

Действие хелатирующих агентов на предстательную железу у крыс

Ещенко Ю.В.¹, Новицкий В.В.², Бовт В.Д.¹, Ещенко В.А.¹, Уразова О.И.²

Chelating agents action on rat prostate

Yeschenko Yu.V., Novitsky V.V., Bovt V.D., Yeschenko V.A., Urazova O.I.

¹ Запорожский национальный университет, г. Запорожье, Украина

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

© Ещенко Ю.В., Новицкий В.В., Бовт В.Д. и др.

В эксперименте на крысах показано, что дитизон вызывает развитие дефицита цинка в клетках предстательной железы. Наблюдается трехфазный тип колебаний концентрации цитохимически определяемого цинка в клетках: фаза первичного снижения, фаза временного частичного восстановления, фаза вторичного снижения. Диэтилдитиокарбамат натрия в отличие от дитизона не вызывает повреждений клеток и вторичного дефицита в них цинка.

Ключевые слова: дитизон, клетки, предстательная железа, цинк.

It was shown in experiments on rats, that dithizone induced zinc deficiency in prostate cells. Three phase type of fluctuations of cytochemically detected zinc concentration was observed in the cells: phase of primary decrease, phase of temporary partial restoration and the phase of secondary decrease. Sodium diethyldithiocarbamate unlike to dithizone didn't induce damage of cells and secondary decrease zinc content in its.

Key words: dithizone, cells, prostate, zinc.

УДК 616.65:599.323.4]-092.9:615.256

Введение

У мужчин преклонного возраста часто возникают опухоли предстательной железы, поэтому заслуживают особого внимания поиски веществ, избирательно действующих на этот орган. Предстательная железа содержит высокие количества цитохимически выявляемого (хелатируемого) цинка [3]. В связи с этим представляет интерес изучение действия на нее хелатирующих агентов, способных взаимодействовать с указанным металлом. Согласно литературным данным, такие агенты делятся на цитотоксические (например, дитизон) и нецитотоксические (диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭДТКН)) [1, 5, 6].

Цель настоящего исследования — изучить динамику изменений содержания цинка в клетках предстательной железы при действии дитизона и ДЭДТКН.

Материал и методы

В опытах было использовано 105 беспородных крыс-самцов в возрасте от 0,5 до 1 года и массой тела 210—250 г. Хелатирующие агенты подопытным животным вводили внутривенно: дитизон в дозе 50 мг/кг массы тела, ДЭДТКН в дозе 500 мг/кг массы

тела (дозы агентов апробированы в предшествующих работах) [1, 6, 7]. Животным контрольной группы назначали физиологический раствор.

Для приготовления основного 1%-го водно-аммиачного раствора дитизона для инъекций в колбу с притертой пробкой наливали 45 мл дистиллированной воды, добавляли 0,9 мл 25%-го раствора гидроокиси аммония и 600 мг дитизона. Смесь перемешивали на водяной бане (70 °С) в течение 10 мин, затем фильтровали через беззольный фильтр. Рабочий 0,2%-й раствор дитизона для цитохимических исследований готовили пятикратным разбавлением дистиллированной водой основного раствора. Поскольку дитизон растворим в воде при щелочных значениях среды, для его растворения воду подщелачивали раствором гидроокиси аммония. Известно, что водно-аммиачный раствор, на основе которого изготавливался раствор дитизона, не вызывает изменений в клетках [1, 6, 7].

ДЭДТКН растворяли в дистиллированной воде без добавления щелочи. Для инъекций готовили 10%-й водный раствор ДЭДТКН. В отдельных сериях опытов инъекции дитизона и ДЭДТКН производили адrenaл-эктомированным животным согласно разработанной методике [1, 6, 7].

При проведении экспериментальных исследований учитывались требования Международной конвенции (Страсбург, 1996), касающиеся этических норм обращения с животными.

Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации через 30 мин — 5 сут после инъекций дитизона или ДЭДТКН. Извлекали предстательную железу и фиксировали в холодном (4 °С) ацетоне в течение 12 ч. Затем фрагменты кишки дважды обрабатывали ксилолом (по 15 мин), смесью 50% ксилола и 50% парафина (30 мин), жидким парафином (дважды по 1,5 ч) и заливали в парафин. Срезы толщиной 5—10 мкм депарафинировали в ксилоле и спирте (дважды по 3 мин в каждом), окрашивали рабочим раствором дитизона (3 ч) или 0,01%-м ацетоновым раствором 8-(п-толуолсульфониламино)-хинолина (8-ТСХ) (1 мин), промывали дистиллированной водой, заключали в глицерин. В первом случае применяли световую, а во втором — люминесцентную микроскопию — люминесцентный микроскоп МИКМЕД-2 (вариант 11) производства фирмы «ЛОМО» (г. Санкт-Петербург). Для возбуждения люминесценции применяли голубой светофильтр, пропускающий свет длиной 360—400 нм, входящий в комплект микроскопа. Исследование люминесценции проводили с помощью желтого светофильтра ЖС-18.

Для изучения прижизненной цитохимической реакции дитизона из железы готовили замороженные срезы толщиной 20—60 мкм и рассматривали с использованием светлопольной и темнопольной микроскопии.

Интенсивность цитохимической реакции дитизона и 8-ТСХ с цинком на депарафинированных срезах оценивали по 3-балльной системе, предложенной В.В. Соколовским [5], а также Ф. Хэйхоу и Д. Кваглино [8]. За 1 балл принимали слабоположительную, 2 балла — умеренную, 3 балла — выраженную по интенсивности реакции. Деструктивные изменения в клетках срезов предстательной железы выявляли окраской гематоксилин-флюксинном [1]. Концентрацию кортикостерона в плазме крови анализировали с помощью метода флюориметрии [4].

Статистическую обработку результатов исследования выполняли при помощи пакета программ Statistica 6.0 for Windows. Для оценки нормальности распределения данных в выборках применяли критерий Колмогорова—Смирнова. Поскольку выборочные данные подчинялись нормальному закону распреде-

ления, для их сравнения применяли *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего выборочного значения X и ошибки среднего m .

Результаты и обсуждение

Введение крысам дитизона вызывало развитие в простате прижизненной цитохимической реакции, которая на замороженных срезах проявлялась в виде красных гранул, светившихся в темном поле оранжево-красным светом. Максимум реакции наблюдался через 30 мин после инъекции. В последующем гранулы становились расплывчатыми, интенсивность прижизненной реакции снижалась, и через 2 ч она на срезах не определялась.

ДЭДТКН образует комплекс с цинком, который не заметен на замороженных срезах предстательной железы. Предварительное введение ДЭДТКН предупреждало развитие интравитальной реакции дитизона. Это объясняется тем, что ДЭДТКН связывает цинк в клетках простаты и исключает прижизненное взаимодействие с дитизоном.

При постановке цитохимической реакции дитизона и 8-ТСХ на депарафинированных срезах предстательной железы в клетках концевых отделов выявляли гранулы. Дитизоновые зерна в светлом поле были окрашены в красный цвет, а в темном поле микроскопа светились оранжево-красным светом. Гранулы 8-ТСХ люминесцировали желто-зеленым светом.

В таблице приведены данные интенсивности реакции с 8-ТСХ в клетках простаты на депарафинированных срезах у крыс, получавших дитизон и ДЭДТКН.

Интенсивность цитохимической реакции с 8-ТСХ в клетках простаты у крыс после введения дитизона и ДЭДТКН ($X \pm m$)

Срок после инъекции	Число животных	Интенсивность реакции, усл. ед.	
		После введения дитизона	После введения ДЭДТКН
30 мин	12	1,14 ± 0,14***	0
2 ч	14	1,53 ± 0,16	0
8 ч	15	1,15 ± 0,12***	0,56 ± 0,03***
1 сут	13	1,17 ± 0,09***	1,43 ± 0,12
2 сут	10	1,24 ± 0,10***	1,52 ± 0,13
3 сут	12	1,38 ± 0,12*	1,68 ± 0,14
5 сут	14	1,35 ± 0,10**	1,74 ± 0,15
Контрольные животные	15	1,82 ± 0,15	1,82 ± 0,15

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Как видно из таблицы, в контрольной группе интенсивность реакции с 8-ТСХ в простате составила $(1,82 \pm 0,15)$ усл. ед. Ее снижение прослеживалось через 30 мин — 5 сут после введения дитизона (на 16—37%; $p < 0,001—0,05$).

При этом наблюдались трехфазные колебания содержания цитохимически выявляемого цинка в клетках простаты. Первичное снижение его содержания — результат связывания части цинка агентом, вследствие чего только часть этого металла становилась доступной для цитохимического выявления с помощью 8-ТСХ. Затем происходило временное частичное восстановление содержания цинка в клетках, которое не наблюдалось у адреналэктомированных животных. На этой стадии обнаруживалось усиление секреторной функции надпочечников: концентрация в крови кортикостерона повышалась. Следовательно, развитие второй фазы связано с гиперфункцией надпочечников (стресс-реакция).

В последующие сроки происходило вторичное снижение содержания цинка в простате, но уже как результат развивающихся деструктивных изменений в клетках.

Отрицательная реакция 8-ТСХ на цинк в простате через 30 мин — 2 ч после инъекции ДЭДТКН объясняется полным связыванием цинка агентом, благодаря чему он не определяется с помощью данной реакции. Цитохимически выявляемый цинк обнаруживался в клетках лишь через 1 сут после инъекции ДЭДТКН и его концентрация составляла 79% ($p > 0,05$) по отношению к контрольным значениям. В последующие сроки происходило дальнейшее повышение содержания цинка в клетках (концентрация 84—96% ($p > 0,05$) по сравнению с таковой у контрольных животных).

В отличие от дитизона трехфазные изменения содержания цинка в клетках не выявлялись в связи с тем, что ДЭДТКН не вызывал деструктивных изменений в них.

Цитотоксичный хелант дитизон представляет интерес с точки зрения консервативного лечения злокачественных опухолей предстательной железы, а нецитотоксический хелант ДЭДТКН — с точки зрения поисков эффективных цитостатических препаратов, избирательно действующих на железу.

Так, например, при введении цитостатика тиюТЭФа (50 мг/кг массы тела) наблюдали сходные с ДЭДТКН, хотя и менее выраженные изменения в предстательной железе. Объясняется это более слабой способностью тиюТЭФа связывать цинк.

В связи с вышеизложенным заслуживают внимания поиски новых цитостатических препаратов с более выраженной цинк-хелатирующей способностью [2].

Заключение

Клетки концевых отделов предстательной железы содержат высокие концентрации цинка, благодаря чему в них могут избирательно накапливаться введенные в организм хелатообразующие агенты (хеланты). Показано, что цитотоксические хеланты (дитизон и др.) вызывают повреждение клеток и необратимый дефицит цинка. Учитывая избирательность повреждающего действия этих соединений на простату, они могут быть рекомендованы в качестве средств региональной химиотерапии опухолей данного органа. Нечитотоксические хеланты (диэтилдитиокарбамат и др.) вызывают лишь обратимые изменения содержания цинка в клетках без деструктивных изменений в них. Эти агенты представляют интерес с точки зрения поисков эффективных цитостатических препаратов избирательного действия на предстательную железу.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. Томск: Изд-во ТГУ, 1993. 136 с.
2. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1986. 238 с.
3. Ещенко В.А. Гистохимическое определение цинка // Цитология. 1978. Т. 20, № 8. С. 927—933.
4. Меньшиков В.В. Лабораторные исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.
5. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л.: Медицина, 1971. 172 с.
6. Торопцев И.В., Ещенко В.А. Экспериментальный дитионовый диабет. Томск: Изд-во ТГУ, 1975. 126 с.
7. Торопцев И.В., Ещенко В.А. Инкреторная функция поджелудочной железы. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1981. 127 с.
8. Хэйхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.

Поступила в редакцию 05.01.2009 г.

Утверждена к печати 17.03.2010 г.

Сведения об авторах

Ю.В. Ещенко — канд. биол. наук, доцент ЗНУ (г. Запорожье, Украина).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск, Россия).

Ещенко Ю.В., Новицкий В.В., Бовт В.Д. и др.

Действие хелатирующих агентов на предстательную железу у крыс

В.Д. Бовт — д-р биол. наук, профессор ЗНУ (г. Запорожье, Украина).

В.А. Ещенко — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой физиологии ЗНУ (г. Запорожье, Украина).

О.И. Уразова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск, Россия).

Для корреспонденции

Уразова Ольга Ивановна, тел. 8-903-913-1483, e-mail: Urazova72@yandex.ru