in healthy albino rabbits: Alternative retinoblastoma treatment

Denisa Darsova<sup>a</sup>, Pavel Pochop<sup>a</sup>, Jiri Uhlík<sup>b</sup>, Eva Klápková<sup>c</sup>, Hundie Tesfaye<sup>c</sup>, Daniela Kodetová<sup>d</sup>, Jan Lestak<sup>e</sup>, Josef Malis<sup>f</sup>, Ludek Vajner<sup>b</sup>

**Aim.** To determine intravitreal and plasma concentrations and retinal toxicity after transcorneal intravitreal injection of 1 µg and 2 µg of topotecan (Hycamtin).

**Method.** Twelve healthy albino rabbits were included in this in vivo experiment. Six anesthetized albino rabbits received a single transcorneal intravitreal injection of 1 µg (group A) or 2 µg (group B) of topotecan. Vitreous and blood samples were collected until 168 h. Left eyes were treated with the same volume of saline. Plasma and vitreous levels of topotecan were determined by high-performance liquid chromatography. Area under the plasma concentration time curve (AUC) was calculated using trapezoidal rule. Clinical evidence of toxicity was classified into four grades according to anatomical structures. Electroretinograms (ERGs) were recorded.

**Results.** Time to maximum concentration was observed up to 2 h after drug injection in group A whereas up to 1 h in group B. Low levels of topotecan were detected in plasma in both groups and in the vitreous humor of the contralateral eye in group B. Topotecan levels (mean vitreous AUC in group A 2.55 µg/mL.h and in group B 5.338 µg/mL.h) were detectable up to 6 h in both groups. We observed following structural changes in rabbit eyes: corneal vascularization, cataract, hemophthalmus, choroidal edema and focal retinal atrophy. Abnormal ERGs were obtained.

**Conclusion.** Our findings proved that transcorneal intravitreal administration of 1 µg and 2 µg of topotecan results in potentially cytotoxic intraocular concentrations. More studies are needed to establish the safety of topotecan for retinoblastoma in children.

**Key words:** intravitreal drug delivery, intravitreal seeding, periocular injection, retinoblastoma, topotecan

Received: September 29, 2011; Accepted: November 30, 2011; Available online: December 20, 2011  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2011.068>

<sup>a</sup>Department of Ophthalmology for Children and Adults, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Histology and Embryology, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Prague

<sup>c</sup>Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital, Prague

<sup>d</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital, Prague

<sup>e</sup>Department of Ophthalmology, Clinic of Jan Lestak, Prague

<sup>f</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol Hospital, Prague

Corresponding author: Denisa Darsova, e-mail: [denisa.darsova@centrum.cz](mailto:denisa.darsova@centrum.cz)

## INTRODUCTION

Retinoblastoma represents approximately 3% of all pediatric malignancies and is the most common intraocular malignancy in children<sup>1,2</sup>. Despite the improved therapeutic indices achieved with systemic chemotherapy, complete tumor control is difficult in most children with advanced stages of retinoblastoma. The main problem with systemic chemotherapy in these cases is the recurrence of vitreous or subretinal seeds<sup>3,4</sup>. Systemically administered chemotherapeutic drugs usually fail to achieve significant concentrations in the vitreous humor because of low permeability across the blood-retinal barrier and due to the avascular vitreous humor. To reach regular therapeutic vitreous levels of anticancer drugs while maintaining low systemic toxicity, alternative strategies have been developed by a number of ophthalmic oncologists.

Currently, subconjunctival delivery is used in conjunction with systemic chemotherapy to boost the local dose of carboplatin<sup>5</sup>. However, intravitreal carboplatin concentrations reached after subconjunctival delivery are irregular<sup>6-8</sup> and this strategy can cause serious adverse effects such as ischemic necrosis with atrophy of the optic nerve and subsequent blindness<sup>9,10</sup>.

Thus, researchers continue to investigate local delivery of potentially non-toxic drugs to improve ocular salvage. Topotecan, a specific topoisomerase I inhibitor that is capable of producing lethal damage during the course of DNA replication<sup>11,12</sup>, has shown promising antitumor activity in pediatric solid tumors and leukemia<sup>13-15</sup>. The first study to examine the pharmacological penetration of topotecan into the vitreous cavity in animals demonstrated that periocular delivery of topotecan reached potentially active levels in the vitreous humor but sys-

temic absorption accounted for most topotecan delivery<sup>16</sup>. Rapid drop-off in vitreous concentration of chemotherapeutic agent after periocular delivery is an impediment to efficacy. Consequently, fibrin sealant was tested, to extend the duration of time of transscleral penetration of topotecan<sup>17</sup>. Subconjunctival delivery of topotecan in fibrin sealant prolonged the period of sufficient topotecan vitreous levels up to 3 weeks after treatment. However, cytotoxic effects of topotecan in fibrin sealant did not differ significantly from the effects of topotecan in aqueous vehicle and there are no reports concerning treatment after vitreous seeding. To achieve higher topotecan levels in the vitreous humor, experiments were carried out on the pharmacokinetics of this drug following intravitreal delivery. Potentially therapeutic concentrations were reached in the vitreous humor up to 48 h after transscleral delivery of 5  $\mu\text{g}$  of topotecan. This study was limited by the potential retinal toxicity that was not assessed<sup>18</sup>.

The aim of the present study was to establish the safety of transcorneal intravitreal delivery of topotecan in relation to concentration using an animal model.

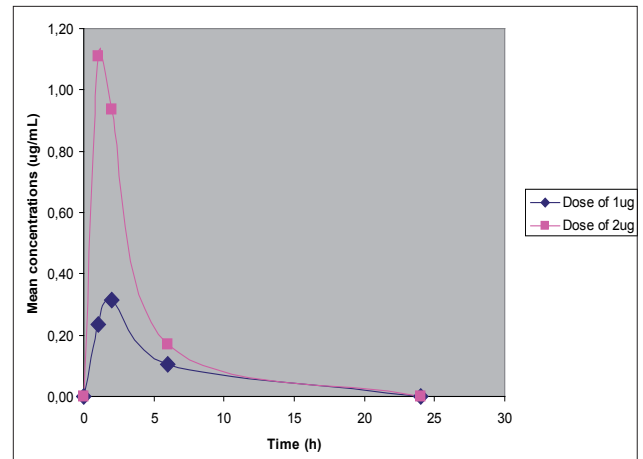
## MATERIALS AND METHODS

### In vivo experiment

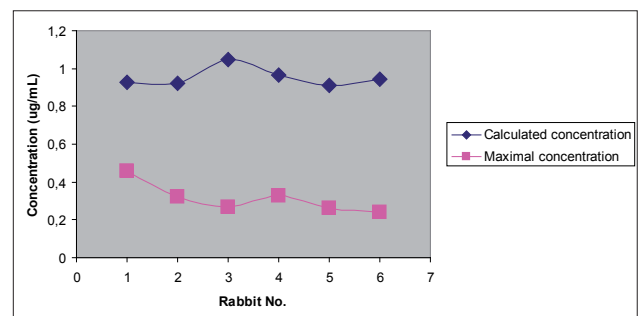
In vivo experiment was approved by the Ethics Committee for Animal Welfare of Charles University, 2nd Faculty of Medicine. The animals were anaesthetized intramuscularly with a mixture of ketamine (50 mg/kg, Narketan 10 a.u.v. inj., Vétouinol, Lure Cedex, France) and xylazine (5 mg/kg, Rometar 2% a.u.v. inj., Spofa, Prague, Czech Republic) throughout the experiment. Twelve healthy male albino rabbits (Anlab, Prague, Czech Republic) were divided into two groups of 6 rabbits each. Group A received transcorneal intravitreal injection of 1  $\mu\text{g}$  of topotecan (Hycamtin, GlaxoSmithKline Beecham Plc., Brentford, United Kingdom) with a 29-gauge insulin syringe into the right eye. Group B was injected by transcorneal intravitreal injection of 2  $\mu\text{g}$  of topotecan with the same type of syringe. Considering retinoblastoma treatment, we used a proven approach through the limbus, anterior chamber and peripheral iris which can prevent seeding of tumor cells to the orbital tissues if used in retinoblastoma patients<sup>8</sup>. Left eyes were treated with the same volume of saline (0.1 mL). Before the treatment and each withdrawal, conjunctival sacks were disinfected by 3 mL of 1% Povidone-Iodine solution (Betadine, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Hungary) and anesthetized by Topical oxybuprocaine eye drops (0.4%, Benoxigt., Unimed Pharma, Bratislava, Slovakia).

### Sampling schedule

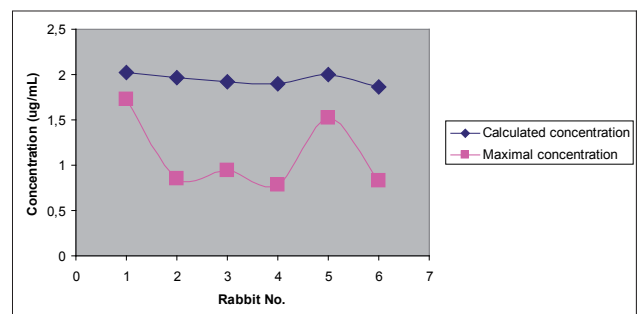
Vitreous and blood samples were collected up to 168 h (at intervals of 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 168 h). Only vitreous samples from left eyes were obtained at 6 h post injection as no measurable topotecan was found at longer times in group A. Our results were obtained from the opposite site to drug injection area to prevent withdrawal of vitreous samples with possible higher topotecan concen-



**Fig. 1.** Mean topotecan concentrations-versus-time profile in vitreous humor of right eyes after transcorneal intravitreal injection of 1  $\mu\text{g}$  (◆) and after transcorneal intravitreal injection of 2  $\mu\text{g}$  (■). Symbols represent individual data points and lines represent the predicted concentrations for topotecan vitreous concentrations.



**Fig. 2.** Measured topotecan concentrations in rabbits versus calculated topotecan concentrations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the vitreous according to measured globe diameter by the intravitreal application of 1  $\mu\text{g}$  of topotecan.



**Fig. 3.** Measured topotecan concentrations in rabbits versus calculated topotecan concentrations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the vitreous according to measured globe diameter by the intravitreal application of 2  $\mu\text{g}$  of topotecan.

tration. At each withdrawal, 150  $\mu\text{L}$  to 400  $\mu\text{L}$  of vitreous humour were aspirated from the vitreous chamber with a 25-gauge needle inserted transcorneally by the limbus through the anterior chamber and the base of the iris. At each sampling time, the rabbit's eyes underwent clini-

cal examination with a funduscopy. Blood samples were drawn from the peripheral auricular vein and placed in tubes with ammonium heparinate.

#### Topotecan concentration measurement

Plasma and vitreous levels of topotecan were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Topotecan, kindly donated by GlaxoSmithKline, England, was used as standard using a modified HPLC method that has been described<sup>19</sup>. A volume of 100  $\mu$ L of sample was pipetted into a 1.5 mL polypropylene tube and 200  $\mu$ L of methanol was added for protein precipitation. The tubes were mixed for 10 s and centrifuged for 5 min at 14 000 rpm (4 °C). 100  $\mu$ L of clear supernatant were transferred to the autosampler vials and 50  $\mu$ L were injected into the system. Detection was performed at 267 nm, the column temperature was maintained at 25 °C. The mobile phase was prepared from 0.01 M potassium dihydrogenphosphate adjusted to pH 3.0 and acetonitrile (85:15). The mobile phase flow rate was 1.5 mL.min<sup>-1</sup>. The analysis was performed on a 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m Inertsil ODS column. No interferences were found during the analysis. The area under the plasma concentration time curve (AUC) was calculated using a trapezoidal rule.

#### Histological examination

After euthanasia, performed by exsanguination from the carotid arteries, the eyes were enucleated together with eyelids and retrobulbar tissues and fixed in 10% formalin. The specimens were dehydrated by a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m in thickness) were stained with haematoxylin & eosin and examined by an experienced pathologist.

#### Grading of toxicity

Clinical evidence of toxicity was classified into four grades according to the anatomical structure. Grade 1 included any signs of toxicity in the periocular orbital con-

tents. Grade 2 was designed as a scleral toxicity, involving the conjunctiva, the sclera and the cornea. Remaining substructures of the rabbit's eye with clinical evidence of topotecan toxicity form grade 3 – ocular toxicity. Grade 4 – systemic toxicity – included all clinical and histological evidence of systemic topotecan toxicity in rabbits. Grades 1 and 2 were usually not considered for dose limiting toxicity. Local topotecan treatment should not be broken in these cases because of minimal effect on visual function. Any grade 3 or grade 4 were designed as dose limiting toxicity.

#### Retinal function evaluation

Electroretinograms (ERGs) were recorded at the beginning and at the end of the experiment in group B. Electroretinographic readings consisted of series of intensities presented under dark- and light-adapted conditions according to the ISCEV protocol. Pupillary mydriasis was induced by instillation of one drop of tropicamide 0.5% (Mydrum, Chauvin Ankerpharm GmbH). After 30 min of dark adaptation, rod ERGs were recorded simultaneously with a skin electrode and direct corneal ERG-jet contact lens electrode. The skin electrode was placed 1 cm behind the lower lid. A skin electrode on the forehead served as a ground. Stimulation and recording of the ERGs were performed with the RETIsan system (Roland Consult, Brandenburg, Germany).

#### Statistical analysis

Average values are represented as means  $\pm$  SD. t-tests for independent groups (Graph Pad Prism 5.03) were used to determine the significance of mean differences.  $P < 0.05$  was considered significant,  $P < 0.01$  was considered very significant.

**Table 1.** Electroretinography recorded before and after the single transcorneal intravitreal injection of 2  $\mu$ g of topotecan. CA a represents wave A of cone activity, CA b means wave b of cone activity, RA responds to rod activity. MSO corresponds to maximal scotopic answer. SD means standard deviation.

EYE		CA a before	CA a after	CA b before	CA b after	RA before	RA after	MSO a before	MSO a after	MSO b before	MSO b after
Right	Median	6.13	7.88	65.45	66.65	41.7	51.55	64.2	41.55	131	139.5
	Maximum	12.3	12.1	75.6	87	56.3	110	86.9	93.90	152	275.0
	Mean	6.70	6.88	64.68	62.75	40.9	52.88	64.98	50.82	131.5	153.8
	SD	4.21	4.99	9.496	22.02	11.69	33.55	13.23	25.72	15.13	64.00
	P-value	0.95		0.85		0.43		0.27		0.45	
Left	Median	7.605	11.92	57.6	82.3	29.55	60.45	63.2	67.50	124	145.5
	Maximum	14.80	389	83.1	128	76.5	194	90.6	128.0	151	292.0
	Mean	7.84	71.8	57.4	79.82	38.65	68.54	65.33	73.52	122.32	154.4
	SD	4.33	155.5	14.83	35.65	20.42	69.32	16.60	34.81	24.25	87.30
	P-value	0.59		0.19		0.34		0.62		0.43	

## RESULTS

### Topotecan concentrations

In both groups in this experiment, the doses were sufficient for achieving the target vitreous concentrations (Fig. 1). The maximum vitreous concentration of topotecan was reached up to 2 h for group A and up to 1 h for group B after drug injection. After steep increase in concentrations, topotecan vitreous levels dropped fast and were under the limit of detection in 24 h in both groups. Mean maximum vitreous concentrations were 0.31 µg/mL in group A and 0.94 µg/mL in group B. These values differed significantly ( $P=0.0006$ ). Conversely, there was no significant difference in mean concentrations reached between group A and group B in 6 h after drug injection ( $P=0.0664$ ). The measured maximal intravitreal concentrations of topotecan in group A and group B were approximately twice lower than the hypothesised topotecan concentrations that were calculated according to the globe diameter (Fig. 2, 3). Mean AUC in vitreous humor was 2.155 µg/mL.h for group A and 5.338 µg/mL.h for group B ( $P=0.0001$ ).

In this experiment, we also measured sufficient concentrations of topotecan in plasma up to 6 h (Fig. 4). The plasma concentration curves have the same profile for both groups. Reached concentrations were lower in plasma than those measured in vitreous humor. In contrary to our expectations, sufficient concentrations of topotecan were obtained from left eyes at 6 h in group B (Fig.5).

### Toxicity

Three right eyes treated with 1 µg of topotecan and 4 right eyes treated with 2 µg of topotecan developed choroidal edema. Additionally, we observed reduction of ganglion cells with focal retinal atrophy in 2 treated and 2 untreated eyes of group B (Fig. 6). A diminution in the size of all retinal cells and their scattering within retinal layers were seen in these eyes of group B (designed as grade 3 – dose limiting toxicity). At the end of this experiment, we noted cataractous changes in 2 treated eyes of each group. One treated eye in group B and 1 untreated eye in group A developed hemorrhage in the vitreous. All eyes of both groups presented with corneal vascularisation around the injection site. This pathologic reaction was not designed as dose limiting toxicity. Histopathological examination of the rabbits' eyes revealed lymphocytic infiltration of 4 left eyelids in group A whereas no pathologic changes were found on the right eyelids in either groups. Mean body weight change did not differ significantly between the two treated groups and all rabbits gained weight regularly throughout the experiment.

### Electroretinogram

Electroretinograms displayed reductions in the dark-adapted (rod-mediated) a-wave amplitudes and light-adapted (cone-mediated) b-wave amplitudes of right eyes in group B. Nevertheless, according to used statistical analysis, these findings were not significant (Table 1). Statistical analysis of ERGs revealed increase of a-wave

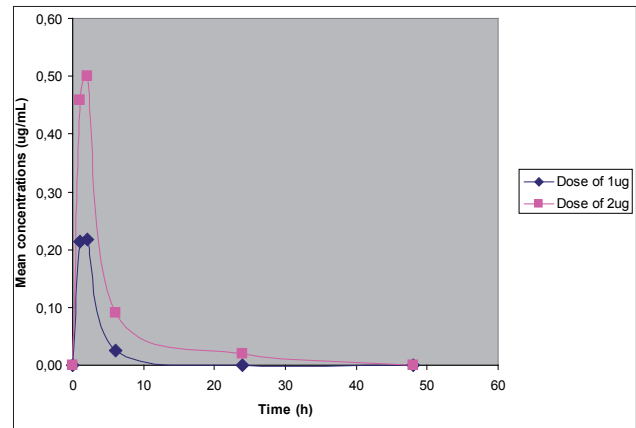


Fig. 4. Plasma levels of topotecan after after transcorneal intravitreal injection of 1 µg (◆) and after transcorneal intravitreal injection of 2 µg (■).

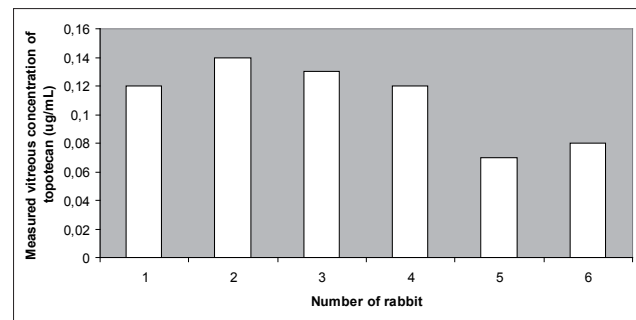
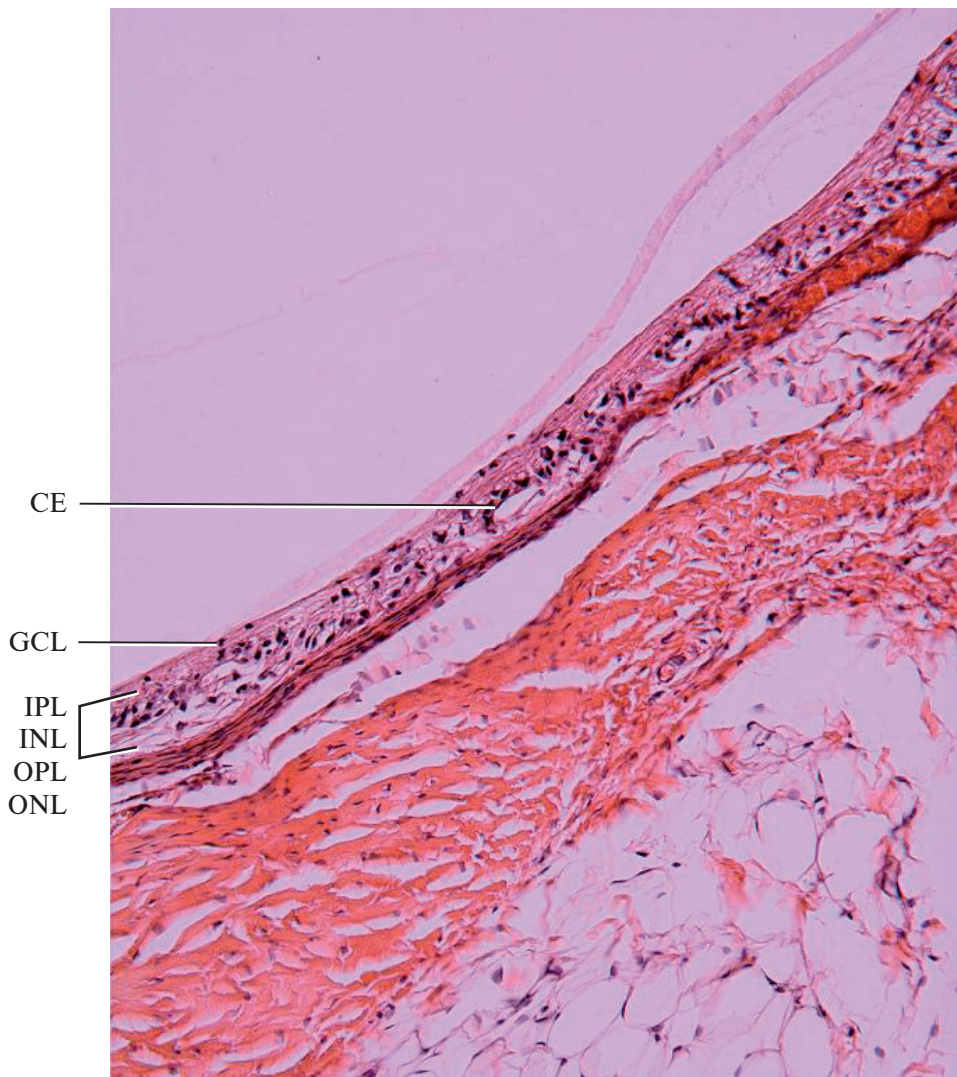


Fig. 5. Vitreous levels of topotecan in left eyes at 6 h after transcorneal intravitreal injection of 2 µg (■) in each rabbit. Only right eyes were injected. Symbols represent individual data points in each rabbit.

and b-wave amplitudes of right eyes. We observed no significant decrease in ERG activity of left eyes at the end of the experiment.

## DISCUSSION

Recently, topotecan was demonstrated to have potent and rapid activity against human retinoblastoma in vitro<sup>20</sup>. Low calculated vitreous concentrations of 0.008-0.13 µg/mL of topotecan were required to reduce Weri or Y79 retinoblastoma cell line viability by 50% within 15 min of exposure. Thus, we can report that in the present study, potentially cytotoxic concentrations were attained in the vitreous humor after the transcorneal intravitreal injection of both 1 µg and 2 µg of topotecan. These doses were five times and two times less than those injected in a previously published experiment<sup>18</sup> but were sufficient to maintain potentially cytotoxic topotecan vitreous humor exposure for up to 6 h. Nevertheless, the higher dose of topotecan delivered transcorneally intravitreally in this study did not significantly prolong exposure time to topotecan. After overcoming the hemato-ocular barrier using transcorneal



**Fig. 6.** Histologic section of retina stained with haematoxylin & eosin. Reduction of ganglion cells in ganglion cell layer (GCL), choroidal edema (CE), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL), outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL).

intravitreal injection, topotecan probably circulated along with the intraocular fluid flow and may have partially drained out of the eye via the trabecular meshwork. The results, measured in the anterior chamber after intravitreal delivery of 5  $\mu\text{g}$  of topotecan<sup>18</sup>, support this explanation.

Calculated topotecan vitreous concentrations were higher than measured concentrations for both groups equally. These differences may have been caused by irregular distribution of topotecan within the vitreous humor. Corresponding with the first published study<sup>18</sup>, using intravitreal topotecan injection, we also observed sufficient concentrations of topotecan in plasma. Contrary to carboplatin, a commonly used chemotherapeutic for retinoblastoma treatment, topotecan does not irreversibly bind local protein to produce inactive complexes that could lead to resistance of tumor cells and to chemotherapy failure<sup>12</sup>. Low affinity to proteins could cause fast clearance of topotecan from the vitreous humor.

One interesting and unexpected finding is that relatively high topotecan vitreous concentrations were attained in untreated left eyes 6 h after the injection of 2  $\mu\text{g}$  of topotecan. As published previously<sup>15-18</sup>, topotecan can traverse the blood-retinal barrier into the vitreous humor or into the systemic circulation. In the present study, 2  $\mu\text{g}$  of topo-

tecans reached sufficient concentrations in plasma and in the contralateral vitreous humor. Data from the untreated eyes after the intravitreal injection of 5  $\mu\text{g}$  of topotecan were not published in the study referred to above<sup>18</sup>. The transscleral approach used in this study<sup>18</sup>, could cause retinoblastoma intraorbital dissemination during drug intravitreal delivery in retinoblastoma patients. Therefore, we used a more difficult approach through the limbus, anterior chamber and peripheral iris. This process of intravitreal injection resulted in minimal bleeding and no retinal detachment even after repeated sampling.

To our knowledge, there is no previously reported information about topotecan side-effects when the drug is administered directly into the vitreous humor. Reduction of ganglion cells with focal retinal atrophy in 2 treated and 2 untreated eyes of group B were found as an adverse side effect of treatment. Consequently, the statistical analysis of electroretinograms displayed insignificant increase of a-wave and b-wave amplitudes of both eyes in group B. We should consider the high intraocular pressure and transient ischemia at the time of topotecan or saline administration that could contribute to this finding. These results are characteristic for initial stages of retinal degeneration after intoxication or hypoxia. Repeated sampling could

lead to decrease in vitreous humor and its replacement by aqueous humor. Fluctuation in intraocular pressure could cause choroidal edema occurrence in most cases. Other observed findings such as corneal vascularization, cataractous changes, vitreous hemorrhage and eyelid inflammation may be the result of repeated mechanical irritation and incautious puncture.

## CONCLUSION

Our findings proved that potentially cytotoxic topotecan concentrations were attained in the vitreous humor of the injected eyes after transcorneal intravitreal delivery. A twofold higher dose of topotecan did not prolong the exposure time to topotecan. Sufficient concentrations of topotecan were also measured in the plasma for both groups. These findings suggest the possibility of attaining potentially cytotoxic concentrations of topotecan in plasma after intravitreal delivery in children but we found no side-effects on the rabbit's body in this experiment. Focal retinal atrophy in 2 treated and 2 untreated eyes of the 6 rabbits was observed after intravitreal delivery of 2 µg of topotecan. Consequently, the ERGs displayed insignificant increase in a-wave and b-wave amplitudes of both eyes in group B. These findings may have been caused by retinal intoxication or hypoxia. No serious histopathological side-effects were noted after transcorneal intravitreal delivery of 1 µg of topotecan. Nevertheless, other histopathological and functional studies are necessary.

## ACKNOWLEDGMENT

To GlaxoSmithKline, England for topotecan donation. Supported by a grant of the Grant Agency of Charles University No. 63008.

## REFERENCES

- Baráková D. Retinoblastom. In: Baráková D, editor. *Nádory oka*. Praha: Grada; 2002. p.132-49.
- Řehůřek J, Aufrata R. Retinoblastom. In: ADAM, Z. – VORLÍČEK J et al. *Speciální onkologie*. Brno: Masarykova univerzita v Brně; 2002. p.261-2.
- Shields CL, Meadows AT, Leahey AM, Shields JA. Continuing challenges in the management of retinoblastoma with chemotherapy. *Retina* 2004;24:849-62.
- Shields CL, Honavar SG, Meadows AT, Shields JA, Demirci H, Singh A, Friedman DL, Naduvilath TJ. Chemoreduction plus focal therapy for retinoblastoma: factors predictive of need for treatment with external beam radiotherapy or enucleation. *Am J Ophthalmol* 2002;133:657-64.
- Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmol* 1999;106:1947-50.
- Hayden BC, Jockovich ME, Murray TG, Voigt M, Milne P, Kralinger M, Feuer WJ, Hernandez E, Parel JM. Pharmacokinetics of Systemic Versus Focal Carboplatin Chemotherapy in the Rabbit Eye: Possible Implication in the Treatment of Retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3644-9.
- Mendelsohn ME, Abramson DH, Madden T, Tong W, Tran HT, Dunkel IJ. Intraocular Concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:1209-12.
- Pochop P, Darsova D, Kukacka J, Tesfaye H, Vajner L, Uhlík J, Kodetova D, Malis J, Dotrelova D. Intravitreal carboplatin concentration and area under concentration versus time curve after intravitreal and periocular delivery. *Europ J Ophthalmol* 2010;20:745-51.
- Schmack I, Hubbard GB, Kang SJ, Aaberg TM, Grossniklaus HE. Ischemic necrosis and atrophy of the optic nerve after periocular carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 2006;142:310-15.
- Abramson DH. Periocular chemotherapy for retinoblastoma: success with problems?. *Arch Ophthalmol* 2005;123:128-9.
- Burris HA, Hanauske AR, Johnson RK, Marshall MH, Kuhn JG, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD. Activity of topotecan, a new topoisomerase I inhibitor, against human tumor colony-forming units in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1816-20.
- Slichenmyer WJ, Rowinsky EK, Donehower RC, Kaufmann SH. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:271-91.
- Santana VM, Zamboni WC, Kirstein MN, Tan M, Liu T, Gajjar A, Houghton PJ, Stewart CF. A pilot study of protracted topotecan dosing using a pharmacokinetically guided dosing approach in children with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:633-40.
- Furman WL, Stewart CF, Kirstein M, Kepner JL, Bernstein ML, Kung F, Vietti TJ, Steuber CP, Becton DL, Baruchel S, Pratt CH. Protracted intermittent schedule of topotecan in children with refractory acute leukemia: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 2002;20:1617-24.
- Chantada GL, Fandiño AC, Casak SJ, Mato G, Manzitti J, Schwartzman E. Activity of topotecan in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2004;25:37-43.
- Carcaboso AM, Bramuglia GF, Chantada GL, Fandiño AC, Chiappetta DA, de Davila MTG, Rubio MC, Abramson DH. Topotecan vitreous levels after periocular or intravenous delivery in rabbits: an alternative for retinoblastoma chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3761-7.
- Tsui JY, Dalgard C, Van Quill KR, Lee L, Grossniklaus HE, Edelhauser HF, O'Brien JM. Subconjunctival topotecan in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:490-6.
- Buitrago E, Höcht CH, Fandiño AC, Navo E, Abramson DH, Schaiquevich P, Bramuglia G. Pharmacokinetic analysis of topotecan after intra-vitreous injection. Implications for retinoblastoma treatment. *Exp Eye Res* 2010;91:9-14.
- Saravanan G, Suryanarayana MV, Balaji N, Someswararao N, Sekhar NM. A stability-indicating LC method for assay of topotecan hydrochloride. *Chromatogr* 2008;67:179-82.
- Laurie NA, Gray JK, Zhang J, Leggas M, Relling M, Egorin M, Stewart C, Dyer MA. Topotecan combination chemotherapy in two new rodent models of retinoblastoma. *Clin Can Res* 2005;11:7569-78.
- Pardue MT, Hejny C, Gilbert JA, Philips MJ, Geroski DH, Edelhauser HF. Retinal function after subconjunctival injection of carboplatin in fibrin sealant. *Retina* 2004;24:776-82.

## Publikace č.5

5 stran textu přílohy





# Retinal toxicity after repeated intravitreal carboplatin injection into rabbit eyes

Pavel Pochop<sup>a</sup>, Denisa Darsova<sup>a</sup>, Jiri Uhlík<sup>b</sup>, Jan Lestak<sup>f</sup>, Jiri Kukacka<sup>c</sup>, Daniela Kodetova<sup>d</sup>, Eva Klappkova<sup>e</sup>, Josef Malis<sup>e</sup>,  
Ludek Vajner<sup>b</sup>

**Background.** The aim of this study was to assess retinal toxicity in a rabbit model after carboplatin delivered as repeated transcorneal intravitreal injection, in order to determine the highest possible safe dose for use in human retinoblastoma "seeding" tumor chemotherapy.

**Methods and Results.** We used six albino rabbits in an *in vivo* experiment and injected 0.008 mg of carboplatin intravitreally (iv) 4 times at two-week intervals. 0.08 mL saline was injected into the left eye. We recorded electroretinograms (ERGs) before the first carboplatin injection and after the fourth injection. Platinum concentration was measured 1 h after the fifth additional injection. We found reduced dark-adapted b-wave amplitudes and, light-adapted b-wave and a-wave amplitudes. The differences between right and left eyes was significant but we found no histopathologic retinal changes.

**Conclusions.** 0.008 mg of carboplatin is probably the highest possible safe dose for the treatment of retinoblastoma patients. Questionable is direct extrapolation of retinal toxicity from the rabbit eye model to the human eye.

**Key words:** carboplatin concentration, electroretinogram, intravitreal seeding, local treatment, rabbit, retinoblastoma

Received: July 13, 2012; Accepted: November 29, 2012; Available online: December 10, 2012  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2012.106>

<sup>a</sup>Department of Ophthalmology for Children and Adults, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Histology and Embryology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague

<sup>c</sup>Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague

<sup>d</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague

<sup>e</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague

<sup>f</sup>Department of Ophthalmology, Clinic of Jan Lestak, Prague

Corresponding author: Pavel Pochop, e-mail: [pavel.pochop@gmail.com](mailto:pavel.pochop@gmail.com)

## INTRODUCTION

Retinoblastoma is a childhood cancer arising from immature retinal cells in one or both eyes. Chemotherapeutics are used in treatment but vitreous seeding is a serious limiting factor in retinoblastoma therapy. Various modalities to increase intravitreal concentrations of chemotherapeutics have been tested, for example, coulomb-controlled iontophoresis<sup>1</sup>, peribulbar administration<sup>2</sup>, cryotherapy one day before intravenous carboplatin with or without cyclosporine<sup>3</sup> etc. Some are too complex for clinical practice or vitreous concentrations of chemotherapeutic do not reach effective levels and are unstable<sup>1</sup>. Another described treatment is intravitreal transscleral injection of chemotherapeutic agent<sup>4,5</sup>. No serious complications have been found to date but tumor dissemination in human retinoblastoma was demonstrated by subsequent fine needle biopsy or pars plana vitrectomy<sup>6</sup>. Hence, some physicians used a more difficult approach through the limbus, anterior chamber and peripheral iris for fine needle aspiration biopsy to avoid seeding tumor cells into orbital tissues<sup>7-9</sup>. This approach was also used in this experiment. We assessed possible retinal changes after transcorneal intravitreal carboplatin injection which would preclude its use in clinical practice. We chose the rabbit and we selected a dose of 0.008 mg

according to previously published data<sup>10,11</sup>, where a dose of 0.001 mg induced no changes on electroretinograms (ERGs) and a dose of 0.01 mg evoked significant alterations. The dose we chose was near the upper limit in order to achieve the most effective concentration.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and drug delivery

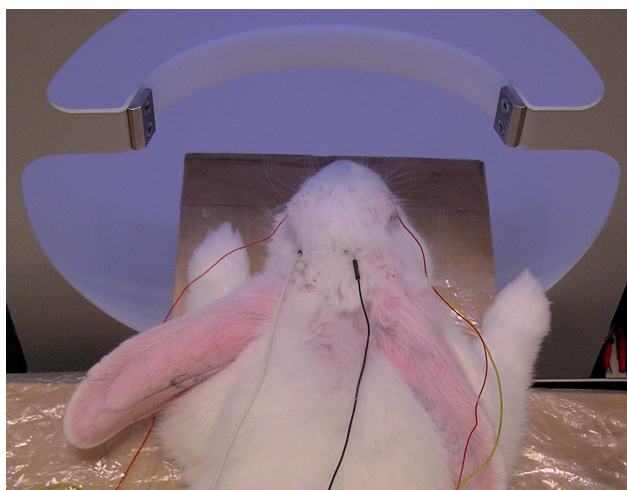
After approval by the Faculty Committee on animal welfare, New Zealand albino male specified pathogen-free (SPF) healthy rabbits (Anlab, Prague, Czech Republic) (n = 6) received a 0.008 mg dose of carboplatin dissolved in 0.08 mL of saline by unilateral transcorneal intravitreal injection into the right eye. The same volume of saline was injected into the left eye of each animal as a sham control. The same procedure was carried out 4 times at two-week intervals. Rabbits were kept under standard laboratory conditions. Ambient temperature was 20–24 °C, and relative air humidity ranged from 55–60%. They were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (50 mg/kg, Narketan 10 a.u.v. inj, Vétoquinol, Lure Cedex, France) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg, Rometar 2% a.u.v. inj, Spofa, Prague, Czech Republic) given intramuscularly (im) before the intervention. Topical oxybu-

procaine anesthetic eyedrops (0.4%, Benoxi gtt., Unimed Pharma, Bratislava, Slovakia) were instilled into the conjunctival sacs and the eyelids were fixed with a sterile speculum. A total of 3 mL of 1% povidoneiodine solution (10% Betadine, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Hungary) was used for disinfection. Two months after the first injection of carboplatin, all rabbits were euthanized by exsanguination via the carotid arteries under general anaesthesia and their eyes were processed for histopathologic examination.

Electroretinograms (ERGs) were recorded before the first and 2 weeks after the fourth injections. Electroretinographic readings consisted of a series of intensities presented under dark and light-adapted conditions according to the ISCEV protocol. Pupillary mydriasis was induced by instillation of one drop of tropicamide 0.5% (Mydrum, Chauvin Ankerpharm GmbH, Germany). After 30 min of dark adaptation, ERGs were recorded simultaneously with a skin electrode and direct corneal ERG-jet contact lens electrode<sup>12</sup>. The skin electrode was placed 1 cm behind the lower lid (Fig. 1). A skin electrode on the forehead served as a ground. Stimulation and recording of the ERGs were performed with the RETIscan system (Roland Consult, Brandenburg, Germany). The rod (scotopic) ERG was recorded with a white flash at an intensity of 0.01 cd.s.m<sup>-2</sup> and for maximal scotopic answer an intensity of 3.0 cd/m<sup>2</sup>.s. The cone (photopic) ERG was recorded with the same stimuli intensities (3.0 cd/m<sup>2</sup>.s) and background illumination of 30 cd/m<sup>2</sup>. Statistical analysis was done using the software Statistica 9.1 WAN (StatSoft, Tulsa, USA). Data were compared using a t-test.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### Carboplatin concentration measurement

To measure the platinum concentration, an additional, i.e. fifth, dose of the carboplatin was injected into the right eyes after the second ERG. Samples of vitreous humour were collected one hour later to verify the concentration of carboplatin in the vitreous cavity. Electrothermal



**Fig. 1.** Corneal ERG-jet contact lens electrode and skin electrode behind lower lid.

atomic absorption spectrometry (ET-AAS) was employed to analyze the total platinum concentrations in vitreous humour after the last administration as a suitable method for carboplatin concentration determination. ET-AAS determines total Pt in fluids or tissues, including any forms of the drug subject to hydrolytic action and subsequently inactivated by irreversible binding to protein and thus rendered inactive and not cytotoxic. The platinum concentration was measured by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry with Zeeman background correction (Varian 220 Z, Australia). 100  $\mu$ L of vitreous humour was diluted 1:14 with a solution containing Triton X-100 (0.2 vol %), antifoam A (0.2 vol %), and deionized water. A programmable sample dispenser piped the samples and calibration standard into the furnace. Platinum determination was carried out by the standard additions method. The highest possible concentrations of carboplatin immediately after its administration were calculated according to the globe diameter.

## RESULTS

All animals were followed up during the experimental period by a veterinarian. No treatment-induced weight changes were found as a sign of the general toxicity of carboplatin. One animal perished suddenly during general anaesthesia before the fourth carboplatin administration. Its gross dissection showed no other cause of death. We found no structural changes on histopathologic examination of the eyes.

Statistically significant reductions in the dark-adapted b-wave (ra - b) amplitudes and in the maximal scotopic answer (msa - b) amplitudes and also elevation of cone answer (Fig. 2, Tables 1 and 2) were found in carboplatin treated eyes. We also found statistically significant changes in ra - b, msa - a, msa - b and ca - b waves in the ERGs records of control eyes (Tables 1 and 3). There were no structural changes on histopathologic examination. The measured average platinum concentration one hour after additional injection was 1349  $\mu$ g/L. The calculated highest possible average concentration of carboplatin according to the globe diameters was 8422  $\mu$ g/L immediately after application of 0.008 mg of carboplatin.

## DISCUSSION

We found significant changes in the ERG records after repeated injection of 0.008 mg of carboplatin into right eyes. Similar but more serious changes were found after single intraocular injection of higher dose (more than 0.01 mg) of carboplatin<sup>10</sup>. Repeated intraocular injection of 0.05 mg of carboplatin resulted in serious ERG changes and also structural changes – chorioretinal atrophy found by histopathologic examination<sup>11</sup>. Similar ERGs changes (elevation in ca - a) were also recorded after lead exposure<sup>13</sup>.

Due to the effect of carboplatin on right eyes, changes in ERG records were significantly different to changes

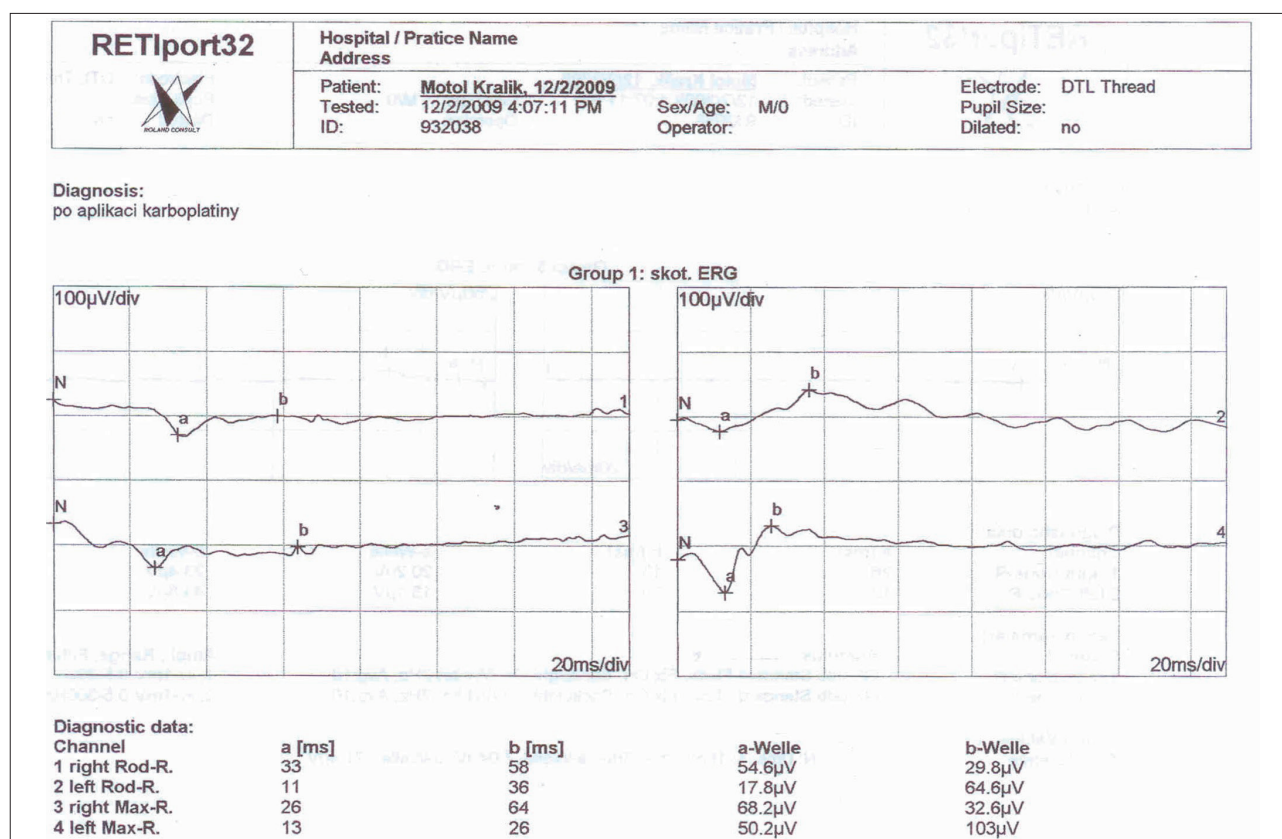


Fig. 2. ERG - Rabbit No. 932038 - Right eye after administration of the carboplatin.

Table 1. ERGs before and after administration of carboplatin (right eyes) and saline (left eyes).

Rabbit No.	ra - b (µV)	msa - a (µV)	msa - b (µV)	ca - a (µV)	ca - b (µV)	category
932038	132	108	230	5	87	right b
931018	91	105	114	2.8	81.2	right b
932012	132	139	233	5.8	59	right b
902035	52.7	87	145	0.8	25.2	right b
932337	94	84.5	212	1.4	48.5	right b
932038	29.8	68.2	32.6	20	23.4	right a
931018	6.79	93.8	30.5	29.8	9.7	right a
932012	3.32	117	88.7	32	18.8	right a
902035	9.42	69.8	25.8	30.8	2.32	right a
932337	1	62	33.2	11.8	13	right a
932038	99	85	199	1	76	left b
931018	73	73.5	96	5.2	65.7	left b
932012	72.6	90	140	4.68	64	left b
902035	69	78	158	3.34	46.5	left b
932337	72	40	130	0.9	46.6	left b
932038	64.6	50.2	103	13.1	44.8	left a
931018	34.1	24.3	52.5	2.79	27.5	left a
932012	35.2	30.5	70.1	2.7	39.9	left a
902035	29.5	72.3	81.3	6.51	34.2	left a
932337	23.7	21.5	47.5	6.77	37.1	left a

Legend:

Rabbit No. = rabbit number

ra - b = rod answer, wave b

msa = maximal scotopic answer

ca = cone answer

right b = right eye before administration

right a = right eye after administration

left b = left eye before administration

left a = left eye after administration

**Table 2.** Right eyes before and after administration of carboplatin.

	mean right b	mean right a	SD right b	SD right a	P
ra - b	100.3400	9.90600	33.17270	11.14920	0.000415*
msa - a	104.7000	82.16000	21.84491	22.93138	0.150185***
msa - b	186.8000	42.16000	54.04350	26.17848	0.000657*
ca - a	3.1600	24.88000	2.18815	8.72995	0.000649*
ca - b	60.1800	13.44400	25.11259	8.15118	0.004188*

\*P<0.01

\*\*\* neglectable

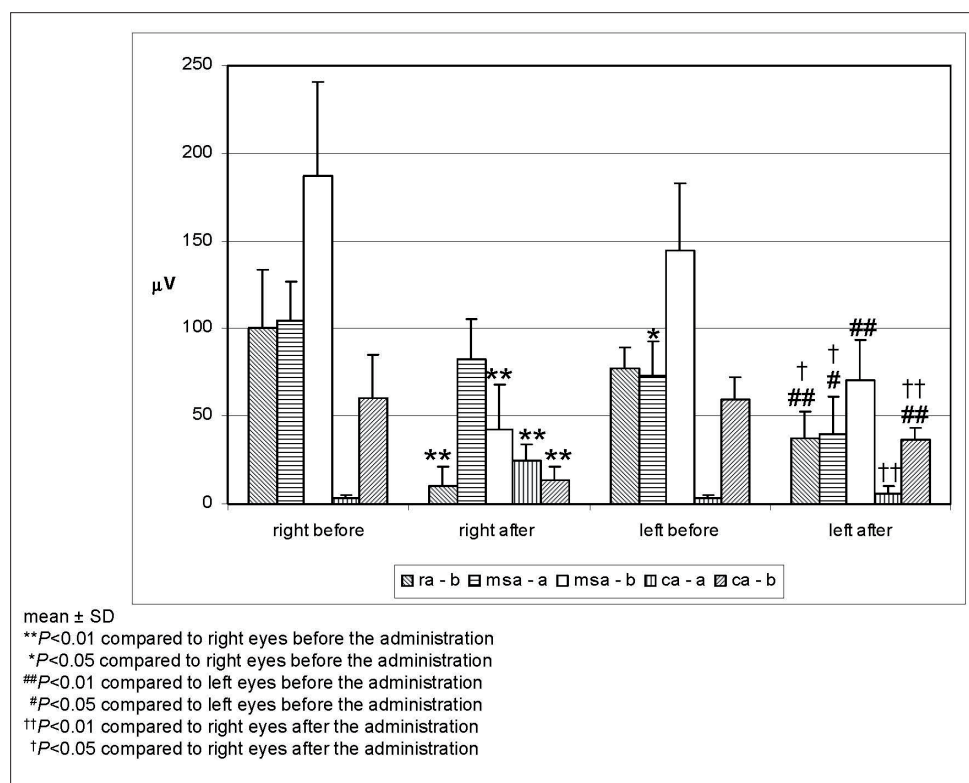
**Table 3.** Left eyes before and after administration of saline.

	mean left b	mean left a	SD left b	SD left a	P
ra - b	77.1200	37.30000	12.33175	15.59920	0.002062*
msa - a	73.3000	39.76000	19.66469	21.36605	0.032478**
msa - b	144.6000	70.88000	37.86555	22.50182	0.005685*
ca - a	3.0240	6.37400	2.01154	4.23550	0.148806***
ca - b	59.7600	36.70000	12.90360	6.45949	0.007258*

\*P<0.01

\*\*P<0.05

\*\*\*neglectable



**Fig. 3.** Mean values of ERG before and after administration of carboplatin.

in ERGs of left eyes (Fig 3). Changes in ERGs, which were recorded in left eyes, may be caused by high intraocular pressure and transient ischemia during injection of saline<sup>14</sup>.

All changes are probably reversible and depend on the period of intraocular pressure increase<sup>15</sup> during intravitreal injection of carboplatin and saline. Recovery of visual functions was expected as we found no structural changes

on histopathologic examinations but an extended period of time for recovery was probably necessary<sup>16</sup>.

## CONCLUSION

Intravitreal delivery of 0.008 mg of carboplatin resulted in damage to retinal function but not structure. Thus, the changes are probably transient. The dose of carboplatin we used is probably the highest possible for the treatment of retinoblastoma patients. Questionable is, of course, the direct extrapolation of retinal toxicity from the rabbit eye model to the human eye.

## REFERENCES

- Hayden BC, Jockovich ME, Murray TG, Voigt M, Milne P, Kralinger M, Feuer WJ, Hernandez E, Parel JM. Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in rabbit eyes: possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3644-9.
- Mendelsohn ME, Abramson DH, Madlen T, Tong W, Tran HT, Dukel J. Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol* 1998;116:1209-12.
- Wilson TW, Chan HSL, Moselhy GM, Heydt DD Jr, Frey CM, Gallie BL. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by cryotherapy and cyclosporine in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1390-5.
- Kaneko A, Suzuki S. Eye-Preservation Treatment of Retinoblastoma with Vitreous Seeding. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:601-7.
- Velez G, Yuan P, Sung C, Tansey G, Reed GF, Chan CC, Nussenblatt RB, Robinson MR. Pharmacokinetics and Toxicity of Intravitreal Chemotherapy for Primary Intraocular Lymphoma. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1518-24.
- Shield JA, Shields CL. *Intraocular Tumors: A Text and Atlas*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co. 1992:305-91.
- Pochop P, Darsova D, Kukacka J, Tesfaye H, Vajner L, Uhlik J, Kodetova D, Malis J, Dotrelova D. Intravitreal carboplatin concentration and area under concentration versus time curve after intravitreal and periocular delivery. *Eur J Ophthalmol* 2010; 20:745-51.
- Cohen VM, Shields CL, Fruta M, Shields JA. Vitreous Seeding From Retinal Astrocytoma in Three Cases. *Retina* 2008;28:884-8.
- Karcioglu ZA. Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) for Retinoblastoma. *Retina* 2002;22:707-10.
- Harbour JW, Murray TG, Hamasaki D, Ciciarelli N, Hernández E, Smith B, Windle J, O'Brien JM. Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:1892-8.
- Pochop P, Darsova D, Uhlik J, Lestak J, Kukacka J, Kodetova D, Vajner J, Malis J, Dotrelova D. Evaluation of retinal toxicity of carboplatin after repeated transcorneal intravitreal injection. In: Monduzzi editor. *Proceedings of the 8th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics – ISOPT, Rome, Italy, 2009 3-6 December; Bologna; 2009*. p. 155-161.
- Pradue MT, Hejny C, Gilbert JA, Phillips MJ, Geroski DH, Edelhauser HF. Retinal function after subconjunctival injection of carboplatin in fibrin sealant. *Retina* 2004; 24:776-82.
- Rothenberg SJ, Schnaas L, Salgado-Valladares M, Casanueva E, Geller AM, Hudnell HK, Fox DA. Increased ERG a- and b-Wave Amplitudes in 7- to 10-Year-Old Children Resulting from Prenatal Lead Exposure. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2036-44.
- Kremmer S, Tolksdorf-Kremmer A, Stodtmeister R. Simultaneous registration of VECF and pattern ERG during artificially raised intraocular pressure. *Ophthalmologica* 1995;209:233-41.
- Zhao H, Ai Y, Niu C, Guan W, Li X, Qin L. Research on Influences of Transient High IOP during LASIK on Retinal Functions and Ultrastructure. *J Ophthalmol*. 2009;2009:230528.
- Polito A, Cereda M, Romanelli F, Pertile G. Macular translocation with 360 degrees retinotomy for management of retinal pigment epithelial tear: long-term results. *Br J Ophthalmol* 2010;95:74-8.

**Publikace č.6**

8 stran textu přílohy

Reprinted from:

**8th International Symposium  
on Ocular Pharmacology  
and Therapeutics**

**ISOPT**

Rome (Italy), December 3-6, 2009

**MEDIMOND**

**INTERNATIONAL PROCEEDINGS**

# Evaluation of retinal toxicity of carboplatin after repeated transcorneal intravitreal injection

Pochop P. (1), Darsova D. (1), Uhlik J. (2), Lestak J. (6), Kukacka J. (3), Kodetova D. (4), Vajner L. (2), Malis J. (5), and Dotrelova D. (1)

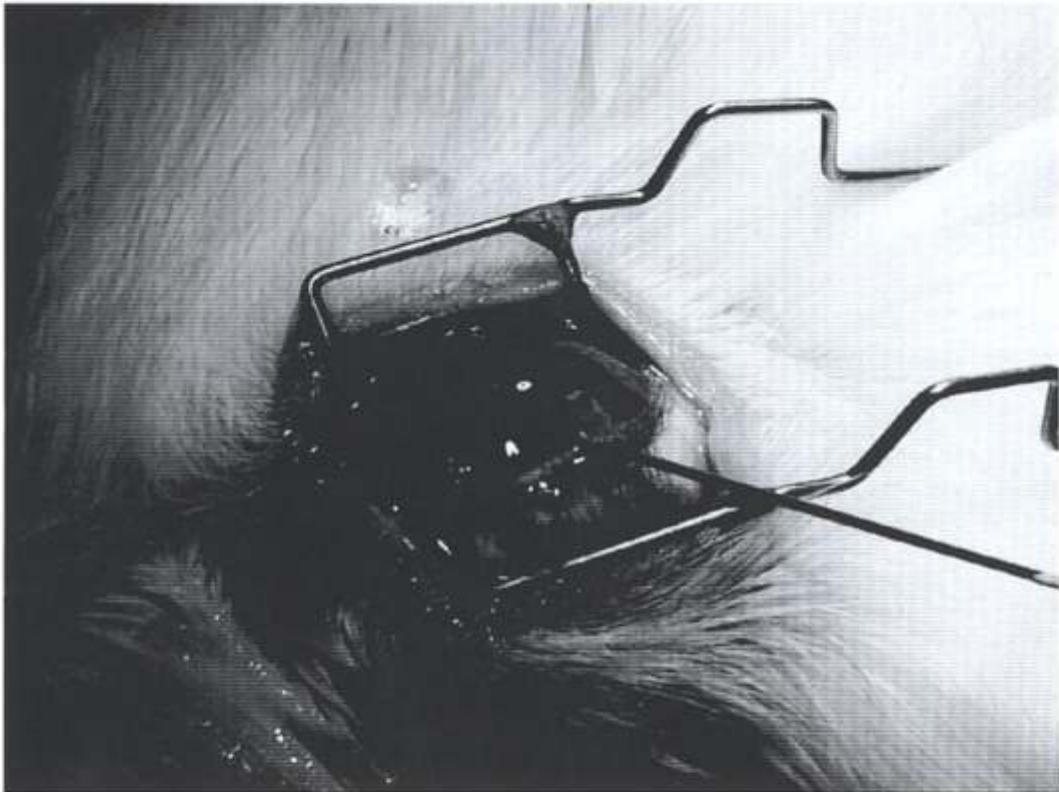
1 – Department of Ophthalmology for Children and Adults, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, 2 – Department of Histology and Embryology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, 3 – Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, 4 – Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, 5 – Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, 6 - Department of Ophthalmology, Clinic of Jan Lestak, Prague, Czech Republic

## Summary

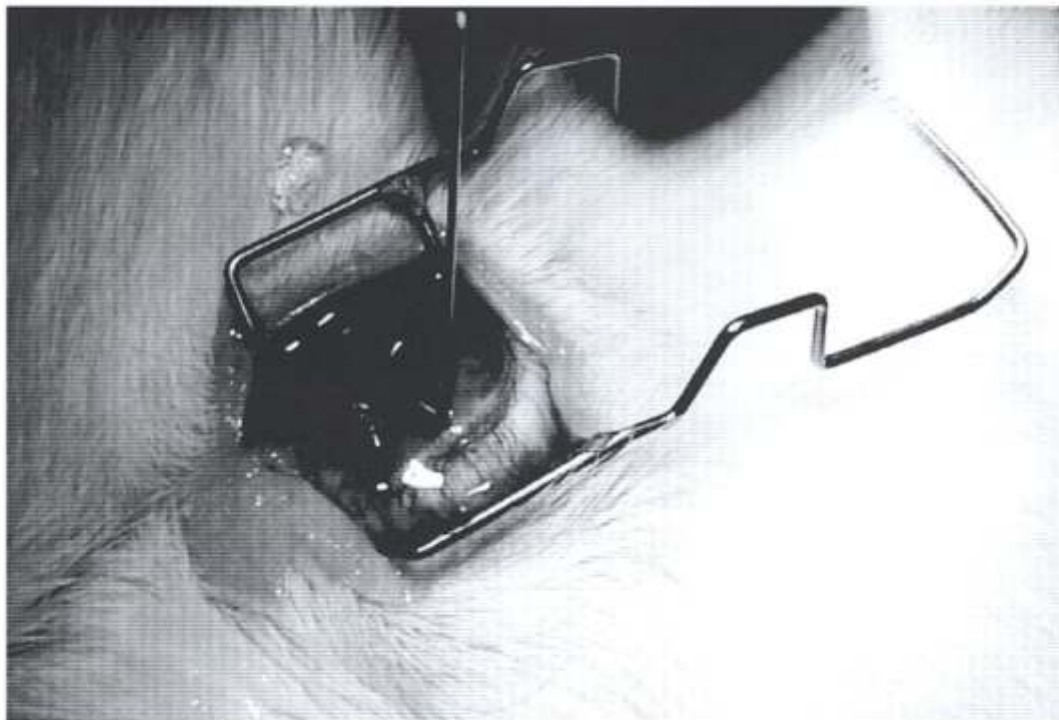
Six albino rabbits were included in an *in vivo* experiment. Transcorneal intravitreal administrations of carboplatin in healthy albino rabbits were used as a model for possible clinical use in human intraocular retinoblastoma “seeding” tumor chemotherapy. We administrated 0.05 mg dose of carboplatin intravitreally three times at two-week intervals. Electroretinograms (ERGs) were recorded before first administration of carboplatin and after last injection when also platinum concentration was measured. Reductions in the dark-adapted b-wave amplitudes and in the light-adapted b-wave and a-wave amplitudes and chorioretinal atrophy were noted after treatment. We considered administered amount of carboplatin probably too high for treatment of retinoblastoma patients.

## Introduction

Several modalities for treatment of retinoblastoma with vitreous seeding were described. One of the described types was intravitreal transscleral injection of chemotherapeutic agents (1,2). No serious complications were found, but tumor dissemination in human retinoblastoma was demonstrated by subsequent fine needle biopsy or pars plana vitrectomy (3). According to this reasoning, some authors used a more difficult approach through the limbus, anterior chamber and peripheral iris for fine-needle aspiration biopsy to avoid seeding of tumor cells to the orbital tissues (4,5). This approach was also used in this experiment (Fig. 1,2).



*Fig. 1: Penetration of the cornea through the limbus.*



*Fig. 2: Rotation of the needle and penetration of the iris basis.*



Tab 1

Tab. 1 - Vitreal concentrations after administration of 0.05 mg of carboplatin	
Rabbit's sort	1 h. after adm.
Rabbit No. 1	18976 µg/l
Rabbit No. 2	-
Rabbit No. 3	3260 µg/l
Rabbit No. 4	24455 µg/l
Rabbit No. 5	6335 µg/l
Rabbit No. 6	14784 µg/l

## Materials and Methods

After approval by our committee on animal welfare, healthy albino rabbits ( $n = 6$ ) received a 0.05 mg dose of carboplatin by unilateral transcorneal intravitreal injection into the right eyes. The same volume of sterile water (0.1 ml) was injected into the left eye of each subject as a control against the right eye. Identical injections were repeated three times at two-week intervals. ERGs were recorded before the first and after the last injections.

Flameless atomic absorption spectroscopy was employed to analyze the total platinum concentrations in vitreous humour after the last administration (Tab 1) as a suitable method for carboplatin bioavailability determination. The platinum concentration was measured by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry with Zeeman background correction (Varian 220 Z, Australia). 100 µl of vitreous humour was diluted 1:14 with solution containing Triton X-100 (0.2 vol %), antifoam A (0.2 vol %), and deionized water. A programmable sample dispenser piped the samples and calibration standard into the furnace. Platinum determination was carried out by the standard additions method. Carboplatin concentration was calculated from platinum concentration and molecular weights.

Electroretinographic readings consisted of series of intensities presented under dark- and light-adapted conditions according to the ISCEV protocol. Pupillary mydriasis was induced by instillation of one drop of tropicamide 0.5% (Mydrum, Chauvin Ankerpharm GmbH). After 30 min of dark adaptation, rod ERGs were recorded simultaneously with a skin electrode and direct corneal ERG-jet contact lens electrode(6). The skin electrode was placed 1 cm behind the lower lid (Fig. 3). A skin electrode on the forehead served as a ground. Stimulation and recording of the ERGs were performed with the RETiscan system (Roland Consult, Brandenburg, Germany).

After 2 months, all rabbits were euthanatised by exsanguination via the carotid

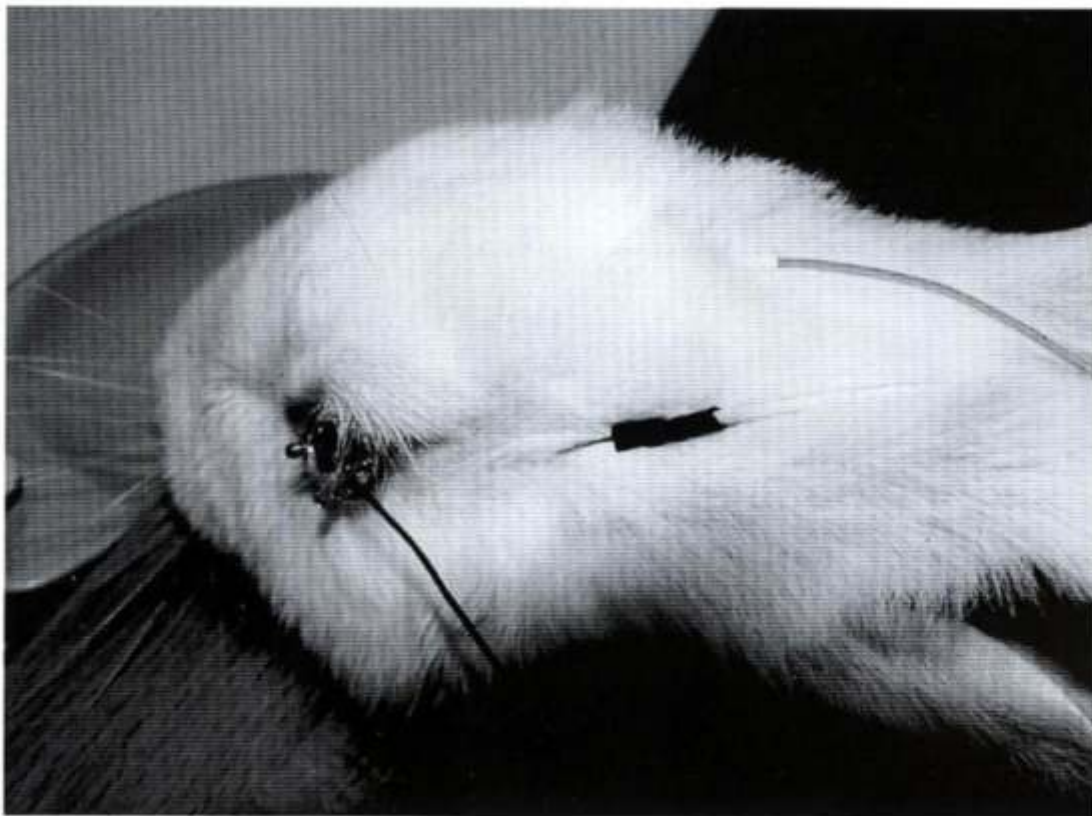


Fig. 3: Corneal ERG-jet contact lens electrode and skin electrode behind lower lid.

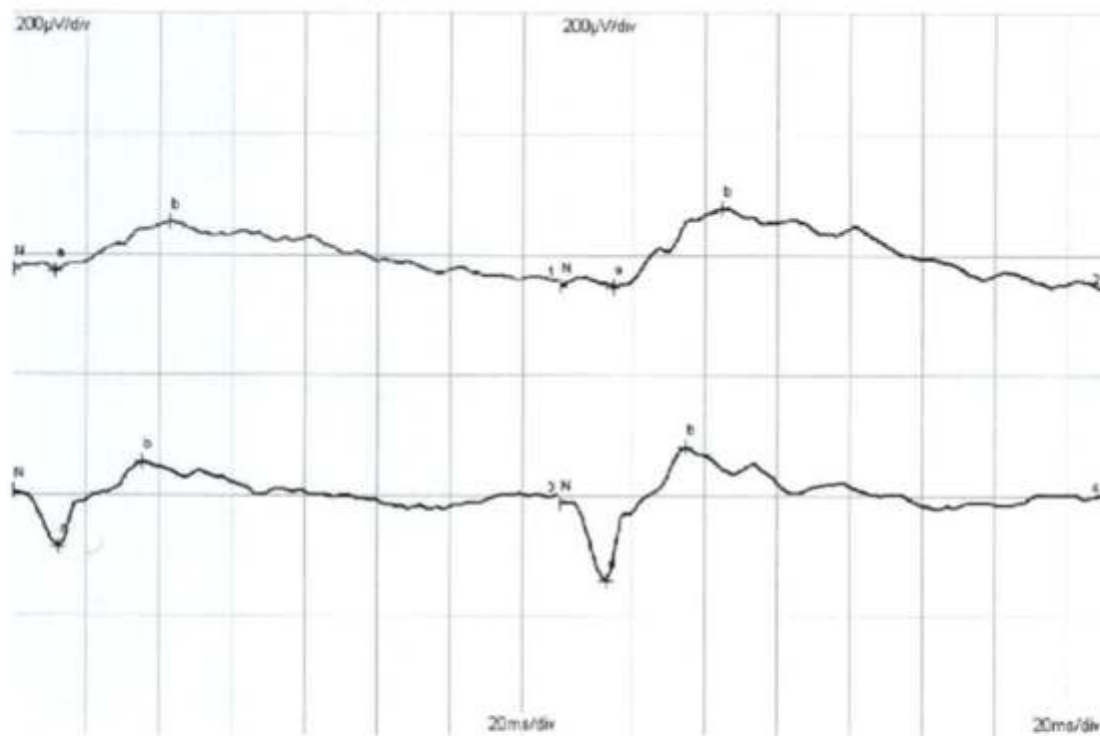


Fig. 4: ERG – Rabbit 3. Right eye before administration of the carboplatin.

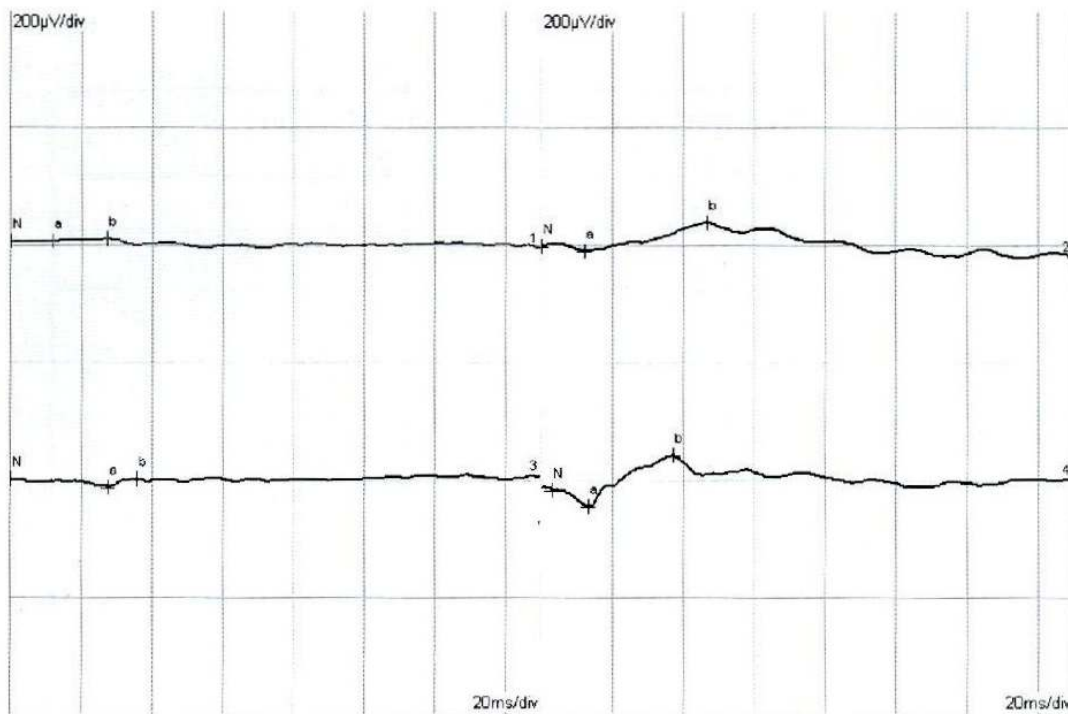


Fig. 5: ERG – Rabbit 3. Right eye after administration of the carboplatin.

arteries under general anaesthesia and their eyes were processed for histopathologic examination.

## Results

Reductions in the dark-adapted b-wave amplitudes and in the light-adapted b-wave and a-wave amplitudes (Fig. 4,5) were noted after treatment of eyes with carboplatin in five cases (Tab. 2). One animal perished during general anaesthesia. Only subtle changes were recorded in the left eyes, maybe caused by high intraocular pressure and transient ischemia during administration of sterile water. Focal chorioretinal atrophy (Fig. 6) was found as an adverse side effect of therapy in the right eyes. Simile changes were found after single administration of higher concentration of carboplatin (7).

## Conclusion

Intravitreal deliveries of 0.05 mg of carboplatin have a toxic effect on retinal function and structure. As it turns out, the administered concentration of carboplatin is probably too high for treatment of retinoblastoma patients.

## Acknowledgements

We thank the sponsors: supported by Grant of the Ministry of Health No. 9532-3/2007

Tab 2

Tab. 2 – Electroretinography before and after intravitreal administration of carbonlatin					
before/after administration ( $\mu$ V)					
Rabbit's sort	eye	r. a. (wave b)		m. s. a. (wave a/b)	
Rabbit No. 1	right	58.2	42.4	55/130	15.4/17.4
	left	81	72	91/148	86.1/138
Rabbit No. 2	right	83.7		81/147	
	left	79.6		76.5/139	
Rabbit No. 3	right	80.2	4.82	91/141	13.6/14.5
	left	131	49.6	126/221	29/87.2
Rabbit No. 4	right	126	12.2	125/227	8.5/20.3
	left	155	39.5	50/101	22/82
Rabbit No. 5	right	56.6	6.3	40/129	57/70
	left	66.1	73	36.6/121	76/139
Rabbit No. 6	right	128	23.5	96.5/188	10/35.9
	left	93.8	61	77.4/158	58/96



Fig. 6: Reduction of ganglion cells with small cystoid spaces in the inner nuclear layer of the retina

## References

1. Kaneko A, Suzuki S. Eye-Preservation Treatment of Retinoblastoma with Vitreous Seeding. *Jpn J Clin Oncol.* 33:601-607, 2003
2. Velez G, Yuang P, Sung C et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Intravitreal Chemotherapy for Primary Intraocular Lymphoma. *Arch Ophthalmol.* 119:1518-1524, 2001
3. Shield JA, Shields CL. Intraocular Tumors: A Text and Atlas. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co. 1992:305-391.
4. Cohen VML, Shields CL, Fruta M et al. Vitreous Seeding From Retinal Astrocytoma in Three Cases. *Retina.* 28: 884-888, 2008
5. Karcioglu ZA. Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) for Retinoblastoma. *Retina.* 22:707-710, 2002
6. Pradue, M.T. Hejny C., Gilbert J.A. et al.: Retinal function after subconjunctival injection of carboplatin in fibrin sealant. *Retina.* 24:776-82, 2004
7. Harbour, J.W., Murray, T.G., Hamasaki, D., et al: Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37(9):1892-8, 1996