

УДК 547.455.623'233:612.66/.67:612.61

Л.В. Яковлева, Є.О. Ковальова, О.Ю. Кошова, Т.К. Юдкевич

**ВПЛИВ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ
НА ФЕРТИЛЬНІСТЬ СТАРІЮЧИХ САМЦІВ ТА РОЗВИТОК ЇХ НАЩАДКІВ**

Національний фармацевтичний університет,
Центральна науково-дослідна лабораторія,
м. Харків, Україна

e-mail: janekovaleva@mail.ru

Резюме: Віковий андрогенний дефіцит включає комплекс патологічних змін низки важливих функцій організму, обумовлених віковим гормональним дисбалансом. Старіння супроводжується порушенням сперматогенезу, зниженням здатності до запліднення та плодючості, обумовлене зниженням рівня тестостерону. Глюкозаміну гідрохлорид виявляє позитивний вплив на показники спермаграми, підвищує здатність до запліднення, фертильність та рівень тестостерону. Глюкозаміну гідрохлорид сприяє нормальному розвитку потомства старіючих самців щурів.

Ключові слова: глюкозамін, щури, старіння, репродуктивна функція, спермаграма, тестостерон.

Вступ. Старіння організму вважається фізіологічним процесом, але воно традиційно асоціюється зі зниженням репродуктивної функції організму людини. У чоловіків зниження цієї функції відбувається повільно та триває протягом значного періоду життя, першими ознаками цього є зниження рівня статевих гормонів, переважно тестостерону (Т), що може починатися поступово з 30-40 років. Т впливає на різні метаболічні процеси та фізіологічні функції організму, тому його дефіцит відображається на усіх органах та системах чоловічого організму. Клінічні прояви вікового андрогенного дефіциту різноманітні та обумовлені великою кількістю тканин мішеней, чутливих до Т. Вікове зниження концентрації вільного та загального Т у чоловіків прямо корелює зі зменшенням м'язової сили, витривалості та зворотнo корелює з об'ємом жирової тканини⁶.

Частка «здорових» чоловіків (без супутньої соматичної патології) зі зниженим рівнем Т зростає від 8% у 40-60 років до 20% у 61-80 років, а після 80 років лише у 15% чоловіків зберігається рівень Т нормальних межах. Іншими словами, як і у жінок в менопаузі, у більшості чоловіків із віком розвивається гіпогонадизм.

За світовими даними, декілька десятиліть тому частка чоловічої інфертильності у безплідному шлюбі складала від 15 до 25 %, сьогодні вона сягає 30-50%. Дані вітчизняних та

закордонних дослідників свідчать про погіршення сперматогенної функції чоловіків. Зокрема, нормативний показник концентрації сперматозоїдів в еякуляті з 60 млн/мл (50-70 рр. XX ст.) знизився до 20 млн/мл у теперішній час. Негативна тенденція репродуктивного здоров'я чоловіків пов'язана з поширенням інфекційно-запальних захворювань статевих системи, негативним впливом факторів навколишнього середовища, безконтрольним застосуванням цитотоксичних лікарських засобів (ЛЗ) тощо¹.

Низкою досліджень показано, що у функціонуванні органів чоловічої статевих системи важливу роль відіграє N-ацетил-D-глюкозамін, який входить до складу глікопептидів сімейства глікоделінів³. Гонадопротекторна активність аміноцукру полягає у його здатності стабілізувати клітинні мембрани, у т.ч. клітин *Сертолі* та судинного ендотелію⁴. Показаний сприятливий вплив аміноцукру на репродуктивну систему щурів самців: як у статевонезрілих, так і в дорослих щурів виявлено важливу роль протеогліканів у синтезі Т очищеними клітинами *Лейдига* (*Grudet*, 1999). За рахунок мембраностабілізуючої дії глюкоза міну (ГА) відносно клітин *Лейдига* реалізується опосередкований вплив на синтез Т. Інформація про розподіл ГА статевих органах при старінні відсутня. За даними літератури, ГА впливає на активність цілої

низки ферментів, активує анаболічні й затримує катаболічні процеси¹⁰.

Ендогенний ГА, що утворюється в організмі у вигляді ГА 6-фосфату, є фундаментальним будівельним блоком, необхідним для біосинтезу таких сполук як гліколіпіди, глікопротеїни, глікозаміноглікани, гіалуронат та протеоглікани. Вказані сполуки, що містять ГА, є компонентами клітинних мембран і поверхневих білків, а також проміжних структурних молекул, що з'єднують клітини. Екзогенний ГА і його похідні виявляють імуномодуючі властивості, протизапальну і анальгетичну дію, гепатопротекторну, гастропротекторну, хондропротекторну і кардіопротекторну активність, мають здатність до посилення регенерації тканин, що і дозволяє передбачити здатність екзогенного ГА покращувати репродуктивну функцію у старіючих щурів самців в експерименті^{4,8}.

Мега дослідження було, встановити наявність відновлюваного впливу ГА на здатність до запліднення у самців старечого віку та на фізіологічний розвиток їх нащадків.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження були проведені на білих безпородних тваринах, виведених у віварії Центральної науково-дослідної лабораторії (м. Харків). Використовували тварин різних вікових груп: 6 місяців (репродуктивний вік), 18 місяців (передстаречий вік) та 24 місяці (старечий вік). Найбільш активним репродуктивним віком щурів самців вважається 6 місяців, оскільки у даної вікової категорії самців найбільш високі показники фертильності та плодючості, що встановлено в наших попередніх дослідженнях⁵. На початку дослідження тварин кожного віку розподілили на 2 групи: віковий інтактний контроль та тварини, яким протягом 2-х місяців вводили ГА гідрохлорид внутрішньошлунково у дозі 100 мг/кг. Після закінчення введення засобу до самців підсаджували інтактних самиць молодого репродуктивного віку (4 міс.) у співвідношенні 1:3 для визначення здатності самців до запліднення. Наявність статевих контактів підтверджували визначенням сперматозоїдів у піхвових мазках самиць, після чого останніх відсаджували у окремі клітки.

Оцінку впливу на генеративну функцію проводили за показниками індексу фертильності (ІФ) та індексу плодючості (ІП). ІФ відображає частку самиць, які мали статевий контакт, відносно загальної кількості самиць у стадії проеструсу, що були підсажені до самців. Індекс плодючості характеризує співвідношення вагітних самиць до тих, які мали статевий контакт. Вагітних самиць залиша-

ли до пологів та спостерігали за розвитком нащадків із першого дня життя і протягом 1 місяця. Вивчення постнатального розвитку потомства включало виживаність щурят, щотижневу реєстрацію динаміки маси тіла, термінів відлипання вушних раковин, появи первинного волосяного покриву, прорізування різців, відкриття очей, опускання сім'яників у самців і відкриття піхвової щілини у самок. Також реєстрували кількість щурят у кожній породіллі. Для визначення зв'язку між фертильністю та станом сперматогенної функції, у самців було проведено тестування функціонального стану сперматозоїдів за допомогою стандартних методів із використанням мікроскопу «Гранум L300». Визначали кількість сперматозоїдів у суспензії епідімісисів, відносну кількість патологічних форм і нерухомих сперматозоїдів та їх витривалість при тестуванні тривалості руху². У сироватці крові визначали рівень Т і простатичного специфічного антигену (ПСА) за допомогою мікрострипового фотометра для імуноферментного аналізу виробництва *Awareness Technology INC* з використанням наборів ІФА (НВЛ «Гранум», Україна).

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «*Statistica 6,0*». Для порівняння непараметричних даних використовували аналог дисперсійного аналізу – метод *Крускала-Уоліса* і критерій *Манна-Уїтні*, для параметричних даних оцінку достовірності відмінностей між вибірками проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу *ANOVA* або *ANOVA RM* і критерію *Ньюмана-Кейлса*⁷. Використовували методи: лабораторний, порівняння, статистичний, експериментальний.

Результати дослідження та їх обговорення. Отримані результати показали, що порівняно з тваринами інтактного контролю молодого репродуктивного віку (6 міс.) у старіючих тварин як у віці 18 міс., так і 24 міс., статистично значуще ($p < 0,0001$) знижуються ІФ та ІП, що свідчить про зменшення здатності самців до парування та запліднення. Введення ГА самцям у віці 18 міс. значуще підвищувало фертильність на 40% відносно інтактних тварин відповідного вікового контролю, хоча залишалися відмінності щодо молодого інтактного контролю (6 міс.), а у самців віком 24 міс. після введення ГА ІФ підвищувався на 20% відносно відповідного вікового інтактного контролю (рис. 1а).

ІП статистично значуще знижувався як у тварин віком 18 міс., так і 24 міс., але більш

виразно – у самців у віці 18 міс. Гірші показники репродуктивної функції у тварин віком 18 міс. можуть бути пояснені тим, що саме у цьому віці відбуваються інтенсивні гормональні перебудови в організмі щурів самців⁵. За отриманими у даному дослідженні результатами при дещо вищій фертильності відносно вікового інтактного контролю віком 24 міс. інтактні самці віком 18 міс. мали нижчу плодючість, отже, вони спарювались із більшою кількістю самиць, проте вагітність наступала у меншій кількості з них у порів-

нянні з самицями, що спарювались із більш старими інтактними щурами самцями (24 міс.). Введення ГА щурам у віці 18 міс. на 20% підвищувало плодючість відносно вікового інтактного контролю, хоча залишалась достовірна відмінність відносно репродуктивного контролю (6 міс.), а застосування ГА у щурів у віці 24 міс. нормалізувало плодючість до рівня репродуктивного контролю (рис. 1 б), показник якої статистично значуще перевищував ІІІ у відповідного вікового інтактного контролю (24 міс.).

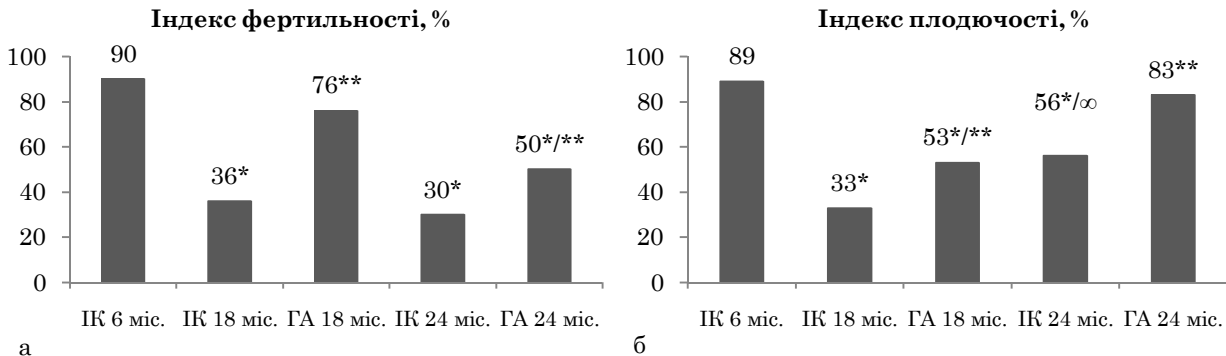


Рис. 1. ІФ та ІІІ самців, яким вводили ГА гідрохлорид у дозі 100 мг/кг у віці 18 та 24 міс.

Примітки:

* – відхилення статистично значущі відносно значень репродуктивного контролю віком 6 міс., $p < 0,05$;

** – відхилення статистично значущі відносно значень відповідного вікового інтактного контролю, $p < 0,05$;

∞ – відхилення статистично значущі відносно значень вікового інтактного контролю 18 міс., $p < 0,05$.

Як наслідок зниженої фертильності та плодючості у обох вікових групах старіючих самців (18 та 24 міс.) загальна кількість їх нащадків була більш, ніж у 3 рази меншою порівняно з репродуктивним контролем віком 6 міс. (рис. 2а, в). Однак, ще більш показовим було народження та виживання меншої кількості нащадків в окремих приплодах. Отже, зменшення кількості нащадків відбувалось як за рахунок меншої кількості вагітних самиць, так і внаслідок зниженої кількості щурят у приплодах (рис. 2б, г). Зокрема, середня кількість щурят нащадків самців віком 18 міс. на 1 приплід складала 6, а нащадків самців віком 24 міс. – меншу 4.

Введення щурам самцям ГА сприяло збільшенню кількості щурят як за рахунок більшої кількості вагітних самиць, так і завдяки збільшенню до нормального рівня кількості щурят у приплодах. Народження повноцінного потомства від самців, яким вводили ГА е, на нашу думку, результатом нормалізації функціонального стану репродуктивної системи старіючих самців, про що свідчать результати даного дослідження.

Протягом спостереження за нащадками у період постнатального розвитку не виявлено загибелі щурят та будь-яких відхилень у їх фізичному розвитку у всіх експерименталь-

них групах. У всіх щурят спостерігали вчасне відлипання вушних раковин, появу волосяного покриву, відкриття очей, прорізання різців, опускання сім'яників у самців та відкриття піхвової щілини у самиць. У нащадків самців молодого репродуктивного віку (6 міс.) спостерігали нормальний приріст маси тіла – у віці 1 тиждень маса тіла щурят збільшувалась у двічі та надалі рівномірно зростала (рис.3).

Нащадки інтактних старіючих самців також мали аналогічну позитивну динаміку приросту маси тіла, але внаслідок меншої кількості щурят у приплодах, спостерігали достовірне збільшення маси тіла у щурят нащадків старіючих самців вікового інтактного контролю 18 міс. у віці 2 тижні та у самців вікового інтактного контролю 24 міс. у віці від 1 тижня до 1 місяця порівняно з нащадками самців репродуктивного контролю 6 міс. (рис.3).

У нащадків самців, яким вводили ГА у віці 24 міс. спостерігали зменшення маси тіла відносно вікового інтактного контролю. Відмінності у прирості маси тіла у нащадків самців віком 18 міс., яким вводили ГА, були менш виразними, їх зазначали лише при зважуванні на 1 та 7 добу від народження. Зменшення середньої маси тіла у нащадків

щурів самців, яким вводили ГА, можна пояснити збільшенням кількості щурят у приплідах до рівня репродуктивного контролю

лодах до рівня репродуктивного контролю (рис. 2).

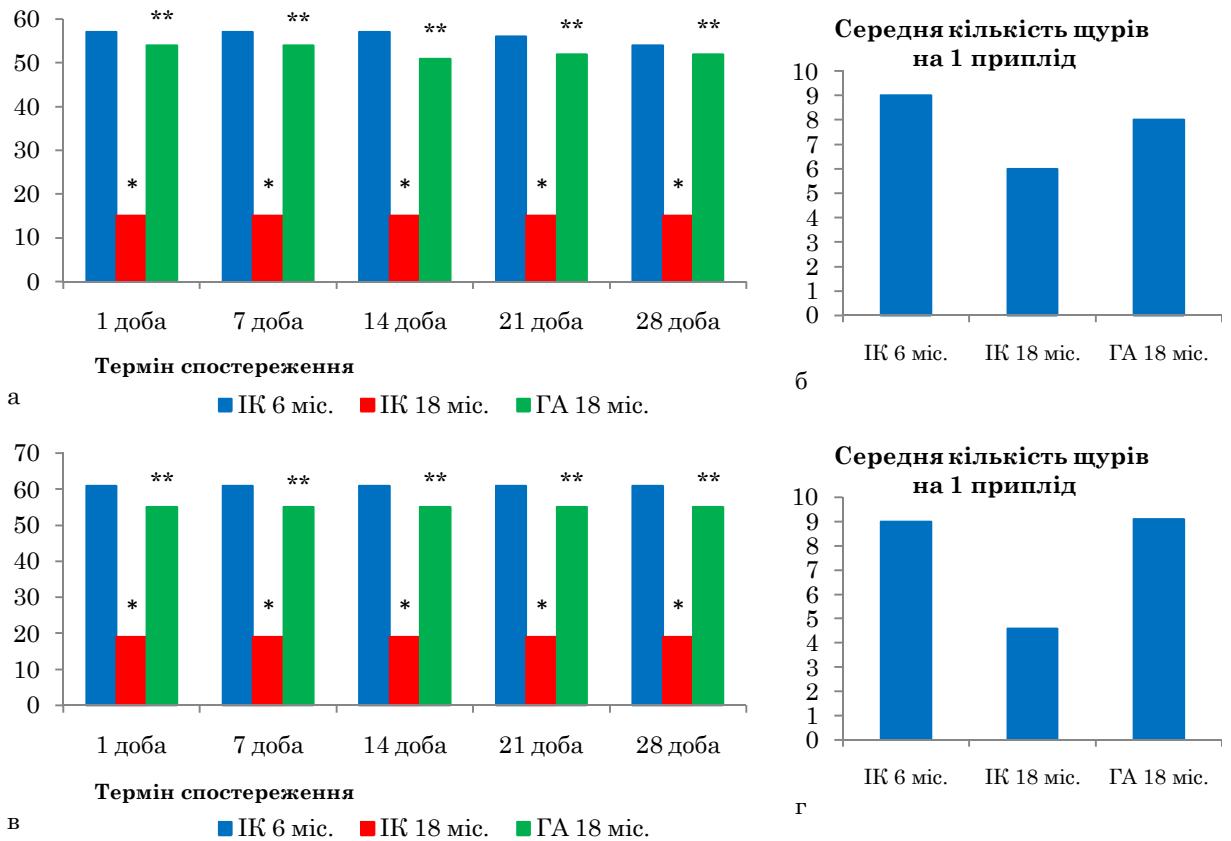


Рис. 2. Загальна кількість щурят (нащадків самців) у експериментальних групах (а, в) та середня кількість щурят на один приплід (б, г)

Примітки:

* – відхилення статистично значущі відносно значень репродуктивного контролю віком 6 міс., $p < 0,05$; ** – відхилення статистично значущі відносно значень відповідного вікового інтактного контролю, $p < 0,05$.

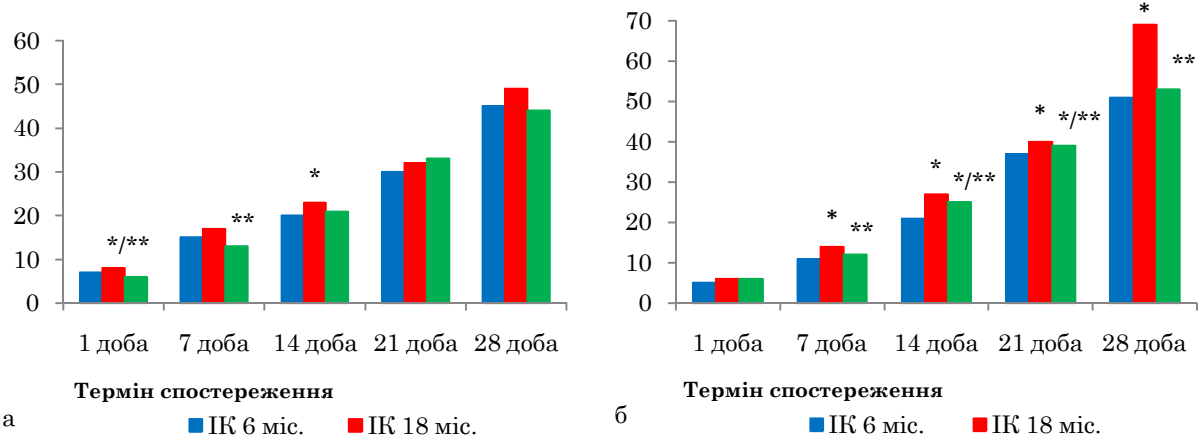


Рис. 3. Динаміка маси тіла нащадків самців, яким вводили глюкозаміну гідрохлорид у дозі 100 мг/кг у віці 18 та 24 міс.

Примітки:

* – відхилення статистично значущі відносно значень інтактного контролю віком 6 міс., $p < 0,05$; ** – відхилення статистично значущі відносно значень відповідного вікового інтактного контролю, $p < 0,05$.

З метою визначення головних чинників зниження фертильності самців та їх дітородної функції було проведено аналіз функціонального стану сперматозоїдів у інтактних

старіючих тварин та на тлі застосування у них ГА у порівнянні з показниками тварин репродуктивного контролю 6 міс. (табл.1).

Таблиця 1. Вплив ГА гідрохлориду у дозі 100 мг/кг на динаміку показників функціонального стану сперматозоїдів щурів

Групи тварин	n	Показники функціонального стану сперматозоїдів			
		Кількість, млн.	Відносна кількість нерухомих, %	Відносна кількість патологічних форм, %	Тривалість рухливості, хв.
		M±m	Me (LQ; UQ)		
6 місяців					
Інтактний контроль	8	46±4	70 (63; 77)	9 (8; 13)	413±11
18 місяців					
Інтактний контроль	6	12±3*	87 (80; 90)*	18 (17; 19)*	240±41*
ГА	6	29±5**	64 (62; 84)**	13 (9; 15)	345±46**
24 місяці					
Інтактний контроль	11	20±3	66 (64; 86)	13 (10; 19)	303±25*
ГА	9	36±5**	46 (42; 54)**	9 (7; 11)**	374±2**

Примітки: * – відхилення статистично значущі відносно значень інтактного контролю віком 6 міс., p<0,05;
 ** – відхилення статистично значущі відносно значень відповідного вікового інтактного контролю, p<0,05;
 n – кількість тварин у групі.

У результаті проведеного дослідження було встановлено зниження як кількості сперматозоїдів, так і їх функціонального стану у інтактних старіючих самців. Концентрація сперматозоїдів знижувалась у 3,8 та 2,3 рази відповідно у тварин у віці 18 міс. та 24 міс. порівняно з репродуктивним контролем (6 міс). Введення ГА старіючим тваринам сприяло статистично значущому підвищенню кількості сперматозоїдів, зокрема, у самців 24 міс. цей показник наближався до рівня молодих тварин. У інтактних самців 18 міс. збільшувалась відносна кількість нерухомих сперматозоїдів та їх патологічних форм, після введення ГА дані показники знижувались до рівня молодих тварин. Тривалість рухливості

сперматозоїдів значуще знижувалась у самців у віці 18 та 24 міс. та достовірно підвищувалась у обох дослідних групах після введення ГА (табл.1).

Вивчення рівня статевих гормонів у старіючих самців показало помірне зниження рівня Т, та статистично значуще підвищення рівня ПСА (табл. 2). Останній є глікопротеїном, що синтезується в нормальних клітинах лише передміхурової залози, виділяється у протоки залози та лише незначна його кількість потрапляє у кров. Збільшення рівня ПСА у сироватці крові при старінні свідчить про ушкодження клітин передміхурової залози запальним процесом.

Таблиця 2. Вплив ГА гідрохлориду у дозі 100 мг/кг на вікову динаміку рівня Т та ПСА у сироватці крові щурів (M±m)

Групи тварин	n	Показники, нмоль/л	
		Т	ПСА
6 місяців			
Інтактний контроль	6	3,78±0,58	0,95±0,11
ГА	6	3,25±0,57	0,98±0,05
18 місяців			
Інтактний контроль	6	2,56±0,37	2,33±0,31*
ГА	6	3,75±0,61	1,77±0,27*
24 місяці			
Інтактний контроль	6	1,82±0,51	2,77±0,09*
ГА	8	2,49±0,75	1,89±0,24**

Примітки: * – відмінності достовірні щодо значень показників тварин репродуктивного віку (6 міс.), p<0,05;
 ** – відмінності достовірні щодо значень показників тварин відповідного вікового інтактного контролю, p<0,05;
 n – кількість тварин у групі.

Отже, на нашу думку, ГА гідрохлорид сприяв підвищенню андрогенної насиченості організму старіючих щурів (табл. 2). Рівень Т у тварин 18 міс. та 24 міс., яким вводили ГА, достовірно не відрізнявся від рівня гормону у

групи інтактних щурів репродуктивного віку (6 міс.). Поряд із цим рівень Т був дещо вищим за абсолютною величиною відносно тварин відповідного вікового інтактного контролю, хоча достовірно від них теж не відрізняв-

ся. Рівень ПСА статистично значуще знижувався у самців, яким вводили ГА у віці 24 міс., при порівнянні з групою відповідного вікового інтактного контролю 24 міс., хоча залишалась значуща відмінність відносно інтактного контролю репродуктивного віку, що характеризувалась підвищенням рівня ПСА

в сироватці крові та вказує на репродуктивне старіння. Позитивний вплив ГА на продукцію ПСА є опосередкованою ознакою нормалізації структурно-функціонального стану передміжурової залози у старіючих щурів та корелює з динамікою рівня Т.

Висновки:

1. Результати дослідження стану репродуктивної функції старіючих щурів самців у віці 18 та 24 міс. показали значне зниження фертильності та плодючості, що пов'язане з андрогенним дефіцитом та погіршенням функціонального стану сперматозоїдів.
2. Введення глюкозаміну старіючим самцям сприяло підвищенню фертильності та плодючості, народженню у них повноцінного потомства, що забезпечувалось під-

вищенням андрогенної насиченості організму, зниженням рівня простатичного специфічного антигену та нормалізацією функціональних показників сперматозоїдів.

3. Отримані дані, на нашу думку, обумовлюють перспективність подальшого дослідження геропротекторних властивостей глюкозаміну щодо вікових змін репродуктивної функції чоловіків.

Література:

1. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. – ООО «Медицинское информационное агенство». – 2005. – 356 с.
2. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин // В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / *Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В., Бишовець Т.Ф., Даниленко В.С.*; За ред. *О.В. Стефанова*. – К.: Авіцена, 2001. – С. 139-152.
3. *Зайченко Г.В.* Корекція порушень генеративної функції сім'яників глюкозаміном гідрохлориду, в експерименті / *Зайченко Г.В., Бречка Н.М., Коренева Є.М.* // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – №1. – 65-71.
4. *Зупанец І.А.* Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине: дис. в форме научного доклада... д-ра мед. наук / *И.А. Зупанец*. – Купавна, 1993. – 90 с.
5. Изучение влияния элгацина на возрастные изменения сперматогенеза у крыс / *Л.В. Яковлева, Е.А. Егорова, Ю.Б. Ларьяновская, Е.Ю. Кошечкина* // Физиология, медицина, фармакология. Высокие технологии, теория, практика. Т.1: сб. статей Четвертой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, медицине, фармакологии», 15-16 ноября 2012 г., г. Санкт-Петербург, Россия / под. ред. *А.П. Кудинова, Б.В. Крылова*. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. – С. 169-171.
6. *Сікора В.В.* Сучасний погляд на проблему вікового андрогенного дефіциту у чоловіків / *Сікора В.В., Шевцова Ю.М.* // Вісник СумДУ. Серія «Медицина». – 2011. – №1, Том 2. – С. 79–83.
7. *Халафян А.А.* STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / *А.А. Халафян*. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
8. *Яковлева Л.В.* Изыскание и изучение новых нестероидных противовоспалительных средств – производных дикарбоновых кислот: дис. докт. фарм. наук: 14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология / *Л.В. Яковлева*. – Х., 1992. – 442 с.
9. *Яковлева Л.В.* Исследование влияния элгацина на динамику изменений органов репродуктивной системы интактных крыс в процессе старения / *Л.В. Яковлева, Е.А. Егорова, Е.Ю. Кошечкина* // сб. статей. науч-практ конф. «Интеграция образования, науки и производства в фармации», 17-18 октября, 2012г., Ташкент. – 2012. – С.530-532.
10. *Brucato S.* Regulation of glypican-1, syndecan-1 and syndecan-4 mRNAs expression by follicle-stimulating hormone, cAMP increase and calcium influx during rat Sertoli cell development / *S. Brucato, J. Bocquet, C. Villers* // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269, № 14. – P.3461-3469.
11. Role of proteoglycans on testosterone synthesis by purified Leydig cells from immature and mature rats / *N. Grudet, P.J. Bonnamy, D. Le Goff, S. Carreau* // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 68, № 3-4. – P.153-162.

УДК: 547.455.623'233:612.66/.67:612.61

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ СТАРЕЮЩИХ САМЦОВ И РАЗВИТИЕ ИХ ПОТОМСТВА

Л.В. Яковлева, Е.А. Ковалева, Е.Ю. Кошова, Т.К. Юдкевич

Национальный фармацевтический университет, Центральная научно-исследовательская лаборатория, г. Харьков, Украина

Резюме: Возрастной андрогенный дефицит включает комплекс патологических изменений ряда важных функций организма, обусловленных возрастным гормональным дисбалансом. Старение сопровождается нарушением сперматогенеза, снижением способности к оплодотворению и плодовитости, обусловленное снижением уровня тестостерона. Глюкозамина гидрохлорид оказывает положительное влияние на показатели спермаграммы, повышает способность к оплодотворению, фертильность и уровень тестостерона. Глюкозамина гидрохлорид способствует нормальному развитию потомства стареющих самцов крыс.

Ключевые слова: глюкозамин, крысы, старение, репродуктивная функция, спермаграмма, тестостерон.

UDC: 547.455.623'233:612.66/.67:612.61

INFLUENCE OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE ON FERTILITY OF AGING MALES AND ON THE DEVELOPMENT OF THEIR OFFSPRING

L. V. Yakovleva, I. O. Kovalyova, O. Y. Koshova, T. K. Yudkevich

National University of Pharmacy, Central Scientific and Research Laboratory, Kharkiv, Ukraine

Summary: The age androgenic deficit involves a complex of pathological changes in numerous essential functions in the organism caused by age hormonal disbalance. Aging is accompanied by the disturbances in spermatogenesis, deterioration of fecundation and fertility abilities in rats due to diminishing of testosterone level. Glucosamine hydrochloride proved to have positive action on spermogram parameters, on increasing aptitude for fecundation and fertility, as well as the testosterone level. Glucosamine hydrochloride induces normal development of the offspring in aging male rats.

Keywords: glucosamine, rats, aging, reproductive function, spermogram, testosterone.

Надійшла до редакції 11.10.2014 р.