



УДК 612.45:615.45

© 2011

**Я. Г. Бальон**, член-кореспондент НАН України **О. Г. Резніков**,  
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько**, **І. П. Пастер**,  
**О. В. Сімуров**

### **Інгібіція адренкортикальної функції розчином *o, n'*-ДДД (хлодитану) в досліджах *in vitro* та *in vivo***

*Вперше створено розчинну лікарську форму інгібітора функції кори надниркових залоз (КНЗ) – *o, n'*-ДДД (хлодитану) для внутрішньосудинного введення і досліджено його вплив на утворення глюкокортикоїдних гормонів в умовно нормальній тканині КНЗ людини та на функцію КНЗ у собак. Додаванням 5%-го розчину *o, n'*-ДДД до живильного середовища створювали концентрації речовини в діапазоні 0,005–5,0 мг/мл. Культивування шматочків адренкортикальної тканини людини в присутності розчину *o, n'*-ДДД протягом 24 год призводило до дозозалежного зниження концентрації 11-гідроксикортикостероїдів (11-ГОКС) у середовищі на 11,0–69,8%. При щоденному внутрішньовенному введенні 10 мл даного розчину протягом трьох діб рівень 11-ГОКС у плазмі крові собак знизився в середньому майже в 3,5 раза, а реакція на стимуляцію синтетичним 1–24-кортикотропіном – майже в 3 рази. Зменшений рівень 11-ГОКС у плазмі крові спостерігався і через 2 тижні після відміни препарату. Отже, запропонований розчин *o, n'*-ДДД виявляє адренкортиколітичну активність і може бути рекомендований для клінічних досліджень.*

Хвороба Іценка–Кушинга та злоякісні пухлини кори надниркових залоз (КНЗ) належать до захворювань, які безпосередньо загрожують життю хворого. Тяжкість 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 КНЗ, які спричиняють на неї цитотоксичний вплив [1, 2]. Найбільш ефективним до цього часу є *орто, пара'*-дихлордифенілдіхлоретан (*o, n'*-ДДД, хлодитан, мітотан), який застосовують перорально у вигляді таблеток [3]. Розроблено комбінований медикаментозно-хірургічний метод лікування даних захворювань із використанням адреналектомії і хлодитану [4, 5]. 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 КНЗ. У деяких хворих може розвиватися резистентність до хлодитану, в цих випадках без операції не обійтись. Але в більш як 90% випадків застосування препарату приводить до нормалізації функції КНЗ. При пероральному використанні високих доз хлодитану спостерігаються деякі побічні ускладнення — нудота, блювання, свербіння шкіри, діарея, атаксія, лейкопенія, гінекомастія та ін. [6, 7]. Крім того, треба зазначити, що хлодитан завдяки ліпофільності при пероральному застосуванні має невисоку біодоступність. З метою підвищення терапевтичної ефективності хлодитану, зниження його дозування та зменшення побічної дії нами запропонована розчинна лікарська форма препарату для внутрішньосудинного введення, яка не має світових аналогів [8]. Необхідним етапом вивчення специфічної фармакологічної активності такої форми *o, n'*-ДДД було експериментальне дослідження її впливу на продукування адренкортикальних гормонів — кортизолу і кортикостерону, що належать до групи 11-гідрокортикостероїдів (11-ГОКС), культивованою тканиною КНЗ людини та їх вмісту в плазмі крові собак при внутрішньосудинному введенні препарату. Відзначимо, що за параметрами гострої токсичності розчин *o, n'*-ДДД для ін'єкцій є малотоксичним [9].

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження був стерильний 5%-й розчин *o, n'*-ДДД (хлодитану) в суміші розчинників: пропіленгліколь, етанол та N, N-диметилацетамід у співвідношенні 7 : 2 : 1. Усі розчинники використовуються в ін'єкційних лікарських формах [10].

Для дослідів *in vitro* умовно нормальну тканину КНЗ людини отримували у відділенні хірургії ендокринних залоз ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України” під час проведення операції адреналектомії з приводу феохромоцитомі або аденоматозної гіперплазії КНЗ, 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<sup>3</sup> 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 °С. Середовище культивування замінювали один раз на дві доби. Протягом 24 год частина проб містила також *o, n'*-ДДД у кінцевих концентраціях 0,005; 0,05; 0,5 та 5,0 мг/мл, які створювали на 2-гу добу культивування додаванням оригінального 5%-го розчину препарату. Аліквоти середовища відбирали на 3-тю, 4-ту, 8-му, 12-ту, 16-ту, 20-ту, 24-ту і 28-му добу та заморожували при –20 °С для наступного визначення рівня 11-ГОКС. Проведено дві серії експериментів з вивчення функціональної активності тканини КНЗ людини в динаміці тривалого культивування та впливу *o, n'*-ДДД на рівень 11-ГОКС в середовищі культивування (у кожній серії по три досліди з групами в дублікатах або триплікатах).

Досліди *in vivo* проводили на собаках, тому що вони так само, як люди, є найбільш чутливими до адренкортиколітичної дії хлодитану в порівнянні з іншими видами ссавців. До того ж брали до уваги, що КНЗ собак так само, як і людей, крім альдостерону синтезує переважно кортизол. Собаки-самці масою (10,0 ± 0,3) кг знаходилися в контрольованих умовах віварію при 20–25 °С, вологості 50–55 %, на стандартному харчовому раціоні. Де-

сять собак були розділені на дві групи. П'ять собак першої групи служили контролем, їм внутрішньовенно вводили 10 мл розчинника *o, n'*-ДДД. П'яти піддослідним тваринам вводили 5%-й розчин *o, n'*-ДДД. Перед першими внутрішньовенними ін'єкціями забирали з вени 5 мл крові для визначення 11-ГОКС і проводили тест на функціональні резерви КНЗ 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 *o, n'*-ДДД або розчинник. Введення препарату або розчинника повторювали у наступні дві доби (усього три ін'єкції на курс), одразу після чого виконували повторний тест з синакшеном. Через два 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 КНЗ людини і в плазмі крові собак проводили флюориметричним мікрометодом [11] на спектрофлуориметрі “Hitachi MPF-4” (Японія) з використанням як стандарту кристалічного кортизолу (“Reanal”, Угорщина).

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

Отримані дані опрацьовували методом Стьюдента за критерієм *t*.

**Результати та їх обговорення.** За результатами проведених досліджень встановлено наявність гормональної активності тканини КНЗ людини в динаміці тривалого культивування: базальний рівень 11-ГОКС в культуральному середовищі зазнавав певних коливань і становив на 4-ту добу ( $44,5 \pm 3,5$ ) мкг/мл, на 8-му — ( $48,0 \pm 7,0$ ) мкг/мл, на 12-ту — ( $44,5 \pm 7,5$ ) мкг/мл, на 16-ту — ( $34,5 \pm 6,5$ ) мкг/мл, на 20-ту — ( $42,8 \pm 9,2$ ) мкг/мл, на 24-ту — ( $31,8 \pm 3,2$ ) мкг/мл, на 28-му — ( $48,2 \pm 1,2$ ) мкг/мл.

Культивування тканини КНЗ людини з *o, n'*-ДДД призводило до дозозалежного зниження рівня 11-ГОКС у 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% ( $P < 0,02$ ) (рис. 1).

Раніше було показано, що етанольний розчин *o, n'*-ДДД в умовах *in vitro* гальмує секрецію кортикостероїдів з КНЗ абортіваного плоду людини [12], собак [13] або щурів і птахів [14]. Одержані нами результати свідчать про те, що *o, n'*-ДДД у складі запропонованого розчину спричинює у порівнянних концентраціях аналогічний ефект у тканинних культурах КНЗ дорослих людей. Таким чином, присутність використаних органічних розчинників не впливає на здатність *o, n'*-ДДД до гальмування секреції кортикостероїдів *in vitro*.

Встановлено, що триденне внутрішньовенне введення по 10 мл суміші розчинників *o, n'*-ДДД на добу не впливає на вміст 11-ГОКС у плазмі крові собак ( $P > 0,05$ ) (табл. 1). Так само під впливом розчинників не виявлено достовірних змін реакції КНЗ на стимулювання синакшеном ( $P > 0,05$ ). При внутрішньовенному введенні 5%-го розчину *o, n'*-ДДД базальний рівень 11-ГОКС через три доби знизився майже в 3,5 раза. На тлі введення синакшену відбулося майже трикратне послаблення реакції КНЗ, яку оці-

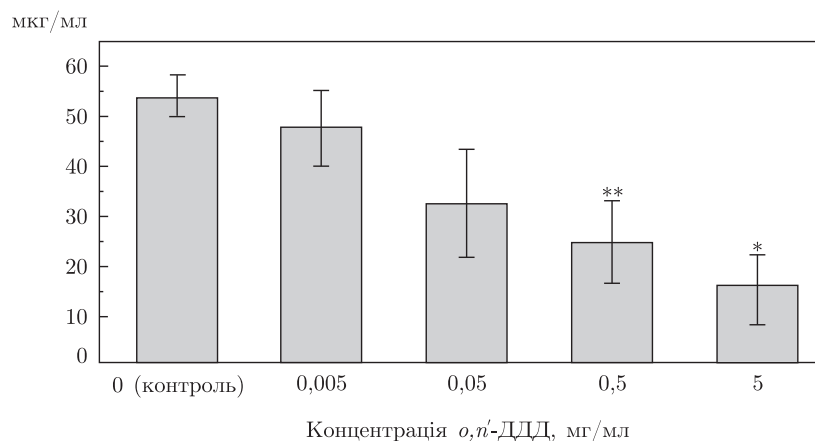


Рис. 1. Вплив розчину *o, n'*-ДДД на рівень 11-ГОКС у середовищі культивування тканини КНЗ людини (\* —  $P < 0,01$ ; \*\* —  $P < 0,05$  — у порівнянні з контролем)

Таблиця 1. Вплив 5 %-го розчину *o, n'*-ДДД на концентрацію 11-ГОКС у плазмі крові самців собак, нмоль/л

| Умови досліджу, показник                                      | Контроль<br>(розчинник, $n = 5$ ) | Дослід<br>( <i>o, n'</i> -ДДД, $n = 5$ ) | $P$     |
|---|-----------------------------------|--|---------|
| До введення розчинника або <i>o, n'</i> -ДДД                  |                                   |  |         |
| Базальний рівень  | 481,8 ± 65,6                      | 414,2 ± 17,3                             | > 0,05  |
| Через 1,5 год після введення синактену                        | 654,4 ± 93,1<br>$P^* < 0,01$      | 556,0 ± 38,6<br>$P^* < 0,01$             | > 0,05  |
| Після 3-добового введення розчинника<br>або <i>o, n'</i> -ДДД |                                   |  |         |
| Базальний рівень  | 465,0 ± 56,3                      | 115,8 ± 7,8                              | < 0,001 |
| Через 1,5 год після введення синактену                        | 712,0 ± 85,5<br>$P^* < 0,02$      | 166,0 ± 18,5<br>$P^* < 0,02$             | < 0,001 |
| Через 2 тижні   | —                                 | 269 ± 15,59<br>$P^{**} = 0,001$          |         |

Примітка. Наведено достовірність різниці:  $P$  — у порівнянні з контролем,  $P^*$  — у порівнянні з відповідним базальним рівнем у тесті з синактенном;  $P^{**}$  — у порівнянні з базальним рівнем на початку досліджу (за двостороннім критерієм Стюдента для зв'язаної вибірки).

нювали як за приростом концентрації 11-ГОКС у плазмі крові (приріст у контролі — 141,8 нмоль/л, у досліді — 50,2 нмоль/л), так і за їх рівнем, досягнутим після гормональної стимуляції.

Одержані результати цілком узгоджуються з раніше опублікованими нами даними, щодо впливу 7–30-добового перорального введення порошку *o, n'*-ДДД собакам у дозах 50–100 мг/кг маси тіла [15]. Доза кортикотропіну 25 МО, згідно з нашим багаторічним досвідом, викликає максимальну стимуляцію біосинтезу і секреції кортикостероїдів у собак. Отже, під впливом розчину *o, n'*-ДДД відбувалося не тільки глибоке пригнічення їх базальної продукції, але й істотне зменшення функціональних резервів КНЗ. Натомість необхідно підкреслити, що за умови внутрішньовенного введення хлоритану ефект досягається при використанні у 10–15 разів меншої кількості інгібітора на курс, що має істотно послабити загальнотоксичні ефекти *o, n'*-ДДД. До того ж вдається уникнути по-

дразливого впливу на слизову оболонку шлунка і кишечника. Цілком імовірно, що запропонований розчин буде ще більше ефективним при його застосуванні у людей шляхом регіонарної перфузії надниркових залоз, що дасть змогу ще більше зменшити дозу *o, n'*-ДДД.

Таким чином, 5%-й розчин *o, n'*-ДДД (хлодитану) виявляє активність інгібітора функції КНЗ як у культурі КНЗ людини (*in vitro*), так і в собак при внутрішньосудинному введенні (*in vivo*), що є визначальним для подальших клінічних досліджень даної форми препарату.

1. Комиссаренко В. П., Резников А. Г. Ингибиторы функции коры надпочечных желез. – Киев: Здоров'я, 1972. – 374 с.
2. 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. – 16, № 2. – С. 271–287.
3. Комиссаренко В. П., Резников А. Г., Комиссаренко И. В., Бальон Я. Г. Хлодитан // Хим.-фарм. журн. – 1977. – 11, № 9. – С. 146–149.
4. Кваченюк А. М. Хлодитанотерапія адренокортикального раку // Лікар. справа. – 2004. – № 8. – С. 64–67.
5. Комиссаренко И. В., Рыбаков С. И. Фармакотерапия опухолей коркового вещества надпочечных желез // Фармакол. вісн. – 2000. – № 1. – С. 50–53.
6. Бальон Я. Г., Корпачев В. В. Деякі досягнення у створенні лікарських засобів для лікування ендокринної патології // Ендокринологія. – 1996. – 1, № 1. – С. 25–31.
7. Машковський М. Д. Хлодитан // Лекарственные средства. – Москва: ООО Новая волна, 2005. – С. 1015.
8. Бальон Я. Г., Резніков О. Г., Тронько М. Д., Сімуров О. В. та ін. Спосіб одержання ін'єкційного розчину 1-(*орто*-хлорфеніл)-1-(*пара*-хлорфеніл)-2,2-дихлоретану (хлодитану), який є інгібітором функції кори надниркових залоз // Пат. України на корисну модель № 54523; Опубл. 10.11.2010, Бюл. № 21.
9. Бальон Я. Г., Ховака В. В., Сімуров О. В. Дослідження гострої токсичності парентеральної форми *o, n'*-ДДД (хлодитану) // Фармакол. лікар. токсикологія. – 2010. – № 3 (16). – С. 12–16.
10. *Технология и стандартизация лекарств* / Ред. В. П. Георгиевский. – Харьков: РИРЕГ, 2005. – 779 с.
11. Балашов Ю. Г. Флюориметрический метод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – 76, № 2. – С. 280–283.
12. 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. – 5. – P. 217–222.
13. Hart M. M., Straw J. A. Effect of 1-(*o*-chlorophenyl)-1-(*p*-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in various preparations *in vitro* of dog adrenal cortex // Biochem. Pharmacol. – 1971. – 20, No 7. – P. 1679–1688.
14. Кравченко В. И. Влияние *o, n'*-ДДД на образование кортикостероидов надпочечниковой тканью *in vitro* // Пробл. эндокринологии. – 1973. – 19, № 5. – С. 76–79.
15. Komissarenko V. P., Reznikov A. G., Gordienko V. M., Zak K. P. Effect of *o, p'*-DDD on the morphology and function of adrenal cortex in dogs // Endocrinol. Exp. – 1968. – 2. – P. 21–28.

Державна установа “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 18.03.2011

**Ya. G. Balyon**, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. G. Reznikov**,  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**, **I. P. Pasteur**,  
**A. V. Simurov**

**Inhibition of adrenal cortex function with *o,p'*-DDD (chloditan) *in vitro*  
and *in vivo***

*A new *o,p'*-DDD (chloditan) drug formulation as a solution for intravessel injection inhibiting the adrenal cortex (AC) function has been developed. Its effect on the production of glucocorticoid hormones by human AC tissue culture and AC function in dogs is studied. By adding 5% *o,p'*-DDD solution to culture medium, the concentration range of 0.005–5.0 mg/ml is established. After 24 h cultivation in the presence of *o,p'*-DDD solution, the dose-dependent decrease of 11-hydroxycorticosteroid (11-HOCS) contents in culture medium by 11.0–69.8% is observed. In dogs, the 3.5-fold decrease in the blood plasma 11-HOCS level and almost the 3-fold decrease in the 11-HOCS response to the synthetic 1–24-corticotropin stimulation are found after the 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-HOCS is observed in 2 weeks after the *o,p'*-DDD withdrawal. The proposed *o,p'*-DDD solution demonstrates the adrenal cortex inhibiting effect and thus might be recommended for clinical trial.*