

# Коррекция токсичности циклофосфана гепатопротекторами полифенольной природы

*Саратиков А.С., Раткин А.В., Фролов В.Н., Чучалин В.С.*

## Correction of cyclophosphan toxicity by polyphenolic hepatoprotectors

*Saratikov A.S., Ratjkin A.V., Frolov V.N., Chuchalin V.S.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Саратиков А.С., Раткин А.В., Фролов В.Н., Чучалин В.С.

В экспериментах на крысах исследована эффективность гепатопротекторов лохеина, максара и карсила при повреждении печени циклофосфаном. Гепатопротекторы снижают общую токсичность цитостатика, уменьшают некроз гепатоцитов и клеточную инфильтрацию паренхимы печени, вызывают регресс гиперминотрансфераземии, гипербилирубинемии, стимулируют конъюгацию билирубина, нормализуют содержание белка в крови. Локеин наиболее эффективно препятствует развитию морфологических нарушений в печени и восстанавливает большинство биохимических нарушений при интоксикации циклофосфаном.

**Ключевые слова:** гепатопротекторы, локеин, максар, карсил, циклофосфан.

Efficiency of lokhein, maksar and karsil hepatoprotectors in the treatment of cyclophosphan damaged liver has been investigated. Hepatoprotectors decrease the overall cytostatic toxicity, reduce the hepatocyte necrosis and the cell infiltration of liver parenchyma, cause the hyperaminotransferase and hyperbilirubin regression, stimulate the bilirubin conjugation and normalize the protein content in blood. Lokhein prevents most efficiently the development of morphologic disturbances in liver and recovers most of biochemical abnormalities at cyclophosphan intoxication.

**Key words:** hepatoprotectors, lokhein, maksar, karsil, cyclophosphan.

**УДК 615.24:615.9**

### Введение

Циклофосфан (ЦФ) является широко применяемым и эффективным алкилирующим цитостатическим средством при различных онкологических заболеваниях. Однако наряду с высокой эффективностью ЦФ обладает значительной гепатотоксичностью [5, 12, 16, 19], что обусловлено образованием токсических продуктов, особенно акролеина, в процессе его метаболизма. ЦФ вызывает у лабораторных животных геморрагические, фиброзные, атрофические, некротические изменения и жировую инфильтрацию печени, снижение содержания в печени цитохромов P-450 и b<sub>5</sub>, истощение внутриклеточных запасов восстановленного глутатиона с последующим повреждением всей системы антиоксидантной защиты гепатоцитов, что ве-

дет к интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) с последующим повреждением мембранных структур гепатоцитов [4, 13, 15, 17]. У онкологических больных лечение ЦФ может сопровождаться структурными и метаболическими нарушениями в ткани печени [9, 11, 14, 18, 20].

Гепатотоксичность ЦФ, как и других цитостатиков, в основном зависящая от интенсификации процессов ПОЛ, определяет перспективность использования в комплексной противоопухолевой химиотерапии гепатопротекторов, обладающих антиоксидантным действием. В эксперименте и клинике показана эффективность легалона, эссенциале и полифитохола при поражениях печени, вызванных циклофосфаном, метотрексатом, доксорубицином, адриамицином, цисплатином [1, 8, 10].

Нами исследована эффективность оригинальных отечественных гепатопротекторов, разработанных кафедрами фармакологии и фармацевтической технологии СибГМУ совместно с Тихоокеанским институтом биоорганической химии СО РАН — лохеина (экстракт солянки холмовой), содержащего полифенолы, сапонины, стерингликозиды, аминокислоты и бетаин (патент РФ  $\kappa$  2046604), и максара (комплекс полифенолов древесины маакии амурской), содержащего изофлавоны и стильбены (патент РФ  $\kappa$  2104027), в сравнении с референтным гепатопротектором карсилом при повреждении печени циклофосфаном в эксперименте.

Механизм терапевтического влияния лохеина и максара обусловлен благоприятным действием на нарушенные метаболизм, функцию и структуру печени. Препараты являются прямыми ингибиторами свободнорадикальных реакций и уменьшают образование токсических продуктов ПОЛ, нормализуют содержание восстановленного глутатиона, препятствуют образованию детергентных лизофосфатидов и способствуют сохранению высокого содержания в мембранах гепатоцитов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, противодействуют накоплению триацилглицеролов и формированию распространенного стеатоза паренхимы печени, стимулируют регенерацию, экскреторную функцию гепатоцитов и глюкуронирование билирубина, повышают каталитическую активность цитохрома P-450 и конъюгацию ксенобиотиков с восстановленным глутатионом [2, 7].

## Материал и методы

Эксперименты проведены в осенне-зимний период на 56 беспородных белых крысах-самцах массой 200–240 г, содержащихся в виварии при естественном световом режиме на стандартной диете со свободным доступом к воде. Животные были разделены на 5 групп: I — интактные крысы ( $n = 8$ ); II (контроль) — животные, получавшие ЦФ ( $n = 18$ ); III—V — крысы, получавшие гепатопротекторы на фоне ЦФ ( $n = 10$  в каждой группе). Крысам II—V групп в течение 10 дней ежедневно вводили внутривенно по 20 мг/кг ЦФ (1/10 ЛД<sub>50</sub>), животные III—V групп получали перораль-

но гепатопротекторы лохеин или карсил в эффективной дозе 200 мг/кг в виде суспензии на 1%-й крахмальной слизи. Животные контрольной (II) группы получали эквивалентное количество растворителя. Через сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали под эфирным наркозом. Терапевтическую эффективность гепатопротекторов оценивали по их влиянию на выживаемость животных, морфологические и биохимические показатели печени и сыворотки крови. Ткань печени фиксировали 10%-м нейтральным формалином, заливали в парафин с последующей окраской гематоксилином и эозином. Подсчитывали количество некротизированных и двухъядерных гепатоцитов. В сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), содержание билирубина, общих липидов с помощью наборов производства фирмы «Lachema» (Чехия); активность щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрацию белка, глюкозы — с помощью наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск); содержание продуктов перекисного окисления липидов — диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) — с помощью набора по параметрическому

$t$ -критерию Стьюдента с определением средней арифметической ( $M$ ) и ее стандартной ошибки ( $m$ ). Оценку нормальности распределения вариант в выборках проводили по критерию Колмогорова—Смирнова. Анализ данных выполнен с использованием программы Statistica 5.0 for Windows.

## Результаты и обсуждение

В группе крыс, получавших ЦФ ( $n = 18$ ), летальность составила 44%. У животных была резко нарушена структура печеночных долек и печеночных триад. Просвет синусоидных капилляров расширен, эндотелиальные клетки набухшие и часто закрывали просвет многих гемокапилляров. Имелись очаги мелких диапедезных кровоизлияний, междольковые желчные капилляры местами разорваны. Многие гепатоциты уменьшены в размерах, преимущественно за счет цитоплазмы (рис. 1).

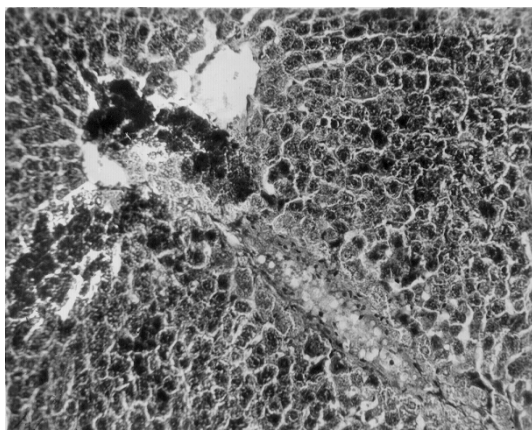


Рис. 1. Печень крысы после внутрибрюшинного введения 20 мг/кг циклофосфана в течение 10 дней. Дискомплексированные печеночные балки, разрыв синусоидов, расширенные вокругсинусоидные пространства, очаги некроза паренхимы, вакуоли в цитоплазме гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250

Коррекция гепатопротекторами токсического действия циклофосфана ( $M \pm m$ )

| Показатели                                             | Интактные<br>( $n = 8$ ) | Циклофосфан<br>( $n = 10$ ) | Циклофосфан +          |                        |                        |
|--------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                                                        |                          |                             | лохеин ( $n = 10$ )    | максар ( $n = 10$ )    | карсил ( $n = 10$ )    |
| Некротизированные гепатоциты, %                        | $0,39 \pm 0,07$          | $6,33 \pm 0,34^1$           | $0,60 \pm 0,05^{1,2}$  | $2,85 \pm 0,25^{1,2}$  | $1,84 \pm 0,19^{1,2}$  |
| Двухъядерные гепатоциты, %                             | $13,60 \pm 0,77$         | $0,68 \pm 0,13^1$           | $0,67 \pm 0,15^1$      | $0,76 \pm 0,18^1$      | $2,38 \pm 0,55^{1,2}$  |
| Плотность клеточного инфильтрата (в $1 \text{ мм}^2$ ) | $3,67 \pm 0,32$          | $90,00 \pm 6,46^1$          | $12,50 \pm 1,19^{1,2}$ | $36,60 \pm 2,63^{1,2}$ | $45,6 \pm 2,77^{1,2}$  |
| Ферменты, мкат/л за 1 ч                                |                          |                             |                        |                        |                        |
| АсАТ                                                   | $0,74 \pm 0,03$          | $1,57 \pm 0,16^1$           | $0,87 \pm 0,06^2$      | $0,88 \pm 0,11^2$      | $0,89 \pm 0,08^2$      |
| АлАТ                                                   | $0,57 \pm 0,03$          | $1,66 \pm 0,13^1$           | $0,78 \pm 0,08^{1,2}$  | $0,77 \pm 0,11^2$      | $0,85 \pm 0,10^{1,2}$  |
| АсАТ/АлАТ                                              | 1,30                     | 0,95                        | 1,12                   | 1,15                   | 1,04                   |
| ЩФ, Е/л                                                | $432,0 \pm 43,8$         | $217,0 \pm 24,2^1$          | $209,6 \pm 18,1^1$     | $253,3 \pm 41,8^1$     | $428,2 \pm 49,9^2$     |
| Билирубин, мкмоль/л                                    |                          |                             |                        |                        |                        |
| общий                                                  | $12,10 \pm 0,87$         | $24,60 \pm 2,30^1$          | $15,80 \pm 2,40^2$     | $14,90 \pm 1,30^2$     | $14,3 \pm 1,71^2$      |
| непрямой                                               | $1,45 \pm 0,30$          | $11,65 \pm 0,65^1$          | $4,99 \pm 1,37^{1,2}$  | $3,87 \pm 0,87^{1,2}$  | $4,91 \pm 0,95^{1,2}$  |
| Коэффициент глюкуронирования, %                        | 88,0                     | 52,6                        | 67,5                   | 74,0                   | 65,8                   |
| Общие липиды, г/л                                      | $4,85 \pm 0,31$          | $2,78 \pm 0,15^1$           | $2,78 \pm 0,19^1$      | $2,64 \pm 0,16^1$      | $3,61 \pm 0,34^{1,2}$  |
| ДК, ед/мл                                              | $2,38 \pm 0,26$          | $1,61 \pm 0,14^1$           | $1,54 \pm 0,21^1$      | $1,43 \pm 0,15^1$      | $1,56 \pm 0,17^1$      |
| МДА, ммоль/мл                                          | $4,41 \pm 0,35$          | $4,17 \pm 0,35$             | $7,06 \pm 0,60^{1,2}$  | $8,38 \pm 0,51^{1,2}$  | $8,33 \pm 0,76^{1,2}$  |
| Белок, г/л                                             | $74,10 \pm 144,00$       | $34,80 \pm 1,41^1$          | $58,30 \pm 1,97^{1,2}$ | $63,20 \pm 1,26^{1,2}$ | $58,70 \pm 0,89^{1,2}$ |
| Глюкоза, ммоль/л                                       | $6,05 \pm 0,15$          | $6,27 \pm 0,24$             | $6,15 \pm 0,19$        | $6,23 \pm 0,13$        | $6,17 \pm 0,16$        |

Примечание. Различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой: <sup>1</sup> — интактные животные, <sup>2</sup> — циклофосфан.

Некрозу подверглось 6,33% гепатоцитов (в норме — 0,39%), было резко снижено количество двухъядерных гепатоцитов. Выявлены лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты (таблица). Биохимические показатели крови также свидетельствуют о значительных нарушениях метаболических процессов в печени. В сыворотке крови возросла активность аминотрансфераз АсАТ и АлАТ в 2,1 и 2,9 раза соответственно. Соотношение АсАТ/АлАТ составило 0,95 (у интактных животных — 1,3). Активность ЩФ снизилась в 2 раза, что соответствует данным литературы [6]. Содержание общего билирубина возросло в 2 раза, непрямого — в 8 раз.

Значительно нарушена антиоксидантная функция печени, коэффициент глюкуронирования билирубина снизился до 52,6% (у интактных крыс — 88%). Наблюдалась гипопропротеинемия и гиполипидемия — содержание общего белка и липидов снизилось в 2,1 и 1,7 раза соответственно. Цитостатик не влиял на уровень глюкозы в сыворотке крыс. Определение продуктов перекисного окисления липидов показало, что концентрация диеновых конъюгатов в сыворотке снизилась в 1,5 раза, а МДА не изменилась.

Гепатопротекторы, введенные совместно с ЦФ, предупреждали гибель животных (в контроле ле-

тельность 44%), препятствовали развитию морфологических и метаболических нарушений печени (см. таблицу). Содержание некротизированных клеток снизилось в 2,2—10,5 раза, количество двухъядерных гепатоцитов возросло до 3,5 раза, что указывает на усиление процессов регенерации печени. Плотность клеточного инфильтрата уменьшилась в 2—7,2 раза, и он локализовался, преимущественно периваскулярно, исчезли очаги склероза. Значительно уменьшилось венозное полнокровие. Наиболее эффективно восстанавливал гистоархитектонику печени лохеин (рис. 2), под влиянием которого венозное полнокровие исчезало, не определялись очаги кровоизлияний, восстанавливалась структура печеночных триад.

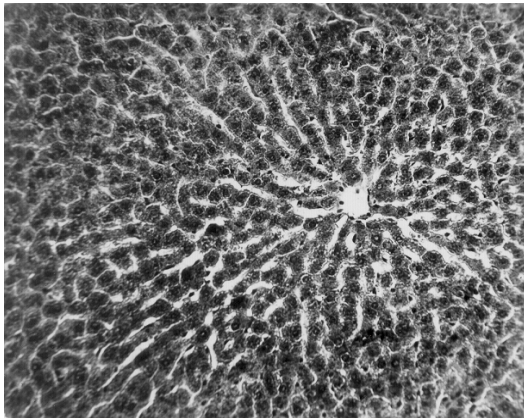


Рис. 2. Печень крысы после введения циклофосфана и лохеина. Радиально расположенные печеночные балки, нерасширенные вокругсинусоидные пространства, имеющие нормальное строение и гипертрофированные гепатоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250

Лохеин вызывал гипертрофию гепатоцитов, увеличение в них количества ядрышек до 3—5 в клетке (в норме 1—2, а при интоксикации циклофосфаном ядрышки иногда вообще не выявлялись), в 10,5 раза уменьшал количество некротизированных гепатоцитов и в 7,2 — содержание клеточного инфильтрата.

Терапия гепатопротекторами сопровождалась регрессом биохимических нарушений, вызванных циклофосфаном. При назначении гепатопротекторов совместно с ЦФ активность АсАТ и АлАТ в крови уменьшалась в 1,8—2,1 раза по сравнению с животными соответствующей контрольной группы, но оставалась выше показателей у intactных животных в 1,2—1,5 раза. Максар, лохе-

ин и карсил увеличивали соотношение АсАТ/АлАТ до 1,15; 1,12 и 1,04 соответственно. Все исследованные гепатопротекторы статистически равнозначно препятствовали развитию гипербилирубинемии — концентрация общего билирубина снижалась в 1,6—1,7 раза, непрямого — в 2,3—3 раза. Максар наиболее активно восстанавливал глюкуронирование пигмента (до 74%), лохеин и карсил проявили практически одинаковую активность (67,5 и 65,8%). Гепатопротекторы препятствовали развитию гипопроteinемии, равнозначно увеличивая содержание белка в крови в 1,7—1,8 раза, не влияли на сниженные циклофосфаном концентрации общих липидов (кроме карсила) и ДК, а также уровень глюкозы в крови. Лохеин, максар и карсил повышали количество МДА в 1,7—2 раза, причем оно превышало уровень intactных животных в 1,6—1,9 раза (см. таблицу).

Таким образом, гепатопротекторы полифенольной природы лохеин, максар и карсил проявили значительную терапевтическую активность при экспериментальном поражении печени крыс циклофосфаном. Лохеин эффективнее других препаратов препятствовал развитию морфологических нарушений в печени и превосходил их по антинекротическому действию. Максар эффективнее лохеина и карсила восстанавливал глюкуронирование билирубина. Карсил, в отличие от максара и лохеина, повышал количество двухъядерных гепатоцитов и препятствовал снижению активности ЩФ, вызванному циклофосфаном. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о целесообразности включения гепатопротективных средств в комплексную фармакотерапию онкологических заболеваний с целью коррекции гепатотоксичности циклофосфана.

## Выводы

1. Циклофосфан (20 мг/кг внутривентриально в течение 10 дней) ухудшает гистоархитектонику печени крыс, вызывает некроз гепатоцитов и лимфомоноцитарную инфильтрацию, уменьшает количество двухъядерных гепатоцитов, в крови возрастает активность аминотрансфераз, снижается активность щелочной фосфатазы, уменьшается содержание

диеновых конъюгатов, наступает гипербилирубинемия с нарушением глюкуронирования билирубина, гипопроотеинемия, гиполипидемия.

2. Гепатопротекторы лохейн, максар и карсил при сочетанном введении с циклофосфаном уменьшают острую токсичность и проявления гепатотоксичности цитостатика: снижают некроз гепатоцитов и клеточную инфильтрацию паренхимы печени, вызывают регресс гипераминотрансфераземии, гипербилирубинемии, стимулируют конъюгацию билирубина, нормализуют содержание белка в крови.

3. Лохейн эффективнее максара и карсила улучшает гистоархитектонику печени и восстанавливает большинство биохимических нарушений при интоксикации циклофосфаном.

#### Литература

1. Ажунова Т.А., Дашинамжилов Ж.Б. Влияние полифитохола на сочетанное поражение печени / IV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Москва, 1997. С. 138.
2. Власова Т.В., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. Полифенолы маакии амурской — эффективное гепатозащитное и желчегонное средство // Хим. фарм. журн. 1994. < 3. С. 56—58.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. 1988. < 2. С. 60—64.
4. Олейник А.В. Влияние циклофосфана на перекисное окисление липидов // Вопр. онкологии. 1985. < 7. С. 97—101.
5. Полунина Т.Е. Лекарственные гепатиты // Терапевт. архив. 1999. < 12. С. 46—49.
6. Порохняк Л.А. Фармакологическая коррекция токсических поражений печени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1988. 44 с.
7. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Чучалин В.С. Экстракт солянки холмовой (лохейн) — эффективная защита печени. Томск: STT, 2000. 114 с.
8. Фомина Т.И., Ветошкина Т.В., Дубская Т.Ю. Фармакологическая коррекция гепатотоксического действия платидиама // Эксперим. и клинич. фармакология. 1999. < 1. С. 62—64.
9. Bacon A.M., Rosenberg S.A. Cyclophosphamide hepatotoxicity in a patient with systemic lupus erythematosus // Ann. Intern. Med. 1982. V. 97. < 1. P. 62—63.
10. Bokemeyer C., Fels L., Dunn T. et al. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity // Br. J. Cancer. 1996. V. 74. < 12. P. 2036—2041.
11. Cleland B.D., Pokorny C.S. Cyclophosphamide related hepatotoxicity // Aust. N. Z. J. Med. 1993. V. 23. < 4. P. 408.
12. Farrell G. Drug-induced hepatic injury // Gastroenterol. Hepatol. 1997. V. 12. < 9—10. P. 242—250.
13. Gismondi C., Dabov L., Dovi M. Hepatotoxicity of cyclophosphamide in the rat after prolonged treatment: a histomorphological study // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1980. V. 56. < 21. P. 2166—2172.
14. Goldberg J.W., Lidsky M.D. Cyclophosphamide-associated hepatotoxicity // South. Med. J. 1985. V. 78. < 2. P. 222—223.
15. Gurtoo H.L., Hipkens J.H., Sharma S.D. Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide // Cancer. Res. 1981. V. 41. < 9. Pt. 1. P. 3584—3591.
16. Honjo I., Suou T., Hirayama C. Hepatotoxicity of cyclophosphamide in man: pharmacokinetic analysis // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1988. V. 61. < 2. P. 1491—1465.
17. Laslett T.J., Alvarez F., Nation R.L. et al. Effect of cyclophosphamide administration on the activity and relative content of hepatic P4502D1 in rat // Xenobiotica. 1995. V. 25. < 10. P. 1031—1039.
18. Ma B., Yeo W., Hui P. et al. Acute toxicity of adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide for early breast-cancer — a retrospective review of Chinese patients and comparison with an historic Western series // Radiother. Oncol. 2002. V. 62. < 2. P. 185—189.
19. Shanholtz C. Acute life-threatening toxicity of cancer treatment // Crit. Care. Clin. 2001. V. 17. < 3. P. 483—502.
20. Snyder L.S., Heigh R.I., Anderson M.L. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a patient with Wegener's granulomatosis // Mayo. Clin. Proc. 1993. V. 68. < 12. P. 1203—204.

Поступила в редакцию 21.11.2003 г.