

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034437**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.07

(21) Номер заявки
201792565

(22) Дата подачи заявки
2016.05.26

(51) Int. Cl. **A61K 31/16** (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(54) БИСАМИДНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РЕГЕНЕРАЦИЮ ТКАНЕЙ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ СНИЖЕННЫХ ФУНКЦИЙ ТКАНЕЙ

(31) **2015120055**

(32) **2015.05.27**

(33) **RU**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/RU2016/050015**

(87) **WO 2016/190785 2016.12.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Небольсин Владимир Евгеньевич,
Рыдловская Анастасия
Владимировна, Дыгай Александр
Михайлович, Боровская Татьяна
Геннадьевна, Скурихин Евгений
Германович (RU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

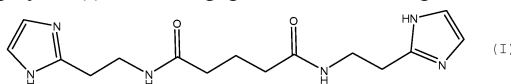
(56) **WO-A1-2014168523**

HOIZUMI M. et al. Diabetes treatment with the aim of blood glucose normalization, Nihon Rinsho, 2012, Vol. 70, no. 8, p. 1445-1450, abstract, [on-line], Retrieved from PubMed, PMID: 22894087

FERRY G. et al. A zinc chelator inhibiting gelatinases exerts potent in vitro anti-invasive effects, European Journal of Pharmacology, 1998, Vol. 351, p. 225-233

PODYMINOGIN M.A. et al. Synthetic RNA-cleaving molecules mimicking ribonuclease A active center. Design and cleavage of tRNA transcripts, Nucleic Acids Research, 1993, Vol. 21, no. 25, p. 5950-5956

(57) Изобретение относится к области медицины и касается средства, стимулирующего регенерацию тканей и восстановление сниженных функций тканей и органов. Указанная ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы. В качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики патологического состояния, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, идиопатический фиброз легкого (ИФЛ), эмфизему легких, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ) и кахексию, в частности, обусловленную нарушением толерантности к глюкозе, легочным фиброзом, хронической обструктивной болезнью легких, раком и другими заболеваниями, предлагается применять средство на основе Треамида. Соединение представляет собой бисамидное производное дикарбонической кислоты формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

**B1****034437****034437****B1**

Область техники

Изобретение относится к области медицины, конкретно к фармакологии, урологии, андрологии, эндокринологии, пульмонологии, гастроэнтерологии, и касается средства, стимулирующего регенерацию тканей и восстановление сниженных функций тканей и органов.

Более конкретно, изобретение относится к способу стимуляции регенерации тканей и восстановления сниженных функций тканей и органов, и еще более конкретно, регенерации и восстановления сниженных функций ткани поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани, ткани предстательной железы.

Изобретение также относится к средству нормализации сниженной мужской фертильности (лечения мужского бесплодия), которая может быть обусловлена такими патологическими состояниями, как гипогонадизм, в частности гипогонадотропный или гипергонадотропный гипогонадизм, астеноспермия, эректильная дисфункция, коррелятивная недостаточность яичек, тестикулярная недостаточность и другие заболевания.

Данное изобретение может быть использовано для лечения и профилактики патологических состояний, выбранных из группы, включающей метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, гепатит, идиопатический фиброз легкого, эмфизему легких, хроническую обструктивную болезнь легких, кахексию, гипогонадизм, предпочтительно гипогонадотропный гипогонадизм или гипергонадотропный гипогонадизм; простатит; доброкачественную гиперплазию предстательной железы, коррелятивную недостаточность яичек и аутоиммунный орхит.

Изобретение также относится к средству для восстановления подвижности сперматозоидов.

Уровень техники

Многие патологические состояния, среди которых метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, гепатит, эмфизема легких, хроническая обструктивная болезнь легких, простатит, доброкачественная гиперплазия простаты, гипогонадизм, тестикулярная недостаточность, астеноспермия, сопровождаются снижением функциональной активности и нарушением структуры тканей пораженных органов.

Метаболический синдром - патологический симптомокомплекс, включающий различные метаболические и гормональные нарушения. Диагноз "метаболический синдром" ставят при наличии центрального ожирения и как минимум двух из далее перечисленных факторов: 1) повышение уровня триглицеридов ≥ 150 мг/дл (1,7 ммоль/л), 2) снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) < 40 мг/дл (1,03 ммоль/л) (мужчины), < 50 мг/дл (1,29 ммоль/л) (женщины), 3) артериальная гипертензия (артериальное давление (АД) $\geq 130/85$ мм рт. ст. или нормальное АД, контролируемое гипотензивными препаратами), 4) повышение уровня глюкозы плазмы ≥ 100 мг/дл (5,6 ммоль/л). Метаболический синдром в настоящее время примерно одинаково часто встречается у мужчин и женщин, его частота, например, в США достигает 39% [Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L., et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000// The Journal of the American Medical Association, 2002, Vol. 288(14), p. 1723-1727].

По данным разных авторов у 30-50% мужчин с ожирением и другими проявлениями метаболического синдрома выявляется гипогонадизм (дефицит тестостерона). Многими исследователями обнаружена не только высокая распространенность гипогонадизма у мужчин с метаболическим синдромом, но и связь между уровнем общего тестостерона в плазме и проявлениями метаболического синдрома. Получены данные как о взаимосвязи между избыточной массой тела и низким уровнем тестостерона, так и о связи между инсулинорезистентностью и снижением содержания тестостерона в сыворотке крови у мужчин с ожирением [Svartberg J., von Muhlen D., Sundsfjord J., et al. Waist circumference and testosterone levels in community dwelling men, The Tromsø study// European Journal of Epidemiology, 2004, Vol. 19(7), p. 657-667]. Снижение содержания тестостерона в сыворотке крови при метаболическом синдроме и состоянии инсулинрезистентности у мужчин происходит вследствие нарушения функциональной активности тестикулярной ткани. В соответствие с этим способы регенерации тестикулярной ткани с целью лечения гипогонадизма как самостоятельного заболевания, так и сопутствующего метаболическому синдрому являются актуальными.

Поджелудочная железа взрослого человека содержит примерно 10^9 клеток. В норме изнашившиеся β -клетки постоянно заменяются новыми, размножающимися в поджелудочной железе (Minami K., Seino S. Current status of regeneration of pancreatic β -cells, Journal of Diabetes investigation, Volume 4, Issue 2, p. 131-141, March 2013). При различных нарушениях работы поджелудочной железы, таких как аутоиммунные или токсические поражения, β -клетки островков Лангерганса сначала характеризуются сниженной функциональной активностью, которая проявляется в снижении продукции инсулина, а на более поздних стадиях погибают. Явные признаки поражения ткани поджелудочной железы появляются, когда разрушено уже больше 90% β -клеток, дефицит инсулина становится постоянным и возникает полная зависимость от вводимого извне инсулина.

Инсулинотерапией не удается достигнуть той степени точности регуляции гликемии, которая обеспечивается при нормальном функционировании островков Лангерганса. Продолжаются попытки лечения

поврежденной поджелудочной железы трансплантацией всего органа, островков Лангерганса, β -клеток. Но трансплантация не всегда проходит успешно (частым является проявление отторжения трансплантата). В случае успешного проведения трансплантации, впоследствии требуется постоянное применение иммунодепрессантов.

Иная проблема - нарушение толерантности к глюкозе. Она представляет собой нарушение метаболического ответа на эндогенный или экзогенный инсулин. Данное состояние приводит к повышенной концентрации инсулина в плазме крови по сравнению с физиологическими значениями для имеющейся концентрации глюкозы.

Наибольшее клиническое значение имеет нарушение толерантности к глюкозе мышечной, жировой и печеночной тканей. Нарушение толерантности к глюкозе мышечной ткани проявляется в снижении поступления глюкозы из крови в миоциты и ее утилизации в мышечных клетках, жировой ткани - в резистентности к антилиполитическому действию инсулина, приводящему к накоплению свободных жирных кислот (СЖК) и глицерина. СЖК поступают в печень, где становятся основным источником образования атерогенных липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Нарушение толерантности к глюкозе ткани печени характеризуется сниженным синтезом гликогена и активацией распада гликогена до глюкозы (гликогенолиз) и синтеза глюкозы *de novo* из аминокислот, лактата, пирувата, глицерина (глюконеогенез). Таким образом, лечение нарушения толерантности тканей к глюкозе позволит восстановить функциональную активность тканей.

Печень - жизненно важная железа организма. Она выполняет около 500 уникальных функций, обеспечивающих процессы пищеварения, инактивацию токсичных веществ, синтез компонентов свертывания крови, метаболизм белков, аминокислот, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот, витаминов, микроэлементов и т.д. Ткань печени часто повреждается химическими, микробными, травматическими, фармацевтическими и другими неблагоприятными факторами. Это приводит к уменьшению количества работоспособных гепатоцитов. Хронический гепатит различной этиологии может длиться многие годы, при этом его часто диагностируют на поздних стадиях развития болезни, когда резко возрастает вероятность развития цирроза печени и хронической печеночной недостаточности [Jung Y.I., Witek R.P., Syn W.K. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors// *Gut*. - 2010. - Vol. 5, p. 655-65].

Известны гепатопротекторы: эссенциале, липоевая кислота, сирепар, альфа-токоферол. Однако эти средства не могут полностью защитить или восстановить нарушенные функции мембран, митохондрий и других структур гепатоцитов, поскольку любой из них влияет лишь на отдельные стадии патогенеза гепатитов. В связи с этим современные гепатопротекторы используются в комплексной терапии. Однако такой подход к лечению гепатитов опасен взаимодействием препаратов вследствие полипрагмазии и осложнением течения заболевания. Одновременно практически все препараты данной группы имеют побочные эффекты, которые ограничивают их применение. В связи с вышесказанным, разработка методов, способных эффективно стимулировать регенерацию печени, остается весьма актуальной.

Одной из самых частых патологий клиники мужского бесплодия являются воспалительные заболевания придаточных половых желез.

К воспалительным заболеваниям придаточных желез относят заболевания предстательной железы, сопровождающихся воспалением, такие как острый бактериальный простатит, хронический бактериальный простатит, ДГПЖ (доброкачественная гиперплазия предстательной железы), а также воспаление семенных пузырьков, такое как острый или хронический везикулит. К заболеваниям предстательной железы относятся также хронический абактериальный простатит, хронический невоспалительный простатит или простатит категории IIIb [Ludwig M., Vidal A., Diemer Th., Pabst W., Failing K., Weidner W. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: seminal markers of inflammation// *World J Urol.*, 2003, Vol. 21, № 2, p. 82-85].

Указанные выше патологии встречаются у 40-70% мужчин. У 40% мужчин с патоспермией наблюдается хронический простатит, который в 80% случаев является абактериальным (Benway B.M., Moon T.D.// *Urol Clin North Am*, 2008, Feb; 35(1):23-32).

Следует отметить, что хронические воспаления предстательной железы очень часто сопровождаются доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ). Наблюдаемая на фоне ДГПЖ гиперпролактинемия приводит к эректильной недостаточности, к олигоспермии. Это, безусловно, снижает мужской репродуктивный потенциал [Johri A.M., Heaton J.P., Morales A. Severe erectile dysfunction is a marker for hyperprolactinemia// *Int J Import Res.*, 2001, Vol. 13, № 3, p. 176-82].

Многие аспекты проявления заболеваний простаты оказывают влияние на качество эякулята, так как предстательная железа выделяет факторы, поддерживающие, прежде всего, подвижность сперматозоидов. В связи с этим на фоне развития заболеваний простаты выявляется коррелятивная недостаточность яичек (вторичное бесплодие). Таким образом, лечение заболеваний предстательной железы благоприятно сказывается на мужской фертильности.

В настоящее время к числу препаратов, оказывающих положительное действие на факторы, сопровождающие течение абактериальных хронических простатитов и ДГПЖ, принадлежат экстракты, выделенные из растительного сырья - Простамол Уно [Bayane C.W., Ross M., Donnelly F., Habib F.K.// *J. Urol.* 2000, Vol. 164, № 3, Pt. 1, p. 876-881]. Однако их эффективность не всегда оказывается достаточно высо-

кой.

К снижению мужской фертильности приводит также угнетение процесса образования андрогенов (гипогонадизм) [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology, 2014, 7].

Мужской гипогонадизм в настоящее время выявлен у 4-5 млн человек. Гипогонадотропный гипогонадизм (или вторичный гипогонадизм) обусловлен недостаточностью гонадотропинов.

Первичный гипогонадизм обусловлен нарушением функции тестикулярной (яичковой) ткани семенника. Его ненаследственные формы (приобретенный гипогонадотропный гипогонадизм) могут быть следствием внешних воздействий, приема лекарственных препаратов (анаболических стероидов, метоклопрамида, фенотиазида, наркотических средств и др.), лучевой терапии [Filicori M. Endocrine basis of reproductive function, Bologna: Monduzzi Editore, 2000. - R 605; Meczekalski B., Tonetti A., Monteleone R et al. Hypothalamic amenorrhea with normal body weight: ACTH, allopregnanolone and cortisol responses to corticotrophin releasing hormone test// Eur. J. Endocrinol. - 2000. - V. 142. - p. 280-285].

Пациентам с вторичным гипогонадизмом назначают тестостерон [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology, 2014, p. 35]. Однако тестостерон имеет много противопоказаний и побочных эффектов.

Известен препарат Трибестан (производитель Sofarma (Болгария)), который стимулирует у мужчин выработку тестостерона и повышает подвижность сперматозоидов, однако эффективность данного препарата не всегда высока.

Гипогонадизм, обусловленный патологией половых желез (гипергонадотропный гипогонадизм или тестикулярная недостаточность), относится к наиболее частой форме снижения мужской фертильности [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology, 2014, p.8].

К числу причин его возникновения относится действие экзогенных факторов, таких как лекарственные препараты, в том числе цитостатические средства, облучение, повышение температуры. Длительное снижение продуктивности сперматогенеза, вплоть до его полной остановки, является следствием повреждения сперматогоний типа А. Восстановление сперматогенеза после повреждения может происходить только за счет этих клеток. Они не теряют специфичность половых клеток, так как необратимо определились как предшественники сперматогенеза, и, как стволовые клетки, обладают способностью к колониообразованию. Эти клетки составляют глубокий резерв регенерационной способности сперматогенной ткани.

Известно, что пролиферативный потенциал сперматогенеза может быть восстановлен за счет трансплантации сперматогенных клеток. Для лекарственной терапии гипергонадотропного гипогонадизма рекомендуется применять тестостерон. Он стимулирует заключительную фазу сперматомейоза, то есть постмитотические деления, приводя тем самым к увеличению количества сперматозоидов и к увеличению продуктивности сперматогенеза за счет стимуляции его конечной фазы. Недостатком этого средства является отсутствие эффективности в отношении стимуляции сперматогоний, которые, как известно, делятся митотически.

Средств медикаментозного лечения мужского бесплодия, обусловленного истощением глубокого резерва регенерационной способности сперматогенной ткани, с восстановлением количества коммитированных колониообразующих сперматогенных клеток, на фармацевтическом рынке не представлено. Предлагаемое в данном изобретении средство восстановления мужской фертильности при тестикулярной недостаточности, обусловленной повреждением стволовых клеток, не имеет аналогов среди существующих средств лечения этой патологии.

Во многих случаях снижение фертильности у мужчин обусловлено нарушением качества спермы. К наиболее частой патологии эякулята относится астеноспермия (Kao S.H. et al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility, Fertil and Steril, 2008; 89: 5: 1183-1190). Нарушение сперматогенеза по типу астеноспермии рассматривают как отдельную нозологическую форму. Она является следствием возрастных изменений, курения, воспаления, дисгормональных расстройств, воздействия токсических веществ, высоких температур. Лечение астеноспермии зависит от причин ее возникновения. В большинстве случаев рекомендуют хориогонический гонадотропин и тестостерон. Однако эти гормональные лекарственные средства вызывают серьезные побочные эффекты и имеют противопоказания.

Для лечения астеноспермии рекомендуется препарат Спеман, который стимулирует сперматогенез и повышает подвижность сперматозоидов. Препарат является дорогостоящим, состоит из сложной композиции лекарственных трав, произрастающих в разных странах мира и имеющих ограниченные сырьевые запасы. В качестве недостатка следует отметить, что он обладает не очень высокой эффективностью.

Эмфизема легких, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и идиопатический фиброз легких (ИФЛ) являются тяжелыми многофакторными легочными расстройствами, у которых хроническое и прогрессирующее течение характерно для пожилых людей (преимущественно для мужчин). Клиническая картина и патогенез ХОБЛ отличается от ИФЛ. Причиной слабо обратимого и прогрессирующего ограничения воздушного потока при ХОБЛ является воспаление дыхательных путей и эмфизематозное расширение альвеол и бронхиол [Hogg J.C., Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmo-

nary disease, *Annu Rev Pathol*, 2009, 4:435-459], в то время как ограничение легочных функций при ИФЛ наступает вследствие развития интерстициального фиброза и формирования сотового легкого [American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement, American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161:646-664]. Распространенность этих двух заболеваний легких совершенно различны. Однако с каждым годом частота и распространенность ИФЛ неуклонно растет, что связано, в том числе, с улучшением диагностических средств. В свою очередь, распространенность ХОБЛ всегда была очень высока. Во многом заболевание связано с вдыханием вредных внешних агентов (в основном в следствие табакокурения).

Несмотря на достаточно большое количество экспериментальных и клинических исследований понимание патогенеза эмфиземы легких и ХОБЛ ограничено, не существует признанных эффективных подходов лечения данного заболевания. Существующий набор лекарственных средств для ИФЛ ограничен глюкокортикоидами, циклофосфамидом, иммунодепрессантами, антикоагулянтами, направлен на лечение осложнений и является по сути своей поддерживающей терапией. В настоящее время только такой терапевтический агент, как пирфенидон, был одобрен для лечения ИФЛ. Между тем, пирфенидон в клинических исследованиях не проявил ожидаемую высокую антифибротическую активность на этапе развернутой стадии болезни. Кроме этого препарат обладает многими побочными эффектами, используется в высоких дозах.

При развитии ИФЛ, ХОБЛ, злокачественных новообразований и многих других хронических заболеваний наблюдается резкая потеря массы тела. Наибольшую опасность представляет крайняя степень истощения - кахексия. Клинически кахексия проявляется чрезмерной потерей веса в условиях протекающего заболевания, обычно с диспропорциональной атрофией скелетных мышц.

При заболеваниях, приводящих к кахексии, наблюдается снижение функциональной активности тестикулярной ткани и, как следствие, снижение уровня тестостерона. Тестостерон стимулирует миобласты и повышает число клеток-сателлитов, тем самым способствуя синтезу белка и восстановлению поврежденных мышц [Bhasin S., Taylor W.E., Singh R. et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol Med Sci*, 2003; 58A:M1103-1110]. Также тестостерон подавляет синтез провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, TNF α и стимулирует продукцию противовоспалительного цитокина - IL-10. С воспалением связывают крайнюю степень истощения при различных заболеваниях. Медиаторы воспаления препятствуют синтезу мышечных белков при кахексии, участвуют в липолизе и бета-окислении жирных кислот [Ryden M., Arvidsson E., Blomqvist L., Perbeck L., Dicker A., Arner P. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 318:168-175].

К сожалению, до сих пор не существует единого признанного подхода к лечению кахексии. Известны многочисленные попытки коррекции этого состояния. Терапия пациентов с выраженной потерей массы тела включает препараты тестостерона, гормоны роста (соматропин), стимуляторы аппетита (антагонисты серотонина, прогестагены, дронабинол) и ингибиторы глюконеогенеза (гидразина сульфат), однако их эффективность недостаточна.

Таким образом, задачей данного изобретения является разработка средства регенерации и восстановления сниженных функций тканей. Такое средство будет, в частности, способствовать лечению нарушений толерантности к глюкозе, гепатита, эмфиземы легкого, хронической обструктивной болезни легких, идиопатического фиброза легких, кахексии, а также способствовать восстановлению мужской репродуктивной функции и позволит преодолеть недостатки известных средств, описанных выше.

Более конкретно, первой задачей настоящего изобретения является разработка средства, которое способствует регенерации тканей, в частности тканей поджелудочной железы, печени, легкого, тестикулярной ткани, ткани предстательной железы, мышечной ткани. В частности, средство по изобретению должно способствовать регенерации тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства снижения уровня глюкозы в крови, повышение которого обусловлено, в частности, такими патологическими состояниями, как метаболический синдром или нарушение толерантности к глюкозе.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства восстановления функции печени, снижение которой обусловлено, в частности, такими патологическими состояниями, как хронический гепатит различной этиологии.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства нормализации сниженной мужской половой активности, обусловленной, в частности, такими патологиями, как гипогонадизм, коррелятивная недостаточность яичек, тестикулярная недостаточность.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства восстановления сперматогенеза (в том числе подвижности сперматозоидов), снижение которого обусловлено, в частности, такими патологиями, как метаболический синдром, простатит, гипогонадизм, астеноспермия, тестикулярная недостаточность, и другими заболеваниями.

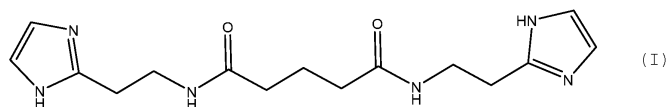
Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства восстановления нарушенной гистоархитектоники и функций легочной ткани, обусловленной, в частности, такими патология-

ми, как эмфизема, идиопатический фиброз легкого и хроническая обструктивная болезнь легких.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства восстановления структуры и функции печени.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства для восстановления структуры и функции поджелудочной железы, обусловленной такими заболеваниями, как метаболический синдром и нарушение толерантности к глюкозе.

Поставленные задачи решаются тем, что в качестве лекарственного средства для лечения и/или профилактики вышеуказанных патологических состояний предлагается применять средство на основе Треамида. Последний представляет собой бисамидное производное дикарбоновой кислоты формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль.

Данное соединение было описано в заявке RU 2013116822 (опубл. 20.10.2014), посвященной новым соединениям, пригодным для использования в качестве хелаторов металлов, в том числе и для лечения ассоциированных с хелатированием металлов заболеваний.

Заявителем впервые обнаружено, что Треамид обладает способностью эффективно регенерировать ткани и восстанавливать их сниженную функцию, в частности это касается тканей мужской половой системы. Треамид уменьшает степень выраженности морфологических изменений предстательной железы при абактериальном простатите и ДГПЖ, восстанавливает подвижность сперматозоидов, усиливает половое влечение и копулятивную активность, что, в совокупности, ведет к восстановлению мужской репродуктивной функции.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - морфологическая картина поджелудочной железы у мышей-самцов линии C57B1/6 интактного контроля, на 70 сутки метаболических нарушений без лечения (патологический контроль) и 70 сутки метаболических нарушений с проведенным курсом лечения Треамидом в дозе 10 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином.

А: треамид в дозе 10 мг/кг ($\times 100$); В: интактный контроль ($\times 100$); С: патологический контроль ($\times 100$); D: треамид в дозе 10 мг/кг ($\times 400$); E: интактный контроль ($\times 100$); F: интактный контроль ($\times 400$).

Фиг. 2 - морфологическая картина поджелудочной железы у мышей самцов линии C57B1/6 интактного контроля, на 70 сутки метаболических нарушений без лечения (патологический контроль) и 70 сутки метаболических нарушений с проведенным курсом лечения Треамидом в дозе 10 мг/кг. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону.

А: треамид в дозе 10 мг/кг ($\times 100$); В: интактный контроль ($\times 100$); С: патологический контроль ($\times 100$); D: треамид в дозе 10 мг/кг ($\times 400$); E: интактный контроль ($\times 400$); F: патологический контроль ($\times 400$).

Фиг. 3 - морфологическая картина печени у мышей линии C57B1/6 группы интактного контроля, группы патологического контроля хронического токсического гепатита и группы животных, получающих лечение Треамидом в дозе 10 мг/кг, увеличение $\times 100$, препараты изготовлены на 28 сутки исследования.

А, В, С - окраска гематоксилин и эозином, D, E, F - окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. А, D - интактный контроль, В, E - патологический контроль, С, F - животные с гепатитом, получившие лечение Треамидом в дозе 10 мг/кг.

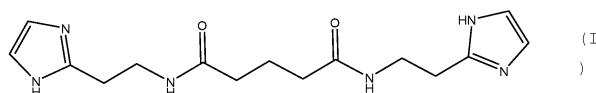
Фиг. 4 - морфологическая картина легких у мышей-самок линии C57B1/6 группы интактного контроля, группы патологического контроля мышей с эмфиземой на 14 и 30 сутки и группы животных, получающих лечение Треамидом в дозе 10 мг/кг, на 30 сутки. Увеличение $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином.

Интактный контроль: А - верхушка легкого, В - среднее легочное поле и С - нижнее легочное поле. Патологический контроль (14 сутки): D - верхушка легкого, E - среднее легочное поле и F - нижнее легочное поле. Патологический контроль (30 сутки): H - верхушка легкого, K - среднее легочное поле и L - нижнее легочное поле. Группа животных, получившая лечение Треамидом: M - верхушка легкого, N - среднее легочное поле и O - нижнее легочное поле.

Фиг. 5 - морфологическая картина легких мышей-самцов линии C57BL/6 интактного контроля (А), патологического контроля (В) и группы мышей с легочным фиброзом, получивших лечение Треамидом в дозе 10 мг/кг (С). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (увеличение $\times 100$), препараты изготовлены на 21 сутки эксперимента.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель для регенерации тканей. При этом ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

Настоящее изобретение также относится к способу регенерации тканей, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Далее, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для регенерации тканей. При этом ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы. Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения патологических состояний, связанных с нарушениями структуры тканей, где патологическое состояние выбрано из группы, включающей метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, гепатит, в частности хронический гепатит и токсический гепатит, идиопатический фиброз легкого (ИФЛ), эмфизему легких, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), и кахексию, в частности, обусловленную нарушением толерантности к глюкозе, идиопатическим легочным фиброзом, хронической обструктивной болезнью легких, раком, и другими заболеваниями. В другом варианте заболевание представляет собой гипогонадизм и ассоциированное с ним нарушение эректильной дисфункции и/или либидо, простатит и ассоциированное с ним нарушение эректильной дисфункции и/или либидо, доброкачественную гиперплазию предстательной железы, коррелятивную недостаточность яичек, аутоиммунный орхит, где гипогонадизм предпочтительно представляет собой гипогонатропный гипогонадизм или гипергонадотропный гипогонадизм. Простатит может представлять собой абактериальный, аутоиммунный простатиты или простатит категории Б.

Настоящее изобретение также относится к способу нормализации сниженной мужской фертильности, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Настоящее изобретение далее относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для нормализации сниженной мужской фертильности. Снижение мужской фертильности в предпочтительном варианте обусловлено патологическим состоянием, включающим гипогонадизм, предпочтительно гипогонатропный гипогонадизм или гипергонадотропный гипогонадизм; астеноспермию, эректильную дисфункцию, коррелятивную недостаточность яичек, тестикулярную недостаточность и другие заболевания. Снижение мужской фертильности может быть также обусловлено угнетением копулятивной активности и либидо, которые, в частности, могут быть спровоцированы заболеваниями, перечисленными выше.

Изобретение далее относится к способу восстановления подвижности сперматозоидов, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления подвижности сперматозоидов, где такое снижение может быть обусловлено гипогонадизмом, астеноспермией, коррелятивной недостаточностью яичек, тестикулярной недостаточностью. Также снижение подвижности может быть обусловлено угнетением копулятивной активности и либидо разной этиологии.

Также изобретение относится к способу снижения уровня глюкозы в крови в лечении и/или профилактике патологического состояния, включающему введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. При этом патологическое состояние может быть выбрано из группы, включающей метаболический синдром и нарушение толерантности к глюкозе. Также изобретение относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для снижения уровня глюкозы в крови.

Также изобретение относится к фармацевтической композиции для восстановления структуры и функции печени в лечении и/или профилактике патологического состояния, включающей эффективное количество соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для восстановления структуры и функции печени, представляющему собой соединение формулы (I). При этом патологическое состояние может быть выбрано из группы, включающей гепатит, в частности хронический гепатит и токсический гепатит. Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления функции печени.

Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для восстановления структуры и функции легкого в лечении и/или профилактике патологического состояния, включающая эффективное количество соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемый носитель. При этом патологическое состояние может быть выбрано из группы, включающей хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), эмфизему легких, и идиопатический

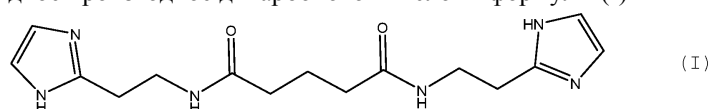
фиброз легкого. Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для восстановления структуры и функции легкого, представляющему собой соединение формулы (I). Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления структуры и функции легкого.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для восстановления структуры и функции поджелудочной железы в лечении и/или профилактике патологического состояния, включающей эффективное количество соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель. При этом патологическое состояние может быть выбрано из группы, включающей метаболический синдром и нарушение толерантности к глюкозе.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к средству стимуляции регенерации тканей и восстановления сниженных функций тканей и органов, и еще более конкретно, регенерации и восстановления сниженных функций ткани поджелудочной железы, печени, легкого, мышечной ткани, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани, ткани предстательной железы.

Объектом настоящего изобретения является средство, которое способствует регенерации тканей, в частности тканей, участвующих в функционировании мужских половых желез. Данное средство представляет собой бисамидное производное дикарбоновой кислоты формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль, известное также под названием Треамид.

В качестве фармацевтически приемлемых солей соединения формулы (I) по настоящему изобретению могут быть использованы кислотно-аддитивные соли органических кислот (например, формиат, ацетат, малеат, тартрат, метансульфонат, бензолсульфонат, толуолсульфонат и др.), кислотно-аддитивные соли неорганических кислот (например, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат и др.), соли с аминокислотами (например, соль аспарагиновой кислоты, соль глутаминовой кислоты и т.д.), предпочтительно хлоргидраты и ацетаты.

Заявителем впервые обнаружено, что треамид обладает способностью эффективно регенерировать ткани и восстанавливать сниженную функцию тканей, в частности это относится к тканям, участвующим в функционировании мужских половых желез.

К тканям, участвующим в функционировании мужских половых желез, относятся различные виды эпителиальных тканей, в частности эпителий семенных извитых канальцев (тестикулярная ткань), эпителий (ацинусов) структурных единиц простаты (ткань простаты), а также различные виды соединительных тканей.

Заявителем также было обнаружено, что Треамид эффективно нормализует сниженную мужскую половую активность, обусловленную, в частности, такими патологиями, как гипогонадизм, коррелятивная недостаточность яичек, тестикулярная недостаточность.

Заявителем также было обнаружено, что Треамид эффективно восстанавливает подвижность сперматозоидов, нарушение которой обусловлено, в частности, такими патологиями, как простатит, гипогонадизм, астеноспермия, коррелятивная недостаточность яичек, тестикулярная недостаточность.

Соединение формулы (I) вводят в эффективном количестве, которое обеспечивает желаемый терапевтический результат.

Соединение формулы (I) может быть введено перорально, местно, парентерально, интраназально, ингаляционно и ректально в виде стандартных дозированных форм, содержащих нетоксичные фармацевтически приемлемые носители. Используемый в настоящем описании термин "парентеральное введение" означает подкожные, внутривенные, внутримышечные или внутривидные инъекции или вливания.

Соединение формулы (I) настоящего изобретения может быть введено пациенту в дозах, составляющих от 0,1 до 100 мг/кг веса тела в день, предпочтительно в дозах от 0,0,1 до 25 мг/кг один или более раз в день.

При этом следует отметить, что конкретная доза для каждого конкретного пациента будет зависеть от многих факторов, включая активность данного используемого соединения, возраст, вес тела, пол, общее состояние здоровья и режим питания пациента, время и способ введения лекарственного средства, скорость его выведения из организма, конкретно используемую комбинацию лекарственных средств, а также тяжесть заболевания у данного индивида, подлежащего лечению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат соединение формулы (I) в количестве, эффективном для достижения желаемого результата, и могут быть введены в виде стандартных дозированных форм (например, в твердой, полутвердой или жидкой форме), содержащих соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента в смеси с носителем или наполнителем, пригодным для внутримышечного, внутривенного, перорального, сублингвального, ингаляционного, интраназального и интаректального введения. Активный ингредиент может быть включен в композицию вместе с обычно используемыми нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями, при-

годными для изготовления растворов, таблеток, пилюль, капсул, драже, эмульсий, суспензий, мазей, гелей и любых других лекарственных форм.

В качестве наполнителей могут быть использованы различные вещества, такие как сахараиды, например глюкоза, лактоза или сахароза, маннит или сорбит, производные целлюлозы и/или фосфаты кальция, например трикальций фосфат или кислый фосфат кальция, в качестве связующего компонента могут быть использованы такие, как крахмальная паста, например кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон. При необходимости могут быть использованы разрыхляющие агенты, такие как вышеупомянутые крахмалы и карбоксиметилкрахмал, поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Могут быть использованы необязательные добавки, такие как агенты, регулирующие текучесть, и смазывающие агенты, такие как диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и ее соли, такие как стеарат магния или стеарат кальция, и/или пропиленгликоль. Ядро драже обычно покрывают слоем, который устойчив к действию желудочного сока. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахаридов, которые могут необязательно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, и подходящие органические растворители или их смеси.

В качестве добавок могут быть также использованы стабилизаторы, загустители, красители и отдушки.

В качестве мазевой основы могут быть использованы углеводородные мазевые основы, такие как вазелин белый и желтый (*Vaselinum album*, *Vaselinum flavum*), вазелиновое масло (*Oleum Vaselini*), мазь белая и жидкая (*Unguentum album*, *Unguentum flavum*), а в качестве добавок для придания более плотной консистенции - такие как твердый парафин и воск; абсорбтивные мазевые основы, такие как гидрофильный вазелин (*Vaselinum hydrophylicum*), ланолин (*Lanolinum*), кольдкрем (*Unguentum leniens*); мазевые основы, смываемые водой, такие как гидрофильная мазь (*Unguentum hydrophylum*); водорастворимые мазевые основы, такие как полиэтиленгликолевая мазь (*Unguentum Glycolis Polyaehtyleni*), бентонитовые основы и другие.

В качестве основы для гелей могут быть использованы метилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, оксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль или полиэтиленоксид, карбопол.

В качестве основы для суппозитория могут быть использованы основы, не растворимые в воде, такие как масло какао; основы, растворимые в воде или смешиваемые с водой, такие как желатино-глицериновые или полиэтиленоксидные; комбинированные основы - мыльно-глицериновые.

При приготовлении стандартной дозированной формы количество активного ингредиента, используемого в комбинации с носителем, может варьироваться в зависимости от реципиента, подвергающегося лечению, от конкретного способа введения лекарственного средства.

Так, например, при использовании соединений настоящего изобретения в виде растворов для инъекций содержание активного агента в них составляет до 5 мас.%. В качестве разбавителей могут быть использованы 0,9% раствор хлорида натрия, дистиллированная вода, раствор новокаина для инъекций, раствор Рингера, раствор глюкозы, специфические добавки для растворения.

При введении в организм соединений настоящего изобретения в виде таблеток и суппозитория их количество составляет до 200 мг на стандартную лекарственную форму.

Дозированные формы настоящего изобретения получают по стандартным методикам, таким как, например, процессы смешивания, гранулирования, формирование драже, растворение и лиофилизация.

Далее эффективность Треамида подтверждена в представленных экспериментальных примерах, предназначенных для иллюстрации реализации изобретения и не ограничивающих его объем.

Все данные, полученные в экспериментальных исследованиях, были обработаны статистически с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни. В исследованиях считали достоверным уровень значимости 0,05.

Пример 1. Исследование эффективности Треамида по восстановлению подвижности сперматозоидов при астеноспермии.

Астеноспермию моделировали путем использования препарата этопозид, обладающего выраженными прооксидантными свойствами. Использование препарата, индуцирующего повышение уровня свободных радикалов, обусловлено тем, что согласно современным представлениям непосредственной причиной астеноспермии является окислительный стресс (Kao S.H. et al. Increase of oxidativestress in human sperm with lower motility, *Fertil and Steril*, 2008; 89: 5: 1183-1190).

Треамид вводили ежедневно внутривентально один раз в сутки в дозе 5 мг/кг лечебным курсом (в течение 10 дней после введения этопозид) и лечебно-профилактическим курсом (в течение 5 дней до и 5 дней после введения этопозид) крысам-самцам, имеющим пониженную подвижность зрелых спермиев.

Эксперименты проводили на 50 крысах-самцах породы Вистар (возраст - 3 мес). Этопозид вводили однократно внутривенно в максимально переносимой дозе - 30 мг/кг.

Эффективность треамида оценивали по проценту подвижных форм сперматозоидов, выделенных из придатка семенника.

В первой серии результаты исследований сравнивали с таковыми при введении препарата сравне-

ния Спеман, который вводили внутривенно в дозе 140 мг/кг.
Результаты исследований представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Количество подвижных спермиев (в %) у животных, получавших треамид за 5 дней до и 5 дней (лечебно-профилактический курс) после введения этопозид

№	Фон	Контроль	Треамид 5,0 мг/кг	Спеман
1	87,37	75,58	74,67	78,04
2	94,74	66,54	85,26	74,67
3	96,84	70,11	77,42	78,15
4	83,12	63,06	79,09	66,67
5	91,35	58,95	82,72	70,18
X±m	90,68±2,48	66,85±2,86 #	79,83±1,88#*◇	73,54±2,25 #*

Примечания: здесь и далее:

- различия достоверны по сравнению с фоном;

* - различия достоверны по сравнению с контролем;

◇ - различия достоверны по сравнению с препаратом сравнения.

Таблица 2

Количество подвижных спермиев (в %)

Название группы № самца	Фон	Контроль	Треамид 5,0 мг/кг в течение 10 дней после введения этопозид
1	78,10	60,26	65,52
2	74,42	53,79	75,34
3	75,90	57,58	74,55
4	73,63	52,98	69,44
5	79,66	54,38	70,20
M±m	76,34±1,13	55,80±1,36 #	71,01±1,80*

Представленные экспериментальные данные показали, что на 5 и 10 день после введения Этопозид (контроль) процент подвижных спермиев достоверно снижался и составлял -73-74% от фоновых значений. В каждой из серий эксперимента процент подвижных спермиев на фоне введения Треамида достоверно возрастал по сравнению с контролем (Этопозид), в первой серии - еще и по сравнению с препаратом Спеман. Во второй серии эксперимента процент подвижных спермиев в опытных группах не отличался от такового у интактных животных (фон). Полученные данные свидетельствуют о том, что Треамид является эффективным средством восстановления подвижности сперматозоидов.

Пример 2. Исследование эффективности Треамида по восстановлению подвижности сперматозоидов при гипогонадотропном гипогонадизме.

Гипогонадотропный гипогонадизм моделировали введением синестрола. Эстрогены способны ингибировать секрецию ЛГ (лютеинизирующий гормон) и ФСГ (фолликулостимулирующий гормон). Повышение концентрации эстрогенов в мужском организме сопровождается увеличением содержания секстероидсвязывающих глобулинов, что ведет к снижению концентрации свободного тестостерона и возникновению астеноспермии.

Эксперименты проводили на 36 крысах породы Вистар (возраст 3 мес.). В течение 30 дней после начала эксперимента всем крысам-самцам (кроме группы фон) внутримышечно вводили Синестрол в дозе 50 ЕД/кг/сут. Далее с 31 по 45 дни опыта животным опытной группы, кроме Синестрола, внутривенно вводили Треамид в дозе 0,5 мг/кг или препарат сравнения Трибестан в дозе 70 мг/кг. Оценку эффективности Треамида проводили по количеству подвижных форм спермиев (проценту подвижных форм сперматозоидов), выделенных из придатка семенника. Результаты исследований сравнивались с таковыми при введении Синестрола (контроль) и препарата сравнения трибестан.

Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Количество подвижных спермиев (в %)

№	Фон	Контроль	Треамид	Трибестан
1	85,43	0,00	72,63	0,00
2	83,69	53,06	66,67	0,00
3	85,26	55,97	66,99	60,21
4	74,72	58,87	85,55	50,00
5	77,66	21,43	68,08	57,53
6	87,64	65,91	67,04	0,00
7	80,22	47,22	56,84	44,93
8	80,89	50,00	78,65	67,04
9	75,26	64,93	59,09	9,09
X±m	81,20±1,55	46,38±7,27 #	69,06±2,98#*◇	32,09±9,69#

Примечание:

- различия достоверны по сравнению с фоном;

* - различия достоверны по сравнению с контролем;

◇ - различия достоверны по сравнению с препаратом сравнения.

Представленные экспериментальные данные показывают, что процент подвижных форм сперматозоидов у интактных крыс составил 81,20±1,55, что соответствует видовой норме. Введение Синестрола животным (контрольная группа) привело к достоверному снижению количества подвижных форм сперматозоидов до 46,38±7,27%, что составило 57% от фона. В группе экспериментальных животных этот показатель статистически значимо превышал контрольные значения на 49%. Трибестан эффекта не оказал.

Таким образом, треамид эффективно восстанавливает подвижность сперматозоидов при гипогонадотропном гипогонадизме.

Пример 3. Исследование эффективности Треамида по восстановлению копулятивной активности.

Снижение копулятивной активности, обусловленной андрогенной недостаточностью, моделировали путем введения крысам-самцам синестрола.

Модель основана на антагонизме андрогенных и эстрогенных гормонов. Введение синестрола крысам-самцам приводит к угнетению половой активности животных.

Эксперименты проводили на 36 крысах породы Вистар (возраст 3 мес.). В течение 30 дней после начала эксперимента всем крысам-самцам (кроме интактной группы (фон)) внутримышечно вводили синестрол в дозе 50 ЕД/кг/сут. Далее с 31 по 45 дни опыта животным опытных групп, кроме синестрола, внутривенно вводили Треамид в дозе 1,5 мг/кг и препарат сравнения Трибестан в дозе 70 мг/кг. Оценку половой активности проводили в тесте парного полового поведения. Для этого в эксперименте использовали крыс-самок, находившихся в стадии эструса, который вызывали предварительным 4-кратным введением синестрола. Эффективность треамида оценивали по показателям: латентный период первой попытки к спариванию (ЛППС), количество попыток к спариванию (садок), количество эякуляций. Полученные данные сравнивали с таковыми у этих же животных до начала опыта (первое тестирование) и с таковыми в контроле (второе тестирование). Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние Треамида на показатели полового поведения крыс-самцов, получавших синестрол

№	Первое тестирование			Второе тестирование		
	ЛППС, сек	количество о садок, абс.	Эякулирующие животные в %	ЛППС, сек	количество садок, абс.	Эякулирующие животные в %
Фон	145,89±84,42	4,56±0,71	22,22%	84,67±34,91	9,22±1,19	44,44
Контроль	387,78±122,24#	7,11±2,86	0,00%#	234,44±55,69#	5,00±1,46#	0,00#
Треамид 1,5	373,89±112,89#	5,89±1,91	0,00%#	381,22±115,18#	8,00±3,12	◇ 44,44*
Трибестан	425,67±123,67#	5,00±1,56	0,00%#	381,89±123,85#	5,00±1,41#	◇ 22,22*

Примечание:

- различия достоверны по сравнению с фоном при P ≤ 005 при сравнении в одном тестировании;

* - различия достоверны по сравнению с контролем при P ≤ 005 при сравнении в одном тестировании;

◇ - различия достоверны при P ≤ 005 внутри группы при сравнении первого и второго тестирований.

Представленные экспериментальные данные показали, что крысы-самцы, получавшие только Синестрол, характеризовались отсутствием эякуляций, возрастанием ЛППС. У животных, получавших Треамид, эякуляции выявлялись в 44% случаях (так же, как и у интактных животных). Их количество превышало контрольные значения и таковые у этих же животных при первом тестировании. Кроме того, коли-

чество попыток к спариванию в опытной группе восстанавливалось до контрольного уровня. Эффективность препарата сравнения Трибестан была выражена в меньшей степени. Таким образом, лекарственное средство Треамид эффективно восстанавливает копулятивную активность у животных, находящихся в условиях андрогенной недостаточности.

Пример 4. Исследование эффективности Треамида по восстановлению копулятивной функции и половой мотивации, сниженных возрастными изменениями, у крыс-самцов.

Эректильную дисфункцию моделировали путем использования животных позднего и старческого репродуктивного возраста (14-19 мес.). Угнетение половой мотивации моделировали использованием животных позднего репродуктивного возраста (14 мес.).

Эксперименты по изучению влияния Треамида на копулятивную активность проведены на 76 крысах породы Вистар (возраст 14, 19 мес.). Треамид вводили внутривенно, в течение 14 дней в дозе 5 мг/кг. Препарат сравнения Силденафил (100 мг, PFIZER PGM, Франция) также вводили внутривенно, что соответствует клиническому применению в дозе 3 мг/кг два раза в неделю. Оценку половой активности проводили в тесте парного полового поведения. Для этого в эксперименте использовали крыс-самок, находившихся в стадии эструс, который вызывали предварительным 4-кратным введением синестрола. Эффективность Треамида оценивали по показателям: латентный период первой попытки к спариванию (ЛППС), количество попыток к спариванию (КС), количество эякуляций (КЭ). Полученные данные сравнивали с таковыми у этих же животных до введения Треамида и с таковыми в контроле (второе тестирование).

Эксперименты по изучению влияния Треамида на половую мотивацию проведены на 40 крысах-самцах породы Вистар (возраст 14 мес.). В качестве экспериментальной модели сексуального влечения крыс была использована модель, предназначенная для целенаправленного поиска новых средств терапии этой патологии [Xi Chu, Ekaterina S. Zhavbert, Julia L. Dugina, Irina A. Kheyfets, Svetlana A. Sergeeva, Oleg I. Epstein, Anders Agmo Sildenafil and a compound stimulating endothelial NO synthase modify sexual incentive motivation and copulatory behavior in male wistar and fisher 344// J Sex Med. - 2008. - 5. - p. 2085-2009]. Эта модель основана на том, что крысы являются общественными животными и стремятся не только к сексуальным, но и к социальным контактам. Определение половой мотивации предполагает определение времени нахождения возле сексуального стимула и балла предпочтения у животных без непосредственных контактов с "социальным" и "сексуальным" стимулами. В качестве сексуального стимула использовали самку, находившуюся в стадии эструс, социального - самца.

Результаты исследований по изучению влияния Треамида на копулятивное поведение и половую мотивацию, проведенных на животных позднего репродуктивного и старческого возраста, представлены в табл. 5-8.

Таблица 5

Показатели копулятивного поведения крыс-самцов позднего репродуктивного возраста (14 мес.)

Возраст животных (месяцы)	Группа	1 тестирование -до введения препаратов		
		ЛППС	КС	КЭ
3	Фон	166,00±26,41	7,25±1,22	0,25±0,16
14	Контроль	592,83±87,68 #	1,50±0,53 #	0,00±0,00 #
	Треамид (5 мг/кг)	559,08±93,55#	1,42±0,50 #	0,00±0,00 #
	Силденафил (3 мг/кг)	610,08±88,34 #	1,58±0,56 #	0,00±0,00 #

Таблица 6

Показатели копулятивного поведения крыс-самцов позднего репродуктивного возраста после введения Треамида (14 мес.)

Возраст животных (месяцы)	Группа	2 тестирование- После 14-дневного курса введений		
		ЛППС	КС	КЭ
3	Фон	155,88±32,66	11,25±1,88	0,25±0,16
14	Контроль	455,91±92,22 #	3,36±0,75 #	0,00± 0,00 #
	Треамид (5 мг/кг)	364,80±127,66	6,90±1,88 ◇	0,60± 0,22 ◇ *
	Силденафил (3 мг/кг)	171,09±78,08 ◇*	6,27± 1,27 ◇ #	0,00± 0,00 #

Примечания:

ЛППС - латентный период первой садки;

КС - количество садок;

КЭ - количество эякуляций;

- различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни);* - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни);◇ - различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные в табл. 5 и 6 данные показали, что у крыс позднего репродуктивного возраста наблюдается снижение показателей половой активности (увеличение латентного времени первой садки, снижение количества садок, эякулирующие животные не выявлялись, табл. 5). У животных, получавших Треамид, достоверно сокращалось латентное время первой садки, увеличивалось количества садок, выявлялись эякулирующие животные (табл. 6). Введение Силденафила улучшало половую активность животных, но в меньшей степени: латентный период первой садки снижался, количество садок возрастало, но эякулирующие животные не выявлялись.

Таким образом, треамид является эффективным средством восстановления копулятивной активности у животных позднего репродуктивного возраста.

Результаты исследований, проведенных на животных предстарческого возраста (19 мес.), представлены в табл. 7.

Таблица 7

Показатели копулятивного поведения крыс-самцов предстарческого возраста (19 мес.) до введения и после 14-дневного введения Треамида

Возраст животных (месяцы)	Название группы	1 тестирование (до введения препаратов)			2 тестирование (после 14-дневного курса введений)		
		ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЭ (абс.)	ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЭ (абс.)
3	Фон	134,80±28,31	8,90±1,66	0,44±0,18	66,70±10,56	10,20±1,58	0,20±0,13
19	Контроль	318,55± 100,11 #	4,00± 0,83 #	0,00± 0,00 #	283,91± 106,39	6,09±1,52	0,00±0,00 #
	Треамид (5,0 мг/кг)	310,27± 94,59 #	4,27± 1,04 #	0,00± 0,00 #	297,20± 117,04	7,90± 1,45 ◇	0,20±0,13 ◇ *

Примечания:

ЛППС - латентный период первой садки;

КС - количество садок;

КЭ - количество эякуляций;

- различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни);* - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни);◇ - различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием ($p<0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные в табл. 7 данные показывают, что у животных контрольной группы оказалось повышенным латентное время первой садки, снижались количества садок, эякулирующие животные отсутствовали. После 14-дневного введения Треамида в дозе 5 мг/кг отмечалось достоверное возрастание количества садок, выявлялись эякулирующие животные.

Таким образом, проведенное исследование показало, что треамид при введении в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней приводит к восстановлению копулятивной активности крыс позднего и предстарческого

возраста.

Таблица 8
Показатели сексуальной мотивации крыс-самцов позднего репродуктивного возраста до введения и после 14-дневного введения Треамида

Возраст животных (месяцы)	Группа	2 тестирование – после введения исследуемого вещества					
		А, сек	Б, сек	ВП, усл. ед.	А, сек	Б, сек	ВП, усл. ед.
3	Фон	240,10±26,38	85,30±25,78	0,74±0,07	261,60±36,58	64,00±7,32	0,77±0,04
14	Контроль	106,92±21,20 #	113,75±25,31	0,48±0,07 #	157,73±46,24 #	170,00±42,18 #	0,49±0,09 #
	Треамид (5 мг/кг)	132,30±23,69 #	113,60±13,77	0,51±0,06 #	154,00±41,83 #	95,60±29,66	0,64±0,09
	Силденафил (3 мг/кг)	166,83±26,27 #	113,58±22,60	0,59±0,06 #	143,18±48,64 #	231,18±62,80 #	0,41±0,12 #

Примечания:

1 - А - время нахождения в зоне "сексуального" стимула,

2 - Б - время нахождения в зоне "социального" стимула,

3 - балл предпочтения = $\frac{A}{A-B} \times 100$,

4 - КК - количество пересеченных квадратов,

5 - # - различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),

6 - * - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),

7 - ◊ - различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные в табл. 8 данные показывают, что время нахождения возле сексуального стимула и балл предпочтения в контроле оказались сниженными по сравнению с таковыми у интактных животных (первое тестирование). Полученные данные свидетельствуют о том, что в контроле получена модель угнетения половой мотивации, обусловленная использованием 14-месячных животных. Это позволяет проводить тестирование лекарственного средства.

Определение времени нахождения исследуемых крыс-самцов в зоне сексуального стимула и подсчет балла предпочтения до начала эксперимента показали, что значения этих показателей в опыте и контроле достоверно не отличались друг от друга. Это подтверждает корректность проведенной рандомизации и тот факт, что крысы-самки не избегали самцов и были к ним восприимчивы.

При анализе средних показателей времени нахождения интактных крыс-самцов (фон) в зонах социального и сексуального стимулов и балла предпочтения, полученных при первом и втором тестировании, выявлено, что они статистически значимо не отличались друг от друга. Это свидетельствует о стабильности мотивационного поведения крыс-самцов, взятых в эксперимент, и подтверждает данные литературы о том, что сексуальная мотивация остается на одном и том же уровне в течение определенного периода времени (до 55 суток).

Анализ исследуемых показателей первого и второго тестирования крыс контрольной группы показал, что уровень сексуальной мотивации животных остается неизменен.

При введении Треамида в дозе 5 мг/кг время нахождения возле "сексуального" стимула возрастало по сравнению с таковым у этих же животных до введения лекарственного средства. Одновременно с этим снижалось (в 2 раза) по сравнению с контролем время пребывания в зоне "социального" стимула. Балл предпочтения статистически значимо возрастал по сравнению с таковым при первом тестировании и достигал 0,64±0,09. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение Треамида в дозе 5 мг/кг оказывает стимулирующее влияние на сексуальную мотивацию крыс-самцов позднего репродуктивного периода. Следует отметить, что балл предпочтения в этой группе крыс статистически значимо не отличался от такового у интактных крыс, т.е. у "молодых" животных.

В группе крыс, которым вводили препарат сравнения Силденафил (3 мг/кг), среднее значение времени пребывания у самки не возрастало. Однако при этом увеличивалось время пребывания около социального стимула. Балл предпочтения практически не отличался от исходного уровня. Это свидетельствует о том, что Силденафил не оказывал влияние на половую мотивацию крыс-самцов.

Таким образом, тестирование Треамида в качестве стимулятора половой мотивации крыс-самцов зрелого репродуктивного возраста (14 месяцев) показало, что субстанция стимулирует половую мотивацию животных позднего репродуктивного возраста. Действие проявляется в дозе 5 мг/кг, оптимальный срок терапии - 14 дней.

Препарат сравнения Силденафил в тесте на половую мотивацию не проявил свою активность. В тесте на копулятивную активность его эффекты оказались недостаточно выраженными и кратковременными.

Пример 5. Исследование эффективности Треамида по восстановлению копулятивной активности крыс-самцов интактных животных, находящихся в условиях сезонного угнетения копулятивной активности

Сезонное угнетение репродуктивной активности моделировали проведением экспериментов в зимний период (конец декабря). В качестве фоновой группы использовались интактные животные (возраст 3 мес.), протестированные в июне месяце.

Эксперименты проведены на 27 крысах-самцах репродуктивного возраста (3 мес.) породы Вистар. Треамид в дозе 5 мг/кг и препарат сравнения Силденафил в дозе 3 мг/кг 2 раза в неделю вводили внутривенно 1 раз в сутки в течение 15 дней. Оценку половой активности проводили в тесте парного полового поведения. Тестирование проводили дважды: до начала введения и через 1 ч после последнего введения Треамида. Крысы контрольных групп, получавшие растворитель, тестировались в те же сроки, что и животные опытных групп.

В эксперименте использовали крыс-самок, находившихся в стадии эструс, который вызывали предварительным 4-кратным введением синестрола. Эффективность Треамида оценивали по показателям: латентный период первой попытки к спариванию (ЛППС), количество попыток к спариванию (КС), количество эякуляций (КЭ). Полученные данные сравнивали с таковыми у этих же животных до введения тестируемого соединения и с таковыми в контроле (второе тестирование).

Результаты сравнения копулятивной активности животных контрольной и опытной групп представлены в табл. 9.

Таблица 9

Влияние Треамида на показатели копулятивного поведения
крыс-самцов на модели его сезонного угнетения

№	Первое и второе тестирование					
	ЛППС, сек	количество садок, абс.	количество эякуляций, в %	ЛППС, сек	количество садок, абс.	количество эякуляций, в %
Контроль	466,56±114,21	3,44±1,23	0%	331,11±116,11	4,56±1,28	11%
Треамид 5,0 мг/кг	462,00±117,81	3,67±1,34	0%	251,33±103,86♦	6,56±1,68	33%♦
Виагра	473,00±137,58	3,33±1,27	0%	308,22±117,73	5,67±1,76	0%

♦ - Различия достоверны по сравнению с 1 тестированием, т.е. до и после введения производной.

Результаты тестирования крыс-самцов фоновой группы показали, что животные характеризуются достаточно высокими и стабильными показателями половой активности. Средний латентный период первой садки составил 114 с, количество садок - 14,7, количество спариваний - 0,33. Сравнение тестируемых показателей в "летнее" время года с таковым в "зимний период" показывает, что латентный период первой попытки к спариванию возрос в 4 раза, количество попыток к спариванию снизилось в 3,4 раза ($P \leq 0,05$). Кроме того, самцы контрольной группы в зимний период не осуществили ни одной эякуляции ($P \leq 0,05$).

Введение Силденафила не оказало существенного влияния на половое поведение крыс-самцов, находящихся в условиях сезонного угнетения их половой активности. До и после его введения исследуемые показатели не отличались от таковых друг от друга и с таковыми в контрольной группе. При наблюдении за половой активностью крыс-самцов, которым вводили Треамид в дозе 5мг/кг, было установлено, что латентный период первой садки после введения достоверно снизился в 1,8 раза по сравнению с таковым до тестирования, что свидетельствует о стимулирующем влиянии лекарственного средства на центры полового влечения и в определенной степени и на копулятивную активность. Общее количество попыток к спариванию возросло на 1,8 раза, но различия оказались статистически не значимыми. При подсчете количества животных в группе, осуществивших эякуляции, было установлено, что после введения Треамида они выявлялись у 33%, в то время как до введения препарата эти животные не эякулировали ($P \leq 0,05$).

Таким образом, получены убедительные доказательства способности Треамида восстанавливать половую активность крыс-самцов, находящихся в условиях сезонного снижения ее активности.

Пример 6. Исследование эффективности Треамида по регенерации и нормализации структуры ткани предстательной железы при хроническом абактериальном простатите (ХАП) или доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ).

Это проявляется в уменьшении степени выраженности морфологических изменений, характерных для этих заболеваний. ХАП моделировали прошиванием вентральной доли железы шелковой нитью, ДГПЖ моделировали введением Сульпирида. В качестве препарата сравнения использовался Простамол Уно.

Животным с ХАП треамид вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг в течение 15 дней.

Животным с ДГПЖ Треамид вводили внутривенно в течение 2 месяцев в дозе 0.5 мг/кг.

1. Исследование эффективности Треамида по регенерации и нормализации структуры ткани предстательной железы на модели хронического абактериального простатита (ХАП).

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах популяции Вистар (возраст 3 мес.). При моделировании хронического абактериального простатита шелковой нитью прошивалась (под наркозом) вентральная доля предстательной железы. Для реализации модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у крыс вызывали гиперпролактинемия, для чего крысам-самцам внутривенно вводили сульпирид в дозе 40 мг/ кг ежедневно в течение 2 месяцев (эглонил; "Санофи Винтроп Индустрия", Франция).

Через 1 месяц после операции животным экспериментальной группы внутривенно вводили Треамид в дозе 0,5 мг/кг 1 раз в сутки в течение 15 дней. По окончании курса введений определяли массу тела животных, проводили их эвтаназию в CO₂-камере. Затем препарировали вентральную долю железы, измеряли массу, объем, определяли весовой коэффициент и проводили морфологический анализ. Для этого простату фиксировали в формалине, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали на соединительную ткань по Ван-Гизону для подсчета относительной площади эпителия - гематоксилин-эозином. Далее проводили количественную оценку выраженности атрофических процессов и развивающегося склероза. Оценку проводили на стандартной площади среза железы с помощью компьютерного графического анализа (микрофотографии последовательных 10 полей зрения, выполненные видеокамерой "AxioCam Erc5s", установленной на микроскопе "AxioLab A1" (объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$), с программой передачи изображения на компьютер фирмы "AxioVision LE", Carl Zeiss). Определяли площадь, занимаемую секреторными отделами, коллагеновыми волокнами соединительнотканых прослоек. Эффективность лекарственного средства оценивали по следующим критериям: меньшая степень выраженности морфологических признаков хронического абактериального простатита (атрофии и склероза): площадь, занимаемая секреторными отделами, коллагеновыми волокнами соединительно-тканых прослоек.

Результаты исследования представлены в табл. 10 и 11.

Таблица 10

Влияние Треамида на массу и объем передней доли предстательной железы крыс на фоне ХАП

Группа	Масса животного в конце эксперимента, г	Масса передней доли предстательной железы, мг	Весовой коэффициент передней доли предстательной железы мг/г	Объем передней доли предстательной железы, см ³
Фон	517,40 $\pm$ 34,24	682,00 $\pm$ 91,56	1,33 $\pm$ 0,20	0,66 $\pm$ 0,10
Контроль	454,40 $\pm$ 36,34	536,00 $\pm$ 111,29	1,15 $\pm$ 0,22	0,49 $\pm$ 0,11
Треамид в дозе 0,5 мг/кг	497,60 $\pm$ 34,03	976,00 $\pm$ 226,62	1,97 $\pm$ 0,47	0,90 $\pm$ 0,20
Простамол-Уно 50 мг/кг	518,40 $\pm$ 24,82	728,00 $\pm$ 61,27	1,40 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,06

Примечания:

- различия достоверны при сравнении с фоном в ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

* - различия достоверны при сравнении с контролем в ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 11

Морфометрические показатели передней доли предстательной железы крыс на фоне хронического асептического воспаления предстательной железы, %

Группа	Площадь коллагеновых волокон	Площадь эпителия ацинусов
Фон	0,66 $\pm$ 0,27	33,08 $\pm$ 4,12
Контроль	3,12 $\pm$ 0,63 #	21,89 $\pm$ 2,45#
Треамид в дозе 0,5 мг/кг	2,64 $\pm$ 0,12#	26,33 $\pm$ 2,63
Простамол-Уно 50 мг/кг	4,12 $\pm$ 0,74#	24,84 $\pm$ 3,62#

Примечания:

- различия достоверны при сравнении с фоном ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

* - различия достоверны при сравнении с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные экспериментальные данные показывают, что масса железы, ее весовой коэффициент, объем во всех сравниваемых группах достоверно не отличались друг от друга (табл. 10). Морфологический анализ (табл. 11) показал, что в предстательной железе крыс контрольных животных достоверно снижалась площадь эпителия ацинусов (атрофия) и возрастала (площадь коллагеновых волокон (склероз)). Введение Треамида крысам-самцам в дозе 0,5 мг/кг приводило к возрастанию (на 22%) площади эпителия ацинусов. Значение этого показателя достоверно не отличалось от фоновых значений, в то время как в контроле он был значимо снижен по сравнению с фоном. Площадь коллагеновых волокон имела тенденцию к снижению. При сравнении полученных данных с таковыми при введении Простамол Уно установлено, что Простамол Уно не оказывает влияния на площадь эпителия ацинусов. Полученные данные позволяют заключить, что использование Треамида в дозе 0,5 мг/кг у крыс с ХАП способствует регенерации эпителиальной ткани предстательной железы. Это выражается в снижении степени выраженности атрофических процессов. Последнее, очевидно, приведет к возрастанию функциональной активности эпителия ацинусов и будет способствовать восстановлению качественных характеристик эякулята.

2. Исследование эффективности Треамида по регенерации и нормализации структуры ткани предстательной железы на модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ).

Изучали способность Треамида нормализовать структуру предстательной железы на фоне введения Сульпирида, Терамид вводили внутривентрикулярно в течение 2 месяцев в дозе 0,5 мг/кг одновременно с Сульпиридом. Контрольные животные получали растворитель (2% крахмальную слизь) в эквивалентном объеме. Животным группы сравнения внутривентрикулярно вводили раствор препарата Простамол Уно в дозе 50 мг/кг. По окончании курса введений определяли массу тела животных, проводили их эвтаназию в CO₂-камере. Известно, что сульпирид вызывает развитие ДГПЖ в боковой доле железы крыс [Van Coppenolle Fabien, Christian Slomianny, Francoise Carpentier Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen - dependence// Physiol. Endocrinol. Metab. - 2001. - p. 120-129]. В связи с этим препарировали эту долю. Определяли ее массу, весовой коэффициент, объем. Далее проводили морфологическое исследование. Боковую долю предстательной железы фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы железы окрашивали гематоксилином и эозином. На гистологических срезах определяли наличие пролиферативных центров и наличие дочерних ацинусов на стандартную площадь среза. Кроме того, на стандартной площади гистологического среза измеряли площадь эпителиальных и стромальных структур. Эти показатели определяли с помощью компьютерного графического анализа на стандартной площади гистологического среза (микрофотографии последовательных 10 полей зрения, выполненные видеокамерой "AxioCam Erc5s", установленной на микроскопе "AxioLab A1"(объектив × 10, окуляр × 10), с программой передачи изображения на компьютер фирмы "AxioVision LE", Carl Zeiss). Стромально-эпителиальное соотношение определяли как отношение площади стромы к площади эпителия.

Эффективность тестируемого соединения определяли по следующим критериям: меньшая степень выраженности морфологических признаков доброкачественной гиперплазии предстательной железы: снижение количества центров пролиферации и дочерних ацинусов, снижение площади эпителия.

Результаты экспериментов представлены в табл. 12-16.

Таблица 12

Масса тела; масса и объем боковой доли предстательной железы
крыс на фоне ее доброкачественной гиперплазии (ДГПЖ)

Название группы	Масса животного в конце эксперимента, г	Масса боковой доли предстательной железы, мг	Весовой коэффициент боковой доли предстательной железы, мг/г	Объем боковой доли предстательной железы, см ³
Фон	559,00±13,39	74,00±9,27	0,13±0,02	0,16±0,02
Контрольный препарат	564,17±28,17	363,33±31,69 #	0,59±0,08 #	0,67±0,07 #
Треамид в дозе 0,5 мг/кг	540,673±42,78	381,67±70,30 #	0,69±0,12 #	0,62±0,14 #
Простамол Уно	496,20±20,34 #	396,00±82,98 #	0,81±0,18* #	0,70±0,17 #

Примечания:

- различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни);

* - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни);

Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 13

Относительная площадь (%) эпителия ацинусов на стандартной площади среза боковой доли предстательной железы крыс-самцов в условиях гиперплазии

Группа № жив-го	Фон	Контроль	Треамид в дозе 0,5 мг/кг	Простамол Уно
1	16,24	18,87	8,61	24,02
2	7,11	17,02	10,26	18,02
3	21,33	23,10	14,09	16,63
4	13,78	21,49	16,30	29,10
5	18,67	22,45	20,19	20,05
M±m	15,43±2,43	20,59±1,15 #	13,89±2,08 *	21,56±2,26

Примечания: здесь и далее:

- различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни);

* - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни);

Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 14

Количество структур (абс.), состоящих из 2-3 плотно прилегающих друг к другу железок, на стандартной площади среза боковой доли предстательной железы крыс-самцов в условиях гиперплазии

Группа № жив-го	Фон	Контроль	Треамид в дозе 0,5 мг/кг	Простамол Уно
1	0	3	0	6
2	0	0	1	3
3	0	2	3	0
4	0	3	4	0
5	0	3	0	0
M±m	0,00±0,00	2,20±0,58 #	1,60±0,81 #	1,80±1,20

Таблица 15

Количество дочерних пролиферативных центров (абс.) на стандартной площади среза боковой доли предстательной железы крыс-самцов в условиях гиперплазии

Группа № жив-го	Фон	Контроль	Треамид в дозе 0,5 мг/кг	Простамол Уно
1	0	8	3	1
2	0	3	3	2
3	0	4	1	1
4	0	3	0	3
5	0	3	1	2
M±m	0,00±0,00	4,20±0,97 #	1,60±0,60 # *	1,80±0,37 # *

Таблица 16

Относительная площадь (%) стромы на стандартной площади
среза боковой доли предстательной железы
крыс-самцов в условиях гиперплазии

Группа № жив-го	Фон	Контроль	Треамид в дозе 0,5 мг/кг	Простамол Уно
1	32,15	46,03	51,82	49,97
2	40,26	45,87	48,61	51,21
3	23,27	45,78	45,59	48,39
4	36,55	40,40	44,14	41,84
5	41,42	39,53	38,12	40,93
M±m	34,73±3,29	43,52±1,46 #	45,66±2,30 #	46,47±2,13 #

Примечания:

- различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

* - различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол Уно ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные экспериментальные данные показали, что масса простаты, ее весовой коэффициент во всех сравниваемых группах достоверно не отличались друг от друга (табл. 12). Количественный морфологический анализ показал, что введение Сульпирида приводило к достоверному возрастанию на 33% площади эпителия ацинусов на стандартной площади среза (табл. 13), что свидетельствует об его усиленной пролиферации. Морфологически это выражается, прежде всего, в обильном разрастании папиллярных выростов эпителия. В простате крыс, получавших Сульпирид, отмечалось появление структур, состоящих из 2-3 прилегающих друг к другу железок (табл. 14). Кроме того, на стандартной площади среза выявлялось около 3-8 дочерних центров пролиферации (табл. 15). Относительная площадь стромальных структур достоверно возрастала на 22%.

При введении Треамида признаки ДГПЖ были выражены в меньшей степени. Так, в простате животных этой группы выявлялось достоверное снижение площади эпителия ацинусов (табл. 14), снижение количества дочерних пролиферативных центров (табл. 15). Эти данные свидетельствуют о наличии антипролиферативных свойств тестируемого соединения. Препарат сравнения Простамол Уно так же обладал терапевтическим эффектом. Так, его введение крысам-самцам, получавшим сульпирид, приводило к снижению количества дочерних пролиферативных центров (табл. 15). Однако его эффективность оказалась ниже таковой у тестируемого соединения, о чем свидетельствует способность последнего приводить к снижению площади эпителия, что не выявлялось на фоне введения препарата сравнения.

Таким образом, Треамид в дозе 0,5 мг/кг эффективно восстанавливает морфологическое состояние предстательной железы на фоне введения Сульпирида, что проявляется в снижении степени выраженности ДГПЖ у экспериментальных животных. Его эффективность превышает таковую препарата сравнения Простамол Уно.

Пример 7. Исследование эффективности Треамида по усилению процессов репаративной регенерации тестикулярной ткани и лечение тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением пролиферативного пула сперматогенеза.

Последнее моделировали однократным введением крысам-самцам (возраст 3 месяцев) цитостатического препарата Паклитаксел (Митотакс, Dr. Reddy's, Индия). Выбор препарата обусловлен тем, что он относится к числу лекарственных средств, повреждающих предшественники сперматогенеза - стволовые клетки.

Паклитаксел вводили животным контрольной и опытной групп однократно внутривенно в максимально переносимой дозе - 7,6 мг/кг. Треамид вводили животным опытных групп внутривенно в дозе 5 мг/кг в виде взвеси в 2% крахмальной слизи в течение 15 дней через 1 месяц после введения Паклитаксела. Контрольные животные вместо исследуемого вещества получали растворитель (2% крахмальная слизь) в эквивалентном объеме.

Для изучения влияния Треамида на глубокий резерв регенерации сперматогенной ткани был использован метод оценки колониеобразующей способности, позволяющий определять количество коммитированных стволовых сперматогенных клеток [A.J. Richards, G.C. Enders, J.L. Resnick// Biol. Reprod. - 1999. - Vol. 61. - p. 1146-1151].

На 1 (через 24 ч) день, а также на 45 и 65 дни после введения Паклитаксела проводили эвтаназию животных и препарирование семенников. Далее методом клонирования *in vitro* определяли содержание клеток-предшественников сперматогенеза в семенниках. Для культивирования клеток-предшественников исследуемого органа использовали подслей, который был представлен клетками адгезирующей фракции.

Для приготовления подслоя прилипающих клеток в условиях 5% CO₂ и 37°C один семенник интактного животного гомогенизировали в среде DMEM и отмывали центрифугированием (1500 об/мин, 10 мин). Далее полученную взвесь клеток разделяли на адгезирующую и неадгезирующую фракции. Для этого в 24-луночной планшете в каждую лунку помещали по 0,5 мл приготовленной взвеси клеток в концентрации 1×10⁶/мл в среде для культивирования клеток-предшественников, и далее инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубирования собирали неадгезирующую часть клеток. В лунки, содержащие фракцию прилипших клеток, помещали 0,5 мл среды для культивирования сперматогенных клеток-предшественников и инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. Через 7 суток проводили замену культуральной среды с последующим наслоением поверх полученной стромы неадгезирующих клеток семенников опытных животных. Для этого по описанной выше методике клетки разделяли на адгезирующую и неадгезирующую фракции. В чашках Петри инкубировали гомогенат органа в течение 1 ч в CO₂ инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. Далее собирали не прилипшую фракцию клеток, в камере Горяева подсчитывали количество клеток/мл. Наслоение не прилипших клеток проводили в концентрации 2×10⁵/мл поверх полученной стромы в объеме 0,5 мл на лунку. Инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывали количество колониеобразующих единиц сперматогенных (КОЕ-Сп)-скопления более 30 клеток округлой формы и различного диаметра. Критерием эффективности используемого средства являлось достоверное увеличение количества клеток, дающих начало КОЕ-Сп, в ткани семенников опытных животных по сравнению с таковым в контроле.

Определение колониестимулирующей активности клеток микроокружения сперматогенной ткани (продукция клетками Сертоли гуморальных регуляторов сперматогенеза) проводили следующим образом. С помощью вышеописанной методики получали гомогенат семенника с последующим выделением адгезирующей фракции клеток. Прилипающие клетки культивировали 24 ч в полной культуральной среде при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. Через сутки собирали супернатант, который хранили при температуре 20°C. Для тестирования уровня гуморальных факторов сперматогенеза в супернатанте использовали тест-систему КОЕ-Сп семенников интактных крыс. Полученные результаты выражались количеством колоний, выросших из количества наслоенных неадгезирующих клеток (10⁵ кл/лунка).

Эффективность Треамида определяли по достоверному увеличению колоний, выросших из клеток тест-системы под действием супернатанта клеток семенников опытных животных по сравнению с таковым в контроле.

Для культивирования клеток-предшественников исследуемого органа использовали подслей (представленный клетками адгезирующей фракции), заранее приготовленный в 96-луночной планшете, по вышеописанной методике.

Далее, от двух групп животных (интактные животные и животные, которым за 2 ч до исследования вводили Паклитаксел внутривенно) выделяли неадгезирующую фракцию клеток сперматогенной ткани и переносили на полученный подслей в полной культуральной среде (80% DMEM, 20% ЭТС, L-глутамин, антибиотики, гепарин) в концентрации 2×10⁵/мл. Перед инкубированием в полную культуральную среду добавляли Треамид в концентрациях 1, 3, 10, 30, 100, 300 и 1000 нг/мл. Инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывали количество колониеобразующих единиц сперматогенных (КОЕ-Сп) скопления более 30 клеток округлой формы и различного диаметра.

Эффективность Треамида определяли по достоверному увеличению количества клеток, дающих начало КОЕ-Сп, в культуре при добавлении исследуемого вещества, по сравнению с таковым в контроле.

Морфологическое и функциональное состояние сперматогенной ткани проводили с целью дополнительного подтверждения эффективности стимуляции образования стволовых коммитированных клеток.

Его оценивали по следующим показателям: численность клеточной популяции сперматогоний, среднее количество клеток Сертоли, степень зрелости сперматогенного пласта, количество клеток Лейдига, эндокринная активность семенника, общее количество сперматозоидов, приходящихся на эпидидимис, процент подвижных форм спермиев. Для этого при эвтаназии на 45 и 65, 90 дни эксперимента при вскрытии выделялись хвостовые части эпидидимиса и семенник. Придаток одного семенника гомогенизировали в теплом (37°C) физиологическом растворе и во взвеси клеток эпидидимиса определили количество подвижных форм сперматозоидов. При подсчете общего количества сперматозоидов, приходящихся на придаток (ОКС), была использована гомогенизированная клеточная взвесь второго эпидидимиса в дозированном количестве физиологического раствора с применением лейкоцитарного меланжера и камеры Горяева.

Для морфологического исследования семенники крыс фиксировали в жидкости Карнуа и готовили парафиновые срезы. Депарафинированные срезы толщиной 5 мкм окрасили гематоксилин-эозином. На срезе семенника определили численность клеточной популяции сперматогоний, количество клеток Сертоли, количество клеток Лейдига, определяли эндокринную активность клеток Лейдига. На основании

подсчета клеток Сертоли вычисляли степень зрелости сперматогенного пласта. Расчет проводили по формуле для экспериментальных групп $y=5,95-0,18x$; для группы интактных животных $y=6,7-0,23x$, где x - среднее количество клеток Сертоли на поперечном срезе извитого семенного канальца, y - индекс, характеризующий степень зрелости сперматогенного пласта. При выборе сроков исследований учитывалась длительность сперматогенеза у крыс, которая составляет полтора месяца. Сроки 45 и 65 сутки после введения Паклитаксела соответствуют проявлению эффектов воздействия на клеточную популяцию сперматогоний.

Критериями стимуляции процесса регенерации тестикулярной ткани явились увеличение численности клеточной популяции сперматогоний, количества клеток Сертоли, снижение степени зрелости сперматогенного пласта, увеличение продуктивности сперматогенеза. Критерием функциональной активности спермиев является процент их подвижных форм.

Результаты экспериментов представлены в табл. 17 и 18.

Таблица 17

Динамика содержания КОЕ-Сп в семенниках крыс при введении Паклитаксела и исследуемого вещества Треамид

Сроки	Группа	КОЕ-Сп, на 2×10^5
исследования, сутки		10^5 ($M \pm SD$, $n=10$)
	Фон	$5,8 \pm 0,70$
1-е	Паклитаксел	$3,5 \pm 0,69^*$
45-е	Паклитаксел	$2,9 \pm 0,48^*$
	Треамид	$4,2 \pm 0,29\#$
65-е	Паклитаксел	$2,3 \pm 0,42^*$
	Треамид	$3,4 \pm 0,4\#$

Примечания:

* отмечена достоверность различий показателя с интактным контролем (фон), тестировании ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

- отмечена достоверность различий между контролем (Паклитаксел) и опытными группами ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные экспериментальные данные показали, что в результате изучения содержания количества предшественников сперматогенной ткани в семенниках крыс после введения Паклитаксела было обнаружено статистически значимое снижение количества клеток, дающих начало колониям (КОЕ-Сп) на 1, 45 и 65 сутки опыта (табл. 17). Так, к концу опыта количества колониеобразующих клеток сократилось почти на 40%.

Введение Треамида сопровождалось достоверным увеличением (на 44-48%) количества колониеобразующих клеток во все исследуемые сроки (на 45 и 65 дни опыта) по сравнению с цитостатическим контролем (табл. 17).

Таблица 18

Изменение уровней колониестимулирующей активности кондиционных сред клеток семенников ($\times 10^5$ клеток) при введении Паклитаксела и исследуемого вещества Треамид

Сроки исследования, сутки	Группа	КОЕ-Сп, на 2×10^5 ($M \pm SD$, $n=10$)
	Фон	$9,25 \pm 0,67$
1-е	Паклитаксел	$3,0 \pm 0,53^*$
45-е	Паклитаксел	$6,37 \pm 0,32^*$
	Треамид	$6,12 \pm 0,29^*$
65-е	Паклитаксел	$3,25 \pm 0,45^*$
	Треамид	$5,88 \pm 0,52^*\#$

Примечания:

* - отмечена достоверность различий показателя с интактным контролем ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни);

- отмечена достоверность различий между контролем (Паклитаксел) и опытными группами ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни).

Исследование механизмов снижения колониестимулирующей активности стволовых клеток после вве-

дения Паклитаксела выявило снижение продукции клетками микроокружения сперматогенной ткани гуморальных факторов, стимулирующих рост колоний из предшественников сперматогенной ткани, на 1, 45 и 65 сутки исследования (табл. 18). Наиболее существенное угнетение гормональной регуляции (в 2,8 и 3 раза) процессов колониеобразования комитированных сперматогенных клеток выявлялось на 1 и 65 дни опыта. Полученные данные свидетельствуют о том, что Паклитаксел оказывал не только прямое токсическое действие на стволовые сперматогонии, но и угнетал функциональную активность клеток микроокружения, тем самым снижал их стимулирующее влияние на процессы обновления клеток, составляющих глубокий резерв сперматогенной ткани. Это свидетельствует об угнетении под действием Паклитаксела гормональной регуляции функционирования стволовых сперматогониев.

На 65 сутки опыта в группе крыс, получавшей Треамид, было отмечено статистически значимое увеличение (на 80%) секреторной активности клеток микроокружения по сравнению с контролем (табл. 18). Это свидетельствует об активации под действием Треамида функционального состояния клеток микроокружения.

Для изучения прямого действия Треамида на предшественники сперматогенной ткани было проведено исследование *in vitro* с добавлением Треамида в культуры клеток в концентрациях 1, 30, 100 и 1000 нг/мл.

Результаты эксперимента представлены в табл. 19.

Таблица 19

Влияние Треамида на рост колоний из КОЕ-Сп при добавлении *in vitro* ($M \pm SD$, $n=6$)

Концентрация ТРЕАМИД в культуре	КОЕ-Сп на 4×10^4 нуклеаров	
	Клетки семенников интактных крыс	Клетки семенников крыс на 1-е сутки после введения Паклитаксела в/в
Контроль	$7,0 \pm 0,58$	$2,67 \pm 0,33$ *
Треамид (1 нг/мл)	$6,83 \pm 0,48$	$6,83 \pm 0,60$ #
Треамид (30 нг/мл)	$6,0 \pm 0,36$	$5,17 \pm 0,65$ #
Треамид (100 нг/мл)	$8,50 \pm 0,42^*$	$4,67 \pm 0,61$ #
Треамид (1000 нг/мл)	$11,67 \pm 1,81^*$	$5,67 \pm 0,33$ #

Примечания:

* - различия достоверны при сравнении с интактным контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

- различия достоверны при сравнении с цитостатическим контролем на ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

В результате определения содержания предшественников сперматогенной ткани в семенниках крыс после введения Паклитаксела было обнаружено статистически значимое (табл. 19) снижение колониеобразования на 1 сутки, что соответствует ранее полученным данным.

При добавлении Треамида (в концентрациях 100 и 1000 нг/мл) в полную культуральную среду, содержащую предшественники сперматогенной ткани интактных животных, было выявлено достоверное увеличение содержания КОЕ-Сп.

Изучение прямого воздействия Треамида *in vitro* на формирование сперматогенных колоний из клеток, взятых из семенников крыс на 1 сутки после внутривенного введения Паклитаксела, выявило увеличение колониеобразования под влиянием исследуемого вещества при введении его во всех исследуемых концентрациях (табл. 19).

Полученные данные свидетельствуют о наличии у Треамида способности непосредственно стимулировать функциональную активность клеток-предшественников сперматогенной ткани.

Таким образом, введение Паклитаксела приводило к снижению регенеративного потенциала семенника, выражающееся в уменьшении количества комитированных колониеобразующих сперматогенных клеток. Это обусловлено не только непосредственным токсическим действием Паклитаксела на источники пролиферативного пула сперматогенеза, но и угнетением гуморальных факторов, стимулирующих пролиферацию этих клеток. Введение Треамида повышало регенераторный потенциал ткани. При этом Треамид не только непосредственно стимулировал образование новых источников пролиферативного пула сперматогенеза (стволовых клеток), но и усиливал действие гуморальных факторов, стимулирующих их образование.

При изучении морфологического и функционального состояния сперматогенной ткани через 45 дней после начала опыта было обнаружено, что введение Паклитаксела приводило к достоверному снижению (более чем на 30%) численности клеточной популяции сперматогоний, продуктивность сперматогенеза, судя по ОКС, снижалась по сравнению с фоном более чем на 40% (табл. 19).

Таблица 20

Оценка состояния сперматогенеза крыс через 45 дней после введения Паклитаксела

Группа	Среднее количество сперматогоний (абс.)	Среднее количество клеток Сертоли (абс.)	Степень зрелости сперматогенного пласта (усл.ед.)	Общее количество сперматозоидов (млн.)	Количество подвижных сперматозоидов (%)
Фон (интактные животные)	18,47±0,28	1,07±0,03	6,45±0,01	213,00±0,81	80,05±3,20
Контроль (Паклитаксел)	11,88±0,35*	1,51±0,02*	5,68±0,00*	125,00±5,82*	63,68±1,50*
Опыт Паклитаксел+Треамид	14,56±0,19*#	1,61±0,03*#	5,66±0,01#	146,00±9,53*	71,57±3,19#

Примечание:

* - различия достоверны по сравнению с фоном;

- различия достоверны по сравнению с контролем.

Одновременно со снижением общего количества зрелых половых клеток выявлялось и статистически значимое уменьшение процента их подвижности. Таким образом, через 45 суток после введения Паклитаксела отмечалась тестикулярная недостаточность в виде патоспермии, что является одной из причин мужского бесплодия. Срок 45 суток соответствует проявлению токсического действия на клеточную популяцию сперматогоний. Учитывая, что при этом наблюдается снижение (на 40%) количества клеток-предшественников сперматогенеза, то в настоящем исследовании получена модель тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением источников пролиферативного пула сперматогенеза. Судя по таким показателям, как степень зрелости сперматогенного пласта и количество клеток Сертоли, у контрольных животных выявляются признаки активации процессов репаративной регенерации тестикулярной ткани. Так, количество клеток микроокружения возрастает, а степень зрелости сперматогенного пласта падает (табл. 20). Однако функциональная активность клеток микроокружения является сниженной. Полученные данные свидетельствуют о низком регенерационном потенциале сперматогенной ткани животных, получавших один Паклитаксел.

Через 45 суток после сочетанного введения Паклитаксела и Треамида (табл. 20) среднее количество сперматогоний статистически значимо возрастало по сравнению с контролем (Паклитаксел), продуктивность сперматогенеза достоверно не увеличивалась, но увеличивался процент подвижных форм спермиев. Возрастание общего количества сперматогоний, очевидно, связано с возрастанием количества коммитированных колониеобразующих клеток сперматогенной ткани. В опытной группе выявлялось достоверное возрастание по сравнению с контролем среднего количества клеток Сертоли, но их функциональная активность оставалась сниженной как в контроле. Степень зрелости сперматогенного пласта не снижалась по сравнению с контрольными значениями. Таким образом, введение лекарственного средства приводило к снижению выраженности патоспермии (судя по проценту подвижных форм), возрастанию количества сперматогоний.

При изучении морфологического функционального состояния сперматогенной ткани крыс, получавших только Паклитаксел, было установлено, что через 65 дней опыта численность клеточной популяции сперматогоний, продуктивность сперматогенеза снижалась (табл. 21).

Таблица 21

Оценка состояния сперматогенеза крыс через 65 дней после введения Паклитаксела

Группа	Среднее количество сперматогоний (абс.)	Среднее количество клеток Сертоли (абс.)	Степень зрелости сперматогенного пласта (усл.ед.)	Общее количество сперматозоидов (млн.)	Эндокринная активность семенников	Количество клеток Лейдига	Количество подвижных сперматозоидов (%)
Фон (интактные животные)	16,95±0,05	2,18±0,06	6,18±0,02	188,40±8,68	4,33±0,10	9,72±0,19	85,66±2,61
Контроль (Паклитаксел)	12,20±0,19*	1,68±0,09*	5,65±0,01#	101,40±12,13*	5,49±0,33	9,21±0,36#	60,48±2,57*
Опыт Паклитаксел+Треамид	13,07±0,28*	2,30±0,03#	5,54±0,00*#	145,20±15,15*#	4,31±0,24*	9,48±0,21	79,81±1,61*

Примечание:

* - различия достоверны по сравнению с фоном;

- различия достоверны по сравнению с контролем.

Это, очевидно, является следствием отмеченного выше истощения популяции клеток-предшественников сперматогенеза и угнетения гуморальных факторов, стимулирующих их пролиферацию. Оставался сниженным и процент подвижности зрелых половых клеток, что свидетельствует об их частичной неполноценности. Таким образом, и в данный срок наблюдения (через 65 дней опыта) выявлялась тестикулярная недостаточность, обусловленная снижением источников пролиферативного пула сперматогенеза, т.е. воспроизводилась экспериментальная модель патологического процесса. Количество

клеток Лейдига оставалось на прежнем уровне. Эндокринная активность клеток Лейдига возрастала. Интенсивность процессов репаративной регенерации не усиливались. Так, степень зрелости сперматогенного пласта хотя и была снижена по сравнению с контролем, но не уменьшалась по сравнению с предшествующим сроком исследования, не возрастало также и количество клеток Сертоли. Отсутствие положительной динамики в течение регенераторных процессов, очевидно, связано с низким количеством комитированных колониобразующих клеток сперматогенной ткани.

У животных, получавших терапию Треамидом на 65 сутки исследования, численность клеточной популяции сперматогоний не возрастала по сравнению с контролем, но продуктивность сперматогенеза, судя по ОКС, увеличивалась (на 43%) (табл. 21). Возрастало также (на 32%) и процент подвижных форм спермиев. Этот показатель статистически значимо не отличался от фоновых значений. Количество клеток Лейдига находилось на уровне контрольных значений. Эндокринная активность клеток Лейдига нормализовалась и достигала контрольных значений. При оценке степени выраженности процессов репаративной регенерации ткани было установлено, что количество клеток Сертоли возрастало, а степень зрелости сперматогенного пласта снижалась. Степень зрелости сперматогенного пласта, напротив, достоверно снижалась. Эти данные совместно с данными о возрастании количества клеток-предшественников сперматогенеза свидетельствуют о том, что введение Треамида крысам, получавшим Паклитаксел, стимулировало процессы репаративной регенерации сперматогенной ткани.

Тестикулярная недостаточность, судя по проценту подвижных форм, проявлялась в меньшей степени. Следует отметить, что отсутствие положительного влияния на численности клеточной популяции сперматогоний, несмотря на увеличение количества клеток-предшественников сперматогенеза и усиление гуморальной регуляции их жизнедеятельности, очевидно, свидетельствует о том, что для проявления эффекта на клетки-предшественники необходим более длительный промежуток времени. С этой целью было исследовано морфологическое и функциональное состояние сперматогенной ткани на 90 день опыта.

При изучении морфологического и функционального состояния сперматогенной ткани на 90 день опыта было установлено, что численность клеточной популяции сперматогоний, ОКС, процент подвижных форм у крыс, получавших один Паклитаксел, были сниженными по сравнению с контролем и не возрастали по сравнению с предшествующими сроками исследования (табл. 22). Эти данные свидетельствуют о сохранении тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением источников пролиферативного пула сперматогенеза. Количество клеток Лейдига достоверно снижалось, но их эндокринная активность возрастала. Количество клеток Сертоли (табл. 22) не увеличивалось и было сниженным по сравнению с контролем. Однако, судя по степени зрелости сперматогенного пласта (этот показатель снижен на 10% от фона, табл. 22), можно говорить о некоторой активности процессов репаративной регенерации ткани, но интенсивность их является явно недостаточной для восстановления исходного количества клеток-предшественников и всего процесса сперматогенеза в целом.

Таблица 22
Оценка состояния сперматогенеза крыс через 90 дней после введения Паклитаксела

Группа	Среднее количество сперматогоний (абс.)	Среднее количество клеток Сертоли (абс.)	Степень зрелости сперматогенного пласта (усл.ед.)	Общее количество сперматозоидов (млн.)	Среднее количество клеток Лейдига	Эндокринная активность	Количество подвижных сперматозоидов (%)
Фон (интактные животные)	17,25±0,25	2,26±0,04	6,18±0,01	202,00±7,17	10,49±0,20	4,66±0,09	77,94±4,69
Контроль (Паклитаксел)	12,73±0,09*	1,72±0,05*	5,64±0,01*	127,70±14,91*	9,65±0,19#	5,65±0,20#	54,24±6,10*
Опыт Паклитаксел+Треамид	14,43±0,21*#	2,10±0,06*#	5,57±0,01*#	186,20±12,74#	9,93±0,08#	4,74±4,04*	67,80±1,14*#

Примечание * - различия достоверны по сравнению с фоном.

В группе животных, получавших терапию Треамидом, количество сперматогоний оказалось статистически повышенным по сравнению с контролем, что является, очевидно, результатом отмеченного ранее увеличения количества источников пролиферативного пула сперматогенеза и усиления гуморальных факторов, стимулирующих их пролиферацию. Продуктивность сперматогенеза, судя по ОКС, возрастала (на 46%) по сравнению с контролем и достигала фоновых значений. Увеличилась и функциональная активность спермиев (число подвижных спермиев достоверно превышало контрольные значения). Эти данные свидетельствуют об эффективности проводимого лечения. Количество клеток Лейдига было сходно с контрольными значениями. Их эндокринная активность нормализовалась. Интенсивность процессов репаративной регенерации ткани, судя по степени зрелости сперматогенного пласта и количеству клеток Сертоли, статистически значимо увеличивалась по сравнению с контролем. Это свидетельствует о том, что регенерационные возможности ткани на фоне введения лекарственного средства остаются на высоком уровне и еще до конца не исчерпаны.

Представленные данные свидетельствуют о том, что Треамид позволяет эффективно стимулировать

репаративную регенерацию тестикулярной ткани, угнетение которой было обусловлено снижением количества коммитированных колониеобразующих клеток. Эффективность Треамида подтверждается данными морфологического анализа тестикулярной ткани.

Пример 8. Исследование влияния Треамида на регенерацию клеток поджелудочной железы на модели стрептозотоцин-индуцированного поражения поджелудочной железы.

Исследование проводили на мышах-самцах линии C57BL/6 в возрасте 4 недель. Поражение поджелудочной железы индуцировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 40 мг/кг в 0,25 мл фосфатного буфера ежедневно в течение 5 дней [Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas// Physiological Research. - 2001. - Vol. 50. - p. 536-546].

Треамид в дозе 1 мг/кг вводили ежедневно внутривенно один раз в день на 7-20 сутки исследования.

На 0, 6, 10, 13, 16, 19, 21, 24 и 28 сутки исследования проводили оценку уровня глюкозы в крови. Уровень глюкозы в крови определяли после 4-часовой депривации корма при помощи глюкометра (глюкометр SencoCard, "77 Электроника Кфт", Венгрия).

На 28 сутки исследования животных эвтаназировали в CO₂-камере, проводили морфологическое исследование поджелудочной железы и иммуноферментный анализ на общий коллаген и коллаген типа I в гомогенате поджелудочной железы.

Для морфологического исследования часть поджелудочной железы, прилежащую к селезенке, фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин. Депарафинированные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах определяли площадь 10 последовательных островков Лангерганса методом графического компьютерного анализа и подсчитывали в них общее количество клеток и количество пикнотизированных клеток. Затем вычисляли количество клеток на единицу площади островка и процент пикнотизированных клеток.

Для выявления клеток воспаления (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги) в ткани поджелудочной железы и их состава использовали окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и азур-эозином.

Уровень мышинового коллагена типа I в гомогенате легких определяли методом иммуноферментного твердофазного анализа с использованием коммерческого набора (Cusabio Biotech CO., LTD, Китай). Гомогенат ткани легких готовили согласно протоколу производителя Cusabio Biotech CO., LTD (Китай).

Уровень общего коллагена в гомогенате легких определяли с использованием набора для определения коллагена путем связывания его с красителем и обработки кислотой и раствором пепсина SIRCOL Collagen Assay (Biocolor Ltd, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Гомогенат ткани легких готовили согласно протоколу производителя тест-системы.

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 23-25.

Таблица 23

Влияние ХС-268-БГ на уровень глюкозы в крови (мМоль/л)
у мышей линии C57BL/6 в условиях введения стрептозотоцина (M±m)

Группы	Исходный уровень	Сроки исследования (сутки после последнего введения стрептозотоцина)							
		6	10	13	16	19	21	24	28
Контроль патологии	5,8±	11,7±	14,0±	15,0±	12,3±	13,9±	15,3±	17,2±	16,4±
	0,4	1,7*	1,8*	2,3*	1,9*	1,6*	1,4*	1,8*	1,7*
Треамид, 1 мг/кг	5,1±	10,8±	11,2±	11,6±	10,4±	12,0±	12,1±	12,2±	12,6 ±
	0,1	0,4*	0,2*	0,3*●	1,4*	0,1*	0,4*●	1,0*●	1,1*

Примечание:

* - достоверность различия (P < 0,05) с исходным уровнем;

● - достоверность различия (P < 0,05) с патологическим контролем.

Таблица 24

Влияние Треамида на общее количество клеток, площадь островка Лангерганса и количество пикнотизированных клеток в островке Лангерганса у мышей линии C57Bl/6 в условиях введения стрептозотоцина на 28 сутки исследования ($M \pm m$)

Группы	Общее количество клеток в островке Лангерганса ($\times 10^4$)	Площадь островковой ткани (пиксель)	Количество пикнотизированных клеток в островке (пиксель)
Интактные	116,2 $\pm$ 7,55	695404 $\pm$ 49971	0,97 $\pm$ 0,11
Контроль патологии	54,7 $\pm$ 5,4 *	314295 $\pm$ 30521 *	3,50 $\pm$ 0,40 *
Треамид, 1 мг/кг	109,9 $\pm$ 12,6 •	635770 $\pm$ 56163 •	1,75 $\pm$ 0,14 •

Примечание:

- * - достоверность различия ($P < 0,05$) с интактным контролем;
- - достоверность различия ($P < 0,05$) с патологическим контролем.

Таблица 25

Влияние Треамида на содержание общего коллагена и коллагена типа I в поджелудочной железе у мышей линии C57BL/6 в условиях повреждения поджелудочной железы на 28 сутки исследования ($M \pm m$)

Группы исследования	Коллаген I типа (нг/мл)	Общий коллаген (мг/мл)
Интактные	341 $\pm$ 28	33 $\pm$ 36
Контроль патологии	856 $\pm$ 76*	57 $\pm$ 5*
Треамид, 1 мг/кг	665 $\pm$ 55*•	41 $\pm$ 4•

Примечание:

- * - достоверность различия ($P < 0,05$) с интактным контролем;
- - достоверность различия ($P < 0,05$) с патологическим контролем.

Курсовое введение стрептозотоцина мышам в значительной степени повысило уровень глюкозы в крови животных на протяжении всего периода наблюдения (6, 10, 13, 16, 19, 21, 24, 28 сутки после последнего введения стрептозотоцина) (табл. 23). Морфологические исследования позволили установить, что в сроки пика гипергликемии (21, 28 сутки) в ткани поджелудочной железы отмечались отек и гиперемия, регистрировалась инфильтрация поджелудочной железы нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами. Кроме этого, начиная с 6 суток после последнего введения стрептозотоцина, у мышей опытной группы наблюдалось нарастающее снижение площади островковой ткани по сравнению с интактным контролем. На 28 сутки падение показателя было наиболее выраженным: общая клеточность островка была снижена более чем на 50% по сравнению с интактными мышами, процент пикнотизированных клеток, напротив, значительно возрастал (в 2,3 раза), в травмированных островках появлялись фибробласты, что свидетельствовало о развитии склероза инсулярного аппарата (табл. 24). Методом иммуноферментного анализа гомогенатов поджелудочной железы у группы патологического контроля выявлено повышение уровней коллагена типа I и общего коллагена по сравнению с интактными животными контролем на 28 сутки исследования (табл. 25).

Введение Треамида в дозе 1 мг/кг достоверно снижало уровень глюкозы в крови у мышей в условиях введения Стрептозотоцина на 13, 21, 24 сутки исследования (табл. 1). Морфологическое исследование поджелудочной железы, проведенное на 28 сутки исследования показало, что Треамид снизил число пикнотизированных панкреатоцитов в островках Лангерганса больных животных, увеличил площадь и клеточность островковой ткани (табл. 24), снижал концентрацию общего коллагена и коллагена типа I в поджелудочной железе у экспериментальных животных по отношению к патологическому контролю (табл. 25).

Полученные результаты позволяют заключить, что на модели стрептозотин-индуцированного поражения поджелудочной железы Треамид оказывает регенеративное действие в отношении ткани поджелудочной железы. В результате восстанавливается количество клеток в островках Лангерганса, увеличивается площадь островковой ткани, нормализуется количество пикнотизированных клеток в островке Лангерганса, происходит снижение фибротических изменений в ткани поджелудочной железы, как следствие снижается уровень глюкозы в крови. Треамид может применяться при лечении нарушения толерантности к глюкозе.

Пример 9. Исследование влияния Треамида на регенерацию клеток поджелудочной железы и восстановление функции тестикулярной ткани у самцов мышей на модели метаболического синдрома.

Метаболические нарушения моделировали следующим образом: на 2 день после рождения самцам мышей линии C57B1/6 вводили стрептозотоцин в дозе 200 мг/кг, однократно, подкожно в область холки, объем вводимого раствора 30 мкл. С 4-недели после рождения животных переводили на рацион с высоким содержанием жира. Для этого использовали корм, обогащенный тяжелыми насыщенными жирами (30% жира) (Siff EF R/M with 30% Fat кат. № E15116-34, Germany). Продолжительность назначения корма с высоким содержанием жира составила 42 суток (с 28 по 70 сутки эксперимента). Треамид вводили в дозе 10 мг/кг внутривенно ежедневно один раз в сутки с 49 по 70 сутки эксперимента. Контрольные животные вместо исследуемого вещества получали растворитель в эквивалентном объеме.

На 28, 35, 42, 49, 56, 63 и 70 сутки эксперимента проводили оценку уровня глюкозы в крови. Уровень глюкозы в крови определяли при помощи глюкометра (Accu-Chek Performs Nano ("Roche Diagnostics GmbH", Germany)). Измерение исходного уровня глюкозы в крови у животных проводили после 16-часовой депривации корма, все последующие измерения уровня глюкозы также производили после 16-часовой депривации еды.

На 70 сутки исследования животных эвтаназировали в CO₂-камере. Затем исследовали уровень свободного тестостерона в сыворотке, проводили морфологическое исследование поджелудочной железы.

Уровень свободного тестостерона в сыворотке оценивали иммуноферментным анализом в соответствии с протоколом производителя тест-систем.

Для морфологического исследования часть поджелудочной железы, прилежащую к селезенке, фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин по стандартной методике.

Депарафинированные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах определяли площадь 10 последовательных островков Лангерганса методом графического компьютерного анализа и подсчитывали в них общее количество клеток и количество пикнотизированных клеток. Затем вычисляли количество клеток на единицу площади островка и процент пикнотизированных клеток. Для выявления клеток воспаления (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги) в ткани поджелудочной железы и их состава использовали окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином.

Результаты проведенного исследования показали, что моделирование метаболического синдрома вызывало отек и гиперемия в ткани поджелудочной железы у мышей самцов линии C57B1/6 на 70 сутки эксперимента (фиг. 1). Кроме этого, у мышей в модельных условиях регистрировалась мелко и средне-капельная жировая дистрофия ацинарных клеток, утолщение и разрастание междольковых перегородок, инфильтрация островковой ткани клетками воспаления, отмечалось уменьшение общего количества островков Лангерганса, снижение их площади и клеточности. В сравнении с таковыми животных интактного контроля, между тем, процент пикнотизированных клеток в островках возрастал (фиг. 2, табл. 26).

Внутрижелудочное введение Треамида в дозе 10 мг/кг с 49 по 70 сутки исследования препятствовало разрушению поджелудочной железы у мышей в условиях моделирования метаболических нарушений. Треамид увеличивал количество островков Лангерганса в поджелудочной железе и их клеточность, препятствовал развитию жировой дистрофии ацинарных клеток и значительно уменьшал количество пикнотизированных клеток в островках Лангерганса у мышей в условиях метаболических нарушений. Кроме этого, Треамид снижал интенсивность отека и инфильтрацию островковой ткани клетками воспаления (фиг. 1 и 2, табл. 26).

Таблица 26
Морфология поджелудочной железы мышей на 70 сутки
моделирования метаболических нарушений (M±m)

Группа	Количество островков на 30 полях зрения	Количество пикнотизированных клеток в островке Лангерганса	Количество клеток в островке Лангерганса	Площадь островка (пиксели)
Интактные (n=10)	7,0±0,42	1,11±0,06	152,8±3,6	1240813 ± 48607
Контроль (n=10)	3,3±0,26*	3,17±0,24*	72,3±1,4 *	596043 ± 9924*
Треамид, 10 мг/кг (n=8)	7,4±0,37●	0,99±0,06●	101,8±3,0*●	743399 ± 21134*●

Примечания:

* - различия достоверны по сравнению с фоном (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни);

● - различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

Результаты исследования глюкозы в сыворотке крови мышей показали, что моделирование метабо-

лических нарушений приводило к стойкому увеличению уровня глюкозы в крови у мышей самцов линии C57BL/6, начиная с 42 суток эксперимента. Высокий уровень глюкозы сохранялся до 70 суток. Максимальные значения показателя были выявлены на 63 сутки эксперимента и превысили исходный уровень в 3,8 раза, на 70 сутки - в 4,2 раза (табл. 27).

Внутрижелудочное введение Треамида в дозе 10 мг/кг с 49 по 70 сутки эксперимента снижало уровень глюкозы в крови мышей на 56 и 63 сутки эксперимента (табл. 27).

Таким образом, курсовое введение Треамида в дозе 10 мг/кг вызывало гипогликемическое действие у мышей самцов линии C57BL/6 в условиях моделирования метаболических нарушений.

Таблица 27

Концентрация глюкозы (ммоль/л) в сыворотке крови мышей в условиях моделирования метаболических нарушений и применения Треамида в дозе 10 мг/кг ($M \pm m$)

Срок проведения анализа	Интактные (n=10)	Патологический контроль (n=10)	Треамид, 10 мг/кг (n=8)
28 суток	4,72 $\pm$ 0,81	6,02 $\pm$ 2,02	5,36 $\pm$ 1,28 *
35 суток	4,6 $\pm$ 0,87	4,74 $\pm$ 1,87	4,21 $\pm$ 1,81 *
42 суток	4,91 $\pm$ 0,96	10,84 $\pm$ 1,97 *	12,75 $\pm$ 2,6 *
49 суток	5,33 $\pm$ 0,89	10,47 $\pm$ 1,96 *	13,59 $\pm$ 2,41 *
56 суток	5,07 $\pm$ 0,86	19,58 $\pm$ 6,34 *	12,91 $\pm$ 4,48 * ●
63 суток	5,43 $\pm$ 0,81	20,51 $\pm$ 3,85 *	14,47 $\pm$ 3,21 * ●
70 суток	4,64 $\pm$ 0,92	19,77 $\pm$ 4,99 *	21,82 $\pm$ 5,83 *

Примечания:

* - различия достоверны по сравнению с фоном ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

● - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Результаты исследования свободного тестостерона в сыворотке крови мышей показали снижение (в 1,6 раза) гормона у самцов группы патологического контроля в сравнении с интактными животными. Полученные данные говорят о сформированном на фоне метаболических нарушений гипогонадизме у самцов лабораторных животных, который во многом соответствует клинической картине гипогонадизма у людей.

Курсовое введение Треамида в дозе 10 мг/кг восстановило концентрацию свободного тестостерона в крови мышей с экспериментальным гипогонадизмом до уровня интактных животных (табл. 28). Таким образом, исследуемая фармацевтическая субстанция предотвратила развитие гормональных нарушений, которые были индуцированы метаболическими нарушениями.

Таблица 28

Уровень свободного тестостерона в сыворотке крови мышей на 70 сутки моделирования метаболических нарушений ($M \pm m$)

Группы	Свободный тестостерон (пг/мл)
Интактные (n=10)	3,06 $\pm$ 0,49
Патологический контроль (n=10)	1,97 $\pm$ 0,31 *
Треамид, 10 мг/кг (n=8)	3,70 $\pm$ 0,46 ●

Примечания:

* - различия достоверны по сравнению с фоном ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);

● - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Полученные результаты позволяют заключить, что на модели метаболического синдрома у самцов мышей Треамид оказывает регенеративное действие в отношении ткани поджелудочной железы. В результате восстанавливается количество клеток в островках Лангерганса, увеличивается площадь островковой ткани, нормализуется количество пикнотизированных клеток в островке Лангерганса, происходит снижение фибротических изменений в ткани поджелудочной железы, как следствие снижается уровень глюкозы в крови. Также Треамид восстанавливает функцию тестикулярной ткани, предотвращая развитие гипогонадизма. Таким образом, Треамид может применяться при лечении метаболического синдрома и гипогонадизма.

Пример 10. Исследование влияния Треамида на регенерацию клеток поджелудочной железы и восстановление функции тестикулярной ткани у самцов крыс на модели метаболического синдрома.

Метаболический синдром моделировали у самцов крыс линии Вистар (260-280 г) путем содержания животных на рационе высокожировой диеты ("диеты кафетерия") в течение 12 недель. "Диета кафетерия" сбалансирована в соответствии с Current Protocols in Pharmacology [Current Protocols in Phar-

macology (2005) Animal Models of Disease//Contributed by Petter Hedlund, Kenshi Matsumoto, and Karl-Erik Andersson]. Диета содержала 25-35% жиров и 25-30% легкоусвояемых углеводов в дополнение к стандартному рациону грызунов. Треамид вводили в дозе 0,5 мг/кг внутрижелудочно ежедневно один раз в сутки на 7-11 неделях диеты. Препарат сравнения Метформин вводили в дозе 200 мг/кг внутрижелудочно в том же режиме.

Оценку развития патологии и терапевтического действия Треамида проводили по следующим показателям: биохимические показатели крови (уровень глюкозы, холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), ЛПВП, ЛПНП, индекс атерогенности), глюкозотолерантный тест, масса висцерального жира, общее количество и процент подвижных форм сперматозоидов.

Определение глюкозы проводили при помощи глюкометра "OneNouch Select" (Швейцария).

Уровень триглицеридов, ОХС и ЛПВП определяли с помощью диагностического набора (Ольвекс диагностика, Россия).

Уровень ЛПНП определялся по формуле (1):

$$\text{ЛПНП} = \text{ОХС} - (\text{ЛПВП} + \text{ТГ}/2.2) \quad (1),$$

где ЛПНП - холестерин липопротеинов низкой плотности;

ЛПВП - холестерин липопротеинов высокой плотности;

ОХС - общий холестерин;

ТГ - триглицериды.

Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{КА} = (\text{ОХС} - \text{ЛПВП})/\text{ЛПВП} \quad (2),$$

где КА - коэффициент атерогенности;

ЛПВП - холестерин липопротеинов высокой плотности.

Индекс атерогенности рассчитывали для каждого животного индивидуально, затем считали среднее арифметическое значение по группе.

Для проведения анализа спермы животных наркотизировали внутрибрюшинным введением смеси Золетила и Ксилы (0,2 мл Золетила+0,8 мл Ксилы) в объеме 70 мкл/100 г массы. Выделяли эпидидимис. Головку эпидидимиса отрезали от хвоста, взвешивали, делали 5 надрезов (для улучшения выхода спермы) и помещали в пробирку, содержащую 10 мл фосфатно-солевого буфера, подогретого до 37°C. В течение 10 мин пробирку выдерживали при 37°C. Далее пробирку встряхивали на шейкере, отбирали 20 мкл жидкости, наносили на подогретое до 37°C предметное стекло и под микроскопом оценивали количество подвижных сперматозоидов. Подсчет вели до 100 сперматозоидов.

Для оценки общего количества сперматозоидов из пробирки с эпидидимисом брали 20 мкл жидкости после встряхивания и вносили в пробирку, содержащую 400 мкл физ. раствора. После встряхивания пробирки отбирали содержимое (20 мкл) и вносили в камеру Горяева. Считали количество сперматозоидов в 100 больших квадратах. Количество сперматозоидов в головке эпидидимиса рассчитывали по формуле:

$$\text{количество сперматозоидов} = \text{количество сперматозоидов в 100 больших квадратах камеры Горяева} \times 0,525 \quad (\text{коэффициент из расчета разведения и объема камеры Горяева})/\text{масса головки эпидидимиса}.$$

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 29-32.

Измерение массы висцерального жира у экспериментальных животных показало, что на фоне высокожировой диеты висцеральный жир около почек, кишечника и семенников нарастает равномерно: в 1,7, 1,5 и 2,0 раза соответственно (табл. 29). Общая масса висцерального жира в группе контроля увеличилась примерно в 1,7 раза по сравнению с интактными животными. Полученные результаты дали основание заключить, что у экспериментальных животных, содержащихся на рационе высокожировой диеты, развилось абдоминальное ожирение - один из признаков метаболического синдрома.

Введение Треамида (в дозе 0,5 мг/кг) самцам крыс снизило прирост массы висцерального жира в 1,3 раза по сравнению с группой контроля. Метформин оказал сходный эффект (табл. 29).

Таблица 29

Относительная масса висцерального жира, % к массе тела ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Жир около почек	Жир около кишечника	Жир около семенников	Весь жир
Интактные	0,49±0,06	0,80±0,09	0,64±0,08	1,94±0,15
Контроль	0,81±0,1*	1,20±0,15*	1,29±0,19*	3,30±0,27*
Треамид (0,5 мг/кг)	0,48±0,05 &	0,94±0,07	1,03±0,14*	2,46±0,15* &
Метформин (200 мг/кг)	0,52±0,05 &	1,07±0,08*	0,98±0,12*	2,57±0,18* &

Примечание:

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p<0,05$);

& - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p<0,05$).

Результаты измерения уровня глюкозы (натощак) в цельной крови крыс приведены в таблице 30. Первое измерение проводилось до введения препаратов животным на сроке 6 недель исследования. Из табл. 30 видно, что у интактных крыс, содержащихся на стандартном рационе питания, уровень глюкозы на сроке 6 недель диеты составил $3,9 \pm 0,3$ ммоль/л, на сроке 12 недель диеты - $6,8 \pm 0,93$ ммоль/л. В свою очередь, у крыс, содержащихся на высокожировой диете, уровень глюкозы на сроке 6 недель диеты составил $6,7 \pm 0,3$ ммоль/л, на сроке 12 недель диеты - $11,6 \pm 0,9$ ммоль/л. Таким образом, у животных, получавших высокожировую диету, наблюдалась выраженная гипергликемия, которая является еще одним признаком метаболического синдрома.

Внутрижелудочное введение Треамида экспериментальным животным, начиная с 7 недели высокожировой диеты, сдерживало увеличение уровня глюкозы в крови. Треамид проявил эффект через 3 недели терапии и сохранил его до конца исследования (табл. 30).

Таблица 30

Динамика уровня глюкозы в крови крыс-самцов, ммоль/л

Группа	Уровень глюкозы в крови крыс-самцов, ммоль/л			
	до введения препаратов	через 3 недели введения препаратов	через 5 недели введения препаратов	через неделю после отмены препаратов
Интактные	$3,9 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,9$
Контроль	$6,7 \pm 0,3^*$	$8,7 \pm 0,4^*$	$9,1 \pm 0,4^*$	$11,6 \pm 0,9^*$
Треамид (0,5 мг/кг)	$6,4 \pm 0,2^*$	$6,5 \pm 0,2^* \&$	$7,8 \pm 0,2^* \&$	$8,3 \pm 0,7 \&$
Метформин (200 мг/кг)	$6,2 \pm 0,1^*$	$6,9 \pm 0,3^* \&$	$8,0 \pm 0,2^* \&$	$7,8 \pm 0,6 \&$

Примечания:

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$);

& - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Для оценки влияния Треамида на липидный обмен были измерены ОХС, ТГ, ЛПНП, ЛПВП, индекс атерогенности на 12 неделе исследования.

Применение рациона "диеты кафетерия" у животных приводило к выраженному статистически значимому увеличению уровня общего ХС, ТГ, ЛПНП и снижению уровня ЛПВП по отношению к интактным животным (табл. 31). Расчетный показатель - индекс атерогенности у животных группы контроля был в 4,2 раза выше, чем у интактных животных. Внутрижелудочное введение Треамида повысило уровень ЛПВП с $1,5 \pm 0,2$ до $1,9 \pm 0,2$ и снизило индекс атерогенности с $2,1 \pm 0,4$ до $0,9 \pm 0,2$. Это дает основание заключить, что при длительном применении Треамид оказывает антиатерогенное действие (табл. 31).

Таблица 31

Липидный спектр крови самцов крыс, содержащихся на высокожировой диете в течение 12 недель ($M \pm m$, $n=8$)

Оцениваемый показатель	Интактные (стандартная диета)	Контроль (высокожировая диета)	Треамид (0,5 мг/кг)	Метформин (200 мг/кг)
Холестерин общий, ммоль/л	$2,6 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2^*$	$3,5 \pm 0,1^*$	$2,8 \pm 0,3$
ЛПВП, ммоль/л	$1,7 \pm 0$	$1,1 \pm 0,1^*$	$1,9 \pm 0,2 \&$	$1,8 \pm 0 \&$
ЛПНП, ммоль/л	$0,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3^*$	$1,2 \pm 0,2^*$	$0,7 \pm 0,3 \&$
Индекс атерогенности	$0,5 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,4^*$	$0,9 \pm 0,2^* \&$	$0,6 \pm 0,1 \&$
Триглицериды, ммоль/л	$0,7 \pm 0$	$1,1 \pm 0,0^*$	$0,9 \pm 0,1^*$	$0,7 \pm 0,1 \&$

Примечание:

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$);

& - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Из табл. 31 видно, что в группе, получавшей "диету кафетерия", общее количество сперматозоидов и процент подвижных форм сперматозоидов были в 2 раза ниже, чем у животных, содержащихся на стандартном рационе. Это согласуется с клиническими данными о снижении качества спермы у мужчин,

страдающих метаболическими расстройствами. Внутривенное введение Треамида увеличило в 1,7 раза общее количество сперматозоидов и в 1,5 раза процент подвижных форм сперматозоидов, доведя эти показатели до уровня интактных. Таким образом, можно заключить, что Треамид оказывает терапевтическое действие не только в отношении основных признаков метаболического синдрома, но и восстанавливает снизившееся на фоне патологии качество спермы.

Терапия Метформинном также в 1,8 раза увеличила общее количество сперматозоидов, но в отличие от Треамида не повлияла на процент подвижных форм сперматозоидов (табл. 32).

Таблица 32

Общее количество сперматозоидов и процент подвижных форм сперматозоидов у самцов крыс на модели метаболического синдрома, индуцированного высокожировой диетой ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Общее количество сперматозоидов	Процент подвижных форм сперматозоидов
Интактные (стандартная диета)	304,2 $\pm$ 46,2	42,43 $\pm$ 4,09
Контроль (высокожировая диета)	154,5 $\pm$ 17,6*	22,71 $\pm$ 3,13*
Треамид (0,5 мг/кг)	260,0 $\pm$ 38,7 &	34,43 $\pm$ 3,15 &
Метформин (200 мг/кг)	276,6 $\pm$ 44,6 &	24,43 $\pm$ 3,99*

Примечание:

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$);

& - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Таким образом, на модели метаболического синдрома у самцов крыс Треамид снизил повышение уровня глюкозы в крови, снизил индекс атерогенности, снизил увеличенное на фоне патологии количество висцерального жира и восстановил сниженное вследствие эндокринных нарушений общее количество сперматозоидов и процент их подвижных форм. Это подтверждает способность Треамида восстанавливать функцию поджелудочной железы и тестикулярной ткани. Треамид рекомендуется применять при метаболическом синдроме и сниженной функции тестикулярной ткани.

Пример 11. Исследование влияния Треамида на фертильность самцов мышей на модели метаболического синдрома.

Метаболические нарушения моделировали следующим образом: на 2 день после рождения самцам мышей линии C57B1/6 вводили стрептозотозин в дозе 200 мг/кг, однократно, подкожно в область холки, объем вводимого раствора 30 мкл. С 4-недели после рождения животных переводили на рацион с высоким содержанием жира. Для этого использовали корм, обогащенный тяжелыми насыщенными жирами (30% жира) (Siff EF R/M with 30% Fat кат. № E15116-34, Германия). Продолжительность содержания животных на высокожировой диете составила 42 суток (с 28 по 70 сутки исследования). Треамид вводили в дозе 10 мг/кг внутривенно ежедневно один раз в сутки с 49 по 80 сутки эксперимента. Контрольные животные вместо исследуемого вещества получали растворитель в эквивалентном объеме.

Для оценки фертильности к самцам экспериментальных групп подсаживали интактных самок в соотношении 1:2 на период с 70 по 80 сутки исследования. В этот период самцам опытной группы продолжали вводить внутривенно один раз в сутки Треамид в дозе 10 мг/кг.

По окончании срока спаривания на 80 сутки исследования самцов эвтаназировали в CO₂-камере. У животных отбирали кровь и в сыворотке методом иммуноферментного анализа определяли уровень свободного тестостерона. Эвтаназия проводилась в утренние часы с 9:30 до 11:00.

Самок умерщвляли в CO₂-камере на 18 день беременности. Исследовали плоды в матке. Для оценки плодовитости вычисляли индекс плодовитости (ИП):

$$\text{ИП} = \frac{\text{число оплодотворенных самок}}{\text{число самок, спаренных с самцами}} \times 100\%.$$

Результаты исследования свободного тестостерона в сыворотке крови у мышей самцов линии C57B1/6 после моделирования метаболических нарушений и применения Треамида в дозе 10 мг/кг представлены на 80 сутки эксперимента в табл. 33. Моделирование метаболических нарушений вызывало снижение концентрации свободного тестостерона в сыворотке крови на 80 сутки эксперимента в 1,8 раз по сравнению с группой интактных животных (табл. 33).

Курсовое введение Треамида в дозе 10 мг/кг повышало уровень свободного тестостерона в сыворотке крови мышей с метаболическими нарушениями в 2 раза по сравнению с патологическим контролем и на 16% по сравнению с интактными животными.

Таким образом, Треамид в дозе 10 мг/кг восстанавливал уровень свободного тестостерона в сыворотке крови у мышей с метаболическими нарушениями.

Таблица 33

Содержание свободного тестостерона в сыворотке крови мышей с гипогонадизмом, вызванным метаболическими нарушениями ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Свободный тестостерон в сыворотке крови (пг/мл)
Интakтные	$2,99 \pm 1,89$
Патологический контроль	$1,66 \pm 0,43$ *
Треамид (10 мг/кг)	$3,46 \pm 1,87$ *•

Примечания:

- * - различия достоверны по сравнению с фоном ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);
- - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Результаты исследования фертильности мышей на 70-80 сутки после моделирования метаболических нарушений и применения Треамида в дозе 10 мг/кг представлены в табл. 34.

Установлено, что индекс плодовитости самцов с метаболическими нарушениями на 70-80 сутки исследования был снижен в 2,8 раза по сравнению с интактным контролем. У самцов с метаболическими нарушениями, получавших Треамид в дозе 10 мг/кг с 49-80 сутки, индекс плодовитости был в 1,8 раза выше, чем у самцов с метаболическими нарушениями, не получавшими лечения (патологический контроль) (табл. 34).

Таблица 34

Индекс плодовитости мышей-самцов в условиях моделирования метаболических нарушений и применения Треамида в дозе 10 мг/кг ($n=20$)

Группа	Индекс плодовитости, %
Интakтный контроль	85
Контроль патологии	30*
Треамид (10 мг/кг)	55*•

Примечания:

- * - различия достоверны по сравнению с фоном ($p < 0,05$, по Фишеру);
- - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, по Фишеру).

Таким образом, на модели метаболического синдрома Треамид эффективно восстановил функцию тестикулярной ткани самцов мышей, что привело к повышению фертильности животных. Треамид рекомендуется применять при лечении метаболического синдрома, гипогонадизма и мужского бесплодия.

Пример 12. Исследование влияния Треамида на восстановление ткани печени на модели хронического токсического гепатита.

Хронический токсический гепатит вызывали у мышей-самцов линии CBA/CaLac внутрижелудочным введением 20% раствора тетрахлоруглерода (CCl_4) на оливковом масле в объеме 0,2 мл/мышь на 0, 3, 7, 10, 14 и 17 сутки исследования. Треамид вводили в дозе 10 мг/кг ежедневно внутрижелудочно один раз в сутки с 14 по 27 день исследования. На 28 сутки исследование животных эвтаназировали в CO_2 -камере и забирали биоптат печени на гистологический анализ.

Для гистологических исследований печень фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и затем заливали в парафин по стандартной методике. Депарафинизированные срезы толщиной 5 мкм окрашивали: 1) гематоксилином и эозином по стандартной методике для рутинного гистологического исследования; 2) пикрофуксином для определения площади соединительной ткани, с помощью средств компьютерной обработки графических данных.

Результаты исследования показали, что через 2 недели после последнего введения CCl_4 в печени мышей выявляются морфологические изменения, характерные для токсического гепатита. Так, на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечалась мелко и среднекапельная жировая дистрофия, моноцеллюлярные и мостовидные некрозы гепатоцитов, а также развитие инфильтрации клетками воспаления (преимущественно макрофагами и лимфоцитами) печеночной паренхимы разной степени выраженности (фиг. 3). Кроме этого, наблюдалось нарушение балочного строения печени вследствие отека и венозное полнокровие. Последнее указывает на гемодинамические нарушения в печени у мышей в условиях курсового введения CCl_4 .

Окрашивание пикрофуксином препаратов печени позволило выявить у животных с индуцированным токсическим гепатитом увеличение содержания соединительной ткани в перипортальных зонах и разрастание коллагена из портальных пространств в виде септ (фиг. 3).

Внутрижелудочное введение Треамида животным в дозе 10 мг/кг существенно снижало выраженность инфильтрации клетками воспаления больной печени, уменьшало количество моноцеллюлярных

некрозов и интенсивность жировой дистрофии, выраженно уменьшало содержание соединительной ткани в печени больных животных по сравнению с патологическим контролем. Гистологическая картина печени леченных животных на 28 сутки эксперимента не отличалось от таковой интактного контроля (фиг. 3).

Таким образом, на модели хронического токсического гепатита Треамид оказывал регенеративное действие в отношении ткани печени: снижал фиброз, снижал интенсивность жировой дистрофии, препятствовал развитию некроза. Это позволяет заключить, что Треамид может применяться в качестве препарата, восстанавливающего структурные и функциональные характеристики ткани печени.

Пример 13. Исследование влияния Треамида на восстановление ткани легкого на модели эмфиземы легкого.

Эмфизему легких вызывали у мышей-самок линии C57B1/6 однократным интратрахеальным введением эластазы (Sigma, США) в дозе 0,6 Е/мышь в 30 мкл NaCl 0,9% [Luthje L., Raupach T., Michels H. et al.// Respiratory Research 2009, 10:7]. День операции приняли за 0 день эксперимента. Треамид вводили в дозе 10 мг/кг ежедневно внутривентрально один раз в сутки с 7 по 60 сутки исследования. На 7, 14, 30 и 60 сутки исследования животных эвтаназировали в CO₂-камере и выделяли легкие.

Для оценки динамики и выраженности развития эмфиземы в ткани легких изготавливались гистологические препараты. Для этого легкие фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и затем заливали в парафин по стандартной методике. Из депарафинизированных срезов получали препараты верхушки легкого, среднего легочного поля и нижнего легочного поля толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Далее делались фотографии верхушки легкого, среднего легочного поля и нижнего легочного поля, исследовали локализацию и площадь эмфиземы с помощью средств компьютерной обработки графических данных. В качестве оценочного показателя развития эмфиземы измерялась площадь эмфизематозно-расширенной ткани легких (% от нормальной ткани), из расчетов исключались сосуды и бронхи [ArrateMunoz-Barrutia, Mario Ceresa, Xabier Artachevarria, Luis M.Montuenga, and Carlos Ortiz-de-Solorzano. Quantification of Lung Damage in an Elastase-Induced Mouse Model of Emphysema// International Journal of Biomedical Imaging. Volume 2012, Article ID 734734, 11 pages; Susumu Sato, Erzsebet Bartolak-Suki, Harikrishnan Parameswaran, Hiroshi Hamakawa and Bela Suki. Scale dependence of structure-function relationship in the emphysematous mouse lung// Front. Physiol. 6:146. doi: 10.3389/fphys.2015.00146].

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что эластаза истончала стенки альвеол и бронхиол, значительно увеличивала площадь просвета, вызывала разрывы альвеолярных стенок на 7 сутки (табл. 13). Слизистая оболочка бронхов и бронхиол имела фестончатые очертания и была выстлана цилиндрическим и кубическим (в бронхиолах) эпителием респираторного типа, имели место умеренные десквамативные изменения. Дополнительно на гистологических препаратах легких обнаруживали умеренную гиперемии капилляров межальвеолярных перегородок и нарушение микроциркуляции: отмечалось умеренно выраженное полнокровие сосудов микроциркулярного русла, капилляров межальвеолярных перегородок в легких.

Таблица 35

Площадь эмфизематозно-расширенной ткани легких (% от нормальной) у мышей-самок линии C57B1/6 в условиях интратрахеального введения эластазы ($M \pm m$, $n=10$)

Группы	Верхушка легкого	Среднее легочное поле	Нижнее легочное поле
Интактный контроль	0	0	0
7 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	$1,3 \pm 0,03 *$	$6,5 \pm 0,98 *$	$43,0 \pm 5,85 *$
Эмфизема легких, леченная Треамидом (10 мг/кг)	$0,9 \pm 0,12 * \bullet$	$5,4 \pm 0,55 *$	$41,3 \pm 1,82 *$
14 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	$1,9 \pm 0,06 *$	$34,1 \pm 4,42 *$	$53,6 \pm 6,57 *$
Эмфизема легких, леченная Треамидом (10 мг/кг)	$0,7 \pm 0,09 * \bullet$	$29,03 \pm 1,76 *$	$42,6 \pm 1,79 * \bullet$
30 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	$11,8 \pm 1,83 *$	$26,2 \pm 1,84 *$	$68,2 \pm 7,61 *$
Эмфизема легких, леченная Треамидом (10 мг/кг)	$2,4 \pm 1,6 * \bullet$	$18,5 \pm 2,91 *$	$32,8 \pm 3,78 * \bullet$
60 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	$7,7 \pm 0,68 *$	$23,8 \pm 2,51 *$	$56,9 \pm 6,41 *$
Эмфизема легких, леченная Треамидом (10 мг/кг)	$3,6 \pm 0,26 * \bullet$	$24,9 \pm 3,11 *$	$40,0 \pm 3,57 * \bullet$

Примечания:

* - достоверность различия с интактным контролем ($P < 0,05$);

• - достоверность различия с патологическим контролем (эмфизема легкого) ($P < 0,05$).

Значительная часть ткани эластазных легких была занята эмфизематозно-расширенными альвеолами с разрушенными межальвеолярными перегородками. Площадь эмфизематозно-расширенной ткани в нижнем легочном поле достигала 43% от площади нормальных легких, в среднем легочном поле - 6,5%, в верхушке легкого - 1,3%. Как видно эмфизема локализовалась преимущественно в нижнем легочном поле. Наряду с растяжением альвеол наблюдались разрывы альвеолярных перегородок.

Эмфизематозно расширенные альвеолы вызывали сдавление неизмененных альвеол, вследствие чего в легких развивались очаговые ателектазы. В эластазных легких площадь соединительной ткани уменьшалась более чем в 3 раза ($P < 0,05$) по сравнению с интактным контролем на 7 сутки. Дополнительно было отмечено, что эластаза приводила к утолщению стенок альвеол за счет лимфо-макрофагальной инфильтрации и воспалительной инфильтрации интерстициальной ткани. Просвет отдельных альвеол также был заполнен макрофагами и лимфоцитами (табл. 35).

К 14 суткам происходило прогрессирование эмфиземы: отмечается увеличение площади эмфизематозно расширенных альвеол в среднем и нижнем легочном поле до 34,1 и 53,6% соответственно, и истончение их стенок (фиг. 4, табл. 35). Это приводило к истончению альвеолярных капилляров и их запустеванию. К 30 суткам наблюдения % эмфизематозно расширенной ткани в верхушке легкого и в нижнем легочном поле увеличивался. На 60 сутки величина показателя была незначительно ниже по сравнению с 30 сутками.

Введение Треамида мышам вызывало снижение интенсивности воспалительной инфильтрации па-

ренхимы легких на протяжении всего периода наблюдения. Препарат уменьшал площадь эмфизематозно-расширенных альвеол в верхушке легкого (7, 14, 30, 60 сутки) и в нижнем легочном поле (14, 30, 60 сутки) по сравнению с группой патологического контроля (фиг. 4, табл. 35).

Таким образом, на модели эластаза-индуцированной эмфиземы легкого пероральное применение Треамида оказывало регенеративное действие в отношении ткани легких: отмечалось уменьшение площади эмфизематозно-расширенной ткани легких. Это позволяет заключить, что Треамид может применяться в качестве препарата, восстанавливающего структурные и функциональные характеристики легких.

Пример 14. Исследование влияния Треамида на развитие легочного фиброза.

Токсическое повреждение альвеолярного эпителия легких, вызывающее легочный фиброз, моделировали интратрахеальным введением цитостатика блеомицина однократно в дозе 80 мкг/мышь в 30 мкл физиологического раствора. Для анестезии во время операции использовали ингаляционный эфирный наркоз. Операционное поле дезинфицировали 70% раствором этанола и освобождали от волосяного покрова. По средней линии шеи рассекали кожу, подкожную клетчатку и собственную фасцию шеи. Методом тупого раздвижения тканей раздвигали мышцы на вентральной стороне трахеи. По ходу тока воздуха на вдохе производили инъекцию блеомицина с помощью шприца Гамильтона. После ушивания раны операционное поле обрабатывали антисептиком. Введение блеомицина принимали за 0 день эксперимента.

Эффективность действия Треамида и воспроизведения легочного фиброза оценивали по количеству и интенсивности синтеза соединительной ткани в легких, а так же по гисто-архитектонике легких.

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что изменения морфологической картины легких мышей-самцов линии C57BL/6 после однократного интратрахеального введения блеомицина были подобны изменениям, характерным для фиброза легких. Так, окрашивание гистологических препаратов легких мышей линии C57BL/6 пикрофуксином по Ван-Гизону и последующая визуализация соединительной ткани позволили обнаружить значительное разрастание соединительной ткани в основном вокруг сосудов и бронхиол (фиг. 5; табл. 36). Дополнительно иммуноферментным анализом были исследованы гомогенаты легких животных интактного контроля и патологического контроля. Как видно из табл. 37, интратрахеальное введение блеомицина достоверно повышало уровни коллагена типа I, общего коллагена и гидроксипролина.

Таблица 36
Содержание соединительной ткани (%) в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях легочного фиброза на 21 сутки опыта ($M \pm m$, $n=10$)

Интактный контроль	Легочный фиброз (патологический контроль)	Легочный фиброз, леченный ХС-268-БГ в дозе 10 мг/кг
$0,91 \pm 0,09$	$2,29 \pm 0,13$ *	$1,17 \pm 0,20$ •

Примечания:

* - достоверность различия с интактным контролем ($P < 0,05$);

• - достоверность различия с патологическим контролем (легочный фиброз) ($P < 0,05$).

Таблица 37
Уровень общего коллагена, коллагена типа I и гидроксипролина в гомогенате легких у мышей линии C57BL/6 в условиях легочного фиброза на 21 сутки опыта ($M \pm m$, $n=10$)

Группы исследования	Коллаген I типа (ng/ml)	Общий коллаген (mg/ml)	Гидроксипролин (mkg/ml)
Интактный контроль	204 ± 17	$22,3 \pm 1,5$	$26,12 \pm 2,3$
Легочный фиброз, (патологический контроль)	$248,4 \pm 21^*$	$32,6 \pm 2,2^*$	$39,01 \pm 2,6^*$
Легочный фиброз, леченный ХС-268-БГ в дозе 10 мг/кг	$201,6 \pm 18^•$	$23,4 \pm 1,7^•$	$27,97 \pm 2,2^•$

Примечания:

* - достоверность различия с интактным контролем ($P < 0,05$);

• - достоверность различия с патологическим контролем (легочный фиброз) ($P < 0,05$).

Треамид в дозе 10 мг/кг был эффективен в лечении легочного фиброза: количество депонированных коллагеновых волокон вокруг сосудов и бронхиол снижалось до уровня интактного контроля (фиг.

5, табл. 37). Дополнительной характеристикой антифибротического действия Треамида выступало значительное падение концентрации коллагена, коллагена типа I и гидроксипролина в гомогенатах легких мышей с легочным фиброзом (табл. 37).

Полученные результаты позволяют заключить, что в условиях легочного фиброза Треамид оказывает антифибротическое действие, проявляющееся в нормализации продукции фибробластами коллагеновых волокон. Это свидетельствует о способности Треамида регенерировать фибробласты ткани легкого. Таким образом, Треамид может применяться в качестве препарата, препятствующего развитию фиброза легкого и способствующего регенерации легочной ткани.

Пример 15. Исследование влияния Треамида на развитие кахексии у животных с опухолью.

Кахексия развивалась у мышей-самцов линии C57B1/6 при моделировании гематогенно метастазирующей карциномы легких Льюис (LLC). Опухолевые клетки вводили мышам однократно подкожно в концентрации 5×10^6 в 0,1 мл физ. раствора (Yu-Chou T., Samuel K.K., I-Lu L. et al. Preclinical Investigation of the Novel Histone Deacetylase Inhibitor AR-42 in the Treatment of Cancer-Induced Cachexia// JNCI J Natl Cancer Inst (2015) 107(12)).

День введения опухолевых клеток приняли за 1 день эксперимента. Треамид вводили курсом в дозе 10 мг/кг ежедневно внутривенно один раз в сутки с 15 по 28 сутки исследования. Взвешивание животных проводили за сутки до введения опухолевых клеток (0 сутки) и на 28 сутки эксперимента. На 28 сутки исследования животных эвтаназируют в CO₂-камере и отбирали кровь. В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли уровень свободного тестостерона.

В результате исследования установлено, что масса животных на 28 сутки после перевивки карциномы легких Льюис (патологический контроль) с учетом вычета массы первичного опухолевого узла достоверно снизилась в 1,2 раза по сравнению с этим показателем в группе здоровых животных (табл. 38). Внутривенное введение Треамида полностью предотвращало потерю массы тела животных с карциномой легких Льюис (табл. 38).

Таблица 38

Масса тела мышей-самцов линии C57B1/6 с кахексией, индуцированной карциномой легких Льюис, с учетом вычета первичного опухолевого узла (г) на 28 сутки эксперимента ($M \pm m$, n=10)

Группы	Масса тела животных с учетом вычета массы опухоли
Интактный контроль	23,95 ± 0,39
Карцинома легких Льюис	20,44 ± 0,88 *
Карцинома легких Льюис, леченная Треамидом (10 мг/кг)	23,83 ± 0,57 •

Примечания:

* - достоверность различия с интактным контролем ($P < 0,05$);

• - достоверность различия с патологическим контролем (карцинома легких Льюис) ($P < 0,05$).

Иммуноферментный анализ сыворотки крови показал, что у животных патологического контроля на фоне карциномы легких Льюис на 28 сутки исследования происходит выраженное снижение уровня тестостерона в сыворотке крови (до 14,8% от интактного контроля) (табл. 39). Курсовое введение Треамида значительно повышало концентрацию свободного тестостерона в сыворотке крови животных с LLC.

Таблица 39

Уровень свободного тестостерона (pg/ml) в сыворотке крови мышей-самцов линии C57B1/6 с кахексией, индуцированной карциномой легких Льюис, на 28 сутки эксперимента ($M \pm m$, n=10)

Параметры	Интактный контроль	Карцинома легких Льюис	Карцинома легких Льюис, леченная треамидом (10 мг/кг)
Свободный тестостерон	11,36 ± 1,2	1,68 ± 0,22*	3,2 ± 0,3 *•

Примечания:

* - достоверность различия с интактным контролем ($P < 0,05$);

• - достоверность различия с патологическим контролем (карцинома легких Льюис) ($P < 0,05$).

Таким образом, в условиях развития карциномы легких Льюис пероральное применение Треамида

препятствовало развитию кахексии. Терапевтический эффект Треамида обусловлен восстановлением функции мышечной и тестикулярной тканей, что выражалось в восстановлении уровня свободного тестостерона в сыворотке крови пораженных животных. Это позволяет заключить, что Треамид может применяться в качестве препарата, препятствующего развитию кахексии.

Пример 40. Фармацевтическая композиция.

Состав на одну таблетку, мг

Компонент	мг	мг
Треамид (активное вещество)	5,00	50,00
Вспомогательные вещества:		
Целлюлоза микрокристаллическая (NF, Ph.Eur., JP)	60,00	300,00
Крахмал прежелатинизированный (Ph.Eur., USP, NF)	27,80	114,00
Карбоксиметилкрахмал натрия (Ph.Eur., NF, JP)	4,00	20,00
Тальк (Ph.Eur., USP, JP)	2,00	10,00
Магния стеарат (USP, NF)	1,00	5,00
Кремния диоксид коллоидный (Ph.Eur.)	0,20	1,00
Пленочная оболочка Opadry® II 31F280007	3,00	15,00
Масса таблетки, покрытой оболочкой	103,00	515,00

Заявителем было установлено, что Треамид способствует регенерации ткани и нормализации структуры ткани предстательной железы на моделях хронического абактериального простатита (ХАП) и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). Полученные данные позволяют заключить, что использование Треамида способствует регенерации эпителиальной ткани предстательной железы. Это выражается в снижении степени выраженности атрофических процессов. Последнее, очевидно, приведет к возрастанию функциональной активности эпителия ацинусов и будет способствовать восстановлению качественных характеристик эякулята.

Также заявителем экспериментально *in vivo* показано, что при введении Треамида признаки ДГПЖ были выражены в меньшей степени. Полученные данные свидетельствуют о наличии антипролиферативных свойств Треамида.

Также заявителем обнаружено, что Треамид является средством усиления процессов репаративной регенерации тестикулярной ткани и может использоваться для лечения тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением пролиферативного пула сперматогенеза.

Полученные заявителем экспериментальные данные свидетельствуют о наличии у Треамида способности непосредственно стимулировать функциональную активность клеток-предшественников сперматогенной ткани.

Также заявителем экспериментально подтверждено, что Треамид является перспективным для восстановления регенеративного потенциала семенника. Введение Треамида повышало регенераторный потенциал ткани. При этом лекарственное средство не только непосредственно стимулировало образование новых источников пролиферативного пула сперматогенеза (стволовых клеток), но усиливало действие гуморальных факторов, стимулирующих их образование.

Также заявителем экспериментально доказано, что Треамид восстанавливает подвижность сперматозоидов, сниженную вследствие введения паклитаксела.

Представленные заявителем данные свидетельствуют о том, что Треамид позволяет эффективно стимулировать репаративную регенерацию тестикулярной ткани, угнетение которой было обусловлено снижением количества коммитированных колониеобразующих клеток.

Кроме того, заявителем показана способность Треамида восстанавливать подвижность сперматозоидов при астеноспермии. Полученные данные свидетельствуют о том, что Треамид является эффективным средством восстановления подвижности сперматозоидов.

Также заявителем было показано, что Треамид восстанавливает подвижность сперматозоидов, выявляемую при гипогонадизме.

Многочисленные эксперименты подтверждают, что Треамид является эффективным средством восстановления копулятивной активности различной этиологии (в том числе возрастное снижение активности, сезонное снижение активности и другие).

Показано, что Треамид оказывает регенеративное действие в отношении ткани поджелудочной железы. Треамид может применяться для лечения нарушения толерантности к глюкозе и метаболического синдрома.

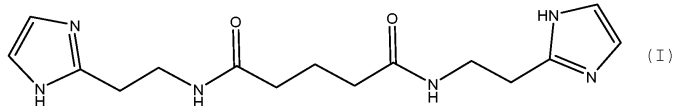
Также экспериментально показано, что Треамид может применяться в качестве препарата, восста-

навливающего структурные и функциональные характеристики ткани печени.

Также показано, что Треамид может применяться в качестве препарата, восстанавливающего структурные и функциональные характеристики ткани легких.

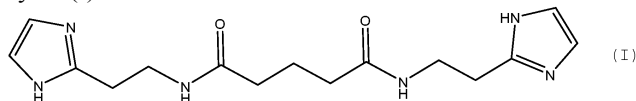
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения формулы (I)



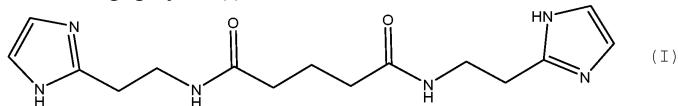
или его фармацевтически приемлемой соли для стимуляции регенерации тканей, где ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

2. Способ регенерации тканей, включающий введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I)



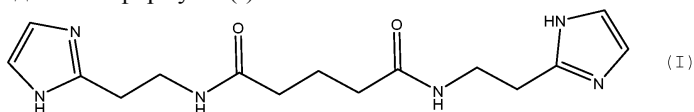
или его фармацевтически приемлемой соли, где ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

3. Применение соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли для регенерации тканей, где ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

4. Применение соединения формулы (I)

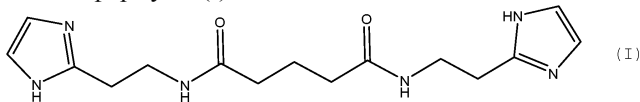


или его фармацевтически приемлемой соли для лечения патологических состояний, связанных с нарушениями структуры и функций тканей, где ткань выбрана из группы, включающей ткань поджелудочной железы, печени, легкого, сперматогенной ткани, тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

5. Применение по п.4, где патологическое состояние, связанное с нарушением структуры тканей, выбрано из группы, включающей метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе, идиопатический фиброз легкого, эмфизему легких, хроническую обструктивную болезнь легких, кахексию, гипогонадизм, простатит, доброкачественную гиперплазию предстательной железы, коррелятивную недостаточность яичек и аутоиммунный орхит.

6. Применение по п.5, где простатит представляет собой хронический простатит, в частности абактериальный хронический простатит; или простатит категории IIIb, или аутоиммунный простатит.

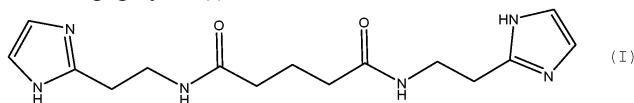
7. Применение соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли для нормализации сниженной мужской фертильности.

8. Применение по п.7, где снижение мужской фертильности обусловлено патологическим состоянием, выбранным из группы, включающей гипогонадизм, астеноспермию, эректильную дисфункцию, коррелятивную недостаточность яичек и тестикулярную недостаточность.

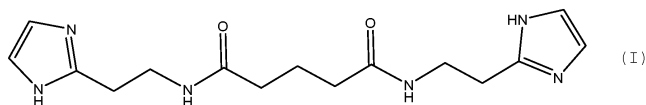
9. Применение соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления подвижности сперматозоидов.

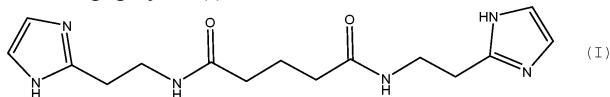
10. Применение по п.9, где снижение подвижности сперматозоидов обусловлено патологическим состоянием, выбранным из группы, включающей гипогонадизм, астеноспермию, коррелятивную недостаточность яичек и тестикулярную недостаточность.

11. Способ снижения уровня глюкозы в крови в лечении и/или профилактике патологического состояния, включающего метаболический синдром и нарушение толерантности к глюкозе, включающий введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I)



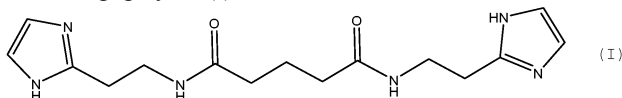
или его фармацевтически приемлемой соли.

12. Применение соединения формулы (I)



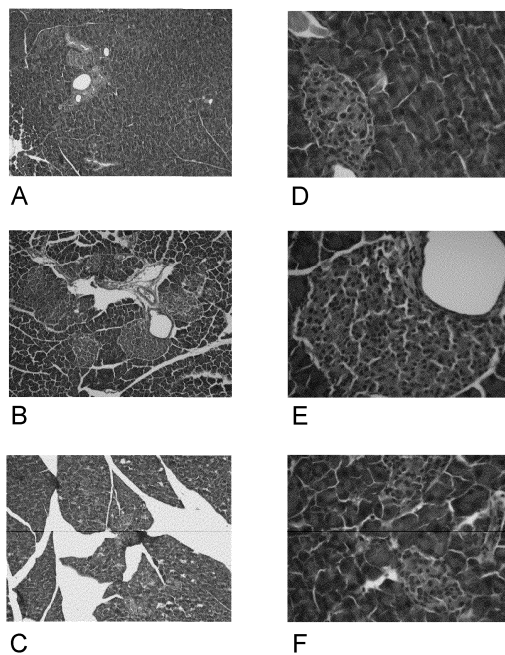
или его фармацевтически приемлемой соли для снижения уровня глюкозы в крови, где повышенный уровень глюкозы обусловлен патологическим состоянием, выбранным из группы, состоящей из метаболического синдрома и нарушения толерантности к глюкозе.

13. Применение соединения формулы (I)

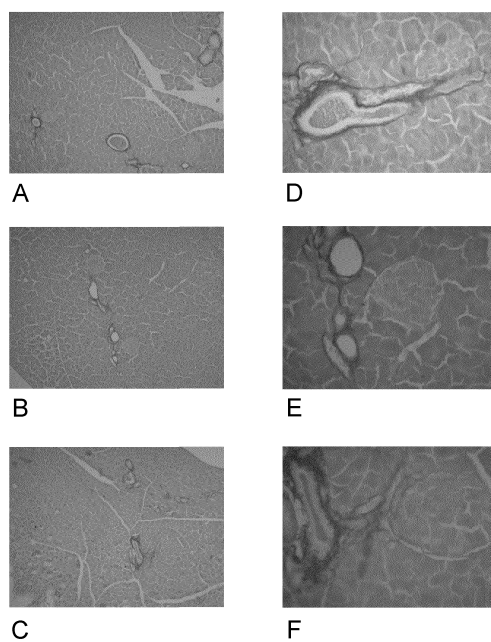


или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления структуры и функции легкого в лечении и/или профилактике патологического состояния, обусловленного нарушением структуры ткани.

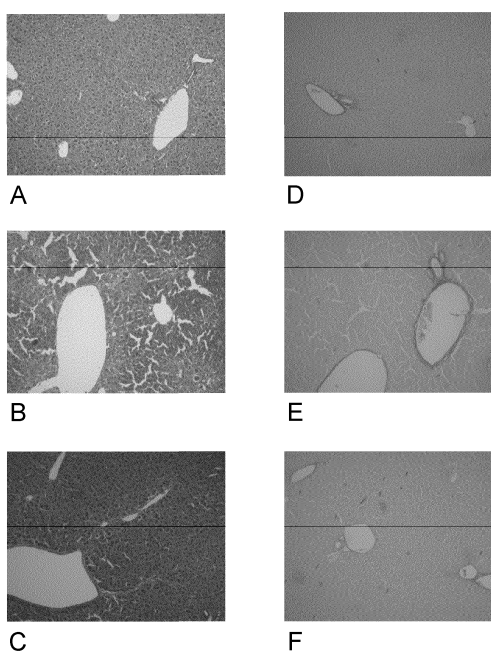
14. Применение по п.13, где патологическое состояние выбрано из группы, включающей хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), эмфизему легких и идиопатический фиброз легкого.



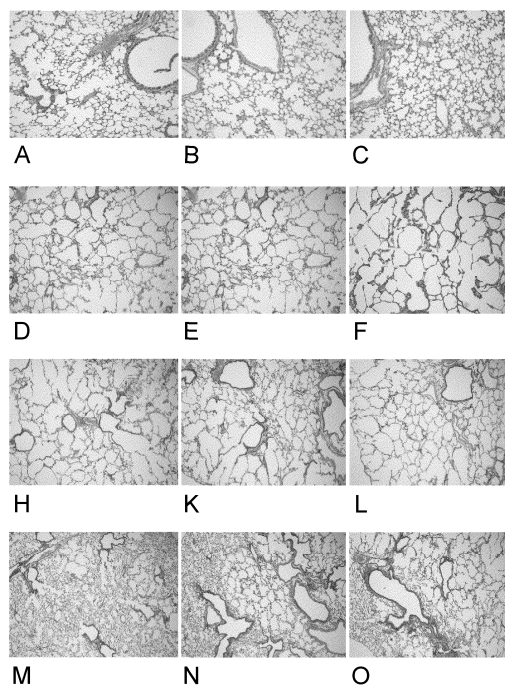
Фиг. 1



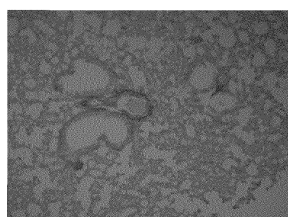
Фиг. 2



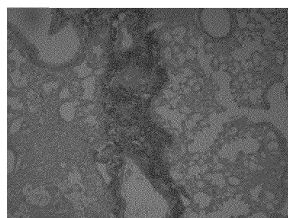
Фиг. 3



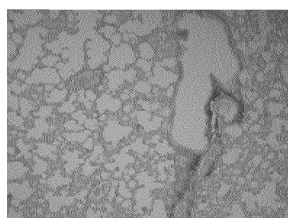
Фиг. 4



A



B



C

Фиг. 5

