

Я. Г. Бальон, А. В. Симунов, И. П. Пастер, Л. И. Вакуленко, Л. М. Точилкина, Л. А. Кузминская, Н. И. Левчук

АНТИАДРЕНКОРТИКОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТВОРИМОГО *o,n'*-ДДД (ХЛОДИТАНА) В ОПЫТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Государственное учреждение "Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины", Киев, Украина

Впервые создана растворимая лекарственная форма ингибитора функции коры надпочечных желез (НЖ) — *o,n'*-ДДД (хлодитана), позволяющая его внутривенное введение. Исследовано влияние новой лекарственной формы хлодитана на биосинтез глюкокортикоидных гормонов в условно нормальной ткани НЖ человека и на функции НЖ собак. Прибавлением 5 % раствора *o,n'*-ДДД к питательной среде создавали концентрации вещества в диапазоне 0,005 – 5,0 мг/мл. Культивирование кусочков адренкортикальной ткани человека в присутствии раствора *o,n'*-ДДД на протяжении 24 ч приводило к дозозависимому снижению концентрации 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в среде на 11,0 – 69,8 %. При ежедневном введении 10 мл данного раствора на протяжении 3 сут уровень 11-ОКС в плазме крови собак снизился в среднем в 3,5 раза, а реакция на стимуляцию синтетическим 1-24-кортикотропином — в 3 раза. Пониженный уровень 11-ОКС в плазме крови наблюдался и через 2 недели после отмены препарата. Таким образом, предлагаемый раствор *o,n'*-ДДД проявляет антиадренкортикотропную активность и может быть рекомендован для клинических исследований.

Ключевые слова: *o,n'*-ДДД; хлодитан; кора надпочечных желез; антиадренкортикотропная активность.

В настоящее время болезнь Иценко-Кушинга и злокачественные опухоли коры надпочечных желез относятся к болезням, непосредственно угрожающим жизни больного. При этом тяжесть состояния больного связана не только с общей онкологической симптоматикой, но и с гормональной гиперфункцией, которая может быть непосредственной причиной смерти [1 – 3]. Актуальной остается проблема устранения гиперфункции гормонов надпочечников, а также радикального избавления больного от опухоли. Ранее в институте был разработан комбинированный метод лечения данных заболеваний с использованием адреналэктомии и хлодитановой терапии [4, 5]. Для достижения устойчивого клинического эффекта необходимо введение *o,n'*-ДДД (1-(2-хлорфенил)-1-(4'-хлорфенила)-2,2-дихлорэтана, "хлодитана") перорально на протяжении нескольких месяцев (максимальная суточная доза 8 – 10 г). В большинстве случаев (более 90 %) лечение препаратом приводит к нормализации функции коры надпочечных желез. Следует отметить, что употребление высоких доз хлодитана вызывает у некоторых пациентов ряд побочных реакций: тошноту, рвоту, зуд, диарею, атаксию, лейкопению, гинекомастию и др. [6 – 8]. Еще одним недостатком перорального введения хлодитана является небольшая биодоступность действующего вещества для тканей опухоли.

В связи с вышеизложенным для повышения эффективности хлодитана, снижения его дозировки и уменьшения побочных действий нами предложена парентеральная форма препарата. Одним из этапов внедрения такой формы хлодитана в практику является исследование ее влияния на уровень 11-оксикортикостероидов

в среде культивирования адренкортикальной ткани человека и в плазме крови собак при внутривенном введении. Следует отметить, что раствор хлодитана для инъекций малотоксичен [9].

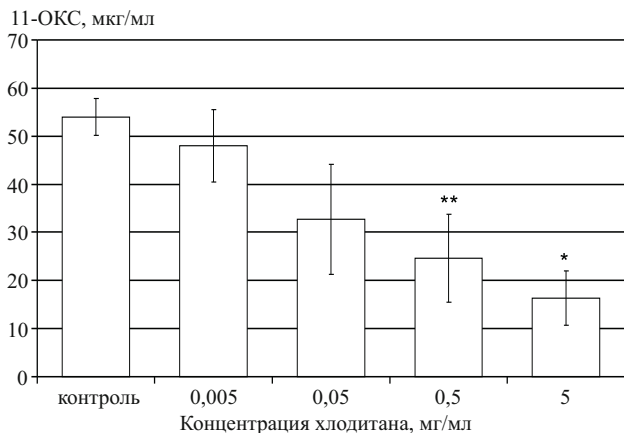
Экспериментальная часть

Объектом исследования был стерильный 5 % раствор хлодитана в смеси растворителей: пропиленгликоль, этиловый спирт, N,N-диметилацетамид в соотношении 7:2:1.

Для опытов *in vitro* условно нормальную ткань коры надпочечников человека получали в отделе хирургии эндокринных желез института во время проведения операции адреналэктомии по поводу феохромоцитомы или аденоматозной гиперплазии коры надпочечников, промывали несколько раз стерильным 0,9 % раствором хлорида натрия с антибиотиками (из расчета 100 ед. бензилпенициллина натриевой соли и 100 мкг стрептомицина сульфата на 1 мл раствора), очищали от жировой и соединительной тканей, после чего разрезали на кусочки до 1 мм³ и снова промывали несколько раз указанным раствором.

Полученную адренкортикальную ткань культивировали по 3 кусочка во флаконах с 1 мл среды RPMI-1640 ("Sigma", США), содержащей 10 % сыворотки новорожденного теленка ("Sigma", США) и антибиотика, при температуре 37 °С. Среду культивирования меняли через день.

На протяжении 24 ч часть проб с тканью коры надпочечников человека содержала дополнительно раствор хлодитана в конечных концентрациях 0,005, 0,05, 0,5 и 5 мг/мл, которые создавали на 2-е сут культиви-



Влияние раствора хлодитана на уровень 11-ОКС в среде культивирования ткани коры надпочечных желез человека. Примечание: * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

рования внесением оригинального 5 % раствора препарата. Аликвоты среды отбирали на 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 28 сут и замораживали при температуре минус 20 °С для последующего определения уровня 11-ОКС. Проведено 2 серии экспериментов по изучению функциональной активности ткани коры надпочечников человека в динамике длительного культивирования и влияния хлодитана на уровень 11-ОКС в среде культивирования (в каждой серии по 3 опыта с группами в дубликатах или трипликатах).

Собаки-самцы массой $10,0 \pm 0,3$ кг, взятые для исследования, содержались с учетом правил Европейской конвенции по защите животных, используемых с экспериментальной и научной целью. Животные находились в контролируемых условиях вивария при 20 – 25 °С, влажности 50 – 55 % на стандартном пищевом рационе. 10 собак были разделены на 2 группы. 5 собак первой группы служили контролем, им внутривенно вводили по 25 у. е. синактена (синтетический АКТГ) для стимуляции биосинтеза 11-ОКС и через 1,5 ч производили забор крови, троекратно через су-

тки вводили 10 мл смеси растворителей (пропиленгликоль, этиловый спирт, N,N-диметилацетамид в соотношении 7:2:1).

Собакам второй группы (5 собак) наряду с инъекциями синактена проводили инъекции 10 мл 5 % раствора хлодитана, аналогичной смеси растворителей.

Количественное определение уровня 11-ОКС, т.е. суммарного содержания кортизола и кортикостерона, в аликвотах среды культивирования адренокортикальной ткани человека и в плазме крови собак проводили флюориметрическим микрометодом на спектрофотометре “Hitachi MPF-4” (Япония) с использованием в качестве стандарта кристаллического кортизола (“Renal”, Венгрия) [10].

До начала исследования было получено положительное решение Комиссии по биоэтике института, а также информированное согласие от каждого пациента. Все манипуляции с животными проводили соответственно с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986 год) и национальных норм по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001 год).

Полученные данные обрабатывали методом Стьюдента по критерию t .

Результаты и их обсуждение

По результатам проведенных исследований установлено наличие гормональной активности ткани коры надпочечников человека в динамике длительного культивирования: базальный уровень 11-ОКС в культуральной среде претерпевал определённые колебания и составлял $44,5 \pm 3,5$ мкг/мл на 4-е сут, $48,0 \pm 7,0$ мкг/мл на 8-е сутки, $44,5 \pm 7,5$ мкг/мл на 12-е сут, $34,5 \pm 6,5$ мкг/мл на 16-е сут, $42,8 \pm 9,2$ мкг/мл на 20-е сут, $31,8 \pm 3,2$ мкг/мл на 24-е сут и $48,2 \pm 1,2$ мкг/мл на 28-е сут.

24-часовое культивирование адренокортикальной ткани человека с хлодитаном приводит к дозозависимому снижению уровня 11-ОКС в среде (рисунок).

Таблица 1
Влияние смеси растворителей (пропиленгликоль, этиловый спирт, N,N-диметилацетамид в соотношении 7:2:1) на концентрацию 11-ОКС самцов собак

День	Условия эксперимента	Концентрация 11-ОКС (нМ/л)($M \pm m$)
1	Фон — забор крови (5 мл). Введение 25 у. е. синактена и через 1,5 ч забор крови (5 мл). Введение 10 мл смеси растворителей	$481,8 \pm 65,6$ $654,4 \pm 93,1^*$
2	Введение 10 мл смеси растворителей	-
3	Введение 10 мл смеси растворителей	-
4	Забор крови (5 мл). Введение 25 у. е. синактена и через 1,5 ч забор крови (5 мл)	$465,0 \pm 56,3$ $712,0 \pm 85,5^{**}$

* $p = 0,007$; ** $p = 0,013$ (по двустороннему критерию Стьюдента для связанной выборки).

Таблица 2
Влияние 5 % раствора хлодитана на концентрацию 11-ОКС самцов собак

День	Условия эксперимента	Концентрация 11-ОКС (нМ/л) ($M \pm m$)
1	Фон — забор крови (5 мл). Введение 25 у. е. синактена и через 1,5 ч забор крови (5 мл). Введение 10 мл 5 % раствора хлодитана	$414,2 \pm 17,3$ $556,0 \pm 38,6^*$
2	Введение 10 мл 5 % раствора хлодитана	-
3	Введение 10 мл 5 % раствора хлодитана	-
4	Забор крови (5 мл). Введение 25 у. е. синактена и через 1,5 ч забор крови (5 мл)	$115,8 \pm 7,8$ $166,0 \pm 18,5^{**}$
5	Забор крови (5 мл) через 2 недели	$269,0 \pm 15,59^{***}$

* $p = 0,003$; ** $p = 0,016$; *** $p = 0,001$ (по двустороннему критерию Стьюдента для связанной выборки).

Как показали эксперименты (табл. 1), внутривенное трехкратное введение 10 мл (в течение 3 дней, через сутки) смеси растворителей (пропиленгликоль, этиловый спирт, N,N-диметилацетамид в соотношении 7:2:1) практически не влияет на содержание 11-ОКС в плазме крови. При внутривенном введении 5 % раствора хлодитана при таких же условиях (см. табл. 2) содержание 11-ОКС снижается почти в 3,5 раза. На фоне введения 25 у. е. синактена отмечается адекватное снижение уровня 11-ОКС в плазме крови.

Более весомым доказательством ослабления реакции коры надпочечных желез на действие синактена под влиянием 5 % раствора хлодитана является достоверное уменьшение прироста концентрации 11-ОКС в 2,8 раза: до введения — 141,8 нмоль/л и после введения раствора хлодитана — 50,2 нмоль/л.

Следует отметить, что проведенный анализ результатов показал высокую достоверность изменений концентраций 11-ОКС в плазме крови после внутривенного введения 25 у. е. синактена как у контрольных животных (см. табл. 1), так и у испытуемых собак после введения 5 % раствора хлодитана (см. табл. 2).

Таким образом установлено, что 5 % раствор хлодитана проявляет антиадренокортикотропную актив-

ность как в культуре коры надпочечников человека (*in vitro*), так и в коре надпочечников собак (*in vivo*), что является определяющим для дальнейших клинических исследований данной формы препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Комиссаренко, А. Г. Резников, *Ингибиторы функции коры надпочечных желез*, Здоров'я, Киев (1972).
2. М. Д. Тронько, І. В. Комісаренко, Я. Г. Бальон та ін., *Ж. АМН України*, **16**, № 2, 271 – 287 (2010).
3. В. П. Комиссаренко, А. Г. Резников, І. В. Комиссаренко, Я. Г. Бальон, *Хим.-фарм. журн.*, **11**(9), 146 – 149 (1977).
4. А. М. Кваченюк, *Лікарська справа*, № 8, 64 – 67 (2004).
5. І. В. Комиссаренко, С. І. Рыбаков, *Фармакол. вісник*, № 1, 50 – 53 (2000).
6. І. В. Комиссаренко, *Современные вопросы эндокринологии*, Медицина, Москва (1975), сс. 195 – 206.
7. Я. Г. Бальон, В. В. Корпачев, *Эндокринологія*, **1**(1), 25 – 31 (1996).
8. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства (хлодитан)*, ООО Новая волна, Москва (2005).
9. Я. Г. Бальон, В. В. Ховака, О. В. Сімуров, *Фармакол. лік. токсикол.*, **3**(16), 12 – 16 (2010).
10. Ю. Г. Балашов, *Физиол. ж. СССР*, **76**(2), 280 – 283 (1990).

Поступила 26.05.11

INVESTIGATION OF ANTIADRENOCORTICOLYTIC ACTIVITY OF *o,p'*-DDD (CHLODITAN) SOLUTION *IN VITRO* AND *IN VIVO* FOR IMPLEMENTATION OF THE PREPARATION IN TO CLINICAL PRACTICE

Ya. G. Balyon, A. V. Simurov, I. P. Pasteur, I. V. Vakulenko, L. M. Tochilkina, L. A. Kuzminskaya, N. I. Levchuk

State Institution "V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine", Kiev, Ukraine

A new *o,p'*-DDD (chloditan) drug formulation as solution for intravessel injection inhibiting adrenal cortex (AC) function has been developed. There was studied its effect on glucocorticoid hormones production by human AC tissue culture and AC function in dogs. By adding 5 % *o,p'*-DDD solution to culture medium the concentration range of 0,005 – 5,0 mg/ml was established. After 24 h cultivation in the presence of *o,p'*-DDD solution, dose-dependent decrease of 11-hydroxycorticosteroid (11-OCS) contents in culture medium by 11,0 % – 69,8 % was observed. In dogs, 3.5-fold decrease in blood plasma 11-OCS level and almost 3-fold decrease in 11-OCS 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-OCS was observed in 2 weeks after *o,p'*-DDD withdrawal. Proposed *o,p'*-DDD solution demonstrates antiadrenocorticolytic cortex inhibiting effect, and thus might be important for further clinical trial.

Key words: *o,p'*-DDD; chloditan; adrenal cortex; adrenocorticolytic activity.