

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА ТОКСИЧНІСТЬ ЦИКЛОФОСФАМІДУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Доц. А. Я. Какар'їн, канд. мед. наук А. П. Ковальчук, Т. В. Ткачук, Б. А. Ковальчук

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

Циклофосфамід — цитостатик із широким спектром дії, входить до складу багатьох схем хіміотерапії пухлин, але має низку побічних ефектів. Метою дослідження було оцінити протекторний вплив різних антиоксидантів на гостру токсичність, імунно- та міелосупресорний ефекти циклофосфаміду в щурів.

Матеріали та методи. Щури — самці лінії Wistar ($n = 101$) масою 100–120 г, яким вводили циклофосфамід та антиоксиданти: убіхінон, токоферол, дибунол, ретинол і селеніт натрію. Імунно- та міелосупресорну дію циклофосфаміду оцінювали після імунізації щурів ($n = 60$) еритроцитами барана.

Результати. У терапевтичних дозах (30 мг/кг × 5 днів) циклофосфамід викликає в імунізованих щурів падіння титру аглютининів і гемолізину в 4,5–5 разів, кількість лейкоцитів — у 10 разів. У дозі 230 мг/кг циклофосфамід призводить до загибелі тварин на 3–10 день після введення. Антиоксиданти різною мірою знижують гостру токсичність циклофосфаміду, продовжуючи життя тварин на 4–8 днів. Також зменшують циклофосфамідіндуковану мієло- й імуносупресію, підвищуючи титр гемолізину і аглютининів у 1,5–2 рази, кількість лейкоцитів — у 2,6–3,6 рази.

Висновки. Циклофосфамід має виражену імунно- та мієлотоксичність, у високих дозах (230 мг/кг) викликає загибель щурів. Антиоксиданти в терапевтичних дозах зменшують загальну токсичність циклофосфаміду, протистоять циклофосфамідіндукованій лейкопенії та імуносупресії. Найбільший протекторний ефект виявлено в антиоксидантів дибунол та убіхінон. Перспективним напрямком подальших досліджень є вивчення впливу антиоксидантів на цитостатичну дію циклофосфаміду.

Ключові слова: циклофосфамід, токсичність, антиоксиданти.

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ТОКСИЧНОСТЬ ЦИКЛОФОСФАМИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Доц. А. Я. Какар'їн, канд. мед. наук А. П. Ковальчук, Т. В. Ткачук, Б. А. Ковальчук

Циклофосфамід — цитостатик с широким спектром действия, входит в состав многих схем химиотерапии опухолей, но обладает рядом побочных эффектов. Целью исследования было оценить протекторные свойства различных антиоксидантов при острой токсичности, иммуно- и миелосупрессорном эффекте циклофосфамида у крыс.

Материалы и методы. Крысы — самцы линии Wistar ($n = 101$) массой 100–120 г, которым вводили циклофосфамид и антиоксиданты: убихинон, токоферол, дибунол, ретинол и селенит натрия. Иммуно- и миелосупрессорное действие циклофосфамида оценивали после иммунизации крыс ($n = 60$) эритроцитами барана.

Результаты. В терапевтических дозах (30 мг/кг × 5 дней) циклофосфамид вызывает у иммунизированных крыс падение титра агглютининов и гемолизина в 4,5–5 раз, количества лейкоцитов — в 10 раз. В дозе 230 мг/кг циклофосфамид приводит к гибели животных на 3–10 день после введения. Антиоксиданты в разной степени снижают острую токсичность циклофосфамида, продлевая жизнь животных на 4–8 дней. Также уменьшают циклофосфамидиндуцированную миело- и иммуносупрессию, повышая титр гемолизина и агглютининов в 1,5–2 раза, количество лейкоцитов — в 2,6–3,6 раза.

Выводы. Циклофосфамид обладает выраженной иммуно- и миелотоксичностью, в высоких дозах (230 мг/кг) вызывает гибель крыс. Антиоксиданты в терапевтических дозах уменьшают общую токсичность циклофосфамида, противостоят циклофосфамидиндуцированной лейкопении и иммуносупрессии. Самым выраженным протекторным эффектом обладают дибунол и убихинон. Перспективным направлением дальнейших исследований является изучение влияния антиоксидантов на цитостатическое действие циклофосфамида.

Ключевые слова: циклофосфамид, токсичность, антиоксиданты.

ANTIOXIDANT EFFECT ON THE TOXICITY OF CYCLOPHOSPHAMIDE IN EXPERIMENT

A. Ya. Kakarkin, A. P. Kovalchuk, T. V. Tkachuk, B. A. Kovalchuk

Cyclophosphamide is a cytostatic with the wide range of action. It is included in many regimens of tumour chemotherapy, though has a row of side effects. The purpose of investigation was to estimate protective impact of different antioxidants on the acute toxicity and immune- and myelosuppressing effect that cyclophosphamide causes to the rats.

Materials and methods. Male rats of Wistar line ($n = 101$) with a 100–120 g weight that were injected cyclophosphamide and antioxidants, such as ubiquinone, tocopherol, dibunol, retinolum, and natriumseleniet. Immune- and myelosuppressing effect of cyclophosphamide was graded after rat's immunization ($n = 60$) with the ram's erythrocytes.

Results. Therapeutic doses of cyclophosphamide applied to the immunized rats (30 mg/kg per 5 days) 4.5–5 times decline the titre of agglutinates and hemolysins and evoke 10-fold decrease in leukocytes. The dose of 230 mg/kg leads to the death of animals on the 3–10th day after injection. Antioxidants decline the acute toxicity of cyclophosphamide prolonging lives of animals to 4–8 days. They also reduce cyclophosphamide induced myelo- and immune suppression raising the titre of agglutinates and hemolysins up to 1.5–2 times and cause a 2.6–3.6-fold increase in leukocytes.

Conclusions. The immune- and myelotoxicity of Cyclophosphamide is strongly pronounced. High doses of cyclophosphamide (230 mg/kg) lead to the death of rats. Therapeutic doses of antioxidants decrease the total toxicity of cyclophosphamide and help to resist cyclophosphamide induced leucopenia and immune suppression. The highest protective effect was seen at dibunolum and ubiquinone. The following investigation may focus upon the influence of antioxidants on the cytostatic effect of cyclophosphamide.

Keywords: cyclophosphamide, toxicity, antioxidants.

Циклофосфамід (ЦФ) належить до алкілюючих цитостатиків із широким спектром дії. Він входить до складу майже всіх стандартних схем ад'ювантної та неoad'ювантної поліхіміотерапії раку молочної залози, легені, яєчника, шийки матки, семіноми яєчка, сарком м'яких тканин,

кісток, пухлини Вільмса, лімфолейкозів, мієломої хвороби та злоякісних лімфом [5]. ЦФ застосовується в різних дозах і в різних схемах, тому особливого значення набуває вивчення його метаболізму та фармакологічної взаємодії з препаратами інших груп.

Протипухлинна дія ЦФ, як і його токсичні ефекти, значною мірою визначаються повнотою перетворення препарату в активні метаболіти та спектром останніх [3]. Водночас ферментні системи організму, які беруть участь у біотрансформації ЦФ, відрізняються значним поліморфізмом, що зумовлює індивідуальні варіації в його ефективності й токсичності. Індивідуальні відмінності в метаболізмі та кліренсі метаболітів ЦФ можуть сягати двох порядків [7].

Суттєве значення для реалізації протипухлинної дії ЦФ має активність ізоферментів альдегіддегідрогенази та глутатіон-S-трансферази, які беруть участь в інактивації активних метаболітів і зумовлюють резистентність до цитостатику [6, 9]. Пошук способів спрямування метаболізму ЦФ у бік більшого перетворення в алкілюючі метаболіти та зменшення утворення токсичних метаболітів або протидія небажаним ефектам останніх є перспективним напрямком оптимізації терапії ЦФ. Вимогами до коректорів метаболізму ЦФ є наявність протекторної дії та відсутність негативного впливу на утворення фармакологічно активних метаболітів. Такими препаратами могли б стати антиоксидантні препарати та вітаміни. У літературі є повідомлення про застосування окремих вітамінів як протекторів побічної дії ЦФ [8].

Мета роботи — оцінити протекторний вплив різних антиоксидантів на гостру токсичність, імуно- та міелосупресорний ефект ЦФ у щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент № 1. Для вивчення впливу антиоксидантів на гостру токсичність ЦФ проводили дослідження на білих щурах — самцях лінії Wistar ($n = 101$) масою 100–120 г. Контрольна група налічувала 25 щурів, група тварин, які отримували антиоксидантний комплекс убіхінон, — 18. У групах із токоферолом, дибунолом, ретинолом було по 15 тварин, у групі, яка отримувала селеніт натрію, — 13 щурів. ЦФ вводили одноразово внутрішньочеревно в дозі 230 мг/кг. Протягом 9 днів (починаючи за 2 дні до введення ЦФ) тваринам додатково вводили ретинол ацетату в дозі 3000 МО/кг, токоферол ацетату в дозі 100 мг/кг, селеніт натрію в дозі 30 мкг/кг (по селену), дибунол у дозі 80 мг/кг, убіхінон вводили підшкірно в дозі 0,03 мл/кг. Оцінювали виживання тварин.

Експеримент № 2. Імуно- та міелосупресорну дію ЦФ оцінювали після імунізації щурів еритроцитами барана (5% суспензія, по 0,1 мл на 100 г маси щурів в/м двічі з інтервалом в один день). ЦФ вводили внутрішньочеревно в дозі 30 мг/кг 5 днів, один раз на добу, починаючи з другого дня після першої імунізації. Антиоксиданти починали вводити за 3 дні до першої імунізації і продовжували вводити до 6 дня досліджу в тих же дозах, що й у першому експерименті. У кожній групі налічувалося по 10 щурів лінії Wistar масою 100–120 г.

Усі експерименти проводили відповідно до методичних рекомендацій Комітету з біоетики при Президії АМН України [1].

Статистичну обробку результатів дослідження виконували методами біометрії [2, 4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Токсичність ЦФ оцінювали за виживанням щурів після його одноразового внутрішньочеревного введення в дозі 230 мг/кг. Середня тривалість життя тварин, що отримали ЦФ, у контрольній групі склала $4,28 \pm 0,36$ доби, під впливом токоферолу вона достовірно зросла на 2,62 доби ($6,90 \pm 0,46$). Під дією ретинолу тривалість життя також дещо підвищилася і склала $5,53 \pm 0,39$ доби, селеніт натрію практично не вплинув на її тривалість ($4,85 \pm 0,82$ доби). Більше подовжували тривалість життя антиоксидантний комплекс убіхінон — на 3,78 доби і дибунол — на 3,82 доби: вона становила, відповідно, $8,06 \pm 0,40$ і $8,10 \pm 0,39$ доби ($p < 0,05$).

Загибель щурів у контрольній групі почалася на 3-й день після введення ЦФ, коли загинули перші 3 щури. На 4-й загинуло 9 тварин. На 5-й — ще 6 щурів, на 6-й і 8-й день загинуло по 3 щури і залишився 1 щур із 25. На 10-й день загинули всі. У групі з токоферолом щури почали гинути пізніше. На 5-й день загинули перші 3 щури, на 6-й день — 2, на 7-й — 4, на 8-й — 3, на 10-й — 2 щури, і залишалася живою ще одна тварина з 15. Токоферол виявив захисний ефект, достовірно продовжуючи життя тварин і затримуючи розвиток смертельних ускладнень на 2 доби. У групі тварин, які отримували селеніт натрію, перша тварина загинула на 2-й день, на 3-й і 4-й день загинуло по 3 щури, з 6-го по 10-й день щодня гинуло по одній тварині, і на 10-й день залишався живим тільки 1 щур із 13. Селеніт натрію не виявив істотного впливу на токсичність ЦФ у щурів. Тварини, які отримували дибунол, почали гинути на 5-й день — тоді загинув перший щур, на 7-й день загинуло 3 щури, на 8-й — 2, на 9-й — 1, на 10-ту добу — 3 щури і живими залишалися ще 5 тварин із 15. Отже, дибунол не лише достовірно збільшував кількість щурів, які вижили, а й затримував розвиток смертельних ускладнень на 2 доби. Загибель щурів, які отримували ретинол, почалася на 4-ту добу після введення ЦФ, коли загинули перші 4 щури, на 5-й день загинула 1 тварина, на 6-й — 3, на 7-й і 8-й день по одній і на 9-й день загинули останні 5 тварин із 15. Ретинол достовірно не впливав на тривалість життя щурів, що отримали токсичну дозу ЦФ. У групі щурів, які отримували убіхінон, перша тварина загинула тільки на 6-й день досліджу. На 7-й і 8-й день загинули по 2 щури, на 9-й — 5 і на 10-й — 4 щури. До кінця експерименту 4 щури із 18 залишилися живими. Таким чином, убіхінон і дибунол можуть істотно знижувати токсичність ЦФ і значно зменшувати кількість і термін появи смертельних ускладнень.

Імунотоксичність і цитопенія під час хіміотерапії ЦФ — один із найнебезпечніших побічних ефектів і головна причина подовження термінів лікування. Установлено, що на 6-й день після першої імунізації в сироватці крові щурів, які отримали ЦФ, титр аглютининів упав співвідносно до контролю в 4,5 разу, титр гемолізину — у 5 разів, кількість лейкоцитів у крові зменшилася в 10 разів. Застосування ретинолу зменшує мієло- й імуносупресивну дію ЦФ. Титр аглютининів у сироватці крові щурів, які отримали ЦФ і ретинол, був достовірно більшим у 2,3 разу, ніж у тварин, які отримували один лише ЦФ, титр гемолізину — у 2,8 разу, кількість лейкоцитів у крові — у 3,6 разу ($p < 0,05$). Уведення селеніту натрію суттєво не впливало на синтез антитіл у щурів. У разі введення разом із ЦФ, селеніт натрію достовірно не впливав на імуносупресію, викликану цитостатиком, проте достовірно зменшував вираженість лейкопенії. Дибунол також не впливав на синтез антитіл і гемопоез у щурів, але достовірно перешкоджав розвитку лейкопенії, індукованої введенням ЦФ ($p < 0,05$). Уведення щурам токоферолу стимулювало (на рівні тенденції) синтез гемолізину у імунізованих тварин. Так, титр гемолізину збільшився майже вдвічі, кількість лейкоцитів — у 2,6 разу, хоча вплив токоферолу на продукцію аглютининів був не достовірним. Убіхінон також не впливав на продукцію аглютининів, гемолізину і лейкоцитів у імунізованих щурів, але зменшував токсичну дію ЦФ

на імунну систему. Титр аглютининів у групі тварин, які отримували разом ЦФ і убіхінон, виявився вірогідно вище на 14,6%, ніж у щурів, які отримували лише ЦФ. Убіхінон зменшував вплив ЦФ на титр гемолізину (на рівні тенденції) і вірогідно протидіяв ЦФ-індукованій лейкопенії.

Використані нами антиоксиданти здатні змінити імуно- та мієлотоксичну дію ЦФ. Дибунол і селеніт натрію зменшують мієлосупресію, викликану ЦФ, ретинол, токоферол і убіхінон, разом із цим, зменшують імуносупресивну активність ЦФ.

ВИСНОВКИ

1. ЦФ має виражену імуно- та мієлотоксичність, і у високих дозах (230 мг/кг) викликає смертельні ускладнення у щурів.

2. Застосування убіхінону, токоферолу, дибунолу, ретинолу й селеніту натрію в терапевтичних дозах зменшує загальну токсичність ЦФ, протистоїть ЦФ-індукованій лейкопенії та імуносупресії.

3. Найбільший протекторний ефект виявляють дибунол та убіхінон.

Використання убіхінону, дибунолу й інших антиоксидантів у хворих, що отримують терапію ЦФ, як протекторів його токсичних ефектів може поліпшити переносимість такої терапії.

Перспективним напрямком подальших досліджень може стати вивчення впливу даних антиоксидантів на утворення фармакологічно активних метаболітів та протипухлинний ефект ЦФ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / О. Г. Резнікова, А. І. Соловйова, Н. В. Добреля, О. В. Стефанова. — К.: Ін-т фармакології і токсикології АМН України; Держ. фармакологіч. центр МОЗ України, 2006. — 28 с.
2. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер. — М.: Медицина, 1978. — 294 с.
3. Кулик Г. И. Биотрансформация лекарств, применяемых в онкологии / Г. И. Кулик, В. А. Филов // Экспериментальная онкология. — 1987. — Т. 9, № 1. — С. 76–77.
4. Носков В. Н. Компьютерная биометрика / В. Н. Носков. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 232 с.
5. Переводчикова Н. И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. — 3-е изд., доп. и перераб. / Н. И. Переводчикова. — М.: Практическая медицина, 2011. — 512 с.
6. Чехун В. П. Современные взгляды на формирование лекарственной устойчивости опухолей / В. П. Чехун, Ю. В. Шишова // Онкология. — 2000. — Т. 2, № 1–2. — С. 11–15.
7. Association of high-dose cyclophosphamide, cisplatin, and carmustine pharmacokinetics with survival, toxicity, and dosing weight in patients with primary breast cancer / W. P. Petros, G. Broadwater, D. Berry [et al.] // Clin. Cancer Res. — 2002. — V. 8, № 3. — P. 698–705.
8. Lamson D. W. Antioxidants and cancer therapy II: quick reference guide / D. W. Lamson, M. S. Brignall // Altern. Med. Rev. — 2000. — V. 5, № 2. — P. 152–163.
9. Sreerama L. Primary breast tumor levels of suspected molecular determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide, ifosfamide, and certain other anticancer agents as predictors of paired metastatic tumor levels of these determinants. Rational individualization of cancer chemotherapeutic regimens / L. Sreerama, N. E. Sladek // Cancer Chemother Pharmacol. — 2001. — V. 47, № 3. — P. 255–262.