

# 1. ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МУЖСКУЮ ФЕРТИЛЬНОСТЬ

Руководство «Влияние лекарственных средств на мужскую фертильность» описывает методику изучения на доклиническом этапе повреждающего действия фармакологических веществ на генеративную функцию.

Задача этого этапа исследований — выявление возможного отрицательного действия фармакологического вещества на стадии прогенеза (формирование мужских и женских гамет), нарушений полового поведения и транспорта продуктов зачатия.

Изучать необходимо все новые оригинальные фармакологические вещества. Исключение может быть сделано для веществ с противоопухолевой активностью, если их применение ограничено только онкологической практикой, и для веществ, рекомендуемых по жизненным показаниям.

Кроме того, исследуют вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственного средства, которые ранее не были разрешены для медицинского применения.

К моменту начала тестирования влияния лекарственного средства на стадии прогенеза необходимо располагать сведениями о физико-химических свойствах вещества; дозах (летальной, эффективной, рекомендуемой для клинических испытаний); признаках интоксикации, специфических для данного вещества; рекомендуемых способах введения; профиле фармакологической активности; планируемых показаниях к медицинскому применению и схемах назначения препарата в клинической практике. Желательно также иметь данные по основным фармакокинетическим параметрам для изучаемого фармакологического вещества.

Изучение может быть проведено как с лекарственной формой, так и с активной субстанцией, из которой лекарственное средство произведено.

Когда использование субстанции не обеспечивает преимущества перед лекарственной формой в отношении возможности применения широкого диапазона доз и удобства введения препарата экспериментальным животным, целесообразно проводить изучение репродуктивной токсичности готовой лекарственной формы. При комбинации нескольких лекарственных веществ в одной лекарственной форме следует изучить комбинацию в целом только в том случае, если репродуктивная токсичность одного из компонентов не изучена.

При проведении исследования изучаемое вещество необходимо вводить тем способом, который предусмотрен в инструкции по медицинскому применению препарата. При пероральном способе применения вещество следует вводить зондом. Желательно предусмотреть дополнительную группу животных для выяснения обратимости эффекта в случае его обнаружения.

Исследование может быть проведено как на линейных, так и на нелинейных крысах. Вещество испытывают не менее чем в 2–3 дозах. Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела. В качестве высшей дозы используют максимальную, при которой не отмечено выраженного токсического действия на животных. Эту дозу определяют, учитывая токсикологическую характеристику вещества (летальная доза 50, кумулятивные свойства и др.). В большинстве случаев в качестве максимальной дозы можно использовать высшую дозу, принятую в опытах по изучению хронической токсичности. Исключение составляют вещества, изменяющие характер своего действия при беременности. Низшая доза близка к терапевтической, рекомендуемой для клинических испытаний. Эту дозу устанавливают путем пересчета дозы, применяемой в доклинических исследованиях, с животных на человека.

Самцам препарат вводят в течение 60 дней, самкам — 15 дней. Затем животных спаривают с интактными самками и самцами, формируя 3 группы, включая интактных животных.

Рекомендуют иметь в каждой группе к началу спаривания не менее 15–20 самцов и 20–30 самок, у которых перед началом опыта прове-

рен астральный цикл. Самок подсаживают к самцам в соотношении 2:1 сроком на 2 астральных цикла. Оплодотворение регистрируют с помощью вагинальных мазков. Половину ссаженных самок подвергают эвтаназии на IT — 21 день беременности, на вскрытии подсчитывают количество желтых тел в яичниках, мест имплантаций в матке и количество живых и погибших плодов. На основании этих данных определяют уровень пред- и постимплантационной смертности зародышей.

Другую половину самок оставляют до родов и наблюдают за физическим развитием потомства до окончания вскармливания (выживаемость, масса тела). Предимплантационную смертность определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке; постимплантационную смертность определяют по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. Для оценки способности к оплодотворению и зачатию вычисляют индекс, характеризующий отношение числа беременных животных к числу ссаженных в процентах.

Необходимо иметь в виду, что подавление репродуктивной функции при длительном введении некоторых фармакологических веществ может быть обусловлено не только нарушениями гаметогенеза, но и многими другими причинами (изменение эндокринной функции половых желез, гипофиза, надпочечников; поражение гипоталамуса, центров головного мозга и т.п.). Поэтому, если под влиянием тестируемого вещества возникают нарушения плодовитости животных, необходимо выяснить, зависит ли это от патологии спермато- или оогенеза либо от других причин, путем использования других существующих методов выявления повреждающего действия фармакологических веществ на спермато- и оогенез. Выбор конкретных методов исследования проводит экспериментатор. Ряд рекомендуемых методов приведен в приложении.

Для ряда препаратов достаточна оценка фертильности, проведенная на грызунах. Большая часть данных, на основании которых мы делаем выводы о влиянии лекарств на параметры спермы и репродуктивную функцию, получена на животных моделях, в ряде случаев результаты не могут быть экстраполированы на человека. Сперматогенез (СМ) — динамический процесс развития мужских

половых клеток, состоящий под строгим генетическим и гормональным контролем, подчиненный пространственно-временным закономерностям. Он включает в себя такие процессы-явления, как самообновление и коммитация сперматогониальных стволовых клеток, пролиферация и апоптоз, дифференцировка и мейоз, репарация и регенерация. Кульминация сперматогенного процесса — образование большого числа мобильных гамет, способных к автономному существованию и переносу отцовского генома в яйцеклетку. СМ возник в результате длительного эволюционного процесса и охватил практически весь мир эукариотических организмов (Захидов С.Т., 2010). Например, у грызунов количество продуцируемых сперматозоидов выше, а сперматогенный путь гораздо более эффективен (протекает с большей скоростью), чем у человека [1], что приводит к потенциально различной и (или) пониженной чувствительности к влиянию лекарственных препаратов. Следовательно, экстраполировать эффекты препарата, который был протестирован исключительно на этой видовой группе, на человека трудно. В рамках требований государственных систем регистрации лекарственных средств разных стран проведение токсикологических исследований по влиянию на репродуктивную функцию необходимо выполнять как минимум на двух видах животных [2].

При условии фармакологической уместности изучение репродуктивной токсичности может быть проведено на животных других групп, дизайн исследования может быть соответствующим образом скорректирован с учетом ряда обстоятельств, например, механизма фармакологического действия препарата и его потенциальной иммуногенности (см. Руководство ICH S5). Исследования на приматах проводят в том случае, если они — единственный подходящий биологический вид.

В отсутствие достаточной информации, полученной на этапе доклинического исследования, риск для пациентов определяют в рамках процедур ведения клинических исследований, при получении информированного согласия и при помощи соответствующей маркировки продукта<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> <http://labmgmu.ru/wiki-preclinic/ls-safety/specificheskie-vidy-toksichnosti/ocenka-bezopasnosti-ls/s6r1-doklinicheskaya-ocenka-bezopasnosti/>

Сбор спермы в исследованиях на животных — тоже сложная задача. Возможные решения варьируют от применения искусственной вагины для эякуляции спермы до прямой экстракции спермы из придатка яичка (эпидидимиса). Такие параметры спермы, как концентрация, моторика, морфология и объем эякулята, как правило, используют в качестве маркеров для определения эффекта лекарств на мужскую фертильность. При этом необходимо учитывать существование возможных исходных различий в параметрах спермы исследуемых особей. Кроме того, влияние препаратов на параметры спермы *in vivo* и *in vitro* различно. И наконец, возможно, что влияние лекарства на СМ может не коррелировать с каким-либо воздействием на плодовитость или тератогенез. Хотя плодовитость — значимый маркер неблагоприятного воздействия препарата на мужскую фертильность, при его оценке необходимо учитывать и роль женского фактора. Необходимо проведение испытания по спариванию особей, чтобы обнаружить влияние препаратов на плодовитость, однако они не входят в стандартную схему доклинического исследования препаратов [3].

## Литература

1. Самойлов Н.Н. Анатомия, физиология и патология репродуктивной системы : уч. пособие. Брянск: Изд-во Брянского государственного университета, 2008. 124 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М. : Медицина, 2005. 832 с.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П. Фисенко и др. М. : Ремедиум, 2000. 398 с.

## **2. ФИЗИОЛОГИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

### **ПУТЬ НЕЙРОРЕГУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА. ИНИЦИАЦИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

Инициацию СМ осуществляют посредством секреции гипоталамусом гонадотропин-релизинг гормона (ГнРГ), который в свою очередь при воздействии на переднюю долю гипофиза вызывает выброс в кровь лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. ЛГ способствует стероидогенезу через стимуляцию клеток Лейдига интерстиция, а ФСГ в свою очередь стимулирует клетки Сертоли, которые сопровождают стадии пролиферации и развития сперматозоидов. Помимо ФСГ и ЛГ, аденогипофиз также вырабатывает адренокортикотропный гормон, пролактин, гормон роста и тиреотропин, которые играют важную роль на протяжении всего СМ. ФСГ и ЛГ ответственны за инициацию СМ внутри яичек — центрального органа репродуктивной оси (гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось) (рис. 2.1; см. цв. вклейку) [1].

Разделяют суточный и сезонный ритмы секреции ГнРГ. Сезонность ритма обусловлена наибольшей продукцией ГнРГ весной. Суточный ритм характеризуется циркадностью (ежедневная секреция, преимущественно утром) и носит импульсный характер (повышение концентрации гормона в крови в среднем происходит каждые 90–120 мин).

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ГУМОРАЛЬНЫМ И НЕЙРОРЕГУЛЯТОРНЫМ ЗВЕНОМ**

Андрогены — неотъемлемая часть СМ. Дигидротестостерон образуется в результате метаболизма тестостерона ферментом 5- $\alpha$ -редуктазой. И тестостерон, и дигидротестостерон регулируют экс-

прессию различных генов. Эстрогены тоже важны для СМ [2]. Во время дифференциации клеток Сертоли уровень эстрогенов в крови снижен до минимума. Во время препубертатного периода эстрогены инактивируют продукцию андрогенов клетками Лейдига. Тиреотропин играет ключевую роль в процессе СМ, отвечая за пролиферацию и развитие клеток Сертоли. Все эти гормоны за счет перекрестного взаимодействия между собой, с интерстицием яичек и клетками Лейдига активируют СМ. В дополнение к гормонам клетки Сертоли секретируют факторы роста, которые тоже играют роль в СМ. Трансформирующийся ( $\alpha$  и  $\beta$ ), инсулиноподобный и  $\beta$ -фибробластный факторы роста способствуют миграции клеток герментативного эпителия во время эмбрионального развития, пролиферации, регуляции мейоза и дифференциации клеток.

## СТРОЕНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЯИЧКА

Яички имеют эллипсоидную форму: длина — 4,5–5,1 см [3], ширина — 2,5–4 см, объем — 15–25 мл [4]. Они окружены соединительнотканной капсулой (*tunica albuginea*). СМ происходит преимущественно при температуре, которая на 2–4 °С ниже, чем общая температура тела (температура ядра). По заднему краю яички сочленены с придатками яичек, в которых берет начало семенной канатик. Яички выполняют 2 основные функции: синтез и секрецию гормонов (в основном тестостерона) и продукцию мужских гамет (сперматозоидов) (рис. 2.2; см. цв. вклейку) [5].

### Клетки Лейдига

Клетки Лейдига занимают 5–12% объема яичек, постоянно, в зависимости от стадии СМ, меняют свою форму. Клетки Лейдига имеют зернистую цитоплазму, расположены по отдельности или объединены в группы посредством соединительной ткани. Клетки Лейдига — основной источник тестостерона. Воздействие ЛГ стимулирует клетки Лейдига к продукции и секреции тестостерона. Этот процесс по принципу отрицательной обратной связи подавляет или, наоборот, усиливает секрецию ЛГ аденогипофизом [6].

### Основные функции тестостерона

- Активация репродуктивной оси (гипофизарно-гонадная часть).
- Формирование полового поведения.
- Инициация и поддержка СМ.
- Дифференцировка мужских половых органов во время эмбрионального развития.
- Формирование вторичных половых признаков.

### Извитые семенные канальцы и клетки Сертоли

Стенки извитого семенного канальца (рис. 2.3; см. цв. вклейку) состоят из 3 слоев: 1) адвентиция — внешний слой представлен соединительной тканью; 2) средний слой — состоит из миоцитов; 3) перитубулярный слой — представлен собственной пластинкой, состоящей из коллагена. Изнутри извитые семенные канальцы покрыты клетками Сертоли, расположенными на базальной мембране и имеющими выросты цитоплазмы в просвет канальца. Около 40% объема яичка составляют клетки Сертоли, и примерно 40% из этой массы клеток Сертоли соединены контактами со сперматидами. Каждая клетка Сертоли образует контакты с 5 другими клетками Сертоли и контакты с 40–50 герментативными клетками на различных стадиях развития и дифференцировки.

Клетки Сертоли обеспечивают структурную, функциональную и метаболическую поддержку герментативным клеткам. Во время СМ сперматозоиды, находящиеся на более ранних стадиях развития, расположены ближе к базальной мембране и по мере созревания мигрируют в сторону просвета.

Клетки Сертоли работают как вспомогательные клетки для СМ: поставляют нутриенты для герментативных клеток во время их развития и участвуют в фагоцитозе герментативных клеток. Многочисленные контакты между клетками Сертоли и развивающимися герментативными клетками имеют большое значение для поддержки СМ при наличии соответствующей гормональной среды. ФСГ связывается с рецепторами на клетках Сертоли, результат этой стимуляции — секреция клетками Сертоли андроген-связывающего белка. Андроген — связывающий белок, при связи с тестостероном или дигидротестостероном повышает их активность, что способствует про-



никновению тестостерона в сперматиды, тем самым стимулируя СМ. Кроме того, клетки Сертоли секретируют ингибин, принимающий участие в регуляции секреции ФСГ аденогипофизом.

Сперматозоиды начинают вырабатываться во время пубертатного периода. Гистогематический барьер позволяет обеспечить микросреду для СМ в целях предотвращения иммунологической реакции в отношении семенников, так как сперматозоиды обладают антигенами, неизвестными для иммунной системы. Гистогематический барьер состоит из 2 отделов: базальный отдел, расположенный рядом с базальной мембраной извитых семенных канальцев, и адлюминальный отдел — ближе к просвету извитых семенных канальцев. Базальный отдел — место СМ для сперматогоний и сперматоцитов первого порядка, в то время как в адлюминальном отделе формируются сперматоциты второго порядка и сперматиды. Гистогематический барьер имеет 3 уровня: 1) контакты запирающего типа между клетками Сертоли, которые помогают отделить премеяотические сперматогонии от остальных герментативных клеток; 2) эндотелиальные клетки капилляров; 3) перитубулярные миоциты. Гистогематический барьер яичек позволяет предотвратить автоагрессию иммунной системы в отношении сперматозоидов, сперматид и сперматоцитов, так как на их поверхности во время пубертатного периода формируются специальные антигены, неизвестные иммунной системе в первый год жизни [8–10, 15].

## СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Процесс дифференцировки диплоидных сперматогоний в сперматиды называют СМ. Это сложный процесс, во время которого тотипотентные стволовые клетки посредством деления либо образуют новые стволовые тотипотентные клетки (клетка, способная дифференцироваться в любой тип клеток), либо преобразуются в сперматозоиды. Этот процесс включает в себя как митотическое, так и мейотическое деление, а также процессы ремоделирования. СМ можно разделить на 3 фазы: 1) пролиферация и дифференцировка сперматогоний; 2) мейоз и 3) спермиогенез — сложный процесс, во время которого круглые сперматиды преобразуются в сперматозоиды посредством

мейоза. Процесс СМ у мужчин дебютирует в пубертатном периоде и идет на протяжении всей жизни (рис. 2.4; см. цв. вклейку).

Гермативные клетки в извитых семенных канальцах расположены в высоко упорядоченной последовательности по направлению от базальной мембраны к просвету канальца. Сперматогонии лежат непосредственно на базальной мембране, по направлению к просвету, и по степени их созревания расположены сперматоциты первого и второго порядка. Барьер, сформированный за счет контактов запирающего типа клеток Сертоли, удерживает сперматогонии и ранние сперматоциты в базальном отделе, а все последующие клетки в адлюминальном отделе.

## **СПЕРМАЦИТОГЕНЕЗ**

Спермацитогенез состоит из мейотической фазы, во время которой в результате мейоза сперматоциты первого порядка становятся гаплоидными сперматидами. Данный процесс происходит в базальном отделе. Сперматоциты первого порядка после прохождения первого митотического деления образуют сперматоциты. Профаза первого митотического деления — наиболее продолжительная часть всего спермацитогенеза, соответственно, сперматоциты первого порядка имеют наибольшую продолжительность жизни. Сперматоциты второго порядка имеют короткую жизнь (1–2 дня) и, подвергнувшись второму митотическому делению, преобразуются в сперматиды [11].

## **СПЕРМИОГЕНЕЗ**

Спермиогенез — это процесс, во время которого сперматиды дифференцируются в сперматозоиды, содержащие хроматин. Спермиогенез имеет 6 стадий, во время которых происходит созревание сперматид. В начале развития в сперматиде образуются аппарат Гольджи и митохондрии, возникают акросомальный пузырек, проксимальная центриоль и аксиальный филамент, далее формируется акросома, средняя часть сперматозоида и начинает развиваться хвостик. В конце этапа спермиогенеза происходит окончательное формирование сперматозоида [11].