

УДК 616.36-008.6-615.244:577.1

**Бардер Е.Г.**

## **БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦИТОСТАТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ОКСАЛІПЛАТИН ТА ЇХ КОРЕКЦІЇ ЛІПОСОМАЛЬНИМ ПРЕПАРАТОМ «ЛІОЛІВ»**

Харківська медична академія післядипломної освіти

*У статті розглядається лабораторна оцінка гепатотоксичності оксаліплатину при введенні щурам гепатопротекторного препарату «Ліолів». Щурам контрольних груп (n=10) вводили фізіологічний розчин, щурам I групи (n=10) – оксаліплатин, II групи (n=10) – спочатку ліолів, потім оксаліплатин, III групи (n=10) – спочатку оксаліплатин, потім ліолів. На 14 добу експерименту аланінамінотрансфераза і лужна фосфатаза у I групі тварин збільшились в 2,1 рази, аспаратамінотрансфераза – в 1,5 рази, вміст альбумінів знизився в 1,6 рази, гамма-глутамілтранспептидаза зросла у 5 разів, лактатдегідрогеназа – у 3,5 рази. У II групі була збільшена лише аспаратамінотрансфераза в 1,26 рази, спостерігалася гіпоальбумінемія, а також зросла гамма-глутамілтранспептидаза у 2,21 рази та лактатдегідрогеназа у 1,86 рази. В III групі збільшувалась аланінамінотрансфераза – в 1,7 рази і аспаратамінотрансфераза – в 1,6 рази, лужна фосфатаза – в 1,77 рази, лактатдегідрогеназа у 2,4 рази, вміст альбумінів був зменшений у 1,41 рази. У I групі на 21 добу аланінамінотрансфераза була збільшена в 2,1 рази, аспаратамінотрансфераза – в 1,9 рази, лужна фосфатаза – в 2 рази, вміст альбумінів знизився в 1,6 рази. Гамма-глутамілтранспептидаза збільшилася у 6,8 рази, лактатдегідрогеназа – у 3,6 рази. У II групі зміни біохімічних маркерів на 21 добу експерименту були найменшими: була збільшена активність аланінамінотрансферази в 1,4 рази, гамма-глутамілтранспептидаза – у 2 рази. У III групі активність аланінамінотрансферази і аспаратамінотрансфераза була збільшена в 1,6 та 1,3 відповідно, гамма-глутамілтранспептидаза – в 2,8 рази, лактатдегідрогеназа – в 1,9 рази, лужна фосфатаза – в 1,5 рази, альбумін знижений в 1,4 рази. Таким чином, найбільш виражений гепатопротекторний ефект виявляли при застосуванні ліоліву перед введенням оксаліплатину.*

Ключові слова: печінка, щури, біохімічні маркери, гепатотоксичність, амінотрансферази, оксаліплатин, гепатопротектори, ліолів

*Робота виконана у рамках наукової теми кафедри онкології та дитячої онкології Харківської медичної академії післядипломної освіти «Нанотехнології у хіміотерапії злоякісних пухлин у дорослих та дітей», № державної реєстрації 0113U000972.*

### **Вступ**

Відомо, що діагностика медикаментозного ураження печінки часто є складною проблемою в клінічній та експериментальній онкології. Згідно з «Практичними рекомендаціями з корекції гепатотоксичності, індукованої протипухлинною хіміотерапією», діагностика гепатотоксичності ґрунтується на принципах ретельного збору інформації про застосовані препарати (включаючи дозування і тривалість прийому), виключення вірусного, алкогольного, аутоімунного гепатиту та інших патологічних станів, динамічного морфологічного контролю [1]. Найважливішими лабораторними показниками, що відображають основні біохімічні аспекти медикаментозних уражень печінки, є стандартні біохімічні тести: рівень аланінамінотрансферази (АлАТ), аспаратамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП), лактатдегідрогенази (ЛДГ), білірубину, загального білка [2;3;4;5].

### **Мета дослідження**

Визначити біохімічні маркери функціонального стану печінки в сироватці крові щурів після застосування препаратів оксаліплатин та ліолів на різних термінах спостереження для оцінки ступеня її токсичного ураження.

### **Об'єкт і методи дослідження**

Дослідження проводились на базі кафедри онкології та дитячої онкології Харківської медич-

ної академії післядипломної освіти, експериментально-біологічної клініки та відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» (свідоцтво про атестацію № 100–287/2015 від 20.11.2015 р.). Дослідження було виконано на білих щурах (n=40), стать – самиці, вік – 2,5–3 місяці, маса тіла – 200±30 г. Було сформовано три дослідних групи щурів (в кожній – по 10 тварин), контрольні групи – дві по 5 щурів. Щурам контрольних груп вводили фізіологічний розчин, щурам I групи – Оксаліплатин, II групи – спочатку Ліолів, потім Оксаліплатин, III групи – спочатку Оксаліплатин, потім Ліолів. Введення щурам Оксаліплатину в дозі 2,5 мг/кг проводили внутрішньочеревно, Ліоліву – 0,3 мл на щура внутрішньовенно, фізіологічного розчину – по 0,3 мл внутрішньовенно. Введення препаратів проводили 5 разів кожен 3 день експерименту. Тривалість експерименту – 21 доба. Через 15 та 21 добу тварини було виведені з експерименту шляхом декапітації під наркозом, після чого було відібрано кров для дослідження. Всі дослідження у роботі виконано із дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986), а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Під час біохімічних досліджень в сироватці крові було визначено наступні біохімічні маркери: альбуміни – за реакцією з бромкрезоловим зеленим,

глюкозу – ферментативним методом, сечовину – за реакцією з діацетилмоноксидом, креатинін – за реакцією Яффе (метод Поппера), білірубін – за методом Йендрашека. Активність ферментів АлАТ, АсАТ, ЛДГ, лужної фосфатази і ГГТП визначали кінетичними методами [9]. Статистичний аналіз даних був здійснений за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel XP та Statsoft Statistica 6.0. Порівняння груп тварин в експерименті проводилося за параметричним критерієм Ст'юдента із визначенням середнього та його похибки ( $M \pm m$ ) [10].

**Результати досліджень та їх обговорення**

Під час аналізу результатів біохімічних досліджень на 15 добу експерименту було встановлено зміни показників функціонального стану печінки, які проявлялися цитолітичним, холестатичним і гепатодепресивним синдромами. Активність

АлАТ і лужної фосфатази у першій групі тварин збільшилась в 2,1 рази, АсАТ – в 1,5 рази порівняно з контрольною групою. Вміст альбумінів знизився в 1,6 рази, активність ГГТП зросла у 5 разів, активність ЛДГ – у 3,5 рази порівняно з контрольною групою тварин. У другій групі була збільшена лише активність АсАТ в 1,26 рази, спостерігалася гіпоальбумінемія (у 1,47 рази), а також зростання активності ГГТП у 2,21 рази та ЛДГ у 1,86 рази порівняно з контрольною групою тварин. В третій групі спостерігалася зростання активності обох амінотрансфераз: АлАТ – в 1,7 рази, АсАТ – в 1,6 рази. Також була збільшена активність лужної фосфатази в 1,77 рази та ЛДГ у 2,4 рази. Вміст у сироватці крові альбумінів був зменшений у 1,41 рази порівняно з контрольною групою (табл. 1).

Таблиця 1

*Біохімічні маркери сироватки крові щурів під час застосування оксаліплатину та піоліу на 15 добу експерименту ( $M \pm m$ )*

Біохімічні маркери	Контрольна група, n=5	Дослідні групи		
		I група	II група	III група
АлАТ, U/L	39,2±4,28	80,4±5,90 **	58,8±4,67	67,2±3,54 *
АсАТ, U/L	214,0±5,79	328,4±6,96 ***	268,8±13,2 *	339,2±15,3 **
Лужна фосфатаза, U/L	192,4±9,33	398,4±26,3 **	305,6±36,5	340,2±30,55 *
Альбуміни, г/л	42,7±1,59	26,4±1,33 **	29,14±0,46**	30,2±0,36 **
Сечовина, ммоль/л	4,18±0,28	4,52±0,50	4,78±0,49	5,22±0,36
Креатинін, мкмоль/л	62,8±5,47	66,6±3,52	54,3±5,84	64,6±3,17
Білірубін, мкмоль/л	3,06±0,17	4,12±0,94	3,78±1,09	3,08±0,28
ГГТП, U/L	4,36±0,65	22,2±1,53 ***	9,66±0,83 *	15,46±0,72 ***
ЛДГ, U/L	531,2±49,5	1850,0±150,2 **	985,5±60,7 **	1270,0±75,0 **
Глюкоза, ммоль/л	8,04±0,21	7,74±0,33	8,46±0,64	8,46±0,66

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \* –  $p \leq 0,001$  порівняно з контрольною групою

Таблиця 2

*Біохімічні маркери сироватки крові щурів під час застосування оксаліплатину та піоліу на 21 добу експерименту ( $M \pm m$ )*

Біохімічні маркери	Контрольна група, n=5	Дослідні групи		
		I група	II група	III група
АлАТ, U/L	38,6±1,19	79,4±3,33 ***	55,0±1,34 **	62,8±3,38 **
АсАТ, U/L	206,4±11,6	389,6±17,4 **	243,4±3,53	277,6±13,4 *
Лужна фосфатаза, U/L	212,0±6,46	429,6±11,14 ***	254,2±13,02	318,8±12,77 **
Альбуміни, г/л	40,4±1,02	24,7±0,85 ***	37,4±0,60	29,9±1,58 **
Сечовина, ммоль/л	4,26±0,27	3,82±0,47	4,04±0,09	4,12±0,30
Креатинін, мкмоль/л	57,6±4,37	58,4±5,61	56,6±2,50	61,2±4,33
Білірубін, мкмоль/л	3,34±0,26	3,00±0,10	3,46±0,07	3,46±0,19
ГГТП, U/L	4,12±0,54	27,84±1,63 ***	8,34±0,61*	11,64±0,89 **
ЛДГ, U/L	525,2±77,7	1889,0±133,7**	744,9±46,2	1019,0±26,5 **
Глюкоза, ммоль/л	7,8±0,26	7,58±0,14	7,42±0,30	7,18±0,26

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \* –  $p \leq 0,001$  порівняно з контрольною групою

На 21 добу експерименту біохімічні маркери сироватки крові у щурів змінились наступним чином. У першій групі активність ферментів цитолізу залишалась підвищеною (АлАТ в 2,1 рази, АсАТ – в 1,9 рази), активність лужної фосфатази зросла удвічі порівняно з контрольною групою. Також було встановлено гіпоальбумінемію як ознаку гепатодепресивного синдрому – вміст альбумінів знизився в 1,6 рази.

Активність ГГТП збільшилась у 6,8 рази, ЛДГ – у 3,6 рази порівняно з контрольною групою. У другій групі зміни біохімічних маркерів на 21 добу експерименту були найменшими: була збільшена активність АлАТ в 1,4 рази, ГГТП – у 2 ра-

зи. У третій групі активність АлАТ і АсАТ була збільшена в 1,6 та 1,3 відповідно, лужна фосфатаза – в 1,5 рази, альбумін знижений в 1,4 рази. Активність ГГТП була збільшена в 2,8 рази, ЛДГ – в 1,9 рази порівняно з контрольною групою тварин (табл. 2).

Таким чином, найбільш важкі прояви цитолітичного, гепатодепресивного й холестатичного синдромів було встановлено у сироватці крові тварин першої групи, які отримували цитостатик без гепатопротекторного препарату. Найменш виражені зміни біохімічних маркерів сироватки крові щурів, які віддзеркалюють порушення функціонального стану печінки, було встановлено у

другій групі тварин, які отримували гепатопротекторний засіб перед введенням цитостатику. Динаміка активності АлАТ вказувала на збільшення активності цитолітичного синдрому в першій групі тварин, а також про поступове зменшення цитолізу гепатоцитів у другій та третій групах порівняно з контрольною групою. Така динаміка свідчить про зменшення токсичності оксаліплатину у групах тварин, які отримували гепатопротектор на основі ліпосом «Ліолів». Найнижчий показник активності АлАТ спостерігався саме у другій групі щурів, яким гепатопротектор вводили перед застосуванням цитостатику.

Активність АсАТ у другій групі тварин на 15 та 21 добу була найнижчою порівняно з іншими групами. У першій групі активність АсАТ зростала від 15 до 21 доби, причому активність АсАТ на 21 добу була вище порівняно з показником на 15 добу. У третій групі тварин активність АсАТ на 21 добу експерименту зменшилася як порівняно з контрольною групою, так і з показником на 15 добу. Така динаміка активності амінотрансфераз пов'язана з токсичним ураженням печінки у тварин першої групи. У щурів другої і третьої груп на 21 добу відбувалось зменшення цитолізу порівняно з контрольною групою, зумовленого дією препарату «Ліолів». Найбільш висока активність лужної фосфатази в сироватці крові була встановлена на 15 та 21 добу експерименту у тварин першої групи, що свідчить про розвиток синдрому холестазу. У другій групі вміст лужної фосфатази був найнижчим порівняно з контрольною, проте не досягав її рівня. Збільшення лужної фосфатази у сироватці крові вказувало на застій жовчі у жовчних протоках, адже порушення відтоку жовчі посилює потрапляння цього ензиму в кровообіг. У третій групі тварин активність лужної фосфатази на 21 добу експерименту була нижче, ніж у другій, але також не досягала значення показника у контрольній групі. Гепатодепресивний синдром у щурів визначали упродовж експерименту за вмістом в сироватці крові альбумінів – білків, які синтезуються у печінці. На 15 добу у всіх дослідних групах тварин було встановлено гіпоальбумінемію, очевидно, зумовлену гепатотоксичною дією оксаліплатину. Найвищий ступінь гіпоальбумінемії був у першій групі, оскільки тварини цієї групи не отримували гепатопротекторний препарат «Ліолів». На 21 добу експерименту гіпоальбумінемія зберігалася у першій і третій групах, у другій групі вміст альбуміну не відрізнявся від контрольної групи, що, на нашу думку, зумовлено гепатопротекторною дією препарату «Ліолів». Також важливим біохімічним маркером гепатотоксичності є активність ГГТП – ферменту, який міститься у плазматичних мембранах клітин жовчних протоків. У тварин першої групи активність ГГТП в сироватці крові була найвищою і зростала від 15 до 21 доби експерименту. У щурів третьої групи активність ГГТП на 15 та 21 добу була значно нижче, ніж у тварин першої групи, але не

досягала межі значень контрольної. Найнижча активність ГГТП була встановлена у другій групі тварин, що, очевидно, зумовлено протекторною дією ліпосомального препарату «Ліолів» до введення цитостатику. Активність ЛДГ у першій групі тварин була найвищою порівняно з контрольною групою на 15 та 21 добу, що зумовлено токсичною дією цитостатичного препарату оксаліплатину. У другій групі активність ЛДГ була найнижчою на 15 добу порівняно з контрольною, на 21 добу вона знизилась, але не досягла рівня контрольної групи. У третій групі тварин збільшення активності ЛДГ було в меншому ступені, ніж у першій, але не досягало показника контрольної групи. Зростання активності ЛДГ є неспецифічною ознакою, однак може свідчити про токсичне ураження печінки внаслідок дії оксаліплатину за рахунок зростання ізоферментів – ЛДГ<sub>4</sub> та ЛДГ<sub>5</sub>.

### **Висновки**

1. В результаті проведення експериментального дослідження протекторної дії ліпосомального препарату «Ліолів» на щурах із застосуванням різних способів введення було встановлено, що за результатами лабораторного дослідження крові щурів найбільш виражений гепатопротекторний ефект проявляється при застосуванні препарату «Ліолів» перед введенням цитостатичного препарату оксаліплатину.

2. Зменшення на 21 добу експерименту в сироватці крові активності ферментів цитолізу (АлАТ і АсАТ, ЛДГ), маркерів синдрому холестазу (активність лужної фосфатази і ГГТП), показника гепатодепресивного синдрому (альбумінів), що зумовлено профілактичною мембраностабілізуючою дією гепатопротектору «Ліолів» на клітини печінки.

### **Перспективи подальших досліджень**

Планується визначення біохімічних маркерів функціонального стану печінки у онкологічних пацієнтів для оцінки ефективності ліпосомального гепатопротектору «Ліолів» на фоні терапії оксаліплатином.

### **Література**

1. Снеговой А. В. Практические рекомендации по коррекции гепатотоксичности, индуцированной противоопухолевой химиотерапией / А. В. Снеговой, Е. Г. Громова, В. Б. Ларионова // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 4, спецвыпуск. – С. 358–368.
2. Кляритская И. Л. Современный взгляд на проблему лекарственных поражений печени / И. Л. Кляритская, Е. В. Максимова // Новости медицины и фармации. – 2011. – № 382. – С. 30–35.
3. Кулініч О. С. Модуляція гепатотоксичності цисплатину кластерними сполуками ренію (III) у моделі канцерогенезу / О. С. Кулініч, О. О. Дьомшина, Н. І. Штеменко // Медична хімія. – 2013. – № 3. – С. 21–26.
4. Longo D. Harrison's Gastroenterology and Hepatology / D. Longo, A. Fauci. – 2nd edition. – McGraw-Hill, 2013. – 783 p.
5. Schiff E. Schiff's Diseases of the Liver / E. Schiff, W. Maddrey. – Wiley-Blackwell, 2012. – 1185 p.
6. Overman M. J. Immunophenotype and molecular characterisation of adenocarcinoma of the small intestine / M. J. Overman, J. Pozadzides, S. Kopetz et al. // Br J Cancer. – 2010. – Vol. 102. – P. 144–150.

- Kim S. H. Update on Advances in Research on Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury / S. H. Kim, D. J. Naisbitt // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2016. – Vol. 8 (1). – P. 3–11.
- Mohankumar N. Drug-induced liver injury: Diagnosing (and treating) it early / N. Mohankumar, P. Ranjan, A. Kumari // *J Fam Pract.* – 2015. – Vol. 64 (10). – P. 634–44.
- Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / За ред. В.В. Влізла. – Львів, СГОЛОМ, 2012. – 764 с.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. / С. Гланц – М.: Практика, 1998. – 459 с.

### Реферат

#### БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ОКСАЛИПЛАТИН И ИХ КОРРЕКЦИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТОМ «ЛИОЛИВ»

Бардер Э.Г.

Ключевые слова: печень, крысы, биохимические маркеры, гепатотоксичность, аминотрансферазы, оксалиплатин, гепатопротекторы, лиолив.

В статье рассматривается лабораторная оценка гепатотоксичности оксалиплатина при введении крысам гепатопротектора «Лиолив». Крысам контрольных групп (n=10) вводили физиологический раствор, крысам I группы (n=10) – оксалиплатин, II группы (n=10) – сначала лиолив, затем оксалиплатин, III группы (n=10) – сначала оксалиплатин, затем лиолив. На 14 сутки эксперимента аланинаминотрансфераза и щелочная фосфатаза в I группе животных увеличились в 2,1 раза, аспартатаминотрансфераза – в 1,5 раза, содержание альбуминов снизилось в 1,6 раза, гамма-глутамилтранспептидаза выросла в 5 раз, лактатдегидрогеназа – в 3,5 раза. Во II группе была увеличена лишь аспартатаминотрансфераза в 1,26 раза, наблюдалась гипоальбуминемия, возросла гамма-глутамилтранспептидаза в 2,21 раза и лактатдегидрогеназа в 1,86 раза. В III группы увеличивалась аланинаминотрансфераза – в 1,7 раза и аспартатаминотрансфераза – в 1,6 раза, щелочная фосфатаза – в 1,77 раза, лактатдегидрогеназа – в 2,4 раза, содержание альбуминов был уменьшено в 1,41 раза. В I группе на 21 сутки аланинаминотрансфераза была увеличена в 2,1 раза, аспартатаминотрансфераза – в 1,9 раза, щелочная фосфатаза – в 2 раза, альбумины снизились в 1,6 раза. Гамма-глутамилтранспептидаза увеличилось в 6,8 раза, лактатдегидрогеназа – в 3,6 раза. Во II группе изменения на 21 дней эксперимента были наименьшими: была увеличена активность аланинаминотрансферазы в 1,4 раза, гамма-глутамилтранспептидаза – в 2 раза. В третьей группе активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансфераза была увеличена в 1,6 и 1,3 соответственно, гамма-глутамилтранспептидаза – в 2,8 раза, лактатдегидрогеназа – в 1,9 раза, щелочная фосфатаза – в 1,5 раза, альбумин снижен в 1,4 раза. Таким образом, наиболее выраженный гепатопротекторный эффект проявлялся при применении препарата «Лиолив» перед введением оксалиплатина.

### Summary

#### BIOCHEMICAL CHANGES IN THE FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER IDENTIFIED IN BLOOD SERUM OF RATS AFTER ADMINISTRATION OF OXALIPLATIN CYTOSTATIC DRUG AND THEIR CORRECTION WITH LIOLIV LIPOSOMAL DRUG

Barder E.G.

Key words: liver, rats, biochemical markers, hepatotoxicity, aminotransferase, Oxaliplatin, hepatoprotectors, Lioliv.

The article examines the laboratory evaluation of hepatotoxicity of Oxaliplatin against the Lioliv hepatoprotective drug administered to rats. The rats of control groups (n=10) were injected with physiological saline, the rats of group I (n = 10) were injected oxaliplatin, the group II (n=10) was introduced Lioliv oxaliplatin, the group III (n = 10) was first introduced Oxaliplatin then followed with Lioliv. On the 14<sup>th</sup> day of the experiment, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase in the I group of animals nearly doubled (in 2.1 times), aspartat aminotransferaze increased in 1.5 times, the albumin content decreased in 1.6 times, gamma-glutamyl transferase increased in 5 times, lactate dehydrogenase increased in 3.5 times. The II group demonstrated the only increase in aspartataminotransferaze in 1.26 times, hypoalbuminemia, gamma glutamyl transpeptidase increased in 2.21 times and lactate dehydrogenase in 1.86 times. The group III showed increase of alanine aminotransferase in 1.7 times, and increase of aspartat aminotransferaze in 1.6 times; alkaline phosphatase grew in 1.77 times, lactate dehydrogenase – in 2.4 times, albumin content decreased in 1.41 times. In the 1st group, for 21 days, alanine aminotransferase was increased in 2.1 times, aspartat aminotransferaze – in 1.9 times, alkaline phosphatase doubled, albumin decreased in 1.6 times, gamma-glutamyl transferase increased in 6.8 times, lactate dehydrogenase grew in 3.6 times. The II group demonstrated the least pronounced changes on the 21 days of the experiment: the activity of alanine aminotransferase was nearly unchanged (increased in 1.4 times), gamma-glutamyl transferase doubled. In the group III, the activity of alanine aminotransferase and aspartat aminotransferaze increased in 1.6 and 1.3, respectively, gamma-glutamyl transferase increased in 2.8 times, lactate dehydrogenase – in 1.9 times, alkaline phosphatase – in 1.5 times, and albumin reduced in 1.4 times. Thus, the most pronounced hepatoprotective effect was observed when Lioliv was administered before the introduction of Oxaliplatin.