

6. *A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant* / H. S. White, H. H. Wolf, E. A. Swinyard [et al.] // *Epilepsia*. – 1992. – Vol. 33. – P. 564–572.

7. *Isoboles* / ed. S. E. De Jongh // *Quantitative Methods in Pharmacology*. – N. Y. : Interscience Publishers, Inc., 1961. – P. 318–327.

8. *Godlevsky L. S. The effects of L-DOPA and transcranial magnetic stimulation on behavioral reactions in kindled rats* / L. S. Godlevsky, E. V. Koboletov // *Neuroscience and Behavioral Physiology (USA)*. – 2005. – Vol. 35, N 3. – P. 313–317.

9. *Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* / G. Paxinos,

C. Watson. – Sydney : Academic Press Inc., 1998.

10. *The effects of electrical stimulation of the paleocerebellar cortex on penicillin-induced convulsive activity in rats* / L. S. Godlevsky, K. I. Stepanenko, B. A. Lobasyuk [et al.] // *Neurosci. Behav. Physiol. (USA)*. – 2004. – Vol. 34, N 8. – P. 797–802.

УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, А. В. Матвієнко, В. М. Коваленко

## ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ мРНК ІЗОФОРМ ЦИТОХРОМУ P-450 У СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ І СТАН ЇХ СПЕРМАТОГЕННОГО ЕПІТЕЛІЮ

ДУ «Інститут фармакології і токсикології НАМН України», Київ

Чоловіча репродуктивна система — одна з основних мішеней токсичної дії хімічних речовин, що надходять до організму з навколишнього середовища, професійного оточення, внаслідок шкідливих звичок (тютюнокуріння, алкоголізм) або застосування хіміотерапевтичних засобів [1]. Незважаючи на те, що дія тестикулярних токсикантів може бути спрямованою на різні структури репродуктивних органів, завершальна відповідь, як правило, є неспецифічною, оскільки ушкодження одного з типів клітин тягне за собою каскад подій, які призводять до структурних змін і дисфункції інших складових системи [2].

Для вияву токсичної дії значна кількість хімічних речовин потребує метаболічної активації, ключова роль у якій належить цитохрому P-450 [3]. У сім'яниках ссавців наявні ізоформи цитохрому P-450 двох основних груп: перша — стероїдогенні, що каталізують ключові ланки в біосинтезі андрогенів [4], та друга — ензими, функцією яких є конверсія ендогенних та екзогенних ліпофільних сполук у більш водорозчинні метаболіти [5].

Остання група ізозимів відповідає також за токсичну біоактивацію ксенобіотиків, у тому числі безпосередньо у чоловічих репродуктивних органах, внаслідок утворення інтермедіатів, здатних зв'язуватись із життєво важливими макромолекулами клітин, такими як ДНК і протеїни, або виступати в ролі ендокринних дизрупторів [3].

Враховуючи, що в реальних умовах на організм одночасно впливає значна кількість хімічних чинників, особливо важливим є визначення їх комбінованої дії на чоловічу репродуктивну функцію. Раніше нами було показано, що сумісне введення протитуберкульозних лікарських засобів (ПТЛЗ) і ряду в терапевтичних дозах білим щурам-самцям призводило до погіршення кількісних і якісних показників їхніх сперматозоїдів і підвищення рівня до- та післяімплантаційної загибелі потомства [6]. Виявлено, що тестикулярна токсичність ПТЛЗ може спостерігатися внаслідок активації перекисного окиснення ліпідів, порушення тілового статусу й ушкодження ДНК у клітинах сім'яників і епідидимісів [6].

**Мета** даної роботи — вивчення впливу сумісного введення білим щурам-самцям етамбутолу (ЕТ), рифампіцину (РИФ), ізоніазиду (ІЗН) та піразинаміду (ПР) на показники, що характеризують стан сперматогенного епітелію та рівень експресії у сім'яниках мРНК ізоформ цитохрому P-450, залучених до метаболізму згаданих препаратів.

### Матеріали та методи дослідження

Субстанції ЕТ, ІЗН, РИФ і ПР були надані ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод».

У дослідженнях використовували самців-щурів лінії Вістар із початковою масою тіла 150–170 г, наданих ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Щурів утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до корму та води. План досліджень був розглянутий і схвалений Комітетом з біоетики ДУ «ІФТ НАМНУ»; процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Дві групи самців-щурів (по 6 у кожній) були сформовані за



методом рандомізації: 1-ша — внутрішньошлункове сумісне введення ПТЛЗ — етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду в 1 % крохмальному гелі; 2-га — контроль (внутрішньошлункове введення 1 % крохмального гелю). Протитуберкульозні лікарські засоби вводили у дозах, що застосовують у клініці для короткочасної комбінованої терапії туберкульозу [7] з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [8]: ЕТ — 155 мг/кг, РИФ — 74,4 мг/кг, ІЗН — 62 мг/кг, ПР — 217 мг/кг протягом 60 днів (період сперматогенезу, враховуючи термін дозрівання сперматозоїдів у епідидимісі).

Через 24 год після останнього введення ПТЛЗ самців під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії дислокацією шийних хребців і виділяли сім'яники для оцінки стану сперматогенного епітелію за стандартними методиками [9] та рівня експресії ізоформ цитохрому Р-450 методом зворотної транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Сумарну мРНК виділяли з використанням TRI-Reagent (Sigma, США). Синтез кДНК проводили з використанням реактивів і протоколу фірми Fer-

mentas (Німеччина). Склад реакційної суміші для ПЛР, протоколи ампліфікації та праймери, специфічні для ПЛР ампліфікації генів CYP2E1, CYP3A2 (ортолог 3A4) та CYP2C23 (ортолог CYP2C19 та CYP2C9) були обрані відповідно до робіт S. M. Lankford et al. [10], V. Jager et al. [11] і S. Imaoka et al. [12].

Для внутрішнього контролю проводили ПЛР із праймерами  $\beta$ -актину. Усі праймери були синтезовані компанією "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації використовували термоциклер MyCycler (BioRad, США). Електрофорез продуктів ПЛР (CYP2E1 — 744 п. н., CYP2C23 — 252 п. н., CYP3A2 — 349 п. н. та  $\beta$ -актин — 353 п. н.) проводили в 2 % агарозному гелі. Гелі забарвлювали розчином бромового етидію, візуалізували в УФ-світлі, фотографували за допомогою системи GelDoc, (BioRad, США) й аналізували в системі Quantity One BioRad System (США). Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані представляли як середнє значення  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ). Різницю між досліджуваними показниками вважали

статистично вірогідною при значенні  $p < 0,05$ .

### Результати дослідження та їх обговорення

Нами досліджено вплив комбінації ПТЛЗ на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 — CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 у сім'яниках щурів (рис. 1). Аналіз електрофореграми продуктів ПЛР свідчить про значну експресію мРНК CYP2E1 у сім'яниках дослідних щурів після сумісного введення ПТЛЗ, тимчасом як у контролі продукти ампліфікації CYP2E1 не візуалізувалися (див. рис. 1). Водночас було зафіксоване підвищення експресії генів CYP3A2 та CYP2C23 удвічі порівняно з контролем. Дані про зростання кількості мРНК CYP2E1 у сім'яниках цілком узгоджуються з даними щодо здатності, щонайменше одного з компонентів застосованої комбінації ПТЛЗ — ІЗН, активувати трансляцію гена даної ізоформи з відповідним збільшенням її мРНК у печінці [13].

Зростання рівня мРНК ізоформ CYP3A2 та CYP2C23 може бути віднесене на рахунок РИФ, який здатен їх індукувати, зокрема в гепатоцитах [14]. Варто зазначити, що раніше на-

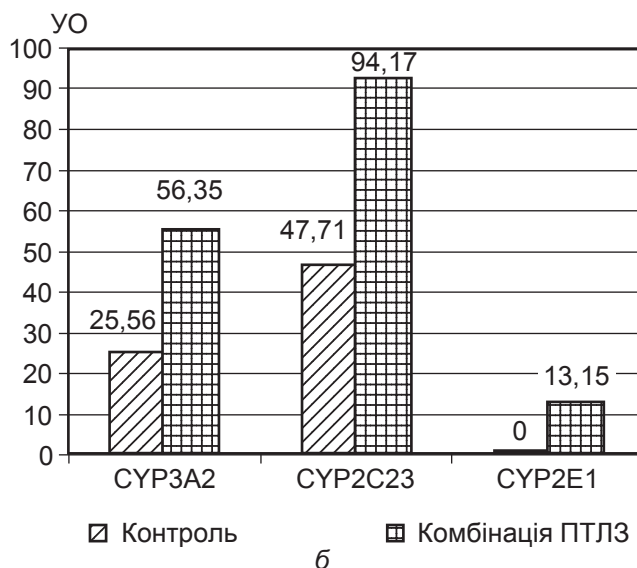
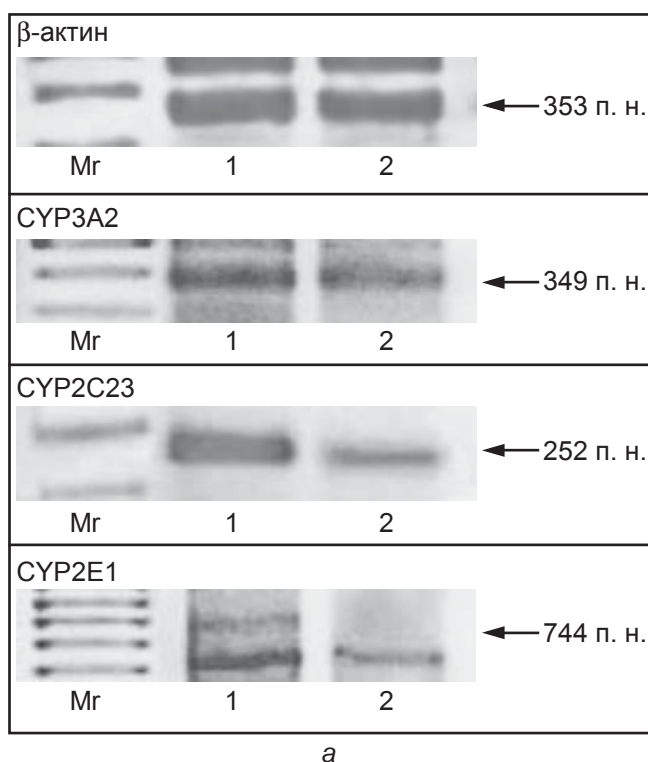


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ПЛР генів CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 у сім'яниках, стрілками вказано ДНК-фрагменти, що відповідають генам зазначених ізоформ (а), відносний рівень експресії ізоформ CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23, інтенсивність піка  $\beta$ -актину взято за 100 % (б)

ми було показано значне зниження репродуктивної здатності щурів-самців, які протягом періоду сперматогенезу отримували ПТЛЗ [6]. Цілком можливо, що виявлена нами індукція ізоферментів цитохрому P-450 у сім'яниках щурів може зробити певний внесок у реалізацію гонадотоксичної дії ПТЛЗ. На користь цього припущення свідчать дані інших авторів, які у досліджах на мишах для речовин різної хімічної структури (індукторів CYP1A2, 2B10, 2E1 та 3A) встановили зв'язок між CYP-індукуючим потенціалом сполуки та її здатністю впливати на метаболізм тестостерону, викликаючи антиандрогенні ефекти [15]. Також відомо, що за умов біотрансформації етанолу до ацетальдегіду в сім'яниках спостерігається конкуренція за кофактори, які використовуються у процесах синтезу тестостерону, що призводить до пригнічення його продукції [16].

Індукція цитохрому P-450 та модуляція біотрансформації ксенобіотиків у органах-мішенях може мати значні токсикологічні наслідки, такі як безпосереднє ушкодження токсичними метаболітами й активними формами кисню найважливіших складових клітин — ліпідів, протеїнів, вуглеводів і ДНК [1]. Серед досліджених нами ізоформ цитохрому P-450 однією з найважливіших, з точки зору токсикології, є CYP2E1 з огляду на його високу здатність до індукції [17]. Присутність цитохрому P-450 2E1 у чоловічих гонадах і його індукційність, на наш погляд, можуть мати велике значення у продукції генотоксичних метаболітів при біотрансформації досліджуваних лікарських засобів. Таке припущення підтверджують отримані нами раніше дані щодо підвищення післяімплантаційної загибелі потомства щурів-самців, які протягом періоду сперматогенезу отримували комбінацію ПТЛЗ, та інтактних самоць [6].

S. B. DuTeaux et al. [18] і P. G. Forkert et al. [19], дослідивши розподіл CYP2E1 у ре-

продуктивних органах щурів, показали, що він локалізується переважно в епідидимісах, сім'яноспійних каналцях сім'яників і клітинах Лейдига. Здатність CYP2E1 генерувати активні форми кисню, такі як супероксидні радикали, що швидко взаємодіють із органічними молекулами з утворенням вторинних вільних радикалів, наразі є доведеним фактом [17]. Подібний каскад може призводити до оксидативного ураження клітин Лейдига, яке, у свою чергу, викликає зниження секреції тестостерону, спричиняючи порушення функції клітин Сертолі, що негативно позначається на сперматогенезі [2].

Результати дослідження стану клітин, які належать до сперматогенного епітелію, наведені в табл. 1. Відповідно до них, індекс сперматогенезу, що відтворює збереження різних типів клітин сперматогенного епітелію, у сім'яниках щурів дослідної групи був нижчим, ніж у контролі. Негативного впливу зазнали сперматогонії — введення ПТЛЗ призвело до істотного зниження мітотичної активності, а отже, зменшення їх кількості у поперечних зрізах каналців сім'яників. Водночас кількість клітин у 12-й стадії мейозу, що характеризує мейотичний поділ сперматоцитів I порядку, у сім'яниках дослідних щурів була вдвічі меншою порівняно з контролем. Очевидно, що зниження мейотичної активності сперматоцитів I порядку узгоджується з отриманими ра-

ніше даними щодо зниження продукції сперматозоїдів у піддослідних самців [6].

Мікроскопічне дослідження сім'яників виявило, що за дії ПТЛЗ досить часто спостерігалися пусті та деформовані каналці, а також каналці з дискомплексованим або спустошеним сперматогенним епітелієм і поодинокі каналці, заповнені загиблими сім'яродними клітинами (рис. 2). У поодиноких звивистих каналцях у зоні сперматоцитів I порядку зрідка виявлялися гігантські та багатоядерні клітини (див. рис. 2), що свідчить про дегенеративні зміни. Також частіше, ніж у контролі, траплялися невеликі ділянки без статевих клітин, так звані вікна, а також сперматозоїди у стані деструкції, що проявлялося їх адгезією та фрагментацією. Відсоток випадків злуццювання сперматогенного епітелію у просвіт каналця, відшарування епітелію від базальної мембрани та специфічні зміни епітелію у вигляді «вікон» у тварин, які отримували ПТЛЗ, були значно вищими порівняно з контролем (див. табл. 1).

## Висновок

Отримані дані дозволяють із високою часткою впевненості стверджувати, що протитуберкульозні засоби I ряду, за умов їх сумісного введення щурам, впливають на експресію генів цитохромів P-450 — CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 у сім'яниках. Уведення ПТЛЗ протягом періоду сперматогенезу призводить до значного зростан-

Таблиця 1

### Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію у щурів за умов сумісного введення протитуберкульозних лікарських засобів

Показники	Експериментальна група	
	ПТЛЗ	Контроль
Індекс сперматогенезу	3,47±0,01	3,630±0,009
Кількість сперматогоній	57,63±0,38	72,94±0,25
12-та стадія мейозу, %	1,60±0,24	3,20±0,58
Злущений епітелій, %	3,40±0,51	1,40±0,60
Відшарування епітелію, %	1,20±0,37	0,40±0,24
Вікна, %	1,60±0,25	0,80±0,37





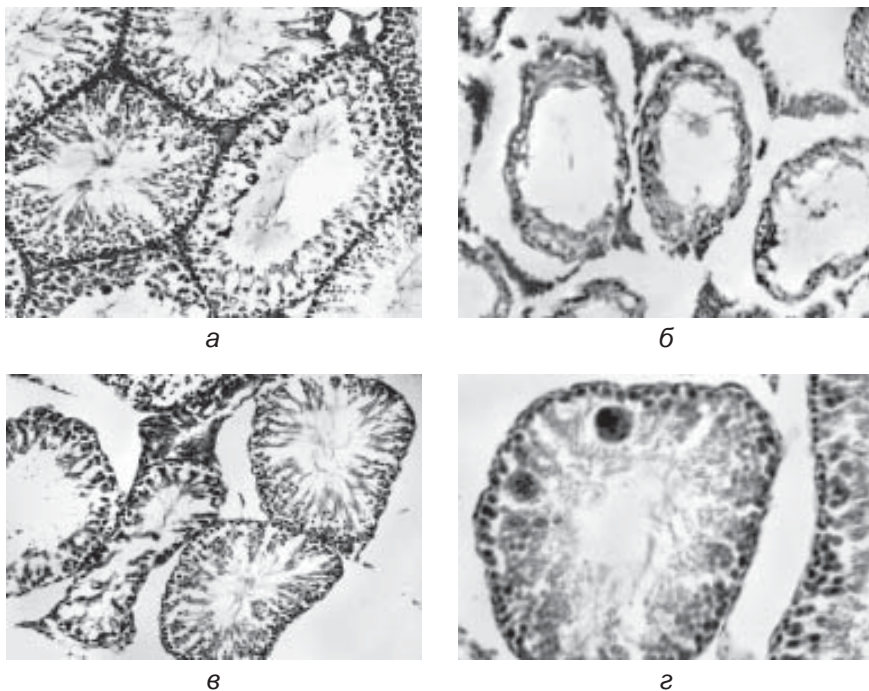


Рис. 2. Стан сперматогенного епітелію щурів-самців: а — сім'яні канальці з нормальною будовою епітеліосперматогенного шару (контроль), гематоксилін-еозин,  $\times 200$ ; б — спустошення гермінативного епітелію й uszkodження оболонки сім'яних канальців (введення ПТЛЗ), гематоксилін-еозин,  $\times 200$ ; в — деформація, дисконплексація та зменшення гермінативного епітелію в сім'яному канальці (введення ПТЛЗ), гематоксилін-еозин,  $\times 200$ ; г — гігантська та багатоядерна клітина в зоні сперматоцитів I порядку (введення ПТЛЗ), гематоксилін-еозин,  $\times 400$

ня рівня вмісту мРНК даних ізоензимів. Модуляція експресії мРНК і, можливо, зміни активності CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 у сім'яниках можуть бути залучені до патогенетичних механізмів розвитку чоловічої неплідності внаслідок порушення сперматогенезу як шляхом прямої дії метаболітів ПТЛЗ і активних форм кисню на сперматогенний епітелій, так і за рахунок опосередкованої дії на продукцію тестостерону. На користь цього припущення свідчать виявлені у сперматогенному епітелії щурів дослідної групи морфологічні та морфометричні порушення.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Occupational and Lifestyle Exposures on Male infertility: A Mini Review* / J. Ten, J. Mendiola, A. M. Torres-Cantero, J. M. Moreno-Crau // *The Open reproductive Science Journal*. – 2008. – N 1. – P. 16–21.
2. *Bonde J. P. Occupational risk to male reproduction* / J. P. Bonde // *G. Ital. Med. Lav. Erg.* – 2002. – Vol. 24, N 2. – P. 112–117.
3. *Xenobiotic metabolism, genetic Polymorphism and male infertility* / H. C. Schuppe, P. Wieneke, S. Donat [et al.] // *Andrologia*. – 2000. – Vol. 32, N 4/5. – P. 255–262.
4. *Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells* / L. X. Shan, D. M. Phillips, C. W. Bardin, M. P. Hardy // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 133. – P. 2277–2283.
5. *Otto S. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in rat adrenal, ovary, and testis microsomes is catalyzed by the same novel cytochrome P450 (P450RAP)* / S. Otto, K. K. Bhattacharyya, C. R. Jefcoate // *Endocrinology*. – 1992. – Vol. 131. – P. 3067–3076.
6. *Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад щурів-самців* / Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, І. С. Блажчук, В. М. Коваленко // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2011. – № 6 (25). – С. 35–40.
7. *Donate J. M. B. Treatment of Tuberculosis* / J. M. B. Donate // *Business briefing : European Pharmacotherapy*. – MWL Print Group Ltd, 2006. – P. 1–4.
8. *Food and Drug Administration [Electronic source] // Guidance for Industry and Reviewers Estimating the*
9. *Principles and Methods of Toxicology* / ed. by A. Wallace Hayes. – 4th ed. – L. : Taylor Francis, 2001. – 1887 p.
10. *Lankford S. M. Cloning of Canine Cytochrome P-450 2E1 cDNA: Identification and Characterization of Two Variant Alleles* / S. M. Lankford, S. A. Bai, J. A. Goldstein // *Drug Metab. Dispos.* – 2000. – Vol. 28, N 8. – P. 981–986.
11. *Ethinylestradiol-mediated induction of hepatic CYP3A9 in female rats: implication for cyclosporine metabolism* / W. Jager, M. A. Correia, L. M. Bornheim [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 1999. – Vol. 27, N 12. – P. 1505–1511.
12. *Imaoka S. Localization of rat cytochrome P450 in various Tissues and comparison of arachidonic acid metabolism by rat P450 with that by human P450 Ortologs* / S. Imaoka, T. Hashizume, Y. Funae // *Drug Metab. Pharmacokin.* – 2005. – Vol. 20, N 6. – P. 478–484.
13. *Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid* / K. S. Park, D. H. Sohn, R. L. Veech, B. J. Song // *Eur. J. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 248, N 1. – P. 7–14.
14. *Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions* / Z. Bibi // *Nutr. Metab.* – 2008. – Vol. 5. – P. 27–36.
15. *Modulation of mouse P450 isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the environmental chemicals Mirex, 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene, Vinclozolin, and Flutamide* / D. Dai, Y. Cao, R. Falls [et al.] // *Pesticide Biochem. and Physiol.* – 2001. – Vol. 70, N 3. – P. 127–141.
16. *Quintans L. N. Oxidation of ethanol to acetaldehyde and free radicals by rat testicular microsomes* / L. N. Quintans, G. D. Castro, J. A. Castro // *Arch. Toxicol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 25–30.
17. *Lieber C. S. Cytochrome P-4502E1: Its Physiological and Pathological Role* / C. S. Lieber // *Physiol. Rev.* – 1997. – Vol. 77. – P. 517–544.
18. *DuTeaux S. B. Identification of cytochrome P450 2E1 in the rat efferent ducts and epididymis of the rat* / S. B. DuTeaux, M. G. Miller // *Toxicologist*. – 2001. – Vol. 60. – P. 385.
19. *Metabolism and toxicity of trichloroethylene in epididymis and testis* / P.-G. Forkert, L. H. Lash, V. Nadeau [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 182, N 3. – P. 244–254.

Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. Of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER. – Available from : <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/02d-0492-gdl0001-vol1.pdf>

