

ВПЛИВ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ТА РОЗЧИННОЇ ФОРМИ ЦИСПЛАТИНУ НА СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

О. Кулініч^{1*}, Н. Штеменко²

¹Дніпропетровська медична академія МОЗ України
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49044, Україна

²Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49000, Україна
e-mail: kulinich.es@gmail.com

Досліджено вплив цисплатину за різних форм введення на біохімічний стан печінки щурів-пухлиноносіїв. Показано, що введення цисплатину в ліпосомальній формі менше впливає на біохімічний стан тканин печінки, тобто знижує його гепатотоксичність. Продемонстровано, що, зокрема, процеси трансамінування та перекисного окиснення ліпідів у печінці щурів-пухлиноносіїв не повністю нормалізуються, як це відбувалося за використання антиоксидантної терапії. Зроблено висновок про перспективність використання наноліпосомних форм цитостатиків у антираковій терапії.

Ключові слова: цисплатин, біохімія печінки, наноліпосоми, карцинома Герена, гепатотоксичність.

Цис-діамінодихлорплатинум (II), або цисплатин, є одним із найбільш активних препаратів у лікуванні новоутворень будь-якої локалізації та гістогенезу [21]. Впроваджений в онкологію на початку 1980-х років, цисплатин активно використовується при лікуванні пухлин [1; 5]. Протипухлинні препарати групи платиновмістних сполук цисплатин і карбоплатин показують високу протипухлинну активність при лікуванні багатьох солідних злоякісних новоутворень легень, голови і шиї та ін. [6, 16]. Визначено три основні причини токсичності цієї сполуки: накопичення цисплатину і продуктів його гідролізу в нирковій тканині, що активує розвиток некрозу; утворення ДНК-аддуктів, що призводить до активації апоптозу; біоактивація цисплатину шляхом його зв'язування з тіоловими групами білків, пептидів та інших внутрішньоклітинних сполук, що порушує антиоксидантний пул клітин і функціонування багатьох ферментів [7]. Відомо, що ліпосомальну форму цисплатину було розроблено для того, щоби знизити його токсичність при одночасному підвищенні ефективності транспорту препарату до пухлини [6, 21]. У наших попередніх дослідженнях було показано токсичну дію цисплатину на печінку щурів [3], а також діагностичне значення параметрів глутатіонової системи захисту тканини печінки за вивчення гепатопротекторної дії кластерних сполук Ренію [4].

Проте в цих експериментах ми не вивчали характеристики печінки за введення ліпосомальної форми цисплатину та не проводили порівняльні дослідження токсичності цисплатину в різних формах введення.

Отже, метою даної роботи було порівняти вплив ліпосомальної та розчинної форми цисплатину на біохімічні показники печінки щурів за розвитку карциноми Герена.

Матеріали та методи

Експеримент проводили на щурах лінії Wistar вагою 100–150 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил „Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для

експериментальних та інших наукових цілей” (м. Страсбург, 1985). Трансплантацію карциноми Герена (Т8) здійснювали методом підшкірного введення в ділянку стегна задньої кінцівки 0,5 мл 20% суспензії клітин пухлини у фізіологічному розчині. Цисплатин (сРt) вводили одноразово у дозі 8 мг/кг на 9-ту добу після трансплантації пухлини у розчині ([сРt]sl) і в ліпосомальній формі ([сРt]nl).

Тварини були розділені на 4 групи (по 6 щурів у кожній): 1 – інтактні тварини (Контроль); 2 – тварини з карциномою Герена (Т8); 3 – тварини з карциномою Герена Т8, яким вводили цисплатин у вигляді розчину (Т8+[сРt]sl); 4 – тварини з карциномою Герена Т8, яким вводили цисплатин у наноліпосомній формі (Т8+[сРt]nl). На 21-й день після трансплантації пухлини проводили декапітацію щурів під етерним наркозом.

Визначення біохімічного стану печінки проводили за змінами активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) і гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) з використанням стандартних лабораторних методик тест-наборів (Реагент, Україна, м. Дніпропетровськ) за методами [Dawson J.M., Reitman S & Frankel S. A.] [9].

Рівень МДА визначали у плазмі та гомогенаті печінки за методикою Андрєєвої [1], глутатіону (GSH) за [9].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили в Microsoft Exel з визначенням імовірних відмінностей з використанням t-критерію Стьюдента [5].

Результати і їхнє обговорення

Відомо, що під дією токсичних факторів, якими є канцерогенез і введення сРt, відбувається спочатку активація в клітинах печінки процесів трансамінування, фосфорилування, окиснення-відновлення тощо, а потім їхній цитоліз із подальшим вивільненням ферментів у кров [3, 12]. Тобто процеси трансамінування вважаються найбільш чутливими до токсичних речовин, а концентрація трансаміназ у крові є одним із найбільш живаних діагностичних показників функціонування гепатоцитів. У наших експериментах було встановлено, що розвиток новоутворення і введення сРt в розчинній формі викликали явище гіперферментемії, тобто збільшення активності ферментів у плазмі крові (рис. 1–3).

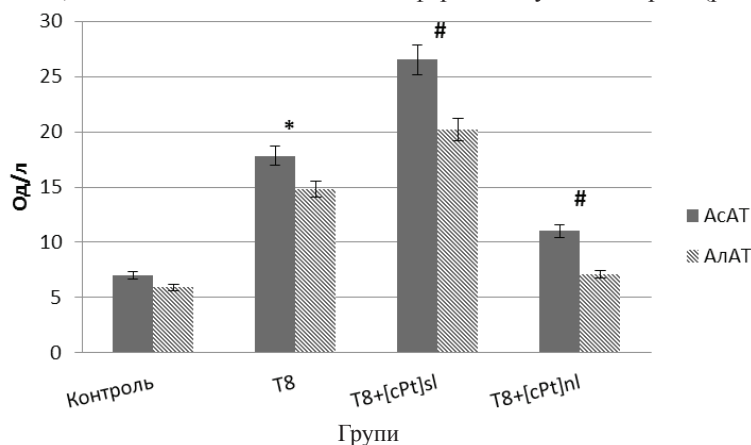


Рис. 1. Активність АсАТ і АлАТ у плазмі крові щурів, Од/л. * – достовірна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); # – достовірна різниця порівняно з групою Т8 ($P < 0,05$).

При введенні розчинної форми цисплатину відбувається зростання активності ферментів у плазмі крові щурів пухлиноносців у 4 рази АсАТ і АлАТ у 5 разів порівняно з контролем.

При застосуванні цисплатину в наноліпосомній формі активність даних ферментів знижувалась у 2,4 разу АсАТ та у 3 рази АлАТ порівняно з групою, де вводили розчинну форму цисплатину. Ці дані свідчать про зниження токсичності сРt при використанні ліпосомної форми. Проте рівень активності АсАТ і АлАТ не досягав норми, особливо для АсАТ, цей рівень залишався практично удвічі більшим за норму. Отже, процеси трансамінування в печінці не повністю нормалізуються, як це відбувалося за введення кластерних сполук Ренію [3,4].

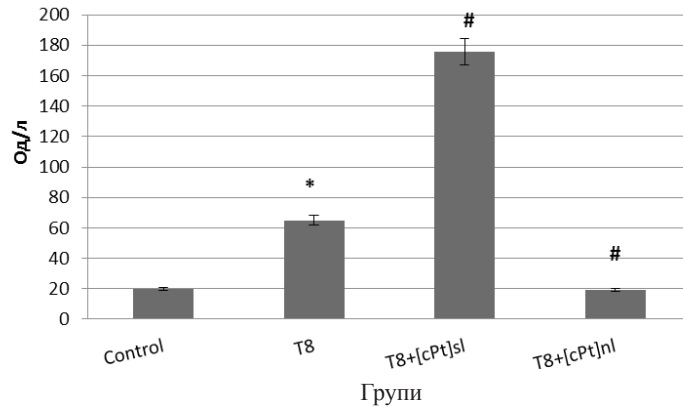


Рис. 2. Активність ЛДГ у плазмі крові щурів, Од/л. * – достовірна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); # – достовірна різниця порівняно з групою T8 ($P < 0,05$).

За розвитку пухлини відбувалося підвищення активності ЛДГ у 3 рази у плазмі крові щурів порівняно з контролем (рис. 2). Відомо, що злоякісна трансформація клітин тісно пов'язана зі зміною активності гліколітичного розпаду глюкози. При цьому активність ЛДГ у плазмі значно збільшується [14], як і у наших експериментах (рис. 2). При введенні цисплатину в розчині активність ферменту підвищувалась у 9 разів порівняно з контролем, а при застосуванні ліпосомальної форми знижувалась практично до норми. Отже, це може вказувати на нормалізацію гліколітичних процесів в організмі щурів пухлиноносіїв за використання ліпосомального цисплатину. При введенні [cPt]nl активність ферменту знижувалась у 9,2 разу порівняно з [cPt]sl, що також вказує на здатність ліпосомальної форми зменшувати токсичний вплив цисплатину.

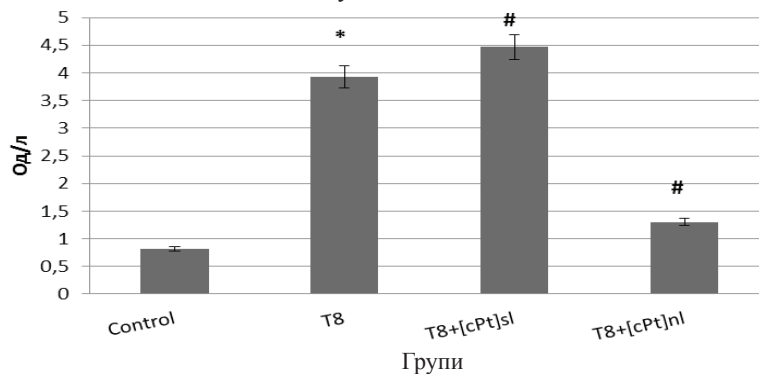


Рис. 3. Активність ГГТП у плазмі крові щурів, Од/л. * – достовірна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); # – достовірна різниця порівняно з групою T8 ($P < 0,05$).

γ -Глутамілтрансептидаза є одним із компонентів антиоксидантної системи організму та діагностичним ферментом [4, 11]. За розвитку карциноми Герена активність ферменту зростала у 5 разів у плазмі крові порівняно з контролем, а за введення цисплатину в розчині – у 5,5 разу (рис. 3). Введення [cPt]nl знижувало активність ферменту в 3,4 разу порівняно з групою, де вводили [cPt]sl. Проте ліпосомальна форма цисплатину не приводить до повної нормалізації активності ГГТП, що свідчить про те, що застосування [cPt]nl не повністю гальмує процеси оксидативного стресу.

Для більш детальних порівняльних досліджень вивчали біохімічні характеристики тканини ізольованої печінки у цих експериментах.

Раніше нами було показано, що введення цисплатину в розчинній формі приводить до зниження концентрації відновленого глутатіону [4]. Введення ліпосомальної форми цисплатину приводить до підвищення кількості глутатіону порівняно з групою, якій вводили розчин цисплатину (рис. 4).

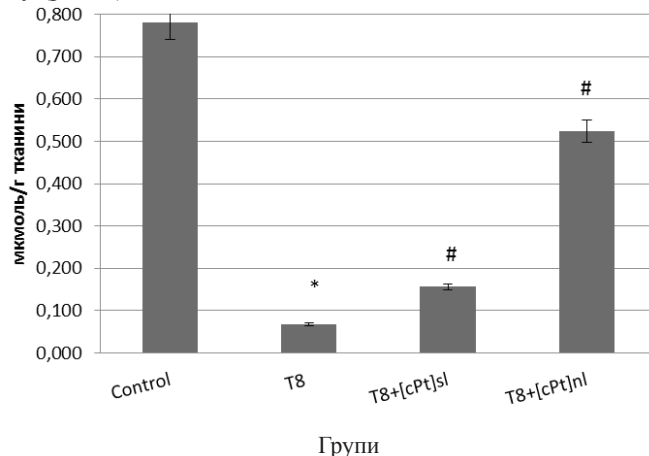


Рис. 4. Концентрація відновленого глутатіону в гомогенаті печінки щурів, (M±m). * – достовірна різниця порівняно з контролем (P<0,05); # – достовірна різниця порівняно з групою T8 (P<0,05).

Концентрація глутатіону в цій групі не досягає норми, проте ліпосомальна форма введення позитивно впливає на стан глутатіонової системи захисту печінки порівняно з введенням у розчині.

Розвиток новоутворення викликав значне підвищення (майже у 7 разів) інтенсивності процесу перекисного окиснення ліпідів (див. таблицю).

Параметри оксидативного стресу та ферментативної активності тканин печінки (Од/г тканини, M±m; n=6)

Групи	ТБК ммоль/г тканини	АсАТ, Од/г тканини	АлАТ, Од/г тканини	ЛДГ, Од/г тканини	ГГТП, Од/г тканини
Control	1,37±2,67	11,94±0,19	9,18±0,46	42,78±8,49	2,73±0,20
T8	2,50±5,05*	22,48±1,73*	16,58±0,41*	61,12±2,70*	3,05±0,54*
T8+[cPt]sl	1,75±2,12#	26,05±1,17#	19,58±0,30#	123,77±2,86#	4,03±0,05#
T8+[cPt]nl	1,50±2,24#	12,71±0,58#	9,10±0,19#	44,31±2,59#	3,19±0,13#

Примітка. * – достовірна різниця порівняно з контролем (P<0,05); # – достовірна різниця порівняно з групою T8 (P<0,05).

Введення цисплатину, незважаючи на гальмування пухлини, також сприяло інтенсивності процесу порушення редокс-стану печінки. У роботах багатьох дослідників

[15, 16] показано, що введення цисплатину інтактним щурам викликало інтенсифікацію процесу перекисного окиснення ліпідів і зниження концентрації глутатіону в тканинах печінки. У наших експериментах у моделі карциноми Герена показано, що розвиток новоутворення призводить до розвитку оксидативного стресу в тканині печінки і є потужним фактором, що викликає оксидативний стрес. Введення цисплатину в розчині викликає гальмування процесу росту пухлини та значно гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів і сприяє підвищенню концентрації глутатіону.

Введення наноліпосомної форми знижувало токсичний ефект цисплатину (рівень ТБК-активних продуктів), але зниження до рівня норми не спостерігалось. Отже, застосування ліпосомної форми цисплатину не повністю нормалізує процес перекисного окиснення ліпідів у печінці (див. таблицю).

Застосування ліпосомальної форми цисплатину зменшувало активність усіх досліджуваних ферментів майже до рівня норми, за винятком ГГТП (див. таблицю).

Оскільки у плазмі крові щурів активність ферментів не досягала норми, можна припустити, що високий рівень цих ферментів у плазмі крові може бути не печінкового походження. Рівень ГГТП не повністю нормалізується за введення ліпосомальної форми, що узгоджується з вищенаведеними даними про неповну нормалізацію процесів перекисного окиснення ліпідів та рівня глутатіону в тканинах печінки і впливає з однієї з вищенаведених функцій ГГТП як маркера оксидативного стресу.

Нами проведено кореляційний аналіз між активністю ферментів плазми крові та гомогенату тканин печінки щурів. Визначено, що у нормі спостерігається сильний кореляційний зв'язок між ГГТП плазми крові та ферментами тканини печінки, а саме: для АсАТ тканини і ГГТП плазми коефіцієнт кореляції становить $r=+0,84$; для АлАТ тканини і ГГТП плазми $r=+0,82$; для ЛДГ тканини і ГГТП плазми $r=+0,63$. Це може бути віддзеркаленням нормального стану печінки, де нормальний редокс-стан тканини і біохімічних процесів (трансамінування, гліколізу) супроводжується незначним, нормальним виділенням у кров'яне русло ще одного діагностичного ферменту – ГГТП, що є маркером оксидативного стресу. За введення цисплатину в розчині та розвитку новоутворення цей зв'язок порушується: для АсАТ тканини і ГГТП плазми коефіцієнт кореляції знижується і становить від $r=+0,02$ до $r=-0,86$; для АлАТ тканини і ГГТП плазми від $r=+0,58$ до $r=-0,72$; для ЛДГ тканини і ГГТП плазми від $r=+0,55$ до $r=-0,16$.

Це свідчить про значне порушення як біохімічних процесів тканини печінки, що супроводжується невпорядкованим виходом елементів клітин у кров, так і про порушення клітин інших органів тварин, що зазначалося вище. Для групи тварин, де вводився цисплатин у вигляді наноліпосом, характерна така сама картина для більшості досліджуваних ферментів, за винятком кореляційного зв'язку між ГГТП плазми і АсАТ тканини ($r=+0,94$) та ГГТП плазми і ЛДГ тканини ($r=+0,84$). Такий сильний кореляційний зв'язок може бути пояснений більш впорядкованим станом мітохондріальних і гліколітичних процесів у печінці тварин цієї групи, що узгоджується з нашими попередніми висновками [4]. Нами знайдено також сильний кореляційний зв'язок між ГГТП плазми і концентрацією МДА у тканині печінки ($r=+0,94$). Це підкреслює діагностичне значення ГГТП у дослідженнях біохімічного стану печінки та свідчить про перспективність вивчення системи глутатіонового захисту цього органа, оскільки часткова нормалізація редокс-стану печінки змінюється узгоджено з концентрацією ГГТП у крові тварин. Вивчення кореляційних зв'язків між активністю ферментів плазми крові та гомогенату печінки щурів підтверджує наші попередні висновки про часткову нормалізацію ферментативної активності біохімічного

стану печінки за введення наноліпосомної форми цисплатину порівняно з введенням розчинів цисплатину.

Отримані нами дані свідчать про те, що введення щурам-пухлиноносійм наноліпосомної форми цисплатину не призводить до такого руйнівного впливу гепатотоксичного цисплатину, як це спостерігається для введень розчинів цього цитостатика. Це, в першу чергу, пояснюється зміненою фармакодинамікою ліпосомних форм порівняно з вільними формами лікарських препаратів. Адже відомо, що введення ліпосомних форм цисплатину пухлиноносійм супроводжується переважним накопиченням препаратів у пухлині та значно знижує накопичення препаратів у інших органах, у тому числі в печінці [6, 20]. Незначна (порівняно з введенням розчину) кількість цисплатину, що потрапляє в печінку, перш за все порушує редокс-стан тканини, що супроводжується зміною біохімічних параметрів оксидативного стресу, таких як МДА, рівень відновленого глутатіону, а також активність ферментів печінки. Удвічі підвищена активність АсАТ порівняно з контролем за введення ліпосомної форми цисплатину може бути пояснена різною локалізацією амінотрансфераз у клітинах печінки (2/3 АсАТ міститься в мітохондріях, на відміну від АлАТ). Тут вірогідний більш значний вплив цисплатину саме на мітохондріальні процеси [15, 18]. Процеси трансамінування та перекисного окиснення ліпідів у печінці щурів-пухлиноносійм не повністю нормалізуються, як це відбувалося за введення наноліпосомних форм кластерних сполук Ренію та системи Реній-Платина [1, 3, 4]. Проте отримані нами дані свідчать про перспективність використання наноліпосомних форм цитостатиків на основі перехідних металів.

Уперше проведено порівняльне дослідження впливу цисплатину за введення у ліпосомальній формі та розчину на біохімічний стан печінки щурів-пухлиноносійм. Показано, що введення цисплатину в ліпосомальній формі сприяє значній нормалізації біохімічних процесів печінки, що свідчить про зниження гепатотоксичності препарату шляхом закінчення його у ліпідну оболонку. Вперше встановлено, що рівень АсАТ у крові, рівень ТБК-активних продуктів, а також рівень глутатіону в печінці щурів-пухлиноносійм не повністю нормалізуються за введення ліпосомальної форми цисплатину, що може бути пояснено різною фармакодинамікою цисплатину в різних формах введення, а також специфічною клітинною локалізацією окремих біохімічних процесів у клітинах печінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Воронкова Ю. С., Леус І. В., Кулініч А. О.* та ін. Використання кластерних сполук Ренію з алкільними лігандами у процесі пригнічення росту карциноми Герена // Вісн. Дніпропетров. ун-ту. Біологія. Екологія. 2008. Вип. 16. Т. 1. С. 51–56.
2. *Гоженко А. И., Москаленко А. М., Стебловский В. В., Жуков В. А.* О нефротоксичности цисплатина у онкобольных // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2010. № 1 (19). С. 81–86.
3. *Івчук В. В., Полішко Т. М., Голіченко О. А.* Вплив протипухлинної системи реній-платина на біохімічний стан печінки // Укр. біохім. журнал. 2011. Т. 83. № 3. С. 83–91.
4. *Кулініч О. С., Дьомшина О. О., Штеменко Н. І.* Модуляція гепатотоксичності цисплатину кластерними сполуками ренію (III) у моделі канцерогенезу // Медична хімія. 2013. Т. 15. № 3 (56). С. 21–26.
5. *Лакін Г. Ф.* Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
6. *Носко М. М., Тодор И. Н., Пономарева О. В, Кулик Г. И.* Сравнение противоопухолевой активности цисплатина в свободной и липосомальной формах в эксперименте // Укр. мед. альманах. 2008. Т. 11. № 5. С. 114–115.

7. Павленко С. О., Сорочан О. О. Вміст триптофану у крові щурів у нормі та за розвитку карциноми Герена Т8 і корекції патологічного стану // Укр. біохім. журнал. 2005. Т. 77. № 5. С. 152.
8. Arnesano F., Natile G. Platinum on the road: Interactions of the antitumoral cisplatin with proteins // Pure Appl. Chem. 2008. Vol. 80. N 12. P. 2715–2725.
9. Dawson J. M., Heatlic P. L., Lowry method of protein quantification Evidence for Photosensitivity // Anal. Biochem. 1984. Vol. 140. N 2. P. 391–393.
10. Dekant W., Vamvakas S. Biotransformation and membrane trans-ort in nephrotoxicity // Crit Rev. Toxicol. 1996. Vol. 26. P. 309–340.
11. Duk-Hee Lee, Rune Blomhoff, David R. Jacobs Jr. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? // Free Radical Res. 2004. Vol. 38. N 6. P. 535–539.
12. Koc A. Protective agent, erdosteine, against Cisplatin 10 mg kg-1 platin-induced hepatic oxidant injury in rats// Mol. Cell. Biochem. 2005. Vol. 278. P. 79–84.
13. Levi J., Jacobs C., Kalman S. M. et al. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity. I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1980. Vol. 213. P. 545–550.
14. Lieberman M. W., Barrios R. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? // Am. J. Pathol. 1995. Vol. 147. N 5. P. 1175–1185.
15. Lu Yongke, Cederbaum I. Arthur Cisplatin-Induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1 // Toxicol. Sci. 2006. Vol. 89. N 2. P. 515–523.
16. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J. E., Mansour V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents // Nature. 1969. Vol. 222. N 5191. P. 385–389.
17. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // Am. J. Clin. Pathol. 1957. Vol. 28. P. 56–63.
18. Renjie L., Shidi S., Changsen S. // Protective effect of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats // Afr. J. Microbiol. Res. 2010. Vol. 4. N 16. P. 1784–1787.
19. Taylor S. K. Erythropoetine (Erh-ipo) more than treatment of anemia in cancer and hemotherapy? // Medical Hypothesis. 2003. N 1. P. 89–93.
20. Terkola R. Liposomal cisplatin: lipoplatin // Eur. J. Onkol. Pharmacy. 2007. Vol. 1. N 2. P. 15–20.
21. Townsend D. M., Deng M., Zhang L., Lapus M. G. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells // J. Am. Soc. Nephrol. 2003. Vol. 14. P. 1–10.
22. Vincent T. DeVita. SHSAR. Cancer: principles and practice of oncology. 6th ed. 2001. Vol. 1. P. 161–169.

INFLUENCE OF LIPOSOMAL AND SOLUBLE FORMS OF CISPLATIN ON THE RAT LIVER IN THE DEVELOPMENT OF GUERIN CARCINOMA**O. Kulinich^{1*}, N. Shtemenko²***¹Dnipropetrovsk Medical Academy, Health Ministry of Ukraine
9, Dzerzhinsky St., Dnipropetrovsk 49044, Ukraine**²Oles Honchar National University of Dnipropetrovsk
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49000, Ukraine
e-mail: kulinich.es@gmail.com*

The influence of cisplatin in various forms of introduction on the biochemical state of the liver of tumor-bearing rats has been investigated. It was shown the decrease of cisplatin hepatotoxicity in experiments with introduction of it in liposome form that was accompanied by less changes of the biochemical parameters of the liver tissues in comparison to control. The full recovery of transamination and lipid peroxidation processes in the rat liver of experimental rats nevertheless was not demonstrated as it took place in the case of introduction of antioxidants in our previous works. The conclusion about perspective of using cytostatics in liposomal forms in anticancer therapy was made.

Keywords: cisplatin, biochemistry of liver, nanoliposomal form, Guerin's carcinoma, hepatotoxicity.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ И РАСТВОРИМОЙ ФОРМ ЦИСПЛАТИНА НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА**Е. Кулинич^{1*}, Н. Штеменко²***¹Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины
ул. Дзержинского, 9, Днепропетровск 49044, Украина**²Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49000, Украина
e-mail: kulinich.es@gmail.com*

Исследовано влияние цисплатина при различных формах введения на биохимическое состояние печени крыс-опухоленосителей. Показано, что введение цисплатина в липосомальной форме меньше влияет на биохимическое состояние тканей печени, то есть снижает его гепатотоксичность. Продемонстрировано, что в частности процессы трансаминирования и перекисного окисления липидов в печени крыс-опухоленосителей полностью не нормализуются, как это происходило при использовании антиоксидантной терапии. Сделан вывод о перспективности использования нанолипосомных форм цитостатиков в антираковой терапии.

Ключевые слова: цисплатин, биохимия печени, нанолипосомы, карцинома Герена, гепатотоксичность.