

О.В. Сачинська, Л.В. Чайковська, О.Г. Резніков

Вплив сумісного застосування синтетичного агоніста лютеїнізуючого-рилізінг-гормону та нестероїдного антиандрогена на статеву систему самців щурів

Изучали влияние сочетанного применения различных доз агониста лютеинизирующего-рилизинг-гормона (сурфагона) с нестероидным антиандрогеном флутамидом (нифтолидом) на морфофункциональное состояние добавочных половых желез и гипофизарно-гонадную систему самцов крыс. Определяли оптимальное соотношение доз препаратов для достижения максимального антипростатического эффекта. Показано, что комплексное применение препаратов приводит к потенцированию сурфагоном антипростатических эффектов флутамида. Максимальный эффект отмечался при длительном (30-суточном) использовании сурфагона в дозе 50 мкг/кг с флутамидом в дозе 10 мг/кг. Данная комбинация препаратов рекомендуется для клинической апробации при лечении рака простаты.

ВСТУП

Відкриття декапептидної структури гіпоталамічного лютеїнізуючого-рилізінг-гормону (ЛГ-РГ) призвело до синтезу великої кількості його агоністів, що значно перевищують нативний гормон за біологічною активністю. Залежно від режиму застосування ЛГ-РГ і його синтетичні агоністи можуть як стимулювати, так і гальмувати синтез і секрецію гіпофізарного ЛГ, а, отже, й тестостерону (Т) [1, 10]. Властивості зниження вмісту Т у плазмі крові до посткастраційних значень при тривалому безперервному застосуванні агоністів ЛГ-РГ у дозах, що перевищують фізіологічні, використовують у клінічній практиці для лікування гормонозалежних пухлин у жінок і чоловіків, зокрема раку передміхурової залози методом андрогенної депривації [7, 8]. За ефективністю інгібуючого впливу на простату терапію агоністами ЛГ-РГ можна порівнювати з кастрацією, проте вона має і свої переваги, однією з яких є відновлення функції статевих залоз після відміни препа-

рату. До недоліків можна віднести викликані ними первинне тимчасове збільшення вмісту статевих гормонів у крові, що може прискорити ріст пухлини, а також продовження синтезу наднирковозалозних андрогенів, які на периферії можуть конвертуватися в активні форми. Тому для досягнення максимальної андрогенної депривації у чоловіків одночасно з агоністами ЛГ-РГ застосовують блокатори клітинних рецепторів чоловічих статевих гормонів – антиандрогени [9, 11].

Метою нашої роботи було вивчення впливу фізіологічно активної речовини сурфагону (маловивченого агоніста ЛГ-РГ) у поєднанні з селективним блокатором андрогенних рецепторів – нестероїдним антиандрогеном флутамідом – на морфофункціональний стан додаткових статевих залоз і гіпофізарно-гонадную систему самців щурів, з'ясування оптимального співвідношення доз препаратів для одержання максимального антипростатичного ефекту. Особлива увага була приділена виявленню можливості потенціювання ефектів флутаміду низькими дозами агоніста ЛГ-РГ.

© О.В. Сачинська, Л.В. Чайковська, О.Г. Резніков

МЕТОДИКА

Експерименти проведені на 65 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 220–260 г. Протягом 30 днів тваринам щодня (один раз на добу) вводили D-Ala6, desGly10-етиламід (сурфагон, „ВАРЕКС ltd”, Латвія) у дозах 25, 50 або 100 мкг/кг, підшкірно, у фізіологічному розчині і/або флутамід (подрібнені пігулки ніфтоліду, ХФО «Дарниця», Україна) у дозі 10 мг/кг, у шлунок крізь металевий зонд, у вигляді 1%-ї суспензії в гелі Дорфмана (ізотонічний розчин натрію хлориду, що містить 0,5 % натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, 0,4 % твіна-80, 0,9 % бензилового спирту). Контрольні тварини отримували плацебо. Через добу після останнього введення препарату щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Сім'яники, їх придатки (епідидиміси) і додаткові статеві залози – вентральну простату, коагулювальну залозу, сім'яні пухирці після витискання секрету зважували, частку вентральної простати заморожували і зберігали при -20°C до аналізу. У її тканинах визначали вміст ДНК, РНК і білка [7]. У плазмі крові визначали

вміст Т радіоімунним методом за допомогою наборів реактивів («Immunotech», Чехія) і ЛГ (біо-ЛГ) методом біологічного тестування [6]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сурфагон у дозах 25–100 мкг/кг істотно не впливав ані на відносну (з розрахунку на 100 г маси тіла) масу додаткових статевих залоз щурів, ані на відносну масу сім'яників та їхніх придатків (рис.1). Спостерігалася лише деяка тенденція до зниження маси додаткових статевих залоз і достовірне зменшення маси сім'яних пухирців, викликане сурфагоном у дозі 100 мкг/кг. Біохімічні дослідження показали, що у тканинах вентральної простати тварин, котрі отримували сурфагон у дозах 25 і 50 мкг/кг, зменшувалася концентрація РНК: контроль – $(2,54 \pm 0,12)$ мкг/мг тканини, сурфагон – $2,05 \pm 0,18$ і $(2,04 \pm 0,17)$ мкг/мг тканини відповідно до вказаних доз, а в групі тварин, що отримували його у дозі 25 мкг/кг, достовірно зменшувалося і співвідношення

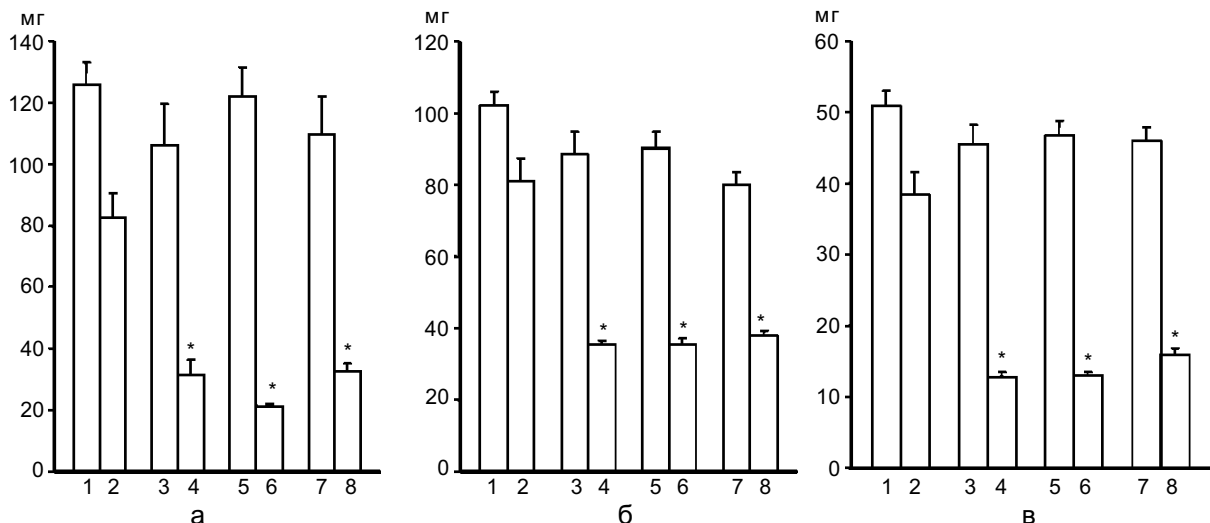


Рис. 1. Маса додаткових статевих залоз у щурів при застосуванні флутаміду та сурфагону: а – вентральна простата, б – сім'яні пухирці, в – коагулювальна залоза. Тут і на рис. 2, 3: 1 – контроль, 2 – флутамід, 10 мг/кг, 3 – сурфагон, 25 мкг/кг, 4 – флутамід і сурфагон, 25 мкг/кг, 5 – сурфагон, 50 мкг/кг, 6 – флутамід і сурфагон, 50 мкг/кг, 7 – сурфагон, 100 мкг/кг, 8 – флутамід і сурфагон, 100 мкг/кг.

* різниця достовірна для дії комбінації препаратів порівняно з дією сурфагону ($P < 0,05$)

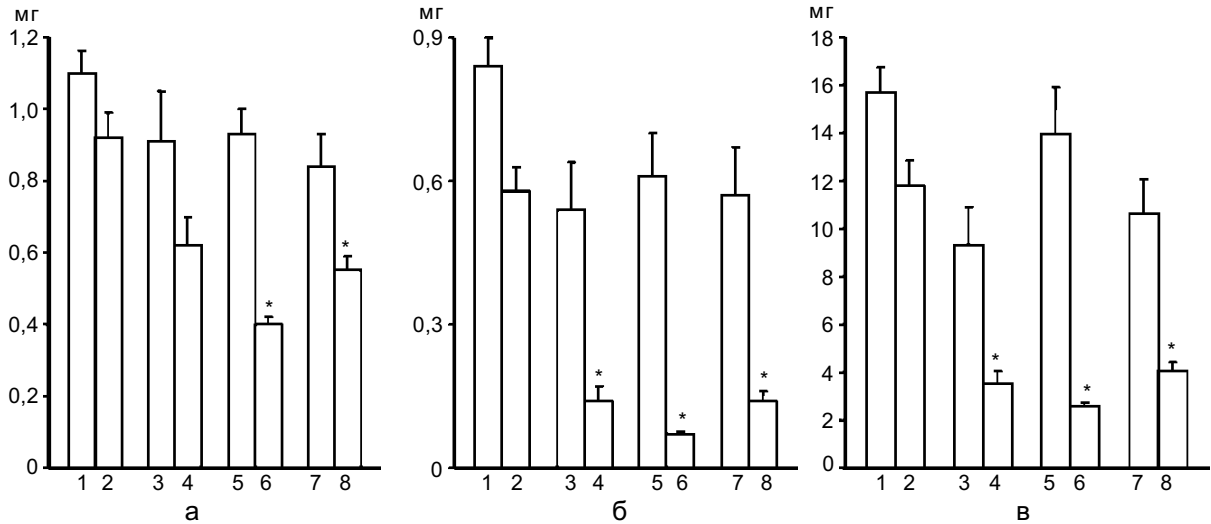


Рис. 2. Вміст ДНК (а), РНК (б) і білка (в) у вентральній простаті щурів при застосуванні флутаміду та сурфагону

РНК/ДНК. Сурфагон у дозах 25 і 50 мкг/кг викликав достовірне зниження загального вмісту РНК і білка в органі (рис.2). Вміст гормонів (Т і біо-ЛГ) достовірно знижувався у щурів при використанні сурфагону у дозах 50 і 100 мкг/кг (рис.3). Дозозалежного ефекту не спостерігалось. Нестабільність антипростатичних ефектів, імовірно, пов'язана з використанням невеликих доз агоніста ЛГ-РГ і досить швидкою елімінацією з крові при разовому введенні.

Під впливом флутаміду в добовій дозі

10 мкг/кг спостерігали достовірні зміни маси додаткових статевих залоз. Так, маса вентральної простати зменшувалася на 34,1 %, коагулявальної залози – на 23,8 %, сім'яних пухирців – на 20,6 % в порівнянні з контрольною групою (див. рис.1). Спостерігалось також достовірне зниження маси епідидимісів (контроль – (313,5±15,4) мг/100 г маси тіла; флутамід – (258,3±8,5) мг/100 г маси тіла). Достовірно знижувався вміст РНК і білка у вентральній простаті (див. рис.2). Під впливом флутаміду знижувалося

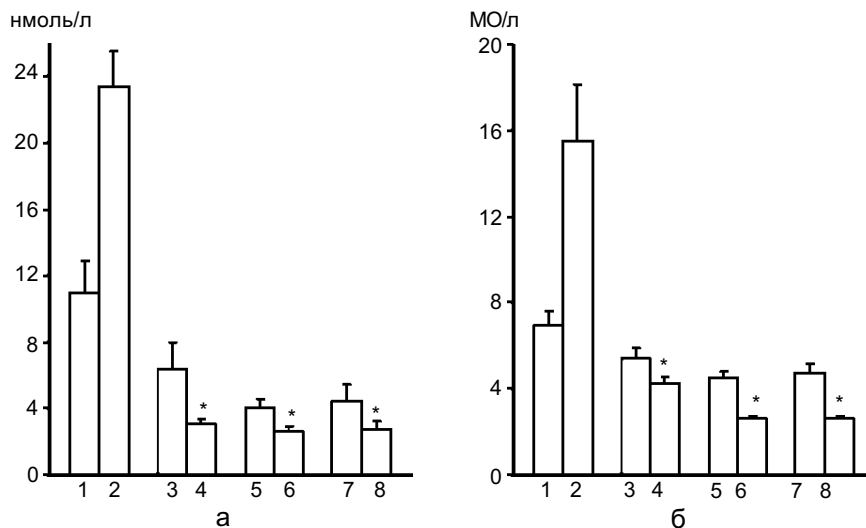


Рис. 3. Вміст тестостерону і біо-лютеїнізуючого гормону у плазмі крові щурів при застосуванні флутаміду та сурфагону

співвідношення РНК/ДНК і збільшувалася концентрація ДНК, що є характерним для блокади андрогенних рецепторів. У контрольній групі ці показники становили: $0,76 \pm 0,03$ і $(3,26 \pm 0,10)$ мкг/мг тканини відповідно; у групі тварин, що отримували флутамід – $0,64 \pm 0,04$ і $(4,29 \pm 0,18)$ мкг/мг тканини. Концентрація гормонів (Т і біо-ЛГ) істотно збільшувалася, що також є характерним наслідком застосування нестероїдних антиандрогенів (див. рис. 3). Антипростатичні ефекти флутаміду можна розцінювати як помірні, вони характерні для обраної нами дози. Що ж до підвищення концентрації ДНК і зменшення індексу РНК/ДНК, то вони пов'язані зі втратою частини цитоплазми епітеліальними клітинами залози [1].

Сумісне застосування сурфагону та флутаміду різко змінювало стан передміхурової залози у напрямі істотного посилення антипростатичних ефектів. Вплив на додаткові статеві залози виявлявся як при використанні найнижчих доз сурфагону, так і при застосуванні агоніста в дозі 100 мкг/кг. Маса додаткових статевих залоз знижувалася: вентральної простати – на 74–83 %, коагулювальної залози – на 69–75 %, сім'яних пухирців – на 63–65 %, тобто спостерігався ефект “фармакологічної кастрації”. Комбіноване застосування препаратів призводило також до зниження маси сім'яників (на 23–28 %) і їх придатків (на 46–56 %; див. рис.1) та до потенціювання сурфагоном антиандрогенного ефекту флутаміду. Отримані результати повністю узгоджуються з гістологічними дослідженнями [4].

В основі зміни маси андрогенозалежних органів лежать істотні біохімічні порушення. Так, ми відзначали достовірне зменшення загального вмісту нуклеїнових кислот і білка у вентральній простаті як порівняно з групою, що отримувала плацебо, так і з тваринами, що отримували кожний з препаратів окремо (див. рис.2). Крім того, значно підвищилася концентрація ДНК (контроль –

$3,26$ мкг/кг $\pm 0,10$ мкг/кг, дослідні групи – $8,78 \pm 0,67$; $8,13 \pm 0,28$; $7,28$ мкг/кг $\pm 0,27$ мкг/кг відповідно). Різноспрямовані зміни концентрації ДНК зумовлені тим самим, що і при окремому введенні флутаміду: при блокаді андрогенного впливу на клітини-мішені в них спочатку зменшується об'єм цитоплазми при одночасному збереженні розміру ядер. Також вірогідно зменшувалася концентрація РНК у порівнянні з тваринами, що отримували плацебо або тільки флутамід. Максимальний антипростатичний ефект спостерігався в групі тварин, що отримували флутамід з сурфагоном у дозі 50 мкг/кг. У групах тварин, що отримували обидва препарати, збільшення дози сурфагону від 25 до 50 мкг/кг призводило до посилення антипростатичних ефектів, а комбінація флутаміду із сурфагоном у дозі 100 мкг/кг несподівано виявилася менш ефективною, ніж з сурфагоном у дозі 50 мкг/кг. Причини цього не з'ясовані. Слід також відмітити, що вміст Т і біо-ЛГ у плазмі крові щурів при комбінованому введенні препаратів був істотно зниженим як у порівнянні з контролем, так і з показниками при окремому застосуванні кожної з речовин, що вивчаються (див. рис.3). Можливою причиною цього є зміна метаболізму гормонів під впливом флутаміду.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що комбіноване тривале застосування досліджених препаратів значно пригнічує основні біосинтетичні процеси в клітинах вентральної простати, що є закономірним результатом блокади андрогенних рецепторів у передміхуровій залозі і пригнічення сурфагоном системи гіпофіз–сім'яники. Про максимальну десенситизацію гіпофіза до ендогенного ЛГ-РГ свідчить зниження концентрації ЛГ і Т у плазмі крові до мінімальних значень. Гальмування сурфагоном секреції Т істотно підвищує ефективність блокади флутамідом клітинних рецепторів андрогенів. Про високу інгібуючу активність сурфа-

гону свідчать також літературні відомості [2, 3]. Враховуючи дані морфологічних [4], біохімічних і гормональних досліджень, можна говорити про доцільність поєднаного застосування досліджених препаратів для досягнення максимального антипростатичного ефекту, при лікуванні раку простати.

ВИСНОВКИ

1. Комбіноване застосування сурфагону та флутаміду у низьких дозах призводить до потенціювання антипростатичного ефекту флутаміду.

2. Максимальний антипростатичний ефект спостерігався за тривалого (30-добового) використання сурфагону в дозі 50 мкг/кг у поєднанні з флутамідом у дозі 10 мкг/кг.

O.V.Sachinska, L.V.Chaikovska, A.G.Reznikov

INFLUENCE OF COMBINED APPLICATION OF THE SYNTHETIC LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE AGONIST AND NON-STEROIDAL ANTIANDROGEN ON REPRODUCTIVE SYSTEM OF RATE MALES

The influence of combined use of different doses of LGRH agonist (Surfagon) and non-steroidal antiandrogen Flutamid (Niftolid) on the structure and functional state of accessory sexual glands and hypophyseal-gonadal system of rate males had been studied. Optimal ratio of the drug doses for achieving the best antiprostatic effect has been determined. It was shown that combined use of above mentioned drugs resulted in the potentiation of antiprostatic effects. A maximal effect was observed after 30 days of Surfagon administration in a dose of 50 mg/kg b.w. together with flutamid in a dose of 10 mg/kg. b.w. Such a combination of drugs is recommended for clinical approbation as therapy for prostate cancer.

V.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Возианов А.Ф., Клименко И.А., Резников А.Г. Эндокринная терапия рака предстательной железы. – К.: Наук. думка, 1999. – 280 с.
2. Гончаров Н.Д. Острое влияние агонистов люлиберина на гипофизарную, тестикулярную и овариальную функцию у обезьян // Пробл. эндокринологии. – 1997. – **43**, №2. – С.42–45.
3. Нижерадзе И. А. Экспериментальные и клинические аспекты применения лютеинизирующего гормона-рилизинг-гормона и его аналогов // Там же. – 1996. – **42**, №5. – С. 40–42.
4. Полякова Л.І., Чайковська Л.В., Резніков О.Г. Морфологічні зміни органів репродуктивної системи у шурів за умов сумісного застосування флутаміду і агоністів гонадоліберину у мінімальних дозах // Ендокринологія. – 2001. – **6**, №1. – С.67–73.
5. Шаткин А. Колориметрические методы определения ДНК, РНК и белка. – В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии / Ред. К. Хабель, М.П. Зальцман. – М.: Мир, 1972. – С. 84–89.
6. Baraghini G.F., Celani M.F., Zaidi et al. Problems associated with the in vitro bioassay of serum luteinizing hormone (LH) on mouse Leydig cell preparations: methodological aspects // J. Endocrinol. Invest. – 1984. – **7**, (suppl. 3). – P. 23–31.
7. Chertin B., Spitz I.M., Lindenberg T. et al. An implant releasing the gonadotropin hormone-releasing hormone agonist histrelin maintains medical castration for up to 30 months in metastatic prostate cancer // J. Urol. – 2000. – **163**, № 3. – P. 838–844.
8. Labrie F. Medical castration with LHRH agonists: 25 years later with major benefits achieved on survival in prostate cancer // J. Androl. – 2004. – **25**. – P. 305–313.
9. Naito S., Tachibana M., Deguchi T. et al. Addition of bicalutamide 80 mg to LHRH-agonist monotherapy in patients with advanced prostate cancer: Impact on quality of life // J. Clin. Oncol. – 2004. – **22**, № 14S. – P. 4703.
10. Pitteloud N., Hayes F.J., Dwyer A. et al. Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism // J. Clin. Endocrinol. Metabol. – 2002. – **87**. – P. 4128–4136.
11. Trachtenberg J., Gittleman M., Steidle C. et al. A phase 3, multicenter, open label, randomized study of abarelix versus leuprolide plus daily antiandrogen in men with prostate cancer // J. Urol. – 2002. – **167**. – P. 1670–1674.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин
ім. В.П.Комісаренка АМН України*

*Матеріал надійшов до
редакції 29.06.2006*