

Рекомендована д.м.н., професором С.М.Дрогвоз

УДК 636.082.454.5:547.495.9: 638.135.547.56:616.69-008.6

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНДРОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ КАПСУЛ «АПІНІН»

К.П.Ромась, О.І.Тихонов, Є.О.Ковальова, В.П.Черненко

Національний фармацевтичний університет

З метою встановлення ефективності капсул «Апінін» андрогенної дії були проведені доклінічні дослідження препарату на тлі експериментального серотонінового ураження сім'яників щурів. У результаті проведення експерименту спостерігали значне покращення стану сперматогенезу та позитивний вплив на показники функціонального стану сперматозоїдів. Отримані результати досліджень підтверджують виразність андрогенної дії та безпечність препарату «Апінін».

Згідно зі статистикою в Україні з сексуальними та андрологічними проблемами до спеціалістів звертаються щороку близько 50-60 тис. чоловіків. Статеві розлади на теперішній час дуже розповсюджені та зустрічаються у кожного четвертого чоловіка, безпліддя – у 15-20% осіб, тому ці порушення є серйозною проблемою сучасності. Якщо врахувати запальні захворювання статевих органів, травми, вікові зміни, то актуальність створення нових препаратів, що покращують репродуктивну функцію чоловіків, не викликає сумнівів [1]. Чоловіче безпліддя секреторної етіології є неоднорідною поліетіологічною групою захворювань, об'єднаних недостатнім синтезом білка. Відомим фактом є позитивний вплив незамінної амінокислоти L-аргініну при використанні у чоловіків з різними видами безпліддя. Аргінін бере участь у сперматогенезі та приводить до підвищення концентрації сперматозоїдів та їх рухливості [10, 11, 12, 14]. Фенольний гідрофобний препарат прополісу (ФГПП) містить понад 50% фенольних сполук, за рахунок чого проявляє широкий спектр фармакологічної дії та, насамперед, має протекторні властивості [13, 15].

Поєднання аргініну, що є фізіологічним компонентом організму, у тому числі й сперматозоїдів, та природного компоненту ФГПП є основою унікального нового препарату для лікування статевої дисфункції.

Метою дослідження було вивчення фармакологічної дії та гострої токсичності нового комплексного препарату на основі аргініну та ФГПП – капсул «Апінін».

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження фармакологічної дії проведені згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких викори-

стовують для експериментальних та наукових цілей» на 28 білих безпородних щурах-самцях з масою тіла 250-300 г. Щури були вирощені у віварії ЦНДЛ і перед початком експерименту проходили акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань протягом 7-ми днів. Тварин утримували при кімнатній температурі $20 \pm 2^\circ\text{C}$, природному світловому режимі з вільним доступом до води та їжі [3]. Виведення тварин з експерименту здійснювали під легким інгаляційним наркозом шляхом декапітації.

Об'єктом дослідження був новий препарат – капсули «Апінін», який містить на 1 капсулу (0,400 г) наступні діючі речовини: аргінін – 0,316 г, ФГПП – 0,050 г та допоміжні речовини: аеросил – 0,002 г, кальцій стеариновокислий – 0,004 г, магнію карбонат основний легкий – 0,008 г, лактози моногідрат модифікований – 0,02 г. Технологія та склад капсул розроблені на кафедрі аптечної технології ліків ім. Д.П.Сала НФаУ [6].

При проведенні досліджень використовували препарат порівняння аналог за фармацевтичною дією таблетки «Спеман» виробництва фірми «Хімалая Драг Компані, Макалі, Бангалор», Індія серії E308072 (реєстрація №UA/2524/01/01).

Дизайн досліджень включав розподіл тварин на 4 групи по 7 тварин у кожній: 1 – інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, 2 – позитивний контроль (ПК) – неліковані тварини з відтвореною патологією, 3 – тварини, у яких на тлі патології застосовували «Апінін», 4 – тварини, у яких на тлі патології застосовували препарат порівняння «Спеман». Препарати вводили у лікувально-профілактичному режимі:

- капсули «Апінін» – у дозі 630 мг/кг (у перерахунку на аргінін 500 мг/кг, ФГПП – 80 мг/кг);
- таблетки «Спеман» вводили у дозі 90 мг/кг, яка визначена за допомогою коефіцієнта перерахунку доз за площею тіла з дози для людини [3].

Дослідні препарати вводили за допомогою металевого зонду внутрішньошлунково щоденно натще. Дозу препаратів розраховували на одиницю маси тіла тварин. Модель серотонінового ураження яєчок відтворювали підшкірним введенням розчину серотоніну гідрохлориду у дозі 10 мг/кг щоденно протягом 14 діб [2].

Після завершення досліду тварин знеживлювали шляхом декапітації під легким інгаляційним наркозом, визначали морфометричні показники – масу

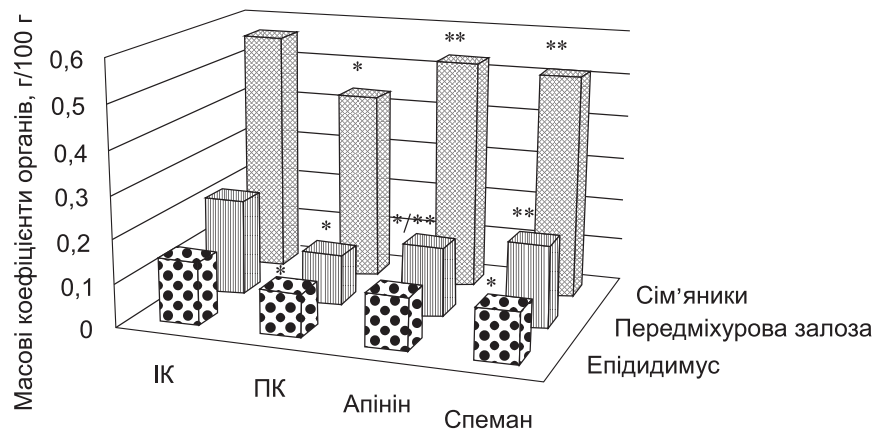


Рис. 1. Морфометричні показники статевих органів щурів, що отримували «Апінін» та «Спеман» на тлі серотонінової патології (відмінності статистично значущі ($p < 0,05$) щодо групи: * – інтактного контролю, ** – позитивного контролю).

сім'яників епідидимусів та передміхурової (ПЗ) з подальшим розрахунком масових коефіцієнтів (МК, г/100 г маси тіла тварини) за формулою:

$$MK = \frac{M_{\text{органу, г}}}{M_{\text{тварини, г}}} \times 100,$$

де: МК – масовий коефіцієнт; $M_{\text{органу}}$ – маса органа; $M_{\text{тварини}}$ – маса тварини.

Для дослідження функціонального стану сперматозоїдів використовували суспензію тканин хвостового придатка сім'яника у фізіологічному розчині. Показниками морфофункціонального стану сперматозоїдів служили: концентрація, відносна кількість нерухомих і патологічних форм сперматозоїдів, осмотична і кислотна резистентність.

Вивчали біохімічні показники у сироватці крові, а саме: лужну (ЛФ) та кислотну фосфатазу (КФ), каталазу, відновлений глутатіон, ТБК-активні речовини. За допомогою даних показників визначають фосфатазний індекс (ФІ) – відношення кислої фосфатази до лужної (КФ/ЛФ). Фосфатазний індекс є стабільною величиною та опосередковано характеризує ступінь андрогенної насиченості організму [3].

Необхідною умовою для проведення подальших випробувань є визначення токсикологічних характеристик досліджуваного препарату при однократному введенні дози та отримання інформації відносно його безпечності/небезпечності, що дозволяє виявити органи-мішені, встановити наявність видової та гендерної чутливості. Дослідження гострої токсичності капсул «Апінін» проводили у дозі 5000 мг/кг, що відповідає максимальній дозі V класу токсичності [4]. При цьому реєстрували вплив препарату на динаміку маси тіла та масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин, характеризуючи таким чином його токсичні властивості. У досліді використовували 24 білих безпородних щурів обох статей масою: самці 160-170 г, самці 150-160 г.

Отримані експериментальні дані статистично обробляли методами варіаційної статистики. Статистичні висновки при порівнянні рядів експериментальних даних отримували на основі дисперсійного аналізу для даних ANOVA та критерію Ньюмена-Кейлса на рівні значущості $p < 0,05$ за допомогою програми Sta-

tistica 6.0. Для даних, що не підлягають нормальному розподілу, використовували непараметричні методи: визначали медіану, верхній та нижній кватилі, оцінку статистичної значущості розбіжностей між вибірками проводили за допомогою непараметричних критеріїв (Крускала-Уолліса та Мана-Уїтні з поправкою Бонфероні) [5].

Результати та їх обговорення

Застосування серотоніну гідрохлориду підшкірно у дозі 10 мг/кг викликає вазоконстрикцію кровоносних судин яєчок та епідидимусів, тим самим тимчасово перешкоджає кровопостачанню у яєчках щурів [10, 11]. Антиандрогенна дія серотоніну також може бути пов'язана з тим, що він є одним з важливих нейромедіаторів, який чинить інгібуючий вплив на нейроендокринну регуляцію секреції гонадотропінів, таким чином здійснюючи пряме гальмування утворення тестостерону у клітинах тестикулярних тканин.

Відтворена патологія серотонінового пошкодження яєчок характеризувалась зниженням МК основних органів статеві системи (рис. 1). Статистично значуще знижувались МК сім'яників, епідидимусів та передміхурової залози відносно показників тварин ІК, що свідчить про значне пошкодження органів-мішеней для андрогенів та порушення їх функціонування. Існує функціональний взаємозв'язок між ПЗ та яєчками. При пошкодженні яєчок різко знижується функція ПЗ, гальмуються всі біосинтетичні процеси, а сама залоза поступово зменшується за рахунок загибелі залозистого епітелію, що й спостерігали за умов відтвореної патології.

Застосування капсул «Апінін» і таблеток «Спеман» у лікувально-профілактичному режимі на тлі серотонінового пошкодження яєчок супроводжувалось нормалізацією МК сім'яників та ПЗ до рівня ІК та тенденцією до збільшення ($p = 0,073$) МК епідидимусів, що спостерігали при застосуванні обох препаратів, але статистично значущі відмінності відносно ІК спостерігали тільки у групі препарату порівняння ($p = 0,0111$).

Патологічний стан характеризувався порушенням секреторної функції у тварин групи ПК (рис. 2 та табл. 1). Статистично значуще ($p = 0,0010$) зміню-

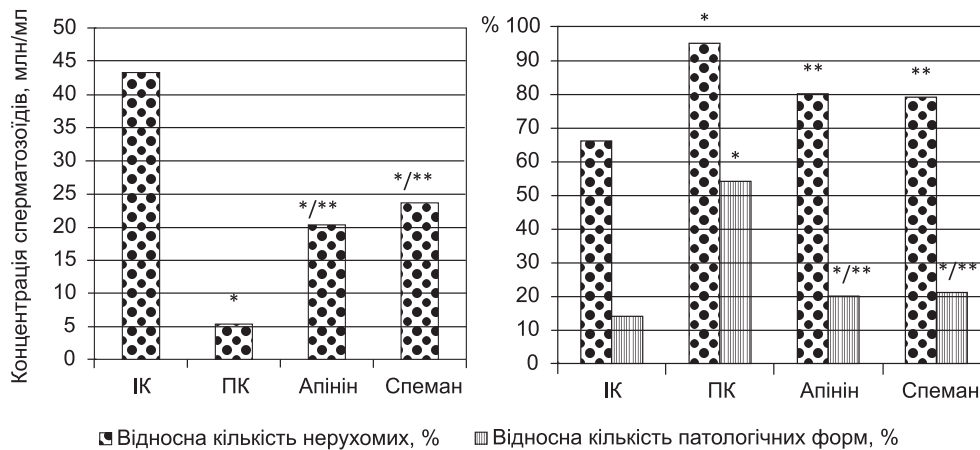


Рис. 2. Показники функціонального стану сперматозоїдів щурів, що отримували «Апінін» і «Спеман» на тлі серотонінової патології (відмінності статистично значущі ($p < 0,05$) щодо групи: * – інтактного контролю, ** – позитивного контролю).

вались усі показники функціонального стану сперматозоїдів у групі ПК порівняно з групою ІК. Концентрація сперматозоїдів зменшувалась у 8 разів, відносна кількість нерухомих форм сперматозоїдів зростала на 30%, відносна кількість патологічних форм збільшувалась майже у 4 рази, час рухливості знижувався у 2,7 рази, також значуще погіршувалась кислотна та осмотична резистентність. Значне погіршення функціонального стану сперматозоїдів свідчить про тяжкість перебігу патологічного процесу, найбільш виразними показниками якого були олігоспермія та критичне зниження рухливості сперматозоїдів, у деяких тварин спостерігали аспермію.

Застосування препаратів «Апінін» і «Спеман» покращувало загальний функціональний стан сперматозоїдів порівняно з ПК ($p = 0,0015$). Концентрація сперматозоїдів збільшувалась у 4 рази порівняно з ПК, хоча була у 2 рази меншою відносно ІК та мала статистично значущі відмінності. Статистично значуще відносно групи ПК знижувалась відносна кількість патологічних форм та нерухомих сперматозоїдів. Нормалізувався час тривалості руху та кислотна резистентність сперматозоїдів майже до рівня інтактного контролю в обох групах, тварини яких отримували лікування. Застосування капсул «Апінін» і таблеток «Спеман» сприяло статистично значущому підвищенню осмотичної резистентності відносно групи ПК (рис. 2 і табл. 1).

Отже, всі показники дослідних груп, які характеризують функціональний стан сперматозоїдів, ста-

тистично значуще відрізняються від групи позитивного контролю, що свідчить про ефективність застосування досліджуваних препаратів на тлі даної патології. Але швидкий розвиток та виразність патології не дозволяють у такий короткий час нормалізувати порушення функціонування статевих залоз до рівня інтактних тварин. Серед наведених показників майже повністю нормалізувались: тривалість руху сперматозоїдів і кислотна резистентність, інші показники статистично значуще відрізнялись від групи ІК. Це пов'язано з тим, що ураження, викликане серотоніном, охоплює одночасно усі стадії сперматогенезу, а це тривалий процес (у щурів – 48 діб), тому до повного одужання необхідно продовження терапії.

З метою оцінки загального впливу на організм щурів вивчали біохімічні показники сироватки крові (табл. 2). Виразність відтвореної патології підтверджує статистично значуще у групі ПК відносно групи ІК збільшення рівня лужної фосфатази, що свідчить про наявність та виразність запального процесу ($p = 0,0001$), зменшення рівня кислої фосфатази ($p = 0,014$), що характеризує погіршення функціонального стану передміхурової залози. Підвищення інтенсивності процесів ПОЛ підтверджувало збільшення рівня ТБК-активних продуктів ($p = 0,024$), каталази ($p = 0,012$) та церулоплазмину ($p = 0,0002$) у сироватці крові щурів групи ПК у порівнянні з групою ІК. Значуще зниження ВГ ($p = 0,0003$) у групі ПК свідчить про зниження антиоксидантного захисту

Таблиця 1

Показники функціонального стану сперматозоїдів у щурів при застосуванні капсул «Апінін» і таблеток «Спеман», $M \pm m$, ($n = 7$)

Показники	Експериментальні групи			
	інтактний контроль	позитивний контроль	капсули «Апінін»	капсули «Спеман»
Тривалість руху, хв	411±9	154±32*	388±10**	369±17**
Осмотична резистентність, %	3,2±0,2	2,3±0,04*	2,7±0,1*/**	2,5±0,1*/**
Кислотна резистентність (pH), %	4,5±0,4	7,1±0,2*	4,5±0,4**	4,6±0,5**

Примітки: відмінності статистично значущі ($p < 0,05$) щодо групи: * – інтактного контролю, ** – позитивного контролю, n – кількість тварин у групі.

Таблиця 2

Біохімічні показники сироватки крові щурів при застосуванні капсул «Апінін» і таблеток «Спеман», $M \pm m$, (n=7)

Показники	Експериментальні групи			
	інтактний контроль	позитивний контроль	капсули «Апінін»	капсули «Спеман»
Лужна фосфатаза, ммоль/год-л	3,49±0,41	9,56±0,42*	6,72±0,45*/**	6,10±0,31*/**
Кисла фосфатаза, ммоль/год-л	0,76±0,02	0,53±0,07*	0,72±0,04**	0,68±0,04**
Церулоплазмін, г/л	0,29±0,01	0,54±0,02*	0,44±0,03*/**	0,47±0,04*
ТБК-активні продукти, ммоль/л	0,64±0,09	0,90±0,10*	0,59±0,06**	0,64±0,04**
Відновлений глутатіон, ммоль/л	6,04±0,30	4,69±0,17*	6,18±0,12**	6,75±0,21**
Каталаза, мкат/л	2,32±0,86	4,80±0,45*	2,55±0,15**	3,08±0,28**
Фосфатазний індекс (КФ/ЛФ)	0,238±0,031	0,057±0,008*	0,108±0,006*/**	0,115±0,012*/**

Примітки: * – відмінності статистично значущі щодо групи інтактного контролю, $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмана-Кейлса), ** – відмінності статистично значущі щодо групи позитивного контролю, $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмана-Кейлса), n – кількість тварин у групі.

організму та неспроможність відновлювати баланс системи ПОЛ/АОЗ.

З ензимологічних показників у дослідних групах, тварини яких отримували препарати «Апінін» і «Спеман», нормалізувалась до рівня інтактного контролю активність КФ ($p=0,03$), що характеризує покращення функціонального стану передміхурової залози. Рівень активності ЛФ дещо знижувався, але встановлено статистично значущі відмінності ($p=0,03$) у дослідних груп відносно як групи ІК, так і групи ПК.

Нормалізацію функціонування системи антиоксидантного захисту спостерігали у тих групах, тварини яких отримували лікування препаратами «Апінін» і «Спеман» порівняно з групою ПК. На тлі підвищення антиоксидантного захисту у дослідних тварин, які отримували лікування, зменшується інтенсивність процесів ПОЛ на відміну від групи ПК. Рівень ТБК-активних продуктів відносно групи ПК знижується статистично значуще у групі, тварини якої отримували капсули «Апінін» ($p=0,033$), а у групі тварин, які отримували таблетки «Спеман», спостерігали тенденцію до зниження ($p=0,056$).

Фосфатазний індекс (ФІ) є стабільною величиною (норма 0,1-0,3 для людини) та опосередковано характеризує ступінь андрогенної насиченості організму. При запальних процесах у передміхуровій залозі ФІ може знижуватися ($\text{ФІ} < 0,1$). При модельній патології яєчок у групі ПК знижувався МК ПЗ, що свідчить про взаємопов'язане пошкодження обох органів. Спостерігали зменшення ФІ у групі ПК у 4 рази порівняно з групою ІК. Застосування препаратів призводило до підвищення ФІ ($p < 0,004$) у порівнянні з групою ПК, але досліджувані препарати не нормалізували ФІ до рівня ІК, статистично значуща відмінність відносно ІК залишилась ($p < 0,004$).

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про позитивний вплив дослідного препарату – капсул «Апінін» на перебіг експериментальної патології пошкодження яєчок підшкірним введенням серотоніну гідрохлориду на рівні препарату порівняння – таблетками «Спеман». Препарати

покращували секреторну функцію сім'яників, показники сперматогенезу, нормалізували МК статевих органів, виявляли андрогену дію.

Механізм дії комплексного препарату «Апінін» реалізується за рахунок складу: аргінін сприяє припливу крові до органів малого тазу та покращує функціональний стан статевих органів, бере участь у процесі сперматогенезу, ФГПП проявляє виражені протизапальні, простатопротекторні та антиоксидантні властивості.

За результатами дослідження гострої токсичності капсул «Апінін» при одноразовому застосуванні максимальної дози четвертого класу токсичності (5000 мг/кг) з урахуванням шляху введення щурам обох статей встановлено відсутність загибелі тварин. Спостереження за динамікою маси тіла тварин протягом 14 діб показують відсутність стійкого впливу препарату на даний показник. Шляхом розрахунку масових коефіцієнтів внутрішніх органів встановлено, що у тварин, які отримували капсули «Апінін», цей показник не відрізняється від інтактного контролю як у самців, так і у самиць.

Таким чином, зважаючи на те, що LD_{50} капсул «Апінін» лежить за межами 5000 мг/кг, динаміка маси тварин відповідає фізіологічній нормі, а порівняння масових коефіцієнтів не показало статистично значущих відхилень, видова та гендерна чутливість відсутні, отримані дані дозволяють класифікувати досліджуваний препарат – капсули «Апінін» як «практично нетоксичний» відповідно до загальноприйнятої класифікації.

ВИСНОВКИ

1. Капсули «Апінін» позитивно впливали на показники функціонального стану сперматозоїдів, такі як: концентрація сперматозоїдів, тривалість їх рухливості, кислотна та осмотична резистентність, знижували відносну кількість патологічних форм та нерухомих сперматозоїдів.

2. Досліджуваний препарат «Апінін» чинить андрогенну дію, тому на тлі антиандрогенного впливу серотоніну покращує загальний стан статевої системи, а також підвищує фосфатазний індекс, який опосе-

редковано характеризує ступінь андрогенної насиченості організму.

3. Застосування капсул «Апінін» і таблеток «Спеман» привело до нормалізації балансу системи ПОЛ/АОС.

4. Визначені показники гострої токсичності капсул «Апінін» дозволяють віднести досліджуваний

об'єкт до V класу токсичності – практично нетоксичних речовин ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

5. Отримані результати доклінічних досліджень підтверджують виразність фармакологічної дії, ефективність та безпечність препарату «Апінін», що дозволяє рекомендувати його для подальших досліджень з перспективою впровадження в медичну практику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зайченко А.В., Андриянников А.В., Ярошенко И.В. // *Провизор*. – 2009. – №11-12. – С. 16-21.
2. Зайченко Г.В., Бречка Н.М., Коренева Є.М. // *Проблеми ендокринної патол.* – 2009. – №1. – С. 65-71.
3. Западнюк М.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. *Лабораторные животные. Использование в эксперименте.* – К.: Высш. шк., 1983. – 382 с.
4. Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. *Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. За ред. О.В.Стефанова.* – К.: Авіценна, 2001. – С. 84-90.
5. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel.* – 2001. – 320 с.
6. Пат. на корисну модель 54662 Україна МПК (2009) А 61 К 35/64, А 61 К 9/48, А 61 Р 13/08. Заявл.: 27.03.2006. Опубл.: 25.06.2008. – Бюл. №12.
7. Korman M. // *Angiol.* – 1970. – №7. – P. 291-295.
8. Lauer T., Kleinbongard P., Rath J. // *J. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 264, №3. – P. 237-244.
9. Lubos E., Monti L., Setola E. // *Metabolism.* – 2009. – Vol. 58, №9. – P. 1270-1276.
10. Simone-Finstrom M., Spivak M. // *Apidol.* – 2010. – Vol. 41, №5. – P. 295-311.
11. Tapiero H., Mathe G., Couvreur P. // *Biomed. Pharmacother.* – 2002. – Vol. 9, №56. – P. 439-445.
12. Vinograd N., Vinograd I., Sosnowski Z. // *Phytomedicine.* – 2003. – Vol. 7, №1. – P. 1-6.

УДК 636.082.454.5:547.495.9: 638.135.547.56:616.69-008.6
 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНДРОГЕННОЙ
 АКТИВНОСТИ КАПСУЛ «АПИНИН»

Е.П.Ромась, А.И.Тихонов, Е.А.Ковальова, В.П.Черненко
 С целью определения эффективности капсул «Апинин» андрогенного действия были проведены доклинические исследования препарата на модели серотонинового поражения семянников крыс. В результате проведения эксперимента наблюдали значительное улучшение состояния сперматогенеза и положительное влияние на показатели функционального состояния сперматозоидов. Полученные результаты исследований подтверждают выраженность андрогенного действия и безопасность препарата «Апинин».

UDC 636.082.454.5:547.495.9: 638.135.547.56:616.69-008.6
 THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANDROGENIC ACTIVITY OF «APININ» CAPSULES

K.P.Romas, O.I.Tikhonov, Ye.O.Kovalyova, V.P.Chernenko
 With the purpose of determination of efficiency of «Apinin» capsules with the androgenic action the pre-clinical studies of the medicine on the model of serotonin damage of the rats' testicles have been carried out. As a result of the experiment a significant improvement in spermatogenesis and a positive impact on the performance of the functional state of spermatozoa have been observed. These results confirm the studies of the expression of the androgenic action and safety of «Apinin» medicine.