

НЕГОРМОНАЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПАТОСПЕРМИЙ. КАТИАЗИН

Гладкова А. И., Сидорова И. В., Яременко Ф. Г., Золотухина В. Н.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков

В Украине число бесплодных мужчин составляет около 18%. Учитывая то, что пограничным для сохранения наций этот показатель находится в пределах 15–20% [1, 2], становится очевидной значимость работ по предупреждению и лечению снижения плодovitости.

Современная терапия патоспермий, и как следствие — мужского бесплодия, обычно базируется на использовании гормональных препаратов (андрогенов, гонадотропинов). Однако сложности с установлением адекватной дозировки гормонов нередко приводят к обратному результату, вплоть до азооспермии [3, 4], что ограничивает их применение и обосновывает поиск альтернативных средств лечения.

Использование негормональных средств коррекции мужского бесплодия до настоящего времени является крайне ограниченным. К таким препаратам относятся тамоксифен и кломифен, обладающие антиэстрогенными свойствами, которые повышают секрецию гонадотропин-рилизин гормона [5] и вероятность оплодотворения при вторичном нарушении сперматогенеза [6]. Однако их целесообразно назначать только при наличии гиперэстрогении [7]. Несколько препаратов разработаны на основе со-

лей аминокислоты аргинина, которые эффективны при разных формах олигоспермии [8, 9].

В качестве вспомогательных средств для лечения мужского бесплодия применяют витамины E, A и C, простагландины, препараты растительного и животного происхождения. Однако изыскание эффективных и безопасных негормональных средств для лечения патоспермии и бесплодия остается актуальной задачей.

Специалистами ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины» синтезировано новое оригинальное соединение, представляющее собой 3-N-(4,5-дигидро-2-ил)амид 1R, 5S, 2S, R-1,2,2-триметилциклопентан 1,3-дикарбоновой кислоты и получившее название Катиазин (КТН) [10–12]. Основанием для разработки этого соединения явились многочисленные данные о важной роли дикарбоновых кислот в ряде биохимических процессов, в частности в половых железах и предстательной железе.

Целью нашей работы являлось определение терапевтических возможностей нового биологически активного соединения катиазина на патогенетически различных экспериментальных моделях патоспермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнялись в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Украина,

2001). В опытах использовали половозрелых крыс самцов популяции Вистар, которых рандомизировали на следующие группы: ин-

тактные; подопытные с патоспермиями различного генеза; контрольные, получающие растворитель испытуемого соединения; подопытные с патоспермией, которым назначался КТН.

Патоспермии моделировались разными способами: воспалением, стрессированием (иммобилизация), эстрогенизацией либо облучением. Указанные воздействия вызывали неоднотипные изменения спермограмм, что позволило определить показания для назначения КТН

Катиазин вводили в дозах 0,6; 5,9 либо 60 мг на 1 кг массы тела в 1 мл 2% крахмального геля перорально через зонд. Длительность курса экспериментальной терапии зависела от вида патологии и длилась

от 14 до 47 дней. В завершении опыта животных забивали декапитацией, на аутопсии извлекали органы репродуктивной системы, вымывали из эпидидимиса сперматозоиды. В полученной суспензии изучали концентрацию и подвижность спермиев, число их морфологически измененных форм. Уровень гормонов определялся иммуноферментным методом.

Статистический анализ полученных данных предполагал проверку нормальности распределения методом Колмогорова-Смирнова. Сравнение между группами осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента [13], данные представлены как $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для индукции изменений, характерных для эпидидимита и простатита небактериальной природы, здоровым половозрелым самцам внутрибрюшинно вводили гипертонический раствор NaCl в объеме 1,8 мл на 100 г массы тела.

Изучение функциональной активности эпидидимальных спермиев через 28 после индуцирования воспаления показало снижение количества их подвижных форм (на 66,4%) и увеличение доли аномалий в их морфологии (на 95,5%) по сравнению с интактным контролем (табл. 1). Через 48 дней после моделирования воспаления подвижность спермиев еще была снижена (до $37,4 \pm 4,5\%$, $P < 0,05$), но наиболее выраженным было увеличение количества патологических форм (до $83,6 \pm 2,0\%$). Последнее свидетельствует о высокой чувствительности клеток начального этапа сперматогенеза — сперматогониев к повреждающему действию воспаления.

Эффективность КТН (0,6 мг/кг) при экспериментальной терапии патоспермии, вызванной воспалением, зависела от длительности введения. Введение соединения в течение 28 дней до забоя привело к статистически значимому (на 55,5%) увеличению концентрации спермиев. Значительно, по сравнению с «нелеченной» патологией, увеличилась доля подвижных клеток

(табл. 1). При 48-дневном введении положительный эффект КТН на спермограмму был выражен значительно слабее. Этим было показано, что в условиях экспериментального воспаления более чувствительными к действию КТН являются половые клетки более поздних стадий сперматогенеза — на этапе превращения сперматид в сперматозоиды. Таким образом, в условиях патоспермии воспалительного генеза назначением КТН можно добиться увеличения концентрации и подвижности спермиев.

Известно, что на сперматогенную функцию негативно влияет гормональный и нейромедиаторный статус, обусловленный стрессом [14]. Это обусловило использование нами в качестве одной из моделей патоспермии стресса иммобилизации (жесткая фиксация животного в положении на спине по 1 часу в течение 7 дней), который классифицируется как модель нервно-мышечного напряжения. Подтверждением реакции напряжения было увеличение массы надпочечников и изменение состава белой крови у стрессированных самцов.

Через 21 день после прекращения стрессирования у подопытных животных резко снизилась концентрация спермиев (на 63,1% по сравнению с интактным контролем). Содержание подвижных спермиев уменьшилось на 15,6%, тогда как число па-

тологических форм увеличилось на 49,2%. После 21-дневного курса экспериментальной терапии КТН в дозе 0,6 мг/кг статистически значимо, по сравнению с «нелеченым» контролем, возросла концентрация и доля подвижных спермиев (см. табл. 1). Следует подчеркнуть, что при указанной постановке эксперимента (введение КТН 21 день до забоя) «лечению» подвергались половые клетки, развитие которых было нарушено 7-дневным стрессированием на этапе спермиогенеза, то есть превращения сперматид в сперматозоиды.

В этой серии исследований проводилось сопоставление эффекта КТН с действием

аргинина гидрохлорида в дозе 100 мг/кг. Результаты сравнительного анализа свидетельствуют, что положительный эффект КТН выражен в большей степени, чем эффект аргинина в аналогичных условиях (см. табл. 1). Однако обращает на себя внимание, что ни КТН, ни соль аргинина не изменили доли морфологически аномальных половых клеток, увеличенной в результате стрессирования самцов.

Как известно, одной из причин патоспермии и бесплодия может быть гиперэстрогения и относительное преобладание эстрадиола над тестостероном в мужском организме [15]. Для моделирования такой ситуации

Т а б л и ц а 1

Спермограмма самцов крыс при различных моделях нарушения сперматогенеза и экспериментальной терапии катиазином

Условия эксперимента	Статистический показатель	Концентрация сперматозоидов, млн/мл	Подвижные спермии, %	Патологические формы, %
Интактный контроль	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	13 47,6 ± 4,5	13 74,4 ± 1,2	13 38,2 ± 3,2
Воспаление + растворитель	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	8 45,6 ± 8,0	8 25,0 ± 3,5*	8 74,7 ± 3,8*
Воспаление + КТН (0,6 мг/кг)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	8 74,0 ± 8,8**/**	8 80,6 ± 2,5**/**	8 52,3 ± 3,1**/**
Стресс	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	5 17,6 ± 0,6*	5 62,8 ± 2,1	5 57,0 ± 4,6
Стресс + растворитель	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	11 13,7 ± 1,7*	12 49,3 ± 3,3	12 52,2 ± 3,5*
Стресс + КТН (0,6 мг/кг)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	6 28,8 ± 1,8**/**	8 71,8 ± 2,5**/**	8 52,3 ± 3,6*
Стресс + аргинина гидрохлорид (100 мг/кг)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	6 19,8 ± 1,7**/**	6 60,8 ± 4,6**/**	6 52,7 ± 5,5*
Эстрогенизация (E ₂ 0,5 мг/кг)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	5 7,8 ± 3,6*	4 55,8 ± 6,2*	5 64,6 ± 4,2*
Эстрогенизация + растворитель (14 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	5 6,4 ± 2,3*	5 46,4 ± 3,4*	5 79,8 ± 5,5*
Эстрогенизация + КТН (0,6 мг/кг, 14 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	6 13,3 ± 3,2*	6 59,8 ± 3,7**/**	6 62,0 ± 6,7*
Эстрогенизация + КТН (5,9 мг/кг, 14 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	7 18,7 ± 8,3*	7 53,7 ± 6,5*	7 65,0 ± 6,2*
Эстрогенизация + растворитель (47 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	5 4,4 ± 0,6*	5 49,4 ± 6,9*	5 80,4 ± 2,3*
Эстрогенизация + КТН (0,6 мг/кг, 47 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	4 8,0 ± 3,1*	4 69,0 ± 3,1**	4 66,0 ± 6,4*
Эстрогенизация + КТН (5,9 мг/кг, 47 дней)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	5 9,0 ± 1,9**/**	5 65,8 ± 4,8	5 74,0 ± 2,5*

Примечание. * — статистически значимые отличия от интактного контроля (p < 0,05); ** — статистически значимые отличия от «нелеченной» группы с соответствующей патологией (p < 0,05).

половозрелым самцам крыс на протяжении 7 дней мы вводили эстрадиол дипропионат в дозе 0,5 мг/кг. При забое через 14 дней после окончания введения эстрадиола (E₂) изучали функциональную активность половых клеток, нарушенную эстрогенизацией на стадии сперматид. Обнаружено ее выраженное угнетение по сравнению с интактным контролем (см. табл. 1).

На модели экспериментальной эстрогенизации изучали эффективность двух доз КТН (0,6 либо 5,9 мг/кг) при двух сроках введения: на протяжении 14 дней, когда действию КТН подвергались половые клетки, поврежденные эстрогенизацией на стадии сперматид, либо на протяжении 47 дней, когда экспериментальной терапии КТН подвергались гаметы, поврежденные в самом начале своего развития — на стадии сперматогониев.

Под влиянием 14-дневного введения КТН в дозе 0,6 мг/кг у эстрогенизированных самцов увеличилось количество подвижных спермиев по сравнению с «нелеченым» контролем. Почти двукратное увеличение концентрации половых клеток оказалось статистически незначимым, по-видимому, из-за значительных колебаний в группах. Изменения показателей функциональной активности половых клеток под влиянием КТН в дозе 5,9 мг/кг были статистически незначимыми. Увеличение срока введения КТН до 47 дней не изменило основной направленности и выраженности его эффекта по сравнению с 14-дневным введением (см. табл. 1).

Основанием для испытания КТН на модели радиационного поражения сперматогенеза стали многочисленные наблюдения о высокой чувствительности семенников к повреждающему действию ионизирующего излучения [16, 17]. Взрослые самцы крыс были подвергнуты внешнему облучению на рентгенотерапевтическом аппарате РУМ-17. Условия облучения: И = 150 кВ, i = 7 мА, фильтр 1 мм СИ + 1 ммАL. Для облучения крыс приспособили специальный тубус, F = 40 см, поле размером 20 × 20 см. Суммарная доза облучения составляла 0,25 или 0,75 Гр (фракционировано за 3 дня).

Крыс декапитировали через 1, 14 и 48 суток после облучения, что дало возможность проследить чувствительность к радиации клеток разных этапов сперматогенеза — зрелых сперматозоидов, сперматид и сперматогониев, соответственно. Через 1 сутки после облучения статистически значимых изменений в показателях спермограммы не выявлено, что свидетельствует об относительной резистентности зрелых сперматозоидов к облучению. Через 14 суток после облучения обеими дозами обнаружены значительные нарушения всех показателей спермограммы (см. табл. 2).

В последние 3 дня облучения и еще 5 дней после животным вводили КТН в дозе 5,9 мг/кг (всего восемь введений). Таким образом выяснялся возможный протективный эффект КТН в отношении радиационного поражения сперматогенеза. Через 48 суток после облучения у крыс, получавших соединение, улучшения концентрации и подвиж-

Т а б л и ц а 2

Показатели спермограммы у крыс при радиационном поражением сперматогенеза и экспериментальной терапии катиозином

Условия эксперимента	Статистический показатель	Концентрация сперматозоидов, млн/мл	Подвижные спермии, %	Патологические формы, %
Интактный контроль	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	13 34,2 ± 3,1	13 71,2 ± 2,1	13 17,3 ± 1,6
Облучение, 0,25 Гр	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	4 18,5 ± 2,6*	4 57,0 ± 6,5*	4 28,8 ± 3,1*
Облучение, 0,75 Гр	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	13 20,5 ± 1,6*	13 57,6 ± 2,4*	13 36,2 ± 2,4*
Облучение 0,75 Гр + КТН (0,6 мг/кг)	n $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	7 30,3 ± 4,8	7 55,6 ± 6,0*	7 20,1 ± 0,8**

Примечание. Как в табл. 1.

ности спермиев не наблюдалось, однако обнаружено статистически значимое уменьшение количества их патологических форм (см. табл. 2).

Приведенные выше результаты исследования специфического действия КТН показали, что это соединение имеет свойства, благодаря которым происходит улучшение показателей спермограммы у крыс с нарушениями сперматогенеза различной природы (индуцированными воспалением небактериальной природы, стрессированием, эстрогенизацией либо радиационным поражением). Несмотря на некоторые различия, выявленные на разных моделях патоспермий, полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности КТН и его перспективности в качестве потенциального лекарственного препарата для лечения нарушений сперматогенеза. Это явилось основанием для патентования соединения [10–12].

Прогнозирование эффективности нового соединения в значительной степени за-

висит от механизма его действия. Как показали наши исследования [10], КТН не обладает непосредственными эстрогенными, антиэстрогенными, андрогенно-антандрогенными свойствами, отсутствует у него также гонадотропная активность. Вместе с тем, в условиях введения КТН, в частности у животных, подвергнутых иммобилизационному стрессу, уровень тестостерона в крови имел тенденцию к повышению (до $11,46 \pm 4,16$ против $2,64 \pm 0,59$ нмоль/л у «нелеченых» животных). Изменения уровня эстрадиола имели противоположную направленность, что привело к нормализации соотношения половых гормонов. Дальнейшие исследования могут способствовать раскрытию механизма действия катиазина.

Высокая эффективность катиазина при отсутствии токсичности позволяет рекомендовать соединение для разработки препарата для лечения мужского бесплодия.

ВЫВОДЫ

1. Новое оригинальное соединение катиазин обладает нормализующим действием при патоспермиях различного генеза.
2. Эффективность катиазина выше при патоспермиях воспалительного и стрессорного происхождения, ни-

же — при гиперэстрогении и облучении.

3. Высокая эффективность катиазина при отсутствии токсичности позволяет рекомендовать соединение для разработки препарата для лечения мужского бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чебан, В. І. Соціальна та гігієнічна оцінка здоров'я населення у контексті його репродуктивної структури [Текст] / В. І. Чебан // Лікувальна справа. — 2003. — № 2. — С. 93–97.
2. Чоловіче безпліддя. Сучасні підходи до лікування [Текст] / О. Л. Івахненко, О. П. Стрілець, Г. І. Кабачний, Л. С. Стрельников // Запорозький мед. журн. — 2010. — Т. 12, № 2. — С. 65–69.
3. Bansal, M. R. Effect of testosterone oenanthate on spermatogenesis and serum testosterone concentrations in adult mice [Text] / M. R. Bansal, A. G. Davies // J. Reprod. Fert. — 1986. — Vol. 78, № 219. — P. 219–224.
4. Investigations upon the mechanism of inhibition of spermatogenesis in the rat by a dimetric ethynodiol-testosterone ester [Text] / H. J. Born, P. Hörster-Poschmann, W. Stoll [et al.] // Acta endocrinol. — 1988. — Vol. 117, № 4. — P. 536–544.
5. Holland-Moritz, H. Effect of tamoxifen on impaired spermatogenesis [Text] / H. Holland-Moritz, W. Krause, P. Schramm // Hum. reprod. — 1990. — Vol. 15, Suppl. — P. 93.
6. Rönnberg, L. Clomiphene treatment in male infertility [Text] / L. Rönnberg // Acta univ. ouluen. — 1981. — № 70. — P. 1–34.
7. Die Behandlung der Oligozoospermie mit Tamoxifen führt zu keiner Verbesserung der Spermienqualität [Text] / K. Sterzik, B. Rosenbusch, D. Grad [et al.] // Zbl. Gynecol. — 1991. — Vol. 113, № 12. — P. 683–688.
8. Джагрбусынов, Б. Ц. Значение свободных аминокислот спермы при мужском бесплодии [Текст]

- / Б. Ц. Джарбусьнов, В. У. Шелекенов // Урологія и нефрологія. — 1981. — № 4. — С. 44–47.
9. Гомон, О. М. Фармакологічне дослідження солей аргініну як засобу для негормональної корекції сперматогенезу: Автореф. дисс... канд. біол. наук. — Одеса, 1997. — 17 с.
10. Пат. 38/30 А Україна, МПК 7 А 61 К 31/16; СО7С 61/06; СО7Д 277/00. 3 (4,5-дигідротіазол-2-іл) амід цис-1,2,2-триметилциклопентан-1,3-дикарбонової кислоти, що стимулює сперматогенез [Текст] / Яременко Ф. Г., Свидло І. М., Вакула В. М., Гладкова А. І., Сидорова І. В., Золотухіна В. М [та ін.], (UA) Укр. НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань. — № 2000083139; Заявл. 01.06.00; Опубл. 13.05.01, Бюл. № 4. — С. 159.
11. Пат. 13894 Україна, МПК 8 А61К31/16, А61К9/20. Засіб для корекції порушень сперматогенної функції / С. П. Кустова, М. О. Бойко, Ю. І. Караченцев [та ін.] (UA); Ін-т проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН Укр. (UA). — № 4200510631; Заяв. 10.11.05; Опубл. 17.04.06, Бюл. № 4. — 4 с.
12. Пат. 38711 UA, МПК (2006) А61К 31/16, А61К 33/30, А61К 9/48. Засіб для профілактики та лікування патоспермій [Текст] / С. П. Кустова, Є. М. Коренева, М. О. Бойко [та ін.] (UA) ; заявник і патентовласник Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського Академії медичних наук України» (UA). — № U2008 07746 ; заявл. 06.06.2008 ; опубл. 12.01.09, Бюл. № 1. — 4 с.
13. Лакин, Г. Ф. Биометрия [Текст] : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
14. Фархутдинов, Р. Р. Влияние экстремальных факторов на мужскую репродуктивную систему [Текст] / Р. Р. Фархутдинов, Ш. Н. Галимов, Э. Ф. Галимова [и др.] // Пробл. репрод. — 2010. — № 4. — С. 60–65.
15. Гладкова, А. И. Ближайшие и отдаленные последствия эстрогенизации для сперматогенной функции крыс [Текст] / А. И. Гладкова, И. В. Сидорова // Пробл. эндокр. патол. — 2010. — № 2. — С. 74–79.
16. Горпинченко, И. И. Сперматологические показатели хемилюминесценции семенной плазмы и сперматозоидов у мужчин, подвергшихся длительному действию малых доз радиации [Текст] / И. И. Горпинченко, Л. И. Добровольская, З. Серебровская, Т. Серебровская // Сексология и андрология. — Киев: 1998. — С. 145.
17. Карпенко, Н. О. Ліпопероксидація, антиоксидантний захист та сперматогенез у щурів за довготривалого аліментарного надходження радіонуклідів у малих дозах // Н. О. Карпенко, Л. М. Овсіннікова, С. М. Альохіна // Довкілля та здоров'я. — 2009. — № 2. — С. 13–18.

НЕГОРМОНАЛЬНЕ ЛІКУВАННЯ ПАТОСПЕРМІЙ. КАТІАЗІН

Гладкова А. І., Сидорова І. В., Яременко Ф. Г., Золотухіна В. Н.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків

На експериментальних моделях патоспермій різного генезу досліджено біологічну активність нової оригінальної сполуки катіазину, похідного дикарбонових кислот. Показано, що під впливом катіазину відбувається поліпшення показників спермограми у щурів з порушеннями сперматогенезу різної природи (індукованими запаленням небактеріального походження, стресуванням, естрогенізацією або опроміненням). Отримані результати свідчать про ефективність та перспективність катіазину як потенційного лікарського засобу для лікування чоловічої неплідності.

К л ю ч о в і с л о в а : сперматогенез, моделювання патоспермій, корекція патоспермій, катіазин.

НЕГОРМОНАЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПАТОСПЕРМИЙ. КАТИАЗИН

Гладкова А. И., Сидорова И. В., Яременко Ф. Г., Золотухина В. Н.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков

На экспериментальных моделях патоспермий различного генеза изучена биологическая активность нового оригинального соединения катиазина, производного дикарбоновых кислот. Показано, что под влиянием катиазина происходит улучшение показателей спермограммы у крыс с нарушениями сперматогенеза различной природы (индуцированными воспалением небактериального происхождения, стрессированием, эстрогенизацией либо радиационным поражением). Полученные результаты свидетельствуют об эффективности и перспективности катиазина в качестве потенциального лекарственного препарата для лечения мужского бесплодия.

К л ю ч е в ы е с л о в а : сперматогенез, модели патоспермий, коррекция патоспермии, катиазин.

NON-HORMONAL TREATMENT OF PATHOSPERMIA. KATIAZIN

A. I. Gladkova, I. V. Sydorova, F. G. Yaremenko, V. N. Zolotukhina

SI «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv

In experimental models of various origins pathospermia studied the biological activity of a new original compound katiazin — derived dicarboxylic acids. It shown that under the influence of katiazin is improving semen in rats with spermatogenesis destructions (induced by non-bacterial inflammation, stress, estrogenization or irradiation). The results show the effectiveness and promise of katiazin as a potential drug for the treatment of male infertility.

K e y w o r d s: spermatogenesis, models of pathospermia, correction of pathospermia, katiazin.