

Антиоксидантная терапия при сниженной фертильности у мужчин

В.В. Евдокимов, М.Н. Коршунов, Е.С. Коршунова, Д.Т. Айбятов, Э.З. Рабинович, В.П. Герасименя, С.В. Захаров
НИИ урологии Минздравсоцразвития, Москва

В нашей стране уровень рождаемости находится ниже пограничной линии, обозначающей простое воспроизводство. Усилия исследователей и клиницистов направлены на сохранение и поддержание репродуктивного здоровья мужчин и женщин. Известно, что в настоящее время доля мужского фактора в бесплодном браке составляет почти 50%. Многочисленные исследования показали, что последние десятилетия отмечены падением уровня мужской фертильности. Многофакторность данной проблемы стала очевидной. Рассматриваются, в первую очередь, внешние и внутренние факторы патологического воздействия. К внешним относят: электромагнитное излучение мобильных телефонов, компьютеров, действие рентгеновской аппаратуры, загрязнение воздуха, воды, почвы. Из внутренних факторов выделяют инфекционные заболевания репродуктивной системы, варикоцеле, травмы половых органов, профессиональные вредности и др. Тем не менее, в ряде случаев причины снижения фертильности остаются необъяснимыми (идиопатическая форма бесплодия) [1, 2, 3].

В последние два десятилетия появился ряд фундаментальных и прикладных работ по изучению регуляции функциональной активности мужской репродуктивной системы. Выработана парадигма многоуровневой системы репродукции, включающая иммунный, генетический, гормональный и другие компоненты. Именно многофакторность патогенеза мужской инфертильности обуславливает трудности диагностики и лечения мужского бесплодия. Выбор адекватной терапии напрямую зависит от точного понимания патологических механизмов нарушения сперматогенеза. Проводятся широкие исследования по коррекции различных видов патоспермии с использованием фармакологических препаратов. Показано, что снижение подвижности сперматозоидов обусловлено активацией процессов перекисного окисления липидов в клетках [4, 5, 6].

Целью работы явилось определение влияния препаратов с установленной антиоксидантной активностью на фертильные параметры эякулята человека при идиопатической форме мужского бесплодия.

Материалы и методы

В эксперименте использовали эякулят от 39 мужчин с идиопатической формой бесплодия. В наших исследованиях были использованы следующие антиоксиданты: Оводорин, Мексидол, Семакс. В серии опытов в образцы эякулята добавляли препараты в разной концентрации. Изменения подвижности сперматозоидов наблюдали через 1, 3 и 24 часа инкубации при комнатной

температуре. Целостность мембраны определялась по способности 1% водного раствора эозина проникать внутрь клетки и окрашивать ее в красный цвет.

Результаты и обсуждение

Мексидол относится к группе антиоксидантов, действующим веществом которых является этилметилгидроксипиридина сукцинат. К основным свойствам препарата относят ноотропное, антиоксидантное, мембраностабилизирующее, церебропротективное, анксиолитическое и адаптогенное действие. Мексидол на клеточном уровне тормозит перекисное окисление липидов, повышает активность антиоксидантной системы, активизирует энергосинтезирующие функции митохондрий, улучшает энергетический обмен в клетке, активизирует внутриклеточный синтез белка и нуклеиновых кислот, ферментативные процессы цикла Кребса, способствует утилизации глюкозы, синтезу и внутриклеточному накоплению АТФ, восстанавливает структуру и функции мембран. Все перечисленные свойства Мексидола позволяют улучшать метаболизм и реологические свойства крови, функционирование иммунной системы, подавлять агрегацию тромбоцитов [7, 8].

Химические и биологические характеристики Мексидола позволили нам рассчитывать на его благоприятное влияние на характеристики эякулята (таблица 1).

Таблица 1. Влияние Мексидола на общую подвижность сперматозоидов человека (%)

серии экспериментов	Время инкубации, часы			
	исход	1	3	24
Контроль в отсутствие Мексидола, n=17	42,3 ± 1,3	40,1 ± 1,8	40,1 ± 2,3	14,3 ± 4,0
Опыт в присутствии Мексидола (50 мкг/мл), n = 9	42,3 ± 2,4	46,3 ± 4,4	44,1 ± 4,2	12,1 ± 4,6
Опыт в присутствии Мексидола (500 мкг/мл) n = 9	42,5 ± 1,2	51,2 ± 2,4*	49,4 ± 3,0*	15,4 ± 9,8

*различия средних арифметических значений параметров в соответствующих группах экспериментов (опыт и контроль) достоверны при $p < 0,05$ (95%)

В таблице 1 представлены экспериментальные результаты влияния Мексидола на общую подвижность сперматозоидов. Внесение Мексидола в концентрации 50 мкг/мл эякулята не привело к изменению подвижности сперматозоидов в течение 3-х часов инкубации, а через 24 часа в контрольных и опытных образцах эякулята подвижность сперматозоидов оставалась на прежнем уровне. Мексидол в концентрации 500 мкг/мл приводил к существенному повышению кинетики сперматозоидов уже к первому часу инкубации и этот уровень сохранялся на протяжении 3-х часов наблюдения. Через 24 часа подвижность сперматозоидов в опытных образцах не отличалась от контрольного уровня.

Кроме этого, изучали влияние Мексидола в присутствии перекиси водорода на целостность цитоплазматической мембраны сперматозоидов. Перекись водорода относится к активным формам кислорода и при повышенном содержании в клетке вызывает оксидативный стресс (таблица 2).

Таблица 2. Влияние перекиси водорода и мексидола на целостность плазматической мембраны сперматозоидов человека *in vitro* (%)

серии экспериментов	Время инкубации, часы			
	30 мин	1	3	24
Контроль, n = 10	91,6 ± 3,5	91,8 ± 2,5	94,6 ± 3,8	87,6 ± 1,5
Влияние H ₂ O ₂ (47ммоль), n=10	94,6 ± 0,6	89,3 ± 4,1	70,3 ± 6,6*	66,8 ± 6,5*
Влияние H ₂ O ₂ (47ммоль) и Мексидола (500 мкг/мл), n=7	97,0 ± 1,7	96,0 ± 2,0*	93,0 ± 2,6**	64,3 ± 2,7*
Влияние H ₂ O ₂ (97ммоль), n=10	93,5 ± 3,5	82,7 ± 2,7*	71,9 ± 3,5*	57,0 ± 5,5*
Влияние H ₂ O ₂ (97ммоль) и Мексидола (500 мкг/мл), n=7	91,6 ± 5,6	88,6 ± 5,7	84,0 ± 6,0**	69,6 ± 5,8**

* различия средних арифметических значений параметров в соответствующих группах экспериментов достоверны с $p < 0,05$ (95%); ** различия средних арифметических значений параметров в соответствующих группах экспериментов достоверны с $p < 0,01$ (99%).

Приведенные в таблице 2 сведения демонстрируют защитное влияние Мексидола на целостность мембраны сперматозоидов в условиях активации перекисного окисления липидов. В контроле (нативный образец эякулята) на протяжении 24 часов число живых сперматозоидов существенно не изменялось. Перекись водорода, внесенная в эякулят, уже к 3 часу наблюдения значительно увеличивает число мертвых клеток, а через 24 часа на 30%. Добавление Мексидола в концентрации 500 мкг/мл в присутствии перекиси водорода позволяет поддерживать число неповрежденных сперматозоидов на протяжении 3-х часов наблюдения. Тем не менее, через 24 часа инкубации в опытных образцах количество мертвых клеток было соразмерно числу поврежденных клеток в образцах с перекисью водорода.

Учитывая положительный эффект влияния Мексидола на подвижность сперматозоидов и сохранность мембраны клеток *in vitro*, мы использовали данный препарат в группе пациентов (n = 10) с выраженной астенотератозооспермией. Пациенты принимали Мексидол перорально в суточной дозе 100 мг, разделенной на 2 приема. Курс медикаментозной терапии составлял 1 месяц. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Результаты исследования свидетельствуют, что после проведенной терапии произошло существенное повышение общей подвижности сперматозоидов на 50% и более высокий подъем активной подвижности почти в 2 раза, достигнув нормальной границы подвижности, констатировано заметное увеличение числа

нормальных форм сперматозоидов на 31% и некоторое повышение числа живых клеток на 12%.

Таблица 3. Влияние Мексидола на фертильность эякулята (n = 10)

Показатель	До лечения	После лечения	%
Объем, мл	4,6	4,0	87
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	75,6	67,3	89
Живые сперматозоиды, %	63,6	71,3	112
Активноподвижные сперматозоиды, %	13,0	25,6	197
Общая подвижность сперматозоидов, %	32,0	48,0	150
Нормальные формы сперматозоидов, %	36,0	47,3	131

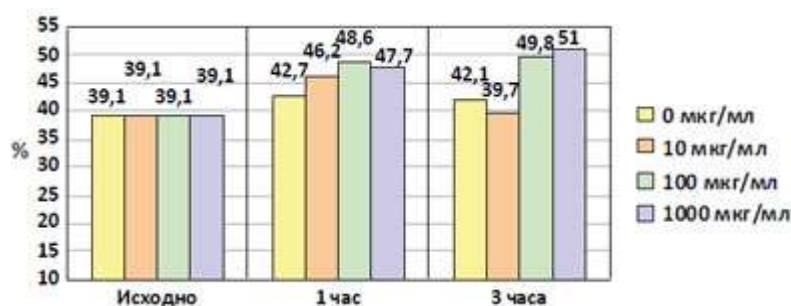


Рисунок 1А. Влияние Семакса (мкг/мл) на подвижность сперматозоидов человека (общая подвижность)

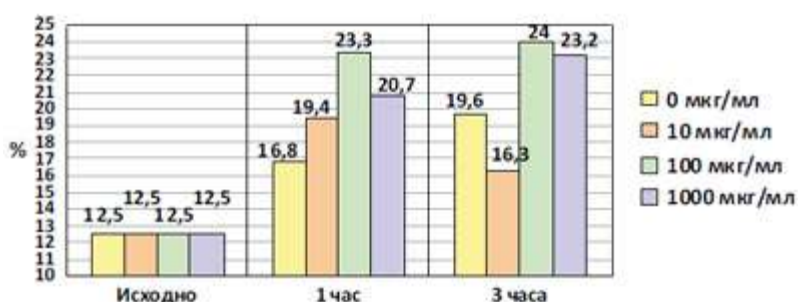


Рисунок 1Б. Влияние Семакса (мкг/мл) на подвижность сперматозоидов человека (активная подвижность)

Полученные результаты, базирующиеся на экспериментальных данных, показали значительные изменения основных параметров фертильности эякулята после курса применения Мексидола в виде монотерапии. Более выраженный

эффект воздействия препарата отмечен в 1,5-2-кратном повышении подвижности сперматозоидов.

Таким образом, Мексидол оказывает положительный эффект в отношении фертильных характеристик эякулята, что позволяет рекомендовать его в качестве монотерапии при астенотератозооспермии.

Семакс синтетический гептапептид, созданный на основе АКТГ(Н-Met-Glu-His-Phe-ProGly-Pro-OH), в основном применяется в области неврологии. В экспериментах на культуре ткани продемонстрировано мощное трофотропное действие препарата на нейроны холинергической группы, как в полной среде, так и в неблагоприятных условиях, обусловленных депривацией глюкозы и кислорода. Препарат оказывает выраженное антиоксидантное, антигипоксическое, ангиопротекторное и нейротрофическое действие [9, 10]. Улучшение трофического обеспечения и снижения реакций оксидантного стресса явились решающими в выборе Семакса для использования его при подготовке эксперимента с эякулятом.

Исследование эякулята проводилось по следующей схеме. Образцы эякулята были разделены на две группы. В первой группе (n = 6) исследовалась сперма от пациентов с патоспермией с добавлением Семакса, ко второй группе (n = 6) мы отнесли эякулят без добавления Семакса.

Первым этапом после разжижения полученного эякулята, время разжижения составляло от 20 до 30 минут, выполнялось исследование эякулята по нормативам рекомендаций ВОЗ 1999 года по основным показателям. Вторым этапом полученные образцы первой группы смешивались с 0,05 мл 0,1% водного раствора Семакса (1 мкг/мл). В обеих группах образцов эякулята исходная подвижность находилась на одном уровне и характеризовалась, как астенозооспермия.

Контроль подвижности сперматозоидов осуществлялся через 1, 3 и 24 часа соответственно для каждой из групп. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Сравнение изменения общей подвижности сперматозоидов (%) при воздействии Семакса (n = 12)

	Семакс	Контроль
Исходно	34,7 ± 3,1	33,2 ± 2,1
1 час	36,1 ± 3,6	32,1 ± 3,6
3 часа	36,7 ± 6,4	32,5 ± 6,1
24 часа	15,5 ± 6,3	22,7 ± 2,2

Из таблицы 4 видно, что в малой концентрации Семакс не вызывает существенного подъема общей подвижности сперматозоидов через 1 час и 3 часа, отмечалось лишь незначительное повышение по сравнению с исходными данными. В контрольной группе была отмечена такая же реакция. По истечению суток в группе образцов эякулята, на которую воздействовали Семаксом, отмечено резкое снижение фертильности в два раза от исходного, и менее заметное снижение в контрольной группе образцов эякулята.

В другой серии опытов были использованы кратные концентрации Семакса, что представлено на рисунках 1А и 1Б.

На рисунке 1Б представлены изменения активной подвижности сперматозоидов на протяжении 3-х часов. В контрольных образцах отмечено незначительное повышение подвижности. В образцах эякулята с Семаксом в концентрации 10 мкг/мл к 3-му часу подвижность повысилась на 30%, в образцах с концентрацией Семакса 100 мкг/мл и на 92% в образцах с концентрацией Семакса 1000 мкг/мл на 86%.

Таким образом, синтетический гептапептид Семакс, оказывает активирующее влияние на подвижность сперматозоидов, особенно на активную фракцию в первые часы после воздействия. Этот препарат может быть рекомендован для использования в качестве вещества, улучшающего фертильность эякулята, в программах вспомогательных репродуктивных технологий, учитывая отсутствие у препарата эмбриотоксичности и мутагенных свойств.

Оводорин один из первых отечественных препаратов, полученный на основе экстракта мицелия вешенки. В молекулярную структуру Оводорина введен один из самых активных природных флавоноидных антиоксидантов дигидрокверцетин, что существенно усиливает его антиоксидантную активность. Оводорин также активирует антиоксидантный ген, блокируя действие перекисного окисления липидов. Указанные свойства позволяют использовать этот препарат в условиях максимального «кислородного стресса», о чем свидетельствуют работы ряда авторов: в клетке происходит нейтрализация избытка кислородных радикалов антиоксидантной системой ферментов [11, 12].

Оводорин выпускается в виде сиропа и геля. В таблице 5 представлены данные о влиянии сиропа в концентрации 30 и 60 мкг/мл эякулята на подвижность сперматозоидов. Через 3 часа более высокая подвижность отмечена в образцах с концентрацией 60 мкг/мл: активная повышена на 45%, общая на 4%, через 24 часа подвижность в опытных образцах превышала таковую в контрольных почти в 2 раза. В следующей серии экспериментов исследовали влияние различных фракций геля на подвижность сперматозоидов.

Таблица 5. Влияние сиропа Оводорина в концентрации 30 и 60 мкг/мл на подвижность сперматозоидов (n = 10)

Показатель	Дозировка препарата	Исход	3 часа	Контроль 3 часа	24 часа	Контроль 24 часа
Активная	30 мкг/мл	11,4	14,0	11,7	2,0	2,4
Активная	60 мкг/мл	11,4	15,9	11,7	4,8	2,4
Общая	30 мкг/мл	42,6	39,7	36,7	16,0	15,4
Общая	60 мкг/мл	42,6	44,4	36,7	22,8	15,4

В таблице 6 представлены результаты воздействия фракции геля № 2 в концентрации 25 и 50 мкг/мл эякулята на подвижность сперматозоидов. Существенное повышение подвижности произошло в течение первого часа

инкубации: активная подвижность возросла в 2 раза, общая увеличилась на 30-40% и эта тенденция сохранилась к 3 часам наблюдения.

Таблица 6. Влияние фракции геля Оводорина № 2 в концентрации 25 и 50 мкг/мл на подвижность сперматозоидов (n = 6)

Показатель	Дозировка препарата	Исход	1 час	3 часа	Контроль 3 часа
Активная	25 мкг/мл	12,0	26,6	24,4	16
Активная	50 мкг/мл	12,0	25,0		
Общая	25 мкг/мл	34,5	45,3	38,8	31,6
Общая	50 мкг/мл	34,5	49		

Таблица 7 представляет результаты влияния фракции геля № 3 в концентрации 25 и 50 мкг/мл эякулята на подвижность сперматозоидов. В данной серии опытов не произошло повышения подвижности и, более того, через 3 часа отмечено снижение подвижности сперматозоидов.

Таблица 7. Влияние фракции геля Оводорина № 3 в концентрации 25 и 50 мкг/мл на подвижность сперматозоидов (n = 11)

Показатель	Дозировка препарата	Исход	1 час	3 часа
Активная	25 мкг/мл	10,2	6,6	2,6
Активная	50 мкг/мл	10,2	10,6	7,6
Общая	25 мкг/мл	33,8	23,3	9,3
Общая	50 мкг/мл	33,8	33,6	22,8

Таблица 8 показывает значительные изменения подвижности сперматозоидов при внесении фракции геля № 4 в более низких концентрациях: 10, 1 и 0,01 мкг/мл эякулята. Результаты показывают обратную зависимость концентрации препарата и подвижности. Внесение геля в концентрации 0,01 мкг/мл дает подъем активной подвижности через 1 час на 20%, через 3 часа на 70%. Общая подвижность имела менее значимый подъем на 6 и 9%.

Таблица 8. Влияние фракции геля Оводорина № 4 в концентрации 1,0 и 0,01 мкг/мл на подвижность сперматозоидов (n = 6)

Показатель	Дозировка препарата	Исход	1 час	3 часа
Активная	1,0 мкг/мл	10	11,6	13,3
Активная	0,01 мкг/мл	10	12	17
Общая	1,0 мкг/мл	33,5	36	35,6
Общая	0,01 мкг/мл	33,5	34	36,5

Проведенные эксперименты позволили нам использовать препарат Оводорин сироп в клинических условиях, учитывая его высокий антиоксидантный потенциал и мембранопротекторные свойства.

Оводорин назначали в виде сиропа в группе пациентов с астенотератозооспермией (n = 12). Суточная доза составляла 4 мл в сутки в течение 20-40 дней в зависимости от степени первоначальных изменений подвижности: при исходной общей подвижности ниже 20% курс терапии составлял 20 дней, при уровне подвижности менее 10% 40 дней. Полученные результаты обобщены в таблице 9.

Таблица 9. Влияние Оводорина на фертильность эякулята (n = 12)

Показатель	До лечения	После лечения	%
Объем, мл	3,6	3,7	102
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	78,3	81,2	103
Живые сперматозоиды, %	66,5	70,5	106
Активноподвижные сперматозоиды, %	12,8	20,3	159
Общая подвижность сперматозоидов, %	23,7	26,0	109
Нормальные формы сперматозоидов, %	40,5	50,0	123

Данные таблицы 9 показывают, что наиболее эффективно Оводорин влияет на активноподвижную фракцию сперматозоидов и количество их нормальных форм.

Таким образом, препарат Оводорин в форме сиропа оказывает существенное положительное действие на фертильность эякулята при исходной патоспермии, выраженной в форме астенотератозооспермии, что позволяет рекомендовать его в качестве средства монотерапии.

Заключение

Итак, проведенное исследование свидетельствует, что Мексидол показал выраженный эффект в отношении подвижности сперматозоидов и целостности мембран клеток как в эксперименте, так и в клинике, а Семакс (в экспериментальных исследованиях) создает условия стимуляции подвижности сперматозоидов.

Оводорин оказывает положительное воздействие на параметры эякулята как в эксперименте, так и у пациентов с патоспермией.

Примененные препараты могут быть рекомендованы к использованию в клинической практике при мужской субфертильности и при подготовке эякулята в процедурах ВРТ вспомогательных репродуктивных технологиях.

Ключевые слова: бесплодие, фертильность, эякулят, Мексидол, Семакс, Оводорин. **Keywords:** male infertility, fertility, ejaculate, Mexidol, Semax, Ovodorin.

Литература

1. Safarinejad M.R., Safarinejad S. Efficacy of selenium and N-acetyl-cystein for improving semen parameters in infertile men // J. Urol. 2009. Vol. 181. P. 741-751.

2. Особенности диагностики и лечения бесплодия у мужчин с ожирением./ Гамидов С.И., Овчинников Р.И, Попова А.Ю., Вирясов А.В., Мясников Д.А., Тажетдинов О.Х. // Фарматека. 2010. № 9. С. 18- 23.
3. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. / Eskenazi B., Kidd S.A., Marks A.R., Slotter E., Block G., Wyrobek A.J. // Human Reprod. 2005. Vol. 20. № 4. P. 1006-1012.
4. Влияние перекиси водорода и этилметилгидропиридина сукцината на сперматозоиды человека / Евдокимов В.В., Харламова Л.А., Пирутин С.К., Туровецкий В.Б. // Андрология и генитальная хирургия. 2010. № 1. С. 35-37.
5. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase / Foresta C., Flohe L., Garolla A., Roveri A., Ursini F., Maiorino M. // Biol. Reprod. 2002. Vol. 67. P. 967-971.
6. Исследование эффекта антиоксидантов на подвижность сперматозоидов и при криоконсервации спермы / Евдокимов В.В., Ерохин А.С, Туровецкий В.Б., Айбяттов Д.Т. // Андрология и генитальная хирургия. 2009. № 1. С. 23-28.
7. Защитное действие Мексидола на мембраны тромбоцитов при кардиохирургических операциях в условии гипертермической перфузии / Короткина Р.Н., Руднева В.Г., Коростылев А.Н., Ситников А.В., Смирнов Л.С., Куприн А.В., Карелин А.А. // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 9. С. 67-68.
8. Влияние Мексидола и его структурных компонентов на содержание углеводов и перекисное окисление липидов при остром стрессе / Девяткина Т.А., Луценко Р.В., Важничая Е.М., Смирнов Л.Д. // Вопросы мед. химии. 1999. Т.45. № 3. С. 246-249.
9. Гусев В.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф. Эффективность Семакса в остром периоде полушарного ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии. 1997. № 6. С. 26-34.
10. Влияние пептида Семакса на индуцированное УФ-излучением повреждение плазматических мембран перитонеальных макрофагов мышей / Пирутин С.К, Туровецкий В.Б., Одгаева А.В., Каменский А.А. // Вестник МГУ. 2007. № 3. С. 51-54.
11. Голевцова З.Ш., Долгих Т.И. и др. Использование БАД к пище «ОВО-Д» (гель) для оптимизации противовирусной терапии хронического вирусного гепатита / Методические рекомендации для врачей. Москва-Омск, 2006. 20 с.
12. Ehomoto A., Wempe M.F. et al. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis // J. Biol. Chim. 2002. V. 277. P. 62-71.