УДК 612.45:615.45

© Колектив авторів, 2012.

ВПЛИВ РОЗЧИНУ О,П'-ДДД (ХЛОДИТАНУ) НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ В ДОСЛІДАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

Я.Г. Бальон, О.В. Сімуров, І.П. Пастер, Л.І. Полякова, О.Г. Резніков, М.Д. Тронько
ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин імені В.П. Комісаренка НАМН України", м. Київ.

INFLUENCE OF O,P'-DDD (CHLODITAN) ON MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF ADRENAL CORTEX *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Ya.G. Balyon, A.V. Simurov, I.P. Pasteur, L.I. Polyakova, A.G. Reznikov, M.D. Tronko

SUMMARY

A new o,p'-DDD (chloditan) drug formulation as solution for intravessel injection inhibiting adrenal cortex function has been developed. After 24 h cultivation in the presence of 0,005-5,0 mg/ml o,p'-DDD solution, dose-dependent decrease of 11-hydroxycorticosteroid contents in culture medium by 11,0-69,8% was observed. In dogs, 3.5-fold decrease in blood plasma 11-hydroxycorticosteroid level and almost 3-fold decrease in 11-hydroxycorticosteroid response to synthetic 1-24-corticotropin stimulation were found after intravenous injection of 5% o,p'-DDD solution at a volume of 10 ml per day during 3 days. As well a low level of 11-hydroxycorticosteroid was observed in 2 weeks after o,p'-DDD withdrawal. Histological examination shows the loss of adrenal cortex cells in applying o,p'-DDD to tissue culture, the intensity of which was dependent on the applied dose. Proposed o,p'-DDD solution demonstrates adrenal cortex inhibiting effect, and thus might be recommended for clinical trial.

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРА О,П'-ДДД (ХЛОДИТАНА) НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРЫ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ В ОПЫТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Я.Г. Бальон, А.В. Симуров, И.П. Пастер, Л.И. Полякова, А.Г. Резников, Н.Д. Тронько

РЕЗЮМЕ

Впервые создана растворимая лекарственная форма ингибитора функции коры надпочечных желез о,п'-ДДД (хлодитана) для внутривенного введения. Культивирование фрагментов адренокортикальной ткани человека в присутствии раствора о,п'-ДДД в концентрации 0,005-5,0 мг/мл на протяжении 24 час приводило к дозозависимому снижению концентрации 11-гидроксикортикостероидов в среде на 11,0-69,8%. При ежедневном внутривенном введении 10 мл данного раствора на протяжении трёх суток уровень 11-гидроксикортикостероидов в плазме крови собак снижался в среднем почти в 3,5 раза, а реакция на стимуляцию синтетическим 1-24-кортикотропином – почти в 3 раза. Сниженный уровень 11-гидроксикортикостероидов в плазме крови наблюдался и через 2 недели после отмены препарата. Гистологический анализ культивированной ткани показал повреждения адренокортикоцитов в зависимости от концентрации о,п'-ДДД. Таким образом, предложенный раствор о,п'-ДДД обладает адренокортиколитической активностью и может быть рекомендован для клинических исследований.

Ключові слова: хлодитан, кора надниркових залоз, 11-гідроксикортикостероїди, *in vitro*, *in vivo*.

Хвороба Іценка-Кушинга та злоякісні пухлини кори надниркових залоз належать до хвороб, які безпосередньо загрожують життю хворого. Важкість стану хворого пов'язана як із загальною онкологічною симптоматикою, так і з гормональною гіперфункцією, яка може самостійно бути причиною смерті. Тому актуальною залишається проблема лікування зазначених форм патології як із метою усунення гіперфункції гормонів, так і для позбавлення хворого від пухлини та її метастазів.

Доведено клінічну ефективність застосування інгібіторів функції кори надниркових залоз, які спричиняють на неї цитотоксичний вплив [5, 12]. Найбільш ефективним до цього часу є *орто,пара*-дихлордифенілдихлоретан (о,п'-ДДД, хлодитан, мітотан), який застосовують перорально у вигляді таблеток [6]. Розроблено комбінований медикаментозно-хірургічний метод лікування даних захворювань із використанням адреналектомії і хлодитану [4, 7]. Для досягнення стійкого клінічного ефекту необхідно застосовувати хлодитан перорально протягом декількох місяців (максимальна добова доза 8-10 г), причому курси лікування необхідно повторювати. Ефект лікування даним препаратом залежить від індивідуальної реактивності хворого, а також від морфологічного і функціонального стану кори надниркових залоз. У деяких хворих може розвиватися резистентність до хлодитану, в цих випадках без операції не обійтись. Але в більш як у 90 % випадків застосування препарату приводить до нормалізації функції кори надниркових залоз.

При пероральному використанні високих доз хлодитану спостерігаються деякі побічні ускладнення – нудота, блювання, свербіння шкіри, діарея, атаксія, лейкопенія, гінекомастія та інші [2, 9]. Крім того, слід зазначити, що хлодитан завдяки ліпофільності при пероральному застосуванні має невисоку біодоступність. З метою підвищення терапевтичної

ефективності хлодитану, зниженню його дозування та зменшенню побічної дії нами запропонована розчинна лікарська форма препарату для внутрішньосудинного введення, яка не має світових аналогів [10].

Необхідним етапом вивчення специфічної фармакологічної активності такої форми о,п'-ДДД було експериментальне дослідження її впливу на продукування адренокортикальних гормонів – кортизолу і кортикостерону, що належать до групи 11-гідроксикортикостероїдів (11-ГОКС), культивованою тканиною кори надниркових залоз людини та їх вмісту в плазмі крові собак при внутрішньосудинному введенні препарату. Слід зазначити, що за параметрами гострої токсичності розчин о,п'-ДДД для ін'єкцій є малотоксичним [3].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження був стерильний 5 % розчин о,п'-ДДД (хлодитану) в суміші розчинників: пропіленгліколь, етанол та N,N-диметилацетамід у співвідношенні 7:2:1. Усі розчинники використовуються в ін'єкційних лікарських формах [11].

Для дослідів *in vitro* умовно нормальну тканину кори надниркових залоз людини отримували у відділенні хірургії ендокринних залоз Інституту під час проведення операції адреналектомії з приводу феохромоцитоми або аденоматозної гіперплазії кори надниркових залоз, промивали декілька разів стерильним 0,9% розчином натрію хлориду з антибіотиками (100 Од бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 мл розчину), очищали від жирової та сполучної тканин, після чого розрізали на шматочки розміром до 1 мм^3 та знову промивали декілька разів вказаним розчином.

Отриману тканину культивували по три шматочки у скляних флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 ("Sigma", США), яке містило 10 % фетальної сироватки теляти ("Sigma", США) і антибіотики, при температурі 37 ^{0}С. Середовище культивування замінювали один раз на дві доби. Протягом 24 або 48 годин частина проб містила також о,п'-ДДД в кінцевих концентраціях 0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5 та 5,0 мг/мл. На 2-у добу культивування адренокортикальну тканину відбирали для гістологічного дослідження, а на 3-ю, 4-у, 8-у, 12-у, 16-у, 20-у, 24-у і 28-у добу відбирали та заморожували при температурі -20 ^{0}С аліквоти середовища для наступного визначення рівня 11-ГОКС. Проведено 2 серії експериментів з вивчення функціональної активності тканини кори надниркових залоз людини в динаміці тривалого культивування та впливу о,п'-ДДД на рівень 11-ГОКС в середовищі культивування (в кожній серії по 3 досліди з групами у дублікатах або триплікатах).

Досліди *in vivo* проводили на собаках, тому що вони, так само, як люди, є найбільш чутливими до адренокортиколітичної дії хлодитану в порівнянні з іншими видами ссавців. До того ж брали до уваги, що кора надниркових залоз собак, так само, як і людей, окрім альдостерону синтезує переважно кортизол. Собаки-самці вагою (10,0±0,3) кг знаходилися в контрольованих умовах віварію при 20-25 ^{0}С, вологості 50-55%, на стандартному харчовому раціоні. Десять собак були розділені на 2 групи. П'ять собак першої групи служили контролем, їм внутрішньовенно вводили 10 мл розчинника о,п'-ДДД. П'яти піддослідним тваринам вводили 5%-й розчин о,п'-ДДД. Перед першими внутрішньовенними ін'єкціями забирали з вени 5 мл крові для визначення 11-ГОКС і проводили тест на функціональні резерви кори надниркових залоз шляхом стимуляції синтетичним 1-24-кортикотропіном (синактен-депо, «Новартіс», Німеччина) внутрішньовенно у дозі, еквівалентній 25 МО гіпофізарного АКТГ. Через 1,5 год забирали 5 мл крові для повторного визначення вмісту 11-ГОКС і вводили розчин о,п'-ДДД або розчинник. Введення препарату або розчинника повторювали у наступні дві доби (усього 3 ін'єкції на курс), одразу після чого виконували повторний тест з синактеном. Через 2 тижні після закінчення експерименту знов визначали базальний рівень 11-ГОКС у плазмі крові.

Кількісне визначення рівня 11-ГОКС, тобто сумарного вмісту кортизолу і кортикостерону, в аліквотах середовища культивування кори надниркових залоз людини і в плазмі крові собак проводили флюориметричним мікрометодом [1] на спектрофлуориметрі "Hitachi MPF-4" (Японія) з використанням в якості стандарту кристалічного кортизолу ("Reanal", Угорщина). Отримані дані опрацьовували методом Стьюдента за критерієм *t*.

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з біоетики Інституту, а також інформована згода від кожного пацієнта. Усі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986 рік) і національних норм з біоетики (І Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 рік).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гістологічний аналіз показав, що культивовані фрагменти надниркової залози людини містили клітини пучкової та клубочкової зон, а також фрагменти капсули. При застосуванні розчину хлодитану в концентрації 0,05 мкг/мл частина клітин гинула, а в збережених спостерігали значну відмінність будови від контролю (рис.1). Об'єм цитоплазми зменшувався, вона забарвлювалась менш оксифільно, часто знаходили великі вакуолі.

Змінювалась будова ядер – в одних клітинах вони були набухлі, гіперхромні, в інших було чітко видно пристінкове розташування хроматину, частина ядер були пікнотичні. Нерідко спостерігали каріолізис. При застосуванні хлодитану в концентраціях 0,5, 5,0 і 50 мкг/мл зміни прогресивно наростали, а при концентрації 0,5 мг/мл у культивованих фрагментах залишався лише сполучнотканинний каркас та поодинокі клітини в стані некробіозу.

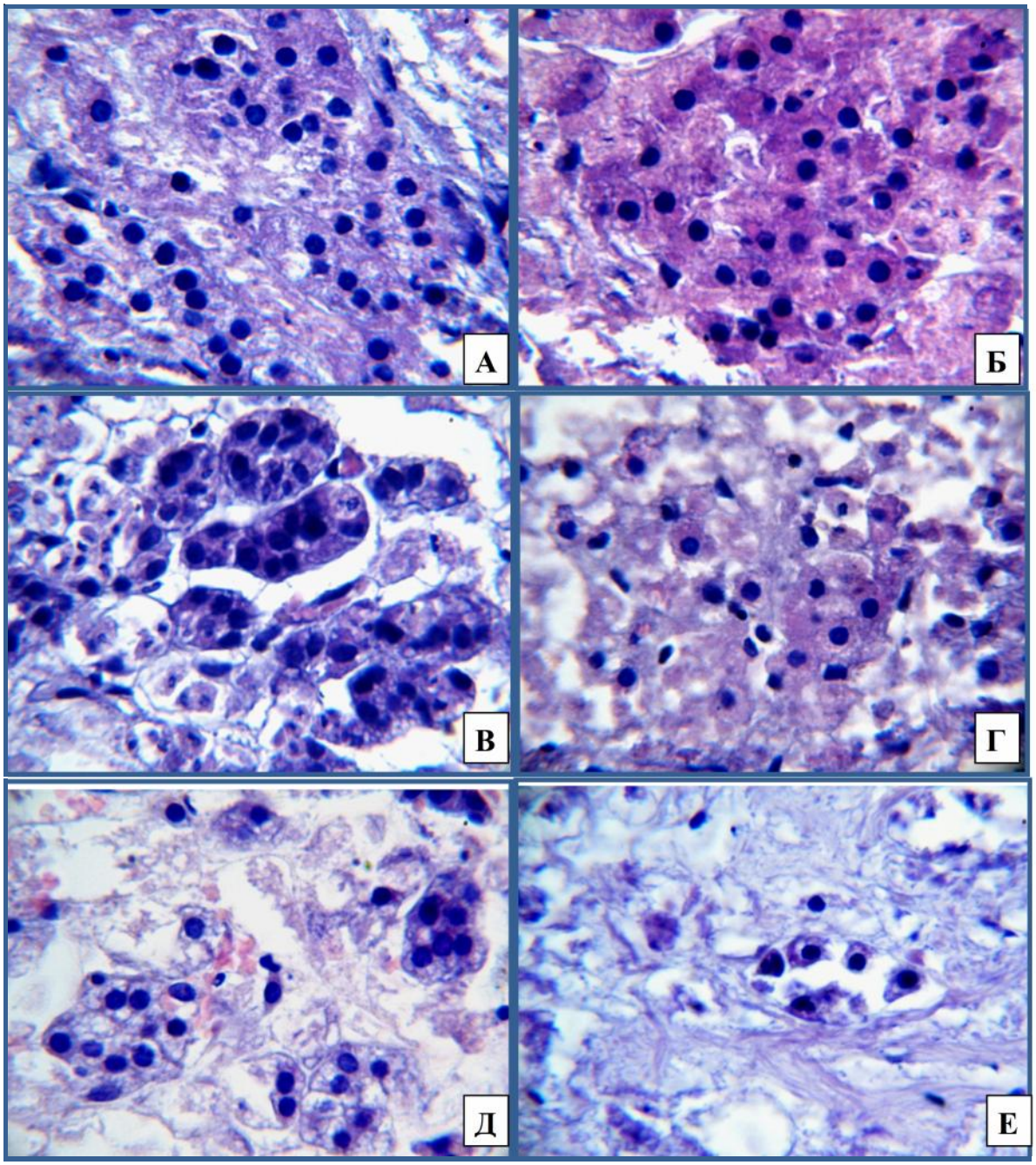

Рис. 1. Вплив розчину *орто,парат*-дихлордифенілдихлоретану (хлодитану) на стан культури тканини кори надниркових залоз людини. А– контроль, клубочкова зона; Б – контроль, пучкова зона, В – 0,05 мкг/мл, пошкодження клубочкової зони; Г– 0,05 мкг/мл, пошкодження пучкової зони; Д – 50 мкг/мл, часткова деструкція кори, Е – 0,5 мг/мл, виражена деструкція кори. Забарвлення гематоксилін-еозином, Ч400.

За результатами проведених досліджень, встановлено наявність гормональної активності тканини кори надниркових залоз людини в динаміці тривалого культивування: базальний рівень 11-ГОКС в культуральному середовищі зазнавав певних коливань і становив на 4-у, 8-у, 12-у, 16-у, 20-у, 24-у і 28-у добу відповідно (44,5±3,5) мкг/мл, (48,0±7,0) мкг/мл, (44,5±7,5) мкг/мл, (34,5±6,5) мкг/мл, (42,8±9,2) мкг/мл, (31,8±3,2) мкг/мл і (48,2±1,2) мкг/мл.

Культивування тканини кори надниркових залоз людини з о,п'-ДДД призводило до дозозалежного зниження рівня 11-ГОКС в середовищі: при концентрації препарату 0,005 мг/мл – на 11,0%, при 0,05 мг/мл – на 39,5%, при 0,5 мг/мл – на 54,3% ($p<0,05$) і при 5 мг/мл – на 69,8% ($p<0,02$).

Раніше було показано, що етанольний розчин о,п'-ДДД в умовах *in vitro* гальмує секрецію кортикостероїдів з кори надниркових залоз собак [13], щурів і птахів [8] або абортованого плоду людини [15].

Результати даної роботи свідчать про те, що о,п'-ДДД у складі запропонованого розчину спричинює у співставимих концентраціях аналогічний ефект в тканинних культурах кори надниркових залоз дорослих людей. Таким чином, присутність використаних органічних розчинників не впливає на здатність о,п'-ДДД до гальмування секреції кортикостероїдів *in vitro*.

Згідно отриманих результатів, триденне внутрішньовенне введення по 10 мл суміші розчинників о,п'-ДДД на день не впливає на вміст 11-ГОКС в плазмі крові собак (табл.1). Так само під впливом розчинників не виявлено достовірних змін реакції кори надниркових залоз на стимулювання синактеном. При внутрішньовенному введенні 5% розчину о,п'-ДДД базальний рівень 11-ГОКС через три доби знизився майже в 3,5 рази. На тлі введення синактену відбулося майже трикратне послаблення реакції кори надниркових залоз, яку оцінювали як за приростом концентрації 11-ГОКС в плазмі крові (приріст у контролі – 141,8 нмоль/л, у досліді – 50,2 нмоль/л), так і за їх рівнем, досягнутим після гормональної стимуляції.

Таблиця 1

Вплив 5 %-го розчину о,п'-ДДД на концентрацію 11-ГОКС у плазмі крові самців собак (нмоль/л, n=5)

Умови досліду, показник	Розчинник	о,п'-ДДД
До введення розчинника або о,п´-ДДД		
Базальний рівень	481,8±65,6	414,2±17,3
Через 1,5 год. після введення синактену	654,4±93,1**	556,0±38,6**
Після 3-денного введення розчинника або о,п´-ДДД		
Базальний рівень	465,0±56,3	115,8±7,8#
Через 1,5 год. після введення синактену	712,0±85,5*	166,0±18,5*,#
Через 2 тижні	-	269±15,59***

Примітка: *** - $p<0,001$, ** - $p<0,01$ і * - $p<0,02$ відносно відповідного базального рівня; # - $p<0,001$ відносно відповідного контролю.

Отримані результати цілком узгоджуються з раніш опублікованими нами даними, що стосуються впливу 7-30-денного перорального введення порошку о,п'-ДДД собакам у дозах 50-100 мг/кг маси тіла [14]. Доза кортикотропіну 25 МО, згідно нашому багаторічному досвіду, викликає максимальну стимуляцію біосинтезу і секреції кортикостероїдів у собак. Отже під впливом розчину о,п'-ДДД відбувалось не тільки глибоке пригнічення їх базальної продукції, але й суттєве зменшення функціональних резервів кори надниркових залоз. Натомість необхідно підкреслити, що за умови внутрішньовенного введення хлодитану ефект досягається використанням у 10-15 разів меншої кількості інгібітору на курс, що має суттєво послабити загальнотоксичні ефекти о,п'-ДДД. До того ж вдається уникнути подразнюючого впливу на слизову оболонку шлунку і кишківника. Цілком ймовірно, що запропонований розчин буде ще більш ефективним при його застосуванні у людей шляхом регіонарної перфузії надниркових залоз, що дасть змогу ще більш зменшити дозу о,п'-ДДД.

ВИСНОВОК

Таким чином, о,п'-ДДД (хлодитан) у формі розчину спричинює цитотоксичний ефект на культивовану кору надниркових залоз людини і гальмує адренокортикальну функцію як в органній культурі людини, так і у собак при внутрішньосудинному введенні, що є визначальним для подальших клінічних досліджень даної форми препарату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический метод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – Т. 76, № 2. – С. 280-283.

2. Бальон Я.Г., Корпачев В.В. Деякі досягнення у створення лікарських засобів для лікування ендокринної патології // Ендокринологія. – 1996. – Т. 1, № 1. – С. 25-31.

3. Бальон Я.Г., Ховака В.В., Сімуров О.В. Дослідження гострої токсичності парентеральної форми о,п'-ДДД (хлодитану) // Фармакол. лік.

токсикол. – 2010. – № 3 (16). – С. 12-16.

4. Кваченюк А.М. Хлодитанотерапія адренокортикального раку // Лікарська справа. – 2004. – № 8. – С 64-67.

5. Комиссаренко В.П., Резников А.Г. Ингибиторы функции коры надпочечных желез. – Київ: Здоров'я, 1972. – 374 с.

6. Комиссаренко В.П., Резников А.Г., Комиссаренко И.В., Бальон Я.Г. Хлодитан // Хим.-фарм. журн. – 1977. – Т. 11, № 9. – С. 146-149.

7. Комиссаренко И.В., Рыбаков С.И. Фармакотерапия опухолей коркового вещества надпочечных желез // Фармакол. вісник. – 2000. – № 1. – С. 50-53.

8. Кравченко В.И. Влияние о,п'-ДДД на образование кортикостероидов надпочечниковой тканью in vitro // Пробл. эндокринол.– 1973. – Т. 19, № 5. – С. 76-79.

9. Машковский М.Д. Лекарственные средства (хлодитан). – Москва: ООО "Новая волна", 2005. – 1015 с.

10. Патент України № 54523. Бальон Я.Г., Резніков О.Г., Тронько М.Д. та ін. // Спосіб одержання ін'єкційного розчину 1-(орто-хлорфеніл)-1-(пара-хлорфеніл)-2,2-дихлоретану (хлодитану), який є інгібітором функції кори надниркових залоз // 10.11.2010, Бюл. № 21.

11. Тронько М.Д., Комісаренко І.В., Бальон Я.Г. та ін. Інгібітори гормоноутворення в надниркових залозах та їх застосування у клінічній практиці // Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16, № 2. – С. 271-287.

12. Технология и стандартизация лекарств // Под ред. Георгиевского В.П. – Харьков: РИРЕГ, 2005. – 779 с.

13. Hart M.M., Straw J.A. Effect of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on adrenocorticotropic hormone-induced steroidogenesis in various preparations in vitro of dog adrenal cortex // Biochem. Pharmacol. – 1971. – Vol. 20, N 7. – P. 1679-1688.

14. Komissarenko V.P., Reznikov A.G., Gordienko V.M., Zak K.P. Effect of o,pr-DDD on the morfology and function of adrenal cortex in dogs // Endocrinol. Exp. – 1968. – Vol. 2, N 1. – P. 21-28.

15. Komissarenko V.P., Reznikov A.G., Turchin I.S. Cytologic and functional changes in the adrenal cell culture from a human fetus under the action of o,p'-DDD. II. Study of corticosteroid production // Endocrinol. Exp. – 1971. – Vol. 5, N 4. – P. 217-222.