

## Azatioprino įtaka galūnių osteogenezei

Janina Žukienė, Violeta Žalgevičienė, Renata Rizgelienė

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Anatomijos, histologijos ir antropologijos katedra

**Raktažodžiai:** embriogenezė, kaulėjimas, embrionas.

**Santrauka.** Šio eksperimentinio tyrimo tikslas – ištirti imunosupresanto azatioprino įtaką žiurkių embrionų galūnių osteogenezei.

**Tyrimo medžiaga ir metodai.** Vienkartinės 50 ir 80 mg/kg azatioprino dozės sušvirkštos į apvaisintų eksperimentinių ir kontrolinių žiurkių pilvo ertmę nuo pirmos iki keturioliktos embriogenezės paros. Fiksuotuose alkoholiu, nuskaidrintuose ir dažytuose alizarino raudonuoju embrionų galūnių preparatuose matuotas kaulų užuomazgų kaulėjimo centrų ilgis.

**Rezultatai.** Gauti tyrimo duomenys rodo, kad galūnių osteogenezę sutriko tų embrionų, kuriuos abi azatioprino dozės paveikė nuo ketvirtos iki tryliktos embriogenezės paros. Eksperimentinių embrionų, paveiktų preparatu dešimtą ir dvyliktą parą, osteogenezę buvo labiausiai sulėtėjusi, galūnių kaulėjimo centrai buvo deformavęsi, trumpesni negu kontrolinės grupės žiurkių, arba jų visiškai nebuvo.

**Išvados.** Azatioprino poveikiui embriono galūnių osteogenezę jautriausia aktyvios organogenezės laikotarpiu. Didesnė preparato dozė labiau slopino osteogenezę. Jautriausiai į preparatą reagojo pėdos ir plaštakos kaulai.

### Įvadas

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Anatomijos, histologijos ir antropologijos katedroje atliekami tyrinėjimai, kur nagrinėjama normali ir patologinė embriogenezė. Nustatomi nukrypimai, atsirandantys veikiant biologiniams bei socialiniams faktoriams.

Šio eksperimentinio tyrimo tikslas – nustatyti galūnės kaulų osteogenezės sutrikimus, sukeltus imunosupresanto azatioprino, kuris vartojamas klinikinėje praktikoje.

Visų žinduolių galūnėse išskiriamos trys dalys: stilopodijus, zeugopodijus ir autopodijus. Susiformavus žiurkės embriono stilopodijaus, zeugopodijaus ir autopodijaus kremzliniam skeletui, jo normalios osifikacijos pradžia laikoma 17–18 embriogenezės para (1). Analizuojant embrionų, paveiktų azatioprinu, galūnių kaulų užuomazgų pirmųjų kaulėjimo židinių atsiradimo laiką, jų ilgį ir nukrypimus nuo normos, galima spręsti apie teratogeninį preparato poveikį.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimui panaudota 241 eksperimentinė ir 20 kontrolinių Wistar linijos baltųjų žiurkių, sveriančių 160–240 g ir jų embrionai (1475 eksperimentiniai ir 208 kontroliniai).

Lakstymosi laikotarpiu patelės nakčiai buvo paliekamos kartu su patiniais. Diena, kuomet patelės makš-

ties tepinėlyje aptikta spermatozoidų, laikoma 0: pipetės turinys su fiziologiniu 0,9 proc. NaCl tirpalu užlašinamas ant objekcinio stiklelio ir, mikroskopu padidinus 40 kartų, makšties tepinėlyje ieškoma spermatozoidų (2).

Vartotos vienkartinės 50 ir 80 mg/kg azatioprino dozės. Preparato dozė skaičiuota kiekvienai žiurkei atsižvelgiant į individualią jos masę. Abi preparato dozės buvo vartotos pradedant pirma ir baigiant keturioliktą embriogenezės parą. Preparato buvo švirkščiamas į pilvo ertmę. Kiekvienos paros eksperimentinę grupę sudarė vidutiniškai aštuonios žiurkės. Žiurkės skrostos 21-ą parą.

Embrionai buvo fiksuoti alkoholiu, nuskaidrinti ir dažyti alizarino raudonuoju. Mikrometru, pritvirtintu prie stereomikroskopo MBS-1 okuliario, buvo matuojamas embrionų galūnių kaulų užuomazgų kaulėjimo centrų ilgis. Nuo kūno atidalytose galūnėse kaulėjimo centrų ilgis matuotas ilgųjų vamzdinių kaulų diafizių viduryje, mentės – išilgai jos ašies, dubens kaulų (klubakaulio, gaktikaulio, sėdynkaulio) – pagal kranio-kaudalinę ašį.

Kontrolinėms žiurkėms buvo sudarytos tokios pačios sąlygos kaip ir eksperimentinėms, vietoje preparato joms į pilvo ertmę buvo švirkšta fiziologinio tirpalo. Šios grupės embrionų preparatai paruošti ir tirti taip pat kaip ir eksperimentinių.

Tyrimų duomenims vertinti taikytas Stjudento (t) kriterijus.

### Rezultatai

Ištyrus galūnių preparatus, paaiškėjo, kad eksperimentinių embrionų kaulai turėjo ryškių kaulėjimo sutrikimų.

Paveikus azatioprino 80 mg/kg doze embrionus nuo penktos iki dvyliktos embriogenezės paros, priekinės galūnės peties lanko kaulų kaulėjimo centrų ilgis reikšmingai ( $p<0,05$ ) skyrėsi palyginti su kontrolinių embrionų kaulais. Didžiausias neigiamas preparato poveikis išryškėjo sušvirkštus preparato dvyliktą parą. Dėl šios preparato dozės net 83,9 proc. embrionų raktikaulio kaulėjimas nevyko arba kaulėjimo centrai buvo deformavęsi. Mentės kaulėjimo centrų atsiradimo laikas labiausiai sulėtėjo sušvirkštus preparato dešimtą embriogenezės parą. Dėl azatioprino 50 mg/kg dozės, sušvirkštotos 12–13 paromis, eksperimentinių embrionų raktikaulio ir mentės kaulėjimo sulėtėjimas buvo ryškiausias ir reikšmingai ( $p<0,05$ ) skyrėsi nuo kontrolinių (lentelė).

Eksperimentinių embrionų laisvos galūnės dalies

(žastikaulio, stipinkaulio, alkūnkaulio ir plaštakos kaulų) kaulėjimas taip pat vėlavo ir reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinių. Žastikaulio osteogenezės pokyčių nustatyta leidžiant preparatą nuo ketvirtos iki tryliktos embriogenezės paros. 80 mg/kg azatioprino dozė, sušvirkšta dvyliktą embriogenezės parą, ypač slopino žastikaulio kaulėjimo centrus. Net 73,3 proc. embrionų žastikaulių kaulėjimo centrų atsiradimo laikas vėlavo palyginti su kontroliniais. Panašūs duomenys buvo gauti ir suleidus 50 mg/kg preparato dozę.

Tiek alkūnkaulio, tiek stipinkaulio kaulėjimas eksperimentinių embrionų galūnėse buvo sulėtėjęs sušvirkštus azatioprino nuo penktos iki dvyliktos paros ir reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinių. Ryškiausių pakitimų rasta embrionuose, kuriuos abi dozės paveikė dvyliktą parą.

Delnakaulių kaulėjimas atsiliko tomis pačiomis embriogenezės paromis kaip ir žastikaulio. Ypač silpnai kaulėjimas vyko antrame delnakaulyje (antrame autopodijaus spindulyje). Didžiausi skeletogenezės pokyčiai išryškėjo vartojant tiek 50 mg/kg, tiek 80 mg/kg dozę dvyliktą embriogenezės parą: trečio delnakaulio kau-

**Lentelė. Galūnių skeleto kaulėjimo centrų ilgis ( $\mu\text{m}$ ) paveikus embrionus azatioprino 50 ir 80 mg/kg vienkartinėmis dozėmis dvyliktą, tryliktą ir keturioliktą embriomenezės parą**

Kaulo pavadinimas			Kontrolė	Preparato dozė					
				azatioprinas 50 mg/kg			azatioprinas 80 mg/kg		
				embriogenezės para, kada sušvirkšta preparato					
				12	13	14	12	13	14
Priekinė galūnė	Raktikaulis		5036±41	4740±98	5000±81	5172±69	4227±172	5023±70	5241±75
	Mentė		4375±47	3865±61	4094±70	4372±68	3370±80	4248±178	4314±61
	Žastikaulis		4388±41	3770±166	4373±93	4655±117	3387±154	4200±70	4334±80
	Alkūnkaulis		4723±50	3665±142	4382±89	4717±144	3173±277	4510±80	4589±91
	Stipinkaulis		3607±36	2824±108	3360±69	3678±90	2053±302	3443±65	3538±70
	Delnakauliai	II	152±15	58±19	153±25	183±43	56±24	140±21	208±19
		III	431±14	180±31	339±27	435±48	153±38	370±33	451±23
		IV	314±12	133±21	279±23	277±41	136±48	231±31	355±18
		V	0	0	0	0	0	0	0
	Užpakalinė galūnė	Klubakaulis		2715±32	2081±55	2520±68	2739±91	1513±263	2557±172
Sėdynkaulis		989±32	514±94	903±69	994±100	327±105	943±47	969±58	
Gaktikaulis		402±35	233±59	503±69	361±90	167±75	686±72	386±65	
Šlaunikaulis		3158±42	2500±174	2855±67	3333±125	1253±286	2876±180	3155±83	
Blauzdikaulis		3510±45	2748±94	3347±89	3694±101	1633±260	3095±193	3454±77	
Šeivikaulis		3266±45	2257±146	3038±84	3194±101	1400±314	2752±117	3131±96	
Padikauliai		II	151±13	31±13	174±26	159±26	15±11	111±22	167±17
		III	260±15	98±26	216±26	306±52	36±20	145±22	296±24
		IV	323±18	81±19	212±26	300±53	50±26	181±25	357±28
		V	6±3	0	0	0	0	0	1,5±4,18

lėjimo nebuvo 6,5 proc., ketvirtos – 4,5 proc. embrionų.

Tiriant dubens lanko kaulų (klubakaulio, sėdynkaulio, gaktikaulio) kaulėjimo pakitimus, sukeltus azatioprino, nustatyta skirtinga atskirų kaulų užuomazgų reakcija į preparatą. Silpniausiai į preparatą reagavo eksperimentinių embrionų klubakaulis ir sėdynkaulis, t. y. jų kaulėjimas mažai atsiliko nuo kontrolinių. Jautriausiai į 80 mg/kg preparato dozę reagavo gaktikaulis: sušvirkštus azatioprino ketvirtą embriogenezės parą, kaulėjimo židinių atsiradimo laikas vėlavo net 39 proc. embrionų. Didžiausias reikšmingas gaktikaulio kaulėjimo skirtumas, palyginti su kontrole, buvo nustatytas sušvirkštus preparato dvyliktą embriogenezės parą. Jo kaulėjimas vėlavo net 41,5 proc. eksperimentinių embrionų. 50 mg/kg azatioprino dozė gaktikaulio kaulėjimą neigiamai veikė nuo ketvirtos iki dvyliktos embriogenezės paros. Dėl šios preparato dozės, sušvirkštos dešimtą embriogenezės parą, gaktikaulis nekaulėjo.

Azatioprino 80 mg/kg dozė užpakalinės galūnės stilopodžio ir zeugopodžio kaulų kaulėjimą stabdė tomis pačiomis paromis kaip ir priekinės galūnės, t. y. nuo ketvirtos iki tryliktos paros. Ši azatioprino dozė šlaunikaulio kaulėjimą labiausiai slopino, kuomet buvo sušvirkšta dvyliktą parą. Šią parą net 39,7 proc. embrionų, paveiktų azatioprinu, kaulėjimo židinių ilgis atsiliko nuo kontrolinių. Mažesnė preparato dozė (50 mg/kg) šlaunikaulio kaulėjimą taip pat slopino, sušvirkštus ją tomis pačiomis embriogenezės paromis, o dvyliktą parą šlaunikaulio kaulėjimas buvo užslopintas net 79,2 proc. eksperimentinių embrionų.

Blauzdos kaulus stipriausiai veikė abi preparato dozės, sušvirkštos dvyliktą parą. Net 44 proc. eksperimentinių embrionų blauzdos kaulų osteogenezė atsiliko ir reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinių.

Padikaulių osifikacija taip pat buvo slopinama, tačiau ypač jautriai jie reagavo į preparatą, sušvirkštą dešimtą ir dvyliktą parą. Kaulėjimas nevyko 6 proc. eksperimentinių embrionų, o kaulėjimo centrų ilgis reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinių.

### Rezultatų aptarimas

Išanalizavus tyrimo duomenis, nustatyta, kad eksperimentinių embrionų priekinių ir užpakalinių galūnių skeleto kaulėjimas buvo paveiktas sušvirkštus tiek 80 mg/kg, tiek 50 mg/kg azatioprino dozę nuo ketvirtos iki tryliktos embriogenezės paros. Embrionų galūnių kaulų užuomazgų jautrumo azatioprinui kritinis laikotarpis yra dešimtą ir dvyliktą parą, t. y. tuomet, kai vyksta aktyvi žiurkės embriono organogenezė.

Palyginus azatiopriną su kitais literatūroje aprašytais preparatais, pažymėtina, kad dauguma jų žiur-

kių galūnes veikia aktyviosios organogenezės laikotarpiu (3, 4). Pradiniu organogenezės laikotarpiu (iki devintos žiurkių embriogenezės paros) pažeidimų būna mažiau matyt todėl, kad tuomet embriono galūnių užuomazgos mažiau determinuotos arba turi daugiau galimybių „ištaisyti“ atsiradusius pakitimus.

Medicinos literatūroje daug duomenų apie įvairios cheminės struktūros teratogenus, kurie trikdo galūnių skeleto sklaidą. Kofeinas ir nikotinas slopina skeleto-genezę, veikdami kremzlės tarplastelinės medžiagos struktūrą, trikdydami besiformuojančio kaulo kraujotaką (5). Didelės A vitamino dozės skatina kremzlės ląstelių proliferaciją ir teratogeniškai veikia galūnių, ypač autopodijaus, kaulus (6). Retinoinė rūgštis, veikdama galūnės užuomazgos poliarizuojančio aktyvumo zoną, sukelia galūnių sklaidos sutrikimų arba skatina papildomų pirštų sklaidą (7). Semikarbazido, tiousemikarbazido ir benzohidrazido mišiniai lemia kaulų sąnarių paviršių suaugimą (8). Galūnių ir kitų organų deformacijų priežastys gali būti: sutrikę metabolitiniai procesai, apoptozė, pakitęs osmosinis slėgis (9, 10). Medicinos literatūroje aprašytos ir žmogaus gemalo bei vaisiaus osteogenezę neigiamai veikiančios medžiagos, pvz., etanolis, vartojamas nėštumo laikotarpiu, trikdo vaisiaus kalcio apykaitą ir gali lėtinti osifikacijos procesą (11).

Literatūros duomenimis, kai kurie teratogenai slopina placentos raidą, lemia kraujotakos sutrikimus, o tai sukelia embrionų hipoksiją, kuri gali skatinti galūnių bei kitų organų apsigimimus (12–16). Kraujotakos sutrikimai galūnės užuomazgos laikotarpiu sutrikdo normalų viršutinių ir apatinių galūnių formavimąsi (17). Mūsų tirtų eksperimentinių embrionų, paveiktų azatioprinu, galūnių preparatuose kraujotakos sutrikimo požymių (kraujosrūvų, kraujagyslių išsiplėtimo ar kt.) nepastebėta.

Šio tyrimo duomenimis, azatioprino embriotoksinis poveikis priklausė ne tik nuo embriogenezės paros, bet ir nuo preparato dozės. Toksiškos buvo abi azatioprino dozės, tačiau mažesnė dozė osteogenezę veikė silpniau. Daugelio tyrėjų duomenimis, dozės dydis lemia cheminių preparatų embriotoksinį ir teratogeninį veikimą, be to, nuo dozės dydžio gali priklausyti embrionų žūtis ir apsigimimų pobūdis (6, 18, 19). Didesnė preparato dozė ir toksiškai, ir teratogeniškai pradeda veikti anksčiau negu mažesnė, todėl sukelia didesnių pakitimų. Tačiau manoma, kad mažesnės dozės sukeltas poveikis labiau atskleidžia preparato toksinį poveikį embrionui. Neigiamą tiriamųjų preparatų poveikį embriogenezėi taip pat nulemia embrionų kūno masė ir ilgis. Yra duomenų, įrodančių, kad kuo mažesnė embriono

masė, tuo didesni patologiniai pokyčiai (3).

Tai, kad azatioprinas labiausiai pažeidė galūnių autopodijaus segmentą, rodo, kad šis preparatas sutrikdė distalinėje galūnės dalyje esančių morfogenetinių sričių, t. y. apikalinės ektodermos kitos ir progreso zonos, sąveiką (20). Remiantis šia prielaida, aiškinami ir kitų įvairios cheminės sudėties medžiagų sukelti autopodijaus, ypač pirštų sklaidos sutrikimai (21).

### Išvados

1. Imunosupresanto azatioprino teratogeniniam poveikiui embrionai jautriausi aktyvios organogenezės laikotarpiu.

2. Galūnių osteogenezę neigiamai veikė abi preparato dozės. Didesnės dozės labiau slopino osteogenezę.

3. Labiausiai pakito priekinių ir užpakalinių galūnių autopodijaus osteogenezę.

## The influence of azathioprine on the osteogenesis of the limbs\*

Janina Žukienė, Viokta Žalgevičienė, Renata Rizgelenė

Department of Anatomy, Histology and Anthropology, Medical Faculty, Vilnius University, Lithuania

**Key words:** embryogenesis, ossification, embryo.

**Summary. Background.** The purpose of this experimental work was to examine the osteogenesis of rats limbs under the influence of immunosuppressant azathioprine.

**Material and methods.** Two doses of azathioprine (50mg/kg and 80 mg/kg) were administered intraperitoneally to experimental and control pregnant rats once during the period from the 1<sup>st</sup> to the 14<sup>th</sup> day of embryogenesis. The size of the centers of ossification was measured in the limbs fixed in ethanol, cleared and stained with alizarin red.

**Results.** The analysis of the experimental data revealed that osteogenesis was sensitive to the influence of azathioprine administered to embryos from the 4<sup>th</sup> to the 13<sup>th</sup> day of embryogenesis. The centers of ossification in embryos treated with azathioprine on the 10 and 12<sup>th</sup> days were most damaged: shorter, deformed or absent.

**Conclusions.** The limb osteogenesis was delayed and damaged by azathioprin in the period of active organogenesis. The bigger the dose of azathioprine the more osteogenesis was delayed. The most sensitive was the skeleton of the autopod.

Correspondence to J. Žukienė, Department of Anatomy, Histology and Anthropology, Medical Faculty of Vilnius University, M. K. Čiurlionio 21, 2009 Vilnius, Lithuania. E-mail: Janina.zukiene@mf.vu.lt

### Literatūra

1. Svendsen O, Hau J. Handbook of Laboratory Animal Science. New York: Raven Press; 1994.
2. Wallace Hayes A. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press; 1994.
3. Hellwig J, Liberacki AB. Evaluation of the pre-, peri- and postnatal toxicity of monoethanolamine in rats following repeated oral administration during organogenesis. *Fundam Appl Toxicol* 1997;40:158-62.
4. Žalgevičienė V. Morfogenetinės sutrikimai, indukuoti naujais citostatiniais preparatais. (Morphogenetic retardation induced by new cytostatic agents.) *Medicina (Kaunas)* 1999;32:797-805.
5. Leblebicioglu-Bekcioglu B, Paulson RB, Paulson JO, Sucheston ME, Shanfeldt J, Bradway SD. Effects of caffeine and nicotine administration on growth and ossification of the ICR mouse fetus. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1995;15: 146-56.
6. Miller RK, Hendrickx AG, Mills JL, Hummler H, Wiegand UW. Periconceptional vitamin A use: how much is teratogenic? *Reprod Toxicol* 1998;12:75-88.
7. Niederreither K, Ward SJ, Dolle P, Chambon P. Morphological and molecular characterization of retinoic acid-induced limb duplication in mice. *Dev Biol* 1996;176:185-98.
8. Dawson DA. Comparative joint actions of semicarbazide and thiosemicarbazide on induction of malformations and osteolathyrism in mixtures with benzoic hydrazide. *Teratog Carcinog Mutagen* 1993;13:23-33.
9. Renault JY, Melcion C, Cordier A. Limb bud cell culture for in vitro teratogen screening: validation of an improved assessment method using 51 compounds. *Teratog Carcinog Mutagen* 1989;9:83-96.
10. Bareggi R, Grill V, Zwyer M, Sandrucci MA, Narducci P, Forabosco A. The growth of long bones in human embryological and fetal upper limbs and its relationship to other developmental patterns. *Anat Embryol* 1994;189:19-24.
11. Keiver K, Herbert L, Weinberg J. Effect of maternal ethanol consumption on maternal and fetal calcium metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1305-12.
12. Rasheed RA, Bashir AK, Ali BH, Padmanabhau R. Effect of *Rhazya stricta* on the developing rat fetus. *Reprod Toxicol* 1997;11:191-9.
13. Ridings JE, Palmer AK, Davidson EJ, Baldwin JA. Prenatal toxicity studies in rats and rabbits with the calcium channel blocker diproteverine. *Reprod Toxicol* 1996;10:43-9.
14. Schmidt H. Effect of papain on different phases of prenatal ontogenesis in rats. *Reprod Toxicol* 1995;9:49-55.
15. Uche-Nwachi EO. Effect of intramuscular sulfadoxine-py-

\* The full-length article in English can be found at <http://medicina.kmu.lt>

- rimethamine on pregnant Wistar rats. *Anat Rec* 1998;250: 426-9.
16. Palot M, Visseaux H, Botmans C. Anesthesie locoregionale et nouveau. *Anesthesiol* 1995;43:547-53.
17. Nolan RS, Schwartz G, Farquharson S, Hootnick DR, Levinson EM, Miller M, Manz LA, Packard DS. Hematomas and limb skeletal malformations in chicken embryos following exposure to 5-fluoro-2-deoxyuridine. *Biomed Environ Sc* 1998;11:15-30.
18. Krewski D, Zhu Y. Applications of multinomial dose-response models in developmental toxicity risk assessment. *Risk Analysis* 1994;14:613-27.
19. Platzek T, Bocher G, Meister R, Neubert D. Embryotoxicity induced by alkylating agents: 7. low dose prenatal-toxic risk estimation based on NAOEL risk factor approach. dose response relationships and DNA adduct using methylnitrosourea as a model compound. *Teratog Carcinog Mutagen* 1993;13: 101-25.
20. Wolpert L. The progress zone model for specifying positional information. *Int J Dev Biol* 2002;46:869-70.
21. Juchau MR. Chemical teratogenesis. *Prog Drug Res* 1993; 41:9-50.

*Straipsnis gautas 2003 03 31, priimtas 2003 05 14*

*Received 31 March 2003, accepted 14 May 2003*