

Влияние потенциального лекарственного средства фобуфол на сперматогенез у крыс

Р.Е.Мурадян, Ф.Г.Арсенян, Т.А.Агаронян, Э.А.Маркарян, Б.Т.Гарибджанян

Институт тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна НАН РА

375014, Ереван, пр. Азатуян, 26

Ключевые слова: фобуфол, предклиническая безвредность, сперматогенез, семенники

Фобуфол (ФБ) является оригинальным бивалентным адrenoблокатором, действующим на β_1 -адренорецепторы сердца и постсинаптические α_1 -адренорецепторы сосудов. Подобное сочетание свойств позволяет предложить ФБ в качестве потенциального антигипертензивного, антиаритмического и антиангинального средства. В эксперименте ФБ по действию на β -адренорецепторы превосходит пропранолол по активности и продолжительности, а по влиянию на α_1 - и β_1 -адренорецепторы – препарат лабеталол. ФБ синтезирован и изучен в лаборатории сердечно-сосудистых препаратов ИТОХа НАН РА, запатентован в РФ и в настоящее время находится на стадии предклинических исследований [3].

Для внедрения в медицинскую практику испытания безвредности потенциального препарата, наряду с общими токсикологическими исследованиями, включает также изучение его воздействия на репродуктивную функцию организма.

Целью настоящей работы явилось изучение характера и степени морфофункциональных изменений репродуктивных органов у крыс при воздействии различных доз препарата ФБ.

Материал и методы

Исследования осуществлены согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [1,2 4–7]. Опыты проведены на 56 половозрелых крысах-самцах (исходная масса 180–240 г) линии Wistar, разводки питомника ИТОХа НАН РА. Крысы были разделены на четыре группы (по 14 самцов в каждой). Животные содержались в обычных лабораторных условиях, на смешанной диете.

ФБ вводили животным перорально (с помощью желудочного зонда), ежедневно, один раз в день, в дозах 50, 150 и 250 мг/кг, что соответствует терапевтической, максимально переносимой и средней между

ними дозам. Продолжительность введения составляла 7 недель, учитывая длительность сперматогенеза у крыс (46–48 дней) и время, необходимое для прохождения сперматозоидов через придаток семенника. Контрольные животные получали растворитель (0,9% раствор хлорида натрия) в объеме 1 мл на крысу.

На 49-е сутки эксперимента животные были умерщвлены методом передозировки эфирного наркоза и подвергнуты макро- и микроскопическому исследованию. Определены относительные массы семенников, эпидидимисов, семенных пузырей и предстательной железы. Семенники были фиксированы в жидкости Буэна по традиционной схеме и залиты в парафин. Срезы толщиной 5–7 мк были окрашены гематоксилин-эозином.

Оценка функционального состояния сперматозоидов проводилась в суспензии, полученной из хвостовой части эпидидимиса. Определялась насыщенность, характер подвижности, относительное количество нормальных и патологических форм, число живых и мертвых сперматозоидов с использованием общепринятых методов [1, 2, 4].

Для исследования генеративной активности на гистологических препаратах семенников подсчитывались 100 строго поперечных срезов извитых семенных канальцев (ИСК), отмечая среди них число ИСК, содержащих четыре стадии развития половых клеток (сперматогонии, сперматоциты 1-го и 2-го порядка, сперматиды и сперматозоиды). Из 100 подсчитанных ИСК отмечали число канальцев со слушающимися в их просвет половыми клетками и канальцев, не содержащих половые клетки (запустевших). Определялось также среднее число нормальных сперматогоний (типы А и В), поддерживающих клеток (клетки Сертоли); относительное количество интерстициальных эндокриноцитов (клетки Лейдига). Определялись индексы сперматогенеза и эндокринной активности [6]. Статистическая обработка результатов проведена методом Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что введение ФБ крысам в вышеуказанных дозах не сопровождается гибелью животных и видимыми токсическими явлениями. На 7-е и 14-е сутки эксперимента у крыс, получавших высокие дозы ве-

щества (250 мг/кг), наблюдалось некоторое снижение массы тела по сравнению с исходными данными. В течение последующих дней регистрировалось постепенное нарастание массы крыс, к концу опыта приближаясь к контрольным значениям. У остальных подопытных животных значения массы тела в течение всего эксперимента, мало отличались от показателей контроля (табл. 1).

Таблица 1

Изменение массы тела крыс после перорального введения фобуфола

Доза, мг/кг	Средняя масса, г				
	1-й день	7-й день	14-й день	28-й день	49-й день
I гр. 250	210,85±15,71	204,22±19,32	207,18±17,26	211,42±20,24	223,57±22,35
II гр. 150	212,35±14,70	219,90±17,72	222,65±17,91	231,27±18,34	240,19±14,52
III гр. 50	191,55±14,57	197,83±18,62	205,70±23,70	213,25±19,12	224,81±25,42
IV гр. Контроль	195,40±13,53	213,90±17,37	221,56±16,63	229,57±19,21	239,73±18,21

Макроскопические исследования подопытных животных не выявили изменений по сравнению с контролем. При вскрытии органы грудной и брюшной полостей были обычной топографии, без видимых изменений. Не отмечалось спаянности, резкого увеличения или уменьшения органов. Не регистрировались

очаги кровоизлияния и отека головного мозга. При макрометрии половых органов не выявлены отличия в абсолютной и относительной массе семенников с их придатками, семенных пузырей и предстательных желез подопытных крыс по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2

Масса половых органов крыс после 48-дневного перорального введения фобуфола

Доза, мг/кг	Средняя масса, г			
	семенники	эпидидимис	предстательная железа	семенной пузырь
I гр. 250	2,60±0,43	0,14±0,03	0,45±0,06	1,02±0,11
II гр. 150	2,59±0,40	0,14±0,03	0,46±0,07	1,01±0,10
III гр. 50	2,51±0,16	0,13±0,03	0,46±0,06	0,98±0,09
IV гр. Контроль	2,54±0,12	0,14±0,02	0,46±0,06	1,01±0,06

Изучение морфофункционального состояния эпидидимальных сперматозоидов показало, что насыщенность сперматозоидов в суспензии во всех подопыт-

ных группах характеризовалась как густая или средняя, не отличаясь от контроля. Аспермия или олигоспермия вовсе не отмечались. Превалярующая форма

подвижности сперматозоидов в подопытных группах, аналогично контролю, оказалась прямолинейно-поступательной (70–75%), в меньшей степени – колебательной и манежной (9–11%). Количество неподвижных форм сперматозоидов во всех подопытных группах варьировало от 16 до 19%, не отличаясь от контрольного показателя – 18%. Процент патологических форм сперматозоидов у подопытных животных (18,8; 17,7 и 19,3 % соответственно в I, II и III группах) не отличался от контроля (19,8%), и этот показатель находился в пределах нормы для крыс данной линии. Среди патологических форм сперматозоидов, независимо от групп, отмечены в основном искривленные оси хвоста и неправильный изгиб бича. В редких случаях наблюдалось отклонение головки сперматозоидов от оси хвоста. Выявлены также единичные случаи деформации или изолирования головки сперматозоидов.

Микроскопические исследования семенников под-

опытных и контрольных животных не выявили отека межтубулярной ткани, разрушения межканальцевых перегородок, отслоения базальной мембраны, перемещения половых клеток в просвет канальца и гибели половых клеток. Морфологическая оценка семенников не обнаружила существенных различий между вычисленными параметрами подопытных и контрольных групп (табл. 3). Так, индекс сперматогенеза в трех подопытных группах составил соответственно 3,72; 3,70 и 3,69, в контроле – 3,68. Число нормальных сперматогоний в подопытных группах составляет соответственно 40,8; 38,6 и 36,8, в синхронном контроле – 38,2. Количество ИСК со слущенными сперматогенными клетками в просвете и ИСК с запустеванием в подопытных группах также было близко к контрольным показателям, что указывает на отсутствие активного слущивания гамет в просвет ИСК под действием ФБ (табл. 3).

Таблица 3

Сперматогенез у крыс под воздействием фобуфола (n=14)

Показатель		Доза, мг/кг			
		I гр. 250	II гр. 150	III гр. 50	IV гр. контроль
Число ИСК, содержащих половые клетки на разных этапах развития, %	IV	71.5±4.8	69.7±4.6	69.5±12.2	68.2±12.3
	III	28.5±4.9	30.3±4.3	30.5±12.2	31.8±11.4
	II	0	0	0	0
	I	0	0	0	0
Индекс сперматогенеза, %		3.72±0.04	3.70±0.06	3.69±0.12	3.68±0.09
Число ИСК со слущиванием половых клеток в просвете, %		2.41±0.4	2.38±0.3	2.31±0.4	2.40±0.4
Число ИСК с запустеванием, %		0	0	1.0±0.5	1.1±0.4
Среднее число	сперматогоний	40.8±1.7	38.6±2.3	36.8±1.5	38.2±1.4
	клеток Сертоли	11.2±0.9	10.5±0.8	11.4±0.8	10.7±0.7
	клеток Лейдига	5.7±0.2	5.2±0.3	5.1±0.5	5.3±0.4
Индекс эндокринной активности		0.51	0.49	0.45	0.49

Примечание. Сперматогенез изучен в обоих семенниках каждой крысы, однако ввиду отсутствия разницы по всем критериям между левой и правой гонадой, в таблице представлены усредненные данные

Эндокринную активность семенников определяли соотношением клеток Лейдига и Сертоли. Количество поддерживающих клеток в поперечном срезе канальца семенника является постоянной величиной, и данный показатель применяется как эталон сравнения при количественном исследовании соотношения различных типов зародышевых клеток. Для определения морфометрических критериев, характеризующих

функциональную активность интерстициальных эндокриноцитов, проводится прямой подсчет их количества в 20 случайных полях зрения. При наличии участков скопления клеток Лейдига учитывается среднее число скоплений на каналец. Согласно полученным данным, среднее количество клеток Лейдига и Сертоли, а также вычисленный на их основе индекс эндокринной активности семенников в подопытных и кон-

трольных группах имели одинаковое значение, что указывает на отсутствие влияния ФБ на ранние стадии сперматогенеза у крыс (табл. 3).

Таким образом, при 7-недельном пероральном введении крысам различных доз (50, 150 и 250 мг/кг) потенциального лекарственного препарата ФБ показа-

тели общего развития, а также функциональные и морфологические критерии состояния гонад остаются в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об отсутствии его влияния на сперматогенез животных и указывает на возможность безопасного применения ФБ в этом аспекте.

Поступила 18.08.04

Պոտենցիալ դեղամիջոց ֆոբուֆոլի ազդեցությունը ամենսխնային սպերմատոգենեզի վրա

Ռ.Ե.Մուրադյան, Ֆ.Ն.Արսենյան, Տ.Ա.Ահարոնյան, Է.Ա.Մարգարյան, Բ.Տ.Դարիբջանյան

Անվտանգության հետազոտությունների մախակի ինհիկական փուլում ամենսխնային մոտ ուսումնասիրվել են սպերմատոգենեզի բնույթը և մորֆոֆունկցիոնալ փոփոխությունները պոտենցիալ դեղամիջոց ֆոբուֆոլի տարբեր դեղաչափերի ազդեցության դեպքում: Պարզվել են, որ երկարատև (7 շաբաթ) ներքին օգտագործման պայմաններում կենդանիների ընհանուր

զարգացման ցուցանիշները, ինչպես նաև գոնադների ֆունկցիոնալ ու մորֆոլոգիական չափանիշները պահպանվում են ֆիզիոլոգիական նորմայի սահմաններում, ինչը վկայում է սպերմատոգենեզի վրա ֆոբուֆոլի ազդեցության գերժ լինելու ու նրա հետագա անվտանգ օգտագործման հնարավորության մասին:

Influence of potential medical preparation fobufol on the spermatogenesis at rats

R.E.Muradyan, F.H.Arsenyan, T.H.Aharonyan, E.A.Markaryan, B.T.Garibdjanyan

At the stage of preclinical investigation of the safety characteristics, the degree of morphofunctional changes of spermatogenesis at rats under the influence of various dozes of a potential medical preparation fobufol have been investigated. It has been established that at its 7-

week oral administration the parameters of common development, the functional and morphological criteria of gonads remain within the limits of the physiological norm, testifying to the absence of fobufol influence on spermatogenesis of animals and safety of its application.

Литература

1. Луцкий Л.Д., Николаев А.А. Морфологическое исследование эякулята. Метод. пособие. Астрахань, 1999.
2. Мамина В.Л., Семенов Д.И. Цитология, 1976, 7, с. 913.
3. Маргарян Э.А., Вартанян С.А., Авакян О.М., Норавян О.С., Асатрян Л.З. Фобуфол – антигипертензивное средство. Патент РФ, N173134 (1993).
4. Николаев А.А., Луцкий Д.Л. Биологическое и биохимическое исследование эякулята. Метод. пособие. Астрахань, 1999.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000.
6. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1983, 3, с. 66.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline "Toxicity to Male Fertility. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products". 1995.