

Г. М. Шаяхметова

Вплив етамбутолу на структурно-функціональні показники гонад та фертильність щурів-самців

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: етамбутол, фертильність, сім'яники

Приблизно в 7 % чоловіків репродуктивного віку клінічно діагностують безпліддя. У 75 % безплідних чоловіків виявляють первинну тестикулярну недостатність. Незважаючи на прогрес, головним чином в області генетики, етіологія даного захворювання лишається невідомою в 50 % випадків, так зване «ідіопатичне безпліддя» [1]. При цьому відомо, що чоловіча репродуктивна функція може зазнавати шкідливих впливів у результаті надходження до організму ксенобіотиків – репродуктивних токсикантів з навколишнього середовища, внаслідок шкідливих звичок (тютюнопаління) або хіміотерапії [2, 3]. Раніше нами було показано, що введення комбінації протитуберкульозних засобів I ряду етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду щурам-самцям протягом періоду сперматогенезу викликало значні біохімічні та морфо-функціональні порушення в гонадах, які, у кінцевому результаті призводили до фатального зниження запліднювальної здатності самців, зменшення плодовитості запліднених ними самиць, значного зростання рівня до- та післяімплантаційної смертності ембріонів [4, 5]. Зміни репродуктивних показників самців у даному випадку могли бути результатом прямої або опосередкованої токсичної дії на гонади, як одного, так і декількох із застосованих препаратів, що зумовило необхідність подальших досліджень.

Мета дослідження – вивчення впливу етамбутолу на фертильність та структурно-функціональні показники сім'яників щурів-самців.

Матеріали та методи. Субстанція етамбутолу (Ethambutolum, (+)-N,N'-етилден-біс-(2-амінобутан-1-ол) була надана ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод». У дослідженні використовували самців та самиць щурів лінії Вістар з початковою масою тіла 150–170 г, наданих ПП «Біомодельсервіс», м. Київ. Щурів утримували в стандартних умовах віварію за температури 22–24 °C та відносної вологості 30–70 % з вільним доступом до корму та води. Групи самців-щурів (по 12 особин у кожній) формували за методом рандомізації з попередньою акліматизацією протягом 10 днів: 1 група – внутрішньошлункове введення етамбутолу в 1 % крохмальному гелі; 2 – контроль (внутрішньошлункове введення 1 % крохмального гелю). Етамбутол з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [6] водили в дозі 155 мг/кг, яку застосовують у клініці для короткотермінової комбінованої терапії туберкульозу [7]. Уведення продовжували протягом 60 днів (період сперматогенезу з урахуванням терміну дозрівання сперматозоїдів в епідидимісі). Через 60 днів повторних введень щурів обох груп парували з інтактними самицями у співвідношенні 1 : 1 протягом 14 днів (2–3 естральних цикли). У цей час самцям щурів продовжували вводити етамбутол. Його вплив на статеву поведінку та запліднювальну здатність самців визначали за величиною індексу:

$$\frac{\text{число вагітних самиць}}{\text{число самиць парованих із самицями}} \cdot 100$$

Після закінчення терміну парування та через 24 год після останнього введення етамбутолу самців під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії дислокацією шийних хребців та виділяли

сім'яники з придатками (епідидимісами) для визначення структурно-функціональних показників [8, 9]. Самець піддавали евтаназії на 20 день вагітності. Першим днем вагітності вважали наявність сперматозоїдів у вагінальних мазках. Після лапаротомії вилучали роги матки з яєчниками, визначали кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантацій у матці, кількість живих плодів та таких, що були в стадії резорбції. Ці дані використовували для визначення показників доімплантаційної та післяімплантаційної загибелі згідно із загальноприйнятими методами [8, 9]. План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ «ІФТ НАМН України»; усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Результати та їх обговорення. Підрахунок кількості самиць, що завагітніли

показав значне зниження фертильності самців після введення етамбутолу (табл. 1). З 12 парованих самиць завагітніло лише 4, у той час як у контролі індекс запліднювальної здатності склав 92 %. Це може бути пов'язане як з інкреторним (стероїдогенним), так із гонадо- або сперматотоксичним впливом етамбутолу на організм тварин [8].

Важливим показником для тварин з багатоплідною вагітністю, який характеризує стан як материнського, так і батьківського організму, є плодючість – середня кількість живих плодів на одну самицю. На останній показник можуть впливати екзогенні та ендогенні фактори, що змінюють гормональний статус організму. Оцінка плодючості та результатів вагітності в даному випадку забезпечує оцінку ступеня ураження репродуктивної системи самців.

Згідно з даними таблиці 2 у самиць, яких парували з піддослідними самця-

Таблиця 1

Індекс запліднювальної здатності щурів-самців за умов введення етамбутолу

Група самців	Кількість парованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності
Контроль	12	11	91,66
Етамбутол	12	4	33,33

Таблиця 2

Показники фертильності, ембріо- та фетогенезу на 20 день вагітності інтактних щурів-самиць, запліднених самцями, яким вводили етамбутол

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Етамбутол
Кількість вагітних самиць у групі	11	4
Загальна кількість жовтих тіл в яєчниках	123	34
Кількість жовтих тіл на 1 самицю, $M \pm m$	$8,50 \pm 0,73$	$11,18 \pm 0,41$
Загальна кількість місць імплантації	110	16
Кількість місць імплантації на 1 самицю, $M \pm m$	$10,00 \pm 0,73$	$4,00 \pm 1,03^*$
Доімплантаційна загибель	абс.	13
	%	11
Післяімплантаційна загибель	абс.	3
	%	3
Загальна смертність, %	13	56
Кількість живих плодів, абс.(%)	107 (97)	15 (94)
Кількість живих плодів на одну самицю, $M \pm m$	$9,72 \pm 0,78$	$3,75 \pm 0,47^*$

Примітка. Тут і в табл. 2–4: *відмінності вірогідні порівняно з контрольною групою ($p \leq 0,05$).

ми, фатально знижувався показник плодючості (кількість живих плодів на одну самицю була меншою, ніж у контролі в 2,6 разу).

Для отримання даних з репродуктивної токсичності корисним є застосування тесту домінантних леталей, у якому самиць піддають евтаназії в середині третього триместру вагітності. У даному тесті визначають до та післяімплантаційну загибель. Рівень ембріональної смертності в самиць, запліднених самцями, які піддавалися впливу ксенобіотиків, є одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію. Дані, наведені в таблиці 2, дозволяють порівняти характеристики ембріональної смертності потомства самців дослідної та контрольної груп у різні періоди ембріонального розвитку та свідчать про значний негативний ефект етамбутолу на чоловічу генеративну функцію. Зокрема, у дослідній групі спостерігали значне підвищення рівня доімплантаційної загибелі ембріонів, яка склала 53 %. Відповідним чином зростав і показник загальної ембріональної смертності.

Доімплантаційна загибель ембріонів може спостерігатись як внаслідок мутагенної дії речовини, так і немутагенних факторів, у результаті яких виникають проблеми з заплідненням (наприклад, зменшення кількості нормальних та рухливих сперматозоїдів, порушення транспорту сперматозоїдів або проникнення їх у яйцеклітину) [9].

Для визначення внеску мутагенної або немутагенної дії етамбутолу необхідно провести додаткові дослідження щодо його мутагенності та/або сперма-

тотоксичності. Але, принаймні в науковій літературі нами було знайдено повідомлення, що при введенні етамбутолу в дозах 25 мг/кг та 250 мг/кг щурам та півням, цей препарат викликав пошкодження сперматогенного епітелію з наступним блокуванням сперматогенезу [10].

Дані, що характеризують морфологічний стан гонад щурів-самців, які протягом періоду сперматогенезу отримували етамбутол, наведено в таблиці 3.

Вони свідчать про зниження абсолютної маси сім'яників у щурів дослідної групи на 13 % порівняно з контролем. Варто відзначити, що у випадку дослідження маси сім'яників саме абсолютна, а не відносна маса точніше характеризує стан даних органів. Пов'язано це з тим, що маса сім'яників статевозрілих тварин, так само як і мозку, практично не залежить від маси тіла [9]. Виявлене нами зниження маси сім'яників може свідчити про втрату гермінативних клітин та зменшення продукції рідини у сім'яних каналцях – це, у свою чергу, може бути пов'язано з втратою сперматид, що подовжуються та/або зниженням рівня тестостерону [9].

Результати дослідження епідидимальної суспензії показали, що етамбутол викликав зниження продукції статевих клітин сім'яниками на 67 % порівняно з контролем (табл. 3).

Мікроскопічний аналіз морфологічних особливостей сперматозоїдів виявив поряд з нормальними клітинами поодинокі петлеподібні форми, які з однаковою частотою зустрічались у щурів дослідної та контрольної груп,

Таблиця 3

Показники функціонального стану сперматозоїдів та маса гонад щурів-самців за умов введення етамбутолу протягом періоду сперматогенезу, $M \pm m$, $n = 12$

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Етамбутол
Маса сім'яників, г	3,48 ± 0,09	3,02 ± 0,05*
Кількість сперматозоїдів, млн/мл	47,07 ± 5,30	15,58 ± 2,34*
Час рухливості, хв	620,58 ± 19,11	238,00 ± 44,99*
Резистентність до зростаючих концентрацій KCl, % KCl	2,62 ± 0,11	1,58 ± 0,29*

недозрілих статевих клітин не спостерігали. Але, слід зазначити, що в суспензії сперматозоїдів із хвостової частини епідидимісів самців, яким вводили етамбутол, виявився високий відсоток клітин з відокремленими голівками. Такий феномен, скоріше за все, пов'язаний зі зміною механічних властивостей сперматозоїдів тварин даної групи та деструкцією клітин під час стандартного приготування суспензії для дослідження. Подібна аномалія, можливо, є свідченням підвищеного доступу етамбутолу до гермінативних клітин [8].

Були досліджені показники, які опосередковано свідчать про енергетичні можливості сперматозоїдів (характер рухової активності, тривалість руху) та їхню стійкість до змін оточуючого середовища – осморезистентність (табл. 3). Загальний час рухової активності статевих клітин після введення етамбутолу зменшувався на 62 % порівняно з контролем. У той самий час їхня життєздатність, що визначається за показником осмотичної резистентності відносно розчинів калію хлориду зростаючих концентрацій, знижувалася на 40 %.

Результати дослідження стану клітин, які належать до сперматогенного епітелію, представлені в таблиці 4. Згідно з ними індекс сперматогенезу, що відтворює збереження різних типів клітин сперматогенного епітелію, у сім'яниках щурів дослідної групи був вірогідно нижчим ніж у контролі. Негативного впливу зазнали первинні клітини сперматогенезу – сперматогонії, введення етамбутолу призвело до суттєвого зниження мітотичної актив-

ності, а отже зменшення їхньої кількості в поперечних зрізах каналців сім'яників. Кількість клітин у 12 стадії мейозу, що характеризує мейотичний поділ сперматоцитів I порядку, у сім'яниках дослідних щурів була в 1,8 разу меншою порівняно з контролем. Очевидно, що зниження мейотичної активності сперматоцитів I порядку узгоджується з даними щодо зниження продукції сперматозоїдів у цій групі самців (табл. 4).

Виявлено, що в щурів дослідної групи нерідко спостерігалися пусті та деформовані каналці, а також каналці з дисконкомплексним сперматогенним епітелієм та поодинокі каналці, заповнені загиблими сім'ярдними клітинами. Набагато частіше, ніж у контролі, зустрічалися невеликі ділянки з відсутніми статевими клітинами, так звані «вікна», а також сперматозоїди в стані деструкції, що проявлялося їхньою адгезією і фрагментацією.

У щурів дослідної групи відсоток випадків злущування сперматогенного епітелію в провіт каналця та відшарування епітелію від базальної мембрани був вищим, ніж в контролі у 2,8 та 3,2 разу відповідно (табл. 4).

Відомо, що до дезінтеграції процесів сперматогенезу залучаються різні механізми. Токсиканти можуть впливати на кожен з типів ранніх гермінативних клітин у базальному компартменті сім'яного епітелію або один чи більше типів зрілих гермінативних клітин у адлюмінальному компартменті. Дія ксенобіотика на більш розвинені гермінативні клітини після подолання гематотестикулярного бар'єру може бути пря-

Таблиця 4

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію в щурів за умов введення етамбутолу $M \pm m, n = 12$

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Етамбутол
Індекс сперматогенезу	3,62 ± 0,01	3,484 ± 0,001*
Число сперматогоній	69,39 ± 0,75	57,84 ± 0,47*
12 стадія мейозу, %	3,56 ± 0,36	2,00 ± 0,32*
Злущений епітелій, %	1,06 ± 0,25	3,000 ± 0,001*
Відшарування епітелію, %	0,31 ± 0,12	1,00 ± 0,32
Вікна, %	0,50 ± 0,16	1,40 ± 0,51

мою або опосередкованою порушенням функцій клітин Сертолі [8]. З іншого боку, на сперматогенний епітелій, зокрема на процес перетворення сперматид у спермії, безпосередньо впливає тестостерон, у той час як гонадотропні гормони гіпофізу стимулюють клітини Лейдіга, які продукують андрогени, підтримують мейотичну та постмейотичну фази сперматогенезу [8, 11].

Отримані дані спонукають до проведення подальших досліджень для з'ясування біохімічних та/або ендокринних механізмів негативної дії етамбутолу на чоловічу репродуктивну функцію.

Висновки

Уведення етамбутолу в терапевтичній дозі щурям-самцям протягом періоду сперматогенезу викликає значні морфологічні та морфометричні порушення в сперматогенному епітелії, що призводить до зниження продукції

сперматозоїдів та зменшення їхньої життєздатності. Результатом подібних змін у гонадах є погіршення фертильності самців, фатальне зменшення фертильності, кількості запліднених ними самиць, значне зростання рівня доїмплантаційної та загальної загибелі ембріонів.

Значне занепокоєння викликає той факт, що етамбутол має широке застосування в комбінованій терапії туберкульозу в чоловіків репродуктивного віку. У той самий час без проведення специфічних досліджень досить важко отримати відповідні клінічні дані. Тим більшу цінність мають отримані нами результати, які визначають пріоритетні напрями подальших експериментів. Вважаємо, що для визначення підходів до профілактики негативного впливу етамбутолу на чоловічі гонади необхідним є дослідження біохімічних та/або ендокринних механізмів його дії.

1. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis / C. Krausz // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2011. – V.25, №2. – P. 271–285.
2. Esteves S. C. Novel concepts in male infertility / S. C. Esteves, A. Agarwal // Int Braz J Urol. – 2011. – V. 37, № 1. – P. 5–15.
3. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience / S. E. Hofherr, A. E. Wictor, B. R. Kipp [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – V. 28, № 11. – P. 1091–1098.
4. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках щурів та стан їх сперматогенного епітелію / Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, А. В. Матвієнко, В. М. Коваленко // Одеський медичний журнал. – 2012. – № 4. – С. 11–14.
5. Shayakhmetova G. M. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide / G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, V. M. Kovalenko // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V. 5, № 1. – P. 9–14.
6. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER [Електронний ресурс]. – режим доступу: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
7. Jochi J. M. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics / J. M. Jochi // Lung India. – 2011. – V. 28, № 3. – P. 193–200.
8. Principles and Methods of Toxicology, 4th edition. / Ed. by A. Wallace Hayes, 2001. – 1887 p.
9. Current Protocols in Toxicology / Ed. by M. Maines, John Wiley & Sons, Inc. – 2005. – P. 2758.
10. Asole A. Effects of ethambutol on the seminal epithelium of the rat and chicken / A. Asole, R. Panu, G. Palmieri // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. – 1976. – V. 52, № 12. – P. 846–848.
11. Chedrese P. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. – Springer, 2009. – 361 p.

А. М. Шаяхметова

Влияние этамбутола на структурно-функциональные показатели гонад и фертильность крыс-самцов

В опытах на белых крысах-самцах показано, что введение этамбутола в терапевтической дозе приводило к морфологическим изменениям в сперматогенном эпителии, уменьшению продукции сперматозоидов (на 67 %) и их жизнеспособности (на 62 %). Нарушения сперматогенеза обуславливали снижение фертильности подопытных самцов на 58 % по сравнению с контролем. У самок, оплодотворенных подопытными самцами, в 2,6 раза снижался показатель плодовитости, а также

повышался уровень доимплантационной и общей смертности эмбрионов. Полученные результаты побуждают к дальнейшим исследованиям, направленным на определение биохимических и/или эндокринных механизмов влияния этамбутола на мужскую репродуктивную функцию, что в дальнейшем позволит обосновать подходы к профилактике его отрицательного влияния на мужские гонады, возможно сопутствующего противотуберкулёзной терапии.

Ключевые слова: этамбутол, фертильность, семенники

G. M. Shayakhmetova

Ethambutol action on structure and functional indices of gonads and male rats fertility

The necessity to minimize adverse effects of tuberculosis chemotherapy requires a comprehensive evaluation of the effects of anti-tuberculosis drugs on the organism. As previously we demonstrated the negative effect of first line anti-tuberculosis drugs co-administration on the rats' male reproductive capability, it was reasonable to investigate the effect of ethambutol on male gonads. The males rats (150–170 g) were divided into two groups: group I – ethambutol (155 mg/kg b.w./day during 60 days) suspended in 1% starch gel per os, group II (control) – received only starch gel in corresponding volumes. Following 46 days of ethambutol repeated administrations, the males from all groups were mated with intact females at the ratio 1 male : 1 female during 14 days. It was shown, that administration of ethambutol in therapeutic dose led to morphological changes in spermatogenic epithelium, decrease of spermatozooids production (by 62 %) and reduction of its vitality (by 67 %). In experimental males sperm resistance to rising concentration of KCl solution was declined by 40 %. Spermatogenesis disorders led to decrease of ethambutol-treated males' fertility by 58 % as compared with control. The index of fertility in females, which were mated with experimental males, was lower at 2.6 times, as well as pre-implantation and total embryos deaths were increased approximately by 42 %. There is a necessity to find out biochemical and/or endocrine mechanisms of ethambutol action on male reproductive function. Future research is needed to expand our understanding of these relationships. This will allow us to ground the approaches to the prevention of ethambutol negative effects on the male gonads, which may accompany anti-tuberculosis treatment.

Key words: ethambutol, fertility, testis

Надійшла: 12.11.2013 р.

Контактна особа: Шаяхметова Ганна Михайлівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник, відділ загальної токсикології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 67 949 45 30.
Електронна пошта: anna_shayakhmetova@yahoo.com