



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122336** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)**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
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2017 12838**
(22) Дата подання заявки: **26.05.2016**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **27.10.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2015120055**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **27.05.2015**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **RU**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2018, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **26.10.2020, Бюл.№ 20**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/RU2016/050015, 26.05.2016**

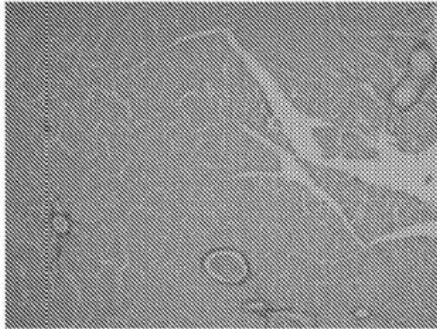
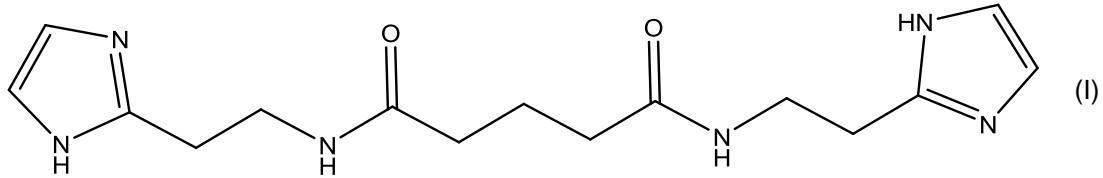
(72) Винахідник(и):
Небольсін Владімір Євгенєвич (RU),
Ридловская Анастасія Владімірівна (RU),
Дигаї Александр Міхайлович (RU),
Боровская Татьяна Генадєвна (RU),
Скуріхін Євгеній Германовіч (RU)
(73) Володілець (володільці):
ТРЕАМІД ТЕРАПЬЮТІКС ГМБХ,
Building S141, Muellerstrasse 178, 13353
Berlin, Germany (DE)
(74) Представник:
Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2014/168523 A1, 16.10.2014
HOIZUMI M. et al., "Diabetes treatment with the aim of blood glucose normalization.", Nihon Rinsho., (20120000), vol. 70, no. 8, pages 1445 - 1450
FERRY G et al., "A zinc chelator inhibiting gelatinases exerts potent in vitro anti- invasive effects.", European Journal of Pharmacology, (19980000), vol. 351, pages 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, (19930000), vol. 21, no. 25, pages 5950 - 5956

(54) БІСАМІДНА ПОХІДНА ДИКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ЗАСІБ, ЩО СТИМУЛЮЄ РЕГЕНЕРАЦІЮ ТКАНИН І ВІДНОВЛЕННЯ ЗНИЖЕНИХ ФУНКЦІЙ ТКАНИН**(57) Реферат:**

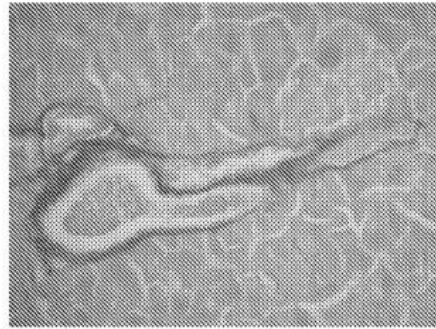
Винахід належить до галузі медицини і стосується засобу, що стимулює регенерацію тканин і відновлення знижених функцій тканин і органів. Як лікарський засіб для лікування і/або профілактики патологічного стану, вибраного з групи, що включає метаболічний синдром,

UA 122336 C2

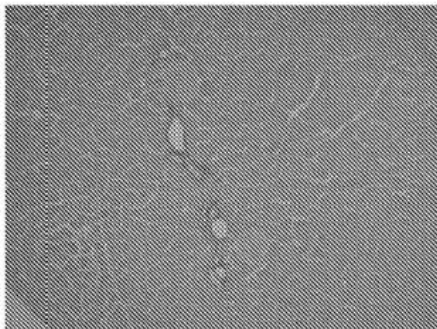
порушення толерантності до глюкози, гепатит, зокрема хронічний гепатит і токсичний гепатит, ідіопатичний фіброз легені (ІФЛ), емфізему легень, хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), і кахексію, зокрема, обумовлену порушенням толерантності до глюкози, легневим фіброзом, хронічною обструктивною хворобою легень, раком і іншими захворюваннями. Пропонується застосовувати засіб на основі Треаміду. Останній являє собою бісамідну похідну дикарбонової кислоти формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль.



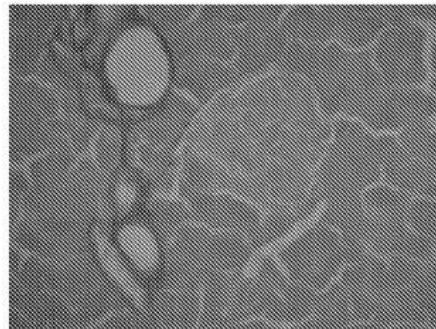
A



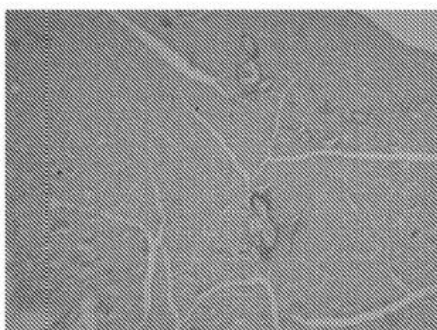
D



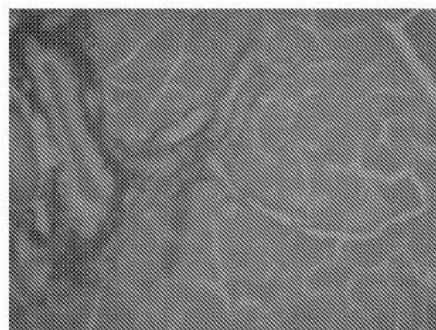
B



E



C



F

ФІГ. 2

Галузь техніки

Винахід належить до галузі медицини, конкретно до фармакології, урології, андрології, ендокринології, пульмонології, гастроентерології, і стосується засобу, що стимулює регенерацію тканин і відновлення знижених функцій тканин і органів.

5 Більш конкретно, винахід належить до способу стимуляції регенерації тканин і відновлення знижених функцій тканин і органів, і ще більш конкретно, регенерації і відновлення знижених функцій тканини підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини, тканини передміхурової залози.

10 Винахід також належить до засобу нормалізації зниженої чоловічої фертильності (лікування чоловічої безплідності), яка може бути обумовлена такими патологічними станом, як гіпогонадізм, зокрема, гіпогонадотропний або гіпергонадотропний гіпогонадізм, астеноспермія, еректильна дисфункція, корелятивна недостатність яєчок, тестикулярна недостатність і інші захворювання.

15 Даний винахід може бути використаний для лікування і профілактики патологічних станів, вибраних з групи, що включає метаболічний синдром, порушення толерантності до глюкози, гепатит, ідіопатичний фіброз легені, емфізему легень, хронічну обструктивну хворобу легень, кахексію, гіпогонадізм, переважно, гіпогонатропний гіпогонадізм або гіпергонадотропний гіпогонадізм; простатит; доброякісну гіперплазію передміхурової залози, корелятивну недостатність яєчок і автоімунний орхіт.

20 Винахід також належить до засобу для відновлення рухливості сперматозоїдів.

Рівень техніки

Багато патологічних станів, серед яких метаболічний синдром, порушення толерантності до глюкози, гепатит, емфізема легень, хронічна обструктивна хвороба легень, простатит, доброякісна гіперплазія простати, гіпогонадізм, тестикулярна недостатність, астеноспермія, супроводжуються зниженням функціональної активності і порушенням структури тканин уражених органів.

30 Метаболічний синдром - патологічний симптомокомплекс, що включає різні метаболічні і гормональні порушення. Діагноз «метаболічний синдром» ставлять за наявності центрального ожиріння і як мінімум двох з далі перерахованих факторів: 1) підвищення рівня тригліцеридів ≥ 150 мг/дл (1,7 ммоль/л), 2) зниження рівня холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) < 40 мг/дл (1,03 ммоль/л) (чоловіки), < 50 мг/дл (1,29 ммоль/л) (жінки), 3) артеріальна гіпертензія (артеріальний тиск (АТ) $\geq 130/85$ мм рт. ст. або нормальний АТ, що контролюється гіпотензивними препаратами), 4) підвищення рівня глюкози плазми ≥ 100 мг/дл (5,6 ммоль/л). Метаболічний синдром у цей час приблизно однаково часто зустрічається у чоловіків і жінок, його частота, наприклад, у США досягає 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].

40 За даними різних авторів, у 30-50% чоловіків з ожирінням і іншими проявленнями метаболічного синдрому виявляється гіпогонадізм (дефіцит тестостерону). Багатьма дослідниками виявлена не тільки висока поширеність гіпогонадізму у чоловіків з метаболічним синдромом, але і зв'язок між рівнем загального тестостерону в плазмі і проявленнями метаболічного синдрому. Отримані дані як про взаємозв'язок між надлишковою масою тіла і низьким рівнем тестостерону, так і про зв'язок між інсулінорезистентністю і зниженням вмісту тестостерону в сироватці крові у чоловіків з ожирінням [Svartberg J., von Mühlen 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]. Зниження вмісту тестостерону в сироватці крові під час метаболічного синдрому і стану інсулінрезистентності у чоловіків відбувається внаслідок порушення функціональної активності тестикулярної тканини. Згідно з цим способи регенерації тестикулярної тканини з метою лікування гіпогонадізму як

50 самостійного захворювання, так і супутнього метаболічному синдрому є актуальними.

Підшлункова залоза дорослої людини містить приблизно 109 клітин. В нормі β -клітини, що виснажилися, постійно замінюються новими, що розмножуються в підшлунковій залозі (Minami K., Seino S. Current status of regeneration of pancreatic β -cells. Journal of Diabetes investigation. Volume 4, Issue 2. pages 131-141 March 2013). Під час різних порушень роботи підшлункової залози, таких як автоімунні або токсичні ураження, β -клітини острівців Лангерганса спочатку характеризуються зниженою функціональною активністю, яка проявляється у зниженні продукції інсуліну, а на більш пізніх стадіях гинуть. Явні ознаки ураження тканини підшлункової залози з'являються, коли зруйновано вже більше 90% β -клітин, дефіцит інсуліну стає постійним і виникає повна залежність від інсуліну, що вводиться ззовні.

Інсулінотерапією не вдається досягти того ступеня точності регуляції глікемії, яка забезпечується під час нормального функціонування острівців Лангерганса. Тривають спроби лікування ушкодженої підшлункової залози трансплантацією всього органа, острівців Лангерганса, β -клітин. Але трансплантація не завжди проходить успішно (частим є проявлення відторгнення трансплантата). У випадку успішного проведення трансплантації, згодом потрібно постійне застосування імунодепресантів.

Інша проблема - порушення толерантності до глюкози. Вона являє собою порушення метаболічної відповіді на ендогенний або екзогенний інсулін. Даний стан призводить до підвищеної концентрації інсуліну в плазмі крові у порівнянні з фізіологічними значеннями для наявної концентрації глюкози. Найбільше клінічне значення має порушення толерантності до глюкози м'язової, жирової і печінкової тканин. Порушення толерантності до глюкози м'язової тканини проявляється у знижуванні надходження глюкози з крові у міоцити і її утилізації у м'язових клітинах, жировій тканині - у резистентності до антиліполітичної дії інсуліну, що призводить до накопичення вільних жирних кислот (ВЖК) і гліцерину. ВЖК надходять у печінку, де стають основним джерелом утворення атерогенних ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ). Порушення толерантності до глюкози тканини печінки характеризується зниженням синтезом глікогену і активацією розпаду глікогену до глюкози (глікогеноліз) і синтезу глюкози de novo з амінокислот, лактату, пірувату, гліцерину (глюконеогенез). Таким чином лікування порушення толерантності тканин до глюкози дозволить відновити функціональну активність тканин.

Печінка - життєво важлива залоза організму. Вона виконує близько 500 унікальних функцій, що забезпечують процеси травлення, інактивацію токсичних речовин, синтез компонентів згортання крові, метаболізм білків, амінокислот, жирів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, вітамінів, мікроелементів і т.д. Тканина печінки часто ушкоджується хімічними, мікробними, травматичними, фармацевтичними і іншими несприятливими факторами. Це призводить до зменшення кількості працездатних гепатоцитів. Хронічний гепатит різної етіології може тривати багато років, при цьому його часто діагностують на пізніх стадіях розвитку хвороби, коли різко зростає імовірність розвитку цирозу печінки і хронічної печінкової недостатності [Jung Y1, Witek RP, Syn WK. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors// Gut. -2010. -Vol. 5. P. 655-65].

Відомі гепатопротектори: Есенціале, ліпоєва кислота, Сирепар, α токоферол. Однак ці засоби не можуть повністю захистити або відновити порушені функції мембран, мітохондрій і інших структур гепатоцитів, оскільки кожний з них впливає лише на окремі стадії патогенезу гепатитів. У зв'язку з цим сучасні гепатопротектори використовуються в комплексній терапії. Однак такий підхід до лікування гепатитів небезпечний взаємодією препаратів внаслідок поліпрагмазії і ускладненням перебігу захворювання. Одночасно практично всі препарати даної групи мають побічні ефекти, які обмежують їхнє застосування. У зв'язку зі сказаним вище, розробка методів, здатних ефективно стимулювати регенерацію печінки, залишається достатньо актуальною.

Однією з найчастіших патологій клініки чоловічої безплідності є запальні захворювання придаткових статевих залоз.

До запальних захворювань придаткових залоз відносять захворювання передміхурової залози, що супроводжуються запаленням, такі, як гострий бактеріальний простатит, хронічний бактеріальний простатит, ДГПЗ (доброякісна гіперплазія передміхурової залози), а також запалення сім'яних пухирців, таке як, гострий або хронічний везикуліт. До захворювань передміхурової залози належать також хронічний абактеріальний простатит, хронічний незапальний простатит або простатит категорії 3Б [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, N 2. P. 82-85].

Зазначені вище патології зустрічаються у 40-70% чоловіків. У 40% чоловіків з патоспермією спостерігається хронічний простатит, який у 80% випадків є абактеріальним (Benway B.M., Moon T.D.// Urol Clin North Am 2008 Feb; 35(1):23-32).

Слід зазначити, що хронічні запалення передміхурової залози дуже часто супроводжуються доброякісною гіперплазією передміхурової залози (ДГПЗ). Спостережувана на фоні ДГПЗ гіперпролактинемія призводить до еректильної недостатності, до олігоспермії. Це, безумовно, знижує чоловічий репродуктивний потенціал [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].

Багато аспектів проявлення захворювань простати впливають на якість еякуляту, тому що передміхурова залоза виділяє фактори, що підтримують, насамперед, рухливість сперматозоїдів. У зв'язку з цим на фоні розвитку захворювань простати виявляється

корелятивна недостатність яєчок (вторинна безплідність). Таким чином, лікування захворювань передміхурової залози сприятливо позначається на чоловічій фертильності.

У цей час до препаратів, що виявляють позитивну дію на фактори, що супроводжують перебіг абактеріальних хронічних простатитів і ДГПЗ, належать екстракти, виділені з рослинної сировини - Простамол Уно [Bayane C.W., Ross M., Donnelly F., Habib F.K.// J. Urol. 2000. Vol. 164, N3, Pt.1. P.876-881]. Однак, їх ефективність не завжди виявляється достатньо високою.

До зниження чоловічої фертильності призводить також пригнічення процесу утворення андрогенів (гіпогонадізм) [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology 2014. 7].

Чоловічий гіпогонадізм у цей час виявлений у 4-5 млн. чоловік. Гіпогонотропний гіпогонадізм (або вторинний гіпогонадізм) обумовлений недостатністю гонадотропнів. Первинний гіпогонадізм обумовлений порушенням функції тестикулярної (яєчкової) тканини сім'яника. Його неспадкоємні форми (набутий гіпогонотропний гіпогонадізм) можуть бути наслідком зовнішніх впливів, приймання лікарських препаратів (анаболічних стероїдів, метоклопраміду, фенотіазиду, наркотичних засобів і ін.), променевої терапії [Filicori M. Endocrine basis of reproductive function. -Bologna: Monduzzi Editore, 2000. -R 605.; Meczekalski B., Tonetti A., Monteleoner et al. Hypothalamic amenorrhea with normal body weight: ACTH, allopregnanolone and cortisol responses to corticotrophin - releasing hormone test // Eur. J. Endocrinol. -2000. -V.142. -R. 280-285].

Пацієнтам з вторинним гіпогонадізмом призначають тестостерон [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology 2014, p.35]. Однак тестостерон має багато протипоказань і побічних ефектів.

Відомий препарат Трибестан (виробник Sofarma (Болгарія)), який стимулює у чоловіків вироблення тестостерону і підвищує рухливість сперматозоїдів, однак ефективність даного препарату не завжди висока.

Гіпогонадізм, обумовлений патологією статевих залоз (гіпергонотропний гіпогонадізм або тестикулярна недостатність), належить до найбільш частої форми зниження чоловічої фертильності [Dohie G.R., Diemer A., Giwerman A., Jungwith A., Kora Z., Kraus C. Man Infertility, European Association of Urology 2014, p.8].

До причин його виникнення належить дія екзогенних факторів, таких як лікарські препарати, у тому числі цитостатичні засоби, опромінення, підвищення температури. Тривале зниження продуктивності сперматогенезу, аж до його повної зупинки, є наслідком ушкодження сперматогоній типу А. Відновлення сперматогенезу після ушкодження може відбуватися тільки за рахунок цих клітин. Вони не втрачають специфічності статевих клітин, тому що незворотно визначилися як попередники сперматогенезу, і, як стовбурові клітини, володіють здатністю до колонієутворення. Ці клітини складають глибокий резерв регенераційної здатності сперматогенної тканини.

Відомо, що проліферативний потенціал сперматогенезу може бути відновлений за рахунок трансплантації сперматогенних клітин. Для лікарської терапії гіпергонотропного гіпогонадізму рекомендується застосовувати тестостерон. Він стимулює заключну фазу сперматомейозу, тобто постмітотичні поділи, призводячи тим самим до збільшення кількості сперматоцитів і до збільшення продуктивності сперматогенезу за рахунок стимуляції його кінцевої фази. Недоліком цього засобу є відсутність ефективності відносно стимуляції сперматогоній, які, як відомо, діляться мітотично.

Засобів медикаментозного лікування чоловічої безплідності, обумовленої виснаженням глибокого резерву регенераційної здатності сперматогенної тканини, з відновленням кількості комітованих колонієутворювальних сперматогенних клітин, на фармацевтичному ринку не надано. Пропонований у даному винаході засіб відновлення чоловічої фертильності під час тестикулярної недостатності, обумовленої ушкодженням стовбурових клітин, не має аналогів серед існуючих засобів лікування цієї патології.

У багатьох випадках зниження фертильності у чоловіків обумовлено порушенням якості сперми. До найбільш частої патології еякуляту належить астеноспермія (Kao S. H. et.al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. Fertil. and Steril. 2008; 89:5: 1183-1190). Порушення сперматогенезу по типу астеноспермії розглядають як окрему нозологічну форму. Вона є наслідком вікових змін, паління, запалення, дисгормональних розладів, впливу токсичних речовин, високих температур. Лікування астеноспермії залежить від причин її виникнення. У більшості випадків рекомендують хоріогонічний гонадотропін і тестостерон. Однак ці гормональні лікарські засоби викликають серйозні побічні ефекти і мають протипоказання.

Для лікування астеноспермії рекомендується препарат Спеман, який стимулює сперматогенез і підвищує рухливість сперматозоїдів. Препарат є дорогим, складається зі складної композиції лікарських трав, що ростуть у різних країнах світу і мають обмежені сировинні запаси. Як недолік слід зазначити, що він має не дуже високу ефективність.

Емфізема легень, хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ) і ідіопатичний фіброз легень (ІФЛ) є важкими багатофакторними легеневиими розладами, в яких хронічний і прогресуючий перебіг характерний для людей похилого віку (переважно для чоловіків). Клінічна картина і патогенез ХОХЛ відрізняється від ІФЛ. Причиною слабко оборотного і прогресуючого обмеження повітряного потоку під час ХОХЛ є запалення дихальних шляхів і емфізематозне розширення альвеол і бронхіол [Hogg JC, Timens W: The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 2009, 4:435-459], у той час як обмеження легеневих функцій під час ІФЛ настає внаслідок розвитку інтерстиціального фіброзу і формування стільникової легені [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]. Поширеність цих двох захворювань легень зовсім різні. Однак з кожним роком частота і поширеність ІФЛ неухильно зростає, що пов'язано, у тому числі, з покращенням діагностичних засобів. У свою чергу поширеність ХОХЛ завжди була дуже високою. Багато в чому захворювання пов'язано з вдиханням шкідливих зовнішніх агентів (в основному у наслідок тютюнопаління).

Незважаючи на достатньо велику кількість експериментальних і клінічних досліджень розуміння патогенезу емфіземи легень і ХОХЛ обмежено, не існує визнаних ефективних підходів лікування даного захворювання. Існуючий набір лікарських засобів для ІФЛ обмежений глюкокортикоїдами, циклофосфамідом, імунодепресантами, антикоагулянтами і спрямований на лікування ускладнень і є по своїй суті підтримувальною терапією. У цей час тільки такий терапевтичний агент, як пірфенідон, був схвалений для лікування ІФЛ. Тим часом, пірфенідон у клінічних дослідженнях не виявив очікувану високу антифібротичну активність на етапі розгорнутої стадії хвороби. Крім цього препарат володіє багатьма побічними ефектами, використовується у високих дозах.

Під час розвитку ІФЛ, ХОХЛ, злоякісних новоутворень і багатьох інших хронічних захворювань спостерігається різка втрата маси тіла. Найбільшу небезпеку відображає крайній ступінь виснаження - кахексія. Клінічно кахексія проявляється надмірною втратою ваги в умовах захворювання, що перебігає, звичайно з диспропорційною атрофією скелетних м'язів.

Під час захворювань, що призводять до кахексії, спостерігається знижування функціональної активності тестикулярної тканини і, як наслідок, знижування рівня тестостерону. Тестостерон стимулює міобласти і підвищує число клітин-сателітів, тим самим сприяючи синтезу білка і відновленню ушкоджених м'язів [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]. Також тестостерон приглушує синтез прозапальних цитокінів IL-1, IL-6, TNF α і стимулює продукування протизапального цитокіну - IL-10. Із запаленням зв'язують крайній ступінь виснаження під час різних захворювань. Медіатори запалення перешкоджають синтезу м'язових білків під час кахексії, беруть участь у ліполізі і бета-окисненні жирних кислот [Ryden M., Arvidsson E., Blomqvist L., Perbeck L., Dicker A., Arner P. Targets for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:168-175].

На жаль, дотепер не існує єдиного визнаного підходу до лікування кахексії. Відомі численні спроби коригування цього стану. Терапія пацієнтів з вираженою втратою маси тіла включає препарати тестостерону, гормони росту (соматропін), стимулятори апетиту (антагоністи серотоніну, прогестагени, дронабінол) і інгібітори глюконеогенезу (гідразину сульфат), однак їх ефективність недостатня.

Таким чином, завданням даного винаходу є розробка засобу регенерації і відновлення знижених функцій тканин. Такий засіб буде, зокрема, сприяти лікуванню порушень толерантності до глюкози, гепатиту, емфіземи легені, хронічної обструктивної хвороби легень, ідіопатичного фіброзу легень, кахексії, а також сприяти відновленню чоловічої репродуктивної функції і дозволить подолати недоліки відомих засобів, описаних вище.

Більш конкретно, першим завданням наданого винаходу є розробка засобу, який сприяє регенерації тканин, зокрема, тканин підшлункової залози, печінки, легені, тестикулярної тканини, тканини передміхурової залози, м'язової тканини. Зокрема, засіб за винаходом повинен сприяти регенерації тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу зниження рівня глюкози в крові, підвищення якого обумовлено, зокрема, такими патологічними станами, як метаболічний синдром або порушення толерантності до глюкози.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу відновлення функції печінки, зниження якої обумовлено, зокрема, такими патологічними станами, як хронічний гепатит різної етіології.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу нормалізації зниженої чоловічої статевої активності, обумовленої, зокрема, такими патологіями, як гіпогонадізм, корелятивна недостатність яєчок, тестикулярна недостатність.

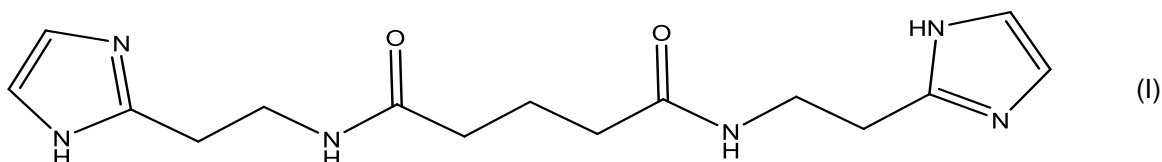
Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу відновлення сперматогенезу (у тому числі, рухливості сперматозоїдів), зниження якого обумовлено зокрема, такими патологіями, як метаболічний синдром, простатит, гіпогонадізм, астеноспермія, тестикулярна недостатність, і іншими захворюваннями.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу відновлення порушеної гістоархітеконики і функцій легеневої тканини, обумовленої зокрема такими патологіями, як емфізема, ідіопатичний фіброз легені і хронічна обструктивна хвороба легень.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу відновлення структури і функції печінки.

Наступним завданням наданого винаходу є розробка засобу для відновлення структури і функції підшлункової залози, обумовленої такими захворюваннями як метаболічний синдром і порушення толерантності до глюкози.

Поставлені завдання вирішуються тим, що як лікарський засіб для лікування і/або профілактики вказаних вище патологічних станів пропонується застосовувати засіб на основі Треаміду. Останній являє собою бісамідну похідну дикарбонової кислоти формули (I):



або її фармацевтично прийнятну сіль.

Дана сполука була описана в заявці RU 2013116822 (опубл. 20.10.2014), що присвячена новим сполукам, придатним для використання як хелатори металів, у тому числі і для лікування асоційованих з хелатуванням металів захворювань.

Заявником вперше виявлено, що Треамід володіє здатністю ефективно регенерувати тканини і відновлювати їхню знижену функцію, зокрема, це стосується тканин чоловічої статевої системи. Треамід зменшує ступінь вираженості морфологічних змін передміхурової залози під час абактеріального простатиту і ДГПЗ, відновлює рухливість сперматозоїдів, підсилює статевий потяг і копулятивну активність, що, у сукупності, веде до відновлення чоловічої репродуктивної функції.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фіг. 1 - Морфологічна картина підшлункової залози у мишей-самців лінії 357Bl/6 інтактного контролю, на 70у добу метаболічних порушень без лікування (патологічний контроль) і 70у добу метаболічних порушень з проведеним курсом лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

А: Треамід у дозі 10 мг/кг (×100); В: Інтактний контроль (×100); Патологічний контроль (×100); D: Треамід у дозі 10 мг/кг (×400); Е: Інтактний контроль (×100) ; F: Інтактний контроль (×400)

Фіг. 2 - Морфологічна картина підшлункової залози у мишей самців лінії 357Bl/6 інтактного контролю, на 70у добу метаболічних порушень без лікування (патологічний контроль) і 70у добу метаболічних порушень з проведеним курсом лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг. Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізону.

А: Треамід у дозі 10 мг/кг (×100); В: Інтактний контроль (×100); Патологічний контроль (×100); D: Треамід у дозі 10 мг/кг (×400); Е: Інтактний контроль (×400) ; F: Патологічний контроль (×400)

Фіг. 3 - Морфологічна картина печінки у мишей лінії C57Bl/6 групи інтактного контролю, групи патологічного контролю хронічного токсичного гепатиту, і групи тварин, що одержують лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг, збільшення ×100, препарати виготовлені на 28-у добу дослідження.

А, В, С - Забарвлення гематоксиліном і еозином, D, Е, F - забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізону. А, D - Інтактний контроль, В, Е - патологічний контроль, С, F - тварини з гепатитом, що одержали лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг.

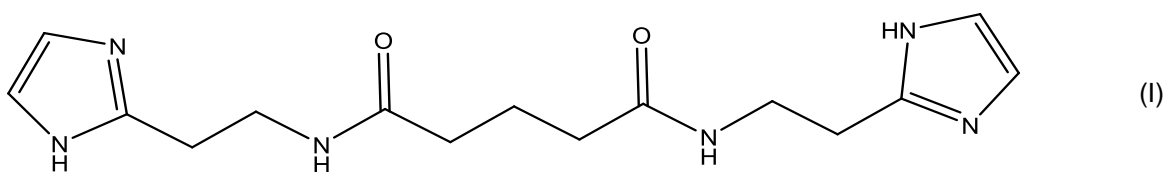
Фіг. 4 - Морфологічна картина легень у мишей-самок лінії C57Bl/6 групи інтактного контролю, групи патологічного контролю мишей з емфіземою на 14 і 30 добу, і групи тварин, що одержують лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг, на 30 добу. Збільшення $\times 100$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Інтактний контроль: А - верхівка легені, В - середнє легеневе поле і С - нижнє легеневе поле. Патологічний контроль (14 доба): D - верхівка легені, Е - середнє легеневе поле і F - нижнє легеневе поле. Патологічний контроль (30 доба): Н - верхівка легені, К - середнє легеневе поле і L - нижнє легеневе поле. Група тварин, що одержала лікування Треамідом: М - верхівка легені, N - середнє легеневе поле і О - нижнє легеневе поле.

Фіг. 5 - Морфологічна картина легень мишей-самців лінії C57BL/6 інтактного контролю (А), патологічного контролю (В) і групи мишей з легеневим фіброзом, що одержали лікування Треамідом у дозі 10 мг/кг (С). Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізону (збільшення $\times 100$), препарати виготовлені на 21-у добу експерименту.

Коротке викладення суті винаходу

Наданий винахід належить до фармацевтичної композиції для регенерації тканин, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій. Також наданий винахід належить до лікарського засобу для регенерації тканин, що являє собою сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль.

В одному варіанті здійснення винаходу тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

Наданий винахід також належить до способу регенерації тканин, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, ефективної кількості сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі. Далі, наданий винахід належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для регенерації тканин. В одному варіанті здійснення винаходу тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози. Наданий винахід також належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для лікування патологічних станів, пов'язаних з порушеннями структури тканин. В одному варіанті здійснення винаходу патологічний стан вибраний з групи, що включає метаболічний синдром, порушення толерантності до глюкози, гепатит, зокрема хронічний гепатит і токсичний гепатит, ідіопатичний фіброз легені (ІФЛ), емфізему легень, хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), і кахексію, зокрема, обумовлену порушенням толерантності до глюкози, ідіопатичним легеневим фіброзом, хронічною обструктивною хворобою легень, раком, і іншими захворюваннями. В іншому варіанті захворювання являє собою гіпогонадізм і асоційоване з ним порушення еректильної дисфункції і/або лібідо, простатит і асоційоване з ним порушення еректильної дисфункції і/або лібідо, доброякісну гіперплазію передміхурової залози, корелятивну недостатність яєчок, автоімунний орхіт, де гіпогонадізм переважно являє собою гіпогонатропний гіпогонадізм або гіпергонадотропний гіпогонадізм. Простатит може являти собою абактеріальний, автоімунний простатит, або простатит категорії Б.

Наданий винахід крім того належить до фармацевтичної композиції для нормалізації зниженої чоловічої фертильності, що включає ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі і фармацевтично прийнятний носій.

Винахід також належить до лікарського засобу для нормалізації зниженої чоловічої фертильності, що являє собою сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль.

Наданий винахід також належить до способу нормалізації зниженої чоловічої фертильності, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, ефективної кількості сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі. Наданий винахід далі належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для нормалізації зниженої чоловічої фертильності. Зниження чоловічої фертильності у переважному варіанті обумовлено патологічним станом, що включає гіпогонадізм, переважно, гіпогонатропний гіпогонадізм або

гіпергонадотропний гіпогонадізм; астеноспермію, еректильну дисфункцію, корелятивну недостатність яєчок, тестикулярну недостатність і інші захворювання. Зниження чоловічої фертильності може бути також обумовлено пригніченням копулятивної активності і лібідо, які, зокрема, можуть бути спровоковані захворюваннями, перерахованими вище.

5 Наданий винахід належить до фармацевтичної композиції для відновлення рухливості сперматозоїдів, що включає ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі і фармацевтично прийнятний носій. Також винахід належить до лікарського засобу для відновлення рухливості сперматозоїдів, що являє собою сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль. Винахід далі належить до способу відновлення рухливості сперматозоїдів, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, ефективної кількості сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі. Наданий винахід також належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення рухливості сперматозоїдів, де таке зниження може бути обумовлено гіпогонадізмом, астеноспермією, корелятивною недостатністю яєчок, тестикулярною недостатністю. Також зниження рухливості може бути обумовлено пригніченням копулятивної активності і лібідо різної етіології.

Наданий винахід також належить до фармацевтичної композиції для зниження рівня глюкози в крові у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I). Наданий винахід також належить до лікарського засобу для зниження рівня глюкози в крові, що являє собою сполуку формули (I). Також винахід належить до способу зниження рівня глюкози в крові у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі. При цьому патологічний стан може бути вибраний з групи, що включає метаболічний синдром і порушення толерантності до глюкози. Також винахід належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для зниження рівня глюкози в крові.

Також винахід належить до фармацевтичної композиції для відновлення структури і функції печінки у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій.

30 Наданий винахід також належить до лікарського засобу для відновлення структури і функції печінки, що являє собою сполуку формули (I). При цьому патологічний стан може бути вибраний з групи, що включає гепатит, зокрема, хронічний гепатит і токсичний гепатит. Наданий винахід також належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення функції печінки.

35 Також наданий винахід належить до фармацевтичної композиції для відновлення структури і функції легені у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій. При цьому патологічний стан може бути вибраний з групи, що включає хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), емфізему легень, і ідіопатичний фіброз легені. Наданий винахід також належить до лікарського засобу для відновлення структури і функції легені, що являє собою сполуку формули (I). Наданий винахід також належить до застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення структури і функції легені.

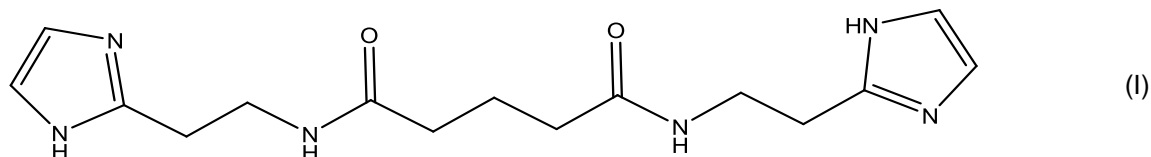
45 Наданий винахід також належить до фармацевтичної композиції для відновлення структури і функції підшлункової залози у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій. При цьому патологічний стан може бути вибраний з групи, що включає метаболічний синдром і порушення толерантності до глюкози.

50 Наданий винахід також належить до лікарського засобу для відновлення структури і функції підшлункової залози, що являє собою сполуку формули (I). Також об'єктом винаходу є застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення структури і функції підшлункової залози.

Докладний опис винаходу

55 Винахід належить до засобу стимуляції регенерації тканин і відновлення знижених функцій тканин і органів, і ще більш конкретно, регенерації і відновлення знижених функцій тканини підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини, тканини передміхурової залози.

60 Об'єктом наданого винаходу є засіб, який сприяє регенерації тканин, зокрема, тканин, що беруть участь у функціонуванні чоловічих статевих залоз. Даний засіб являє собою бісамідну похідну дикарбонової кислоти формули (I):



або її фармацевтично прийнятну сіль, відому також за назвою Треамід.

Як фармацевтично прийнятні солі сполуки формули (I) за наданим винаходом можуть бути використані кислотно-адитивні солі органічних кислот (наприклад, формиат, ацетат, малеат, тартрат, метансульфонат, бензолсульфонат, толуолсульфонат і ін.), кислотно-адитивні солі неорганічних кислот (наприклад, гідрохлорид, гідробромід, сульфат, фосфат і ін.), солі з амінокислотами (наприклад, сіль аспарагінової кислоти, сіль глутамінової кислоти і т.д.), переважно, хлоргідрати і ацетати.

Заявником вперше виявлено, що Треамід володіє здатністю ефективно регенерувати тканини і відновлювати знижену функцію тканин, зокрема, це належить до тканин, що беруть участь у функціонуванні чоловічих статевих залоз.

До тканин, що беруть участь у функціонуванні чоловічих статевих залоз, належать різні види епітеліальних тканин, зокрема епітелій сім'яних звивистих каналців (тестикулярна тканина), епітелій (ацинусів) структурних одиниць простати (тканина простати), а також різні види з'єднувальних тканин.

Заявником також було виявлено, що Треамід ефективно нормалізує знижену чоловічу статеву активність, обумовлену, зокрема, такими патологіями, як гіпогонадізм, корелятивна недостатність яєчок, тестикулярна недостатність.

Заявником також було виявлено, що Треамід ефективно відновлює рухливість сперматозоїдів, порушення якої обумовлено, зокрема, такими патологіями, як простатит, гіпогонадізм, астеноспермія, корелятивна недостатність яєчок, тестикулярна недостатність.

Сполуку формули (I) вводять в ефективній кількості, яка забезпечує бажаний терапевтичний результат.

Сполука формули (I) може бути введена перорально, місцево, парентерально, інтраназально, інгаляційно і ректально у вигляді стандартних дозованих форм, що містять нетоксичні фармацевтично прийнятні носії. Використовуваний у наданому описі термін «парентеральне введення» означає підшкірні, внутрішньовенні, внутрішньом'язові або внутрішньогрудні ін'єкції або вливання.

Сполука формули (I) наданого винаходу може бути введена пацієнту у дозах, що становлять від 0,1 до 100 мг/кг ваги тіла на день, переважно, у дозах від 0,0,1 до 25 мг/кг один або більше разів на день.

При цьому слід зазначити, що конкретна доза для кожного конкретного пацієнта буде залежати від багатьох факторів, включаючи активність даної використовуваної сполуки, вік, вагу тіла, стать, загальний стан здоров'я і режим харчування пацієнта, час і спосіб введення лікарського засобу, швидкість його виведення з організму, конкретно використовувану комбінацію лікарських засобів, а також тяжкість захворювання у даного індивіда, що підлягає лікуванню.

Фармацевтичні композиції за наданим винаходом містять сполуку формули (I) у кількості, ефективній для досягнення бажаного результату, і можуть бути введені у вигляді стандартних дозованих форм (наприклад, у твердій, напівтвердій або рідкій формі), що містять сполуки наданого винаходу як активний інгредієнт в суміші з носієм або наповнювачем, придатним для внутрішньом'язового, внутрішньовенного, перорального, сублінгвального, інгаляційного, інтраназального і інтраректального введення. Активний інгредієнт може бути включений у композицію разом зі звичайно використовуваними нетоксичними фармацевтично прийнятними носіями, придатними для виготовлення розчинів, таблеток, пілюль, капсул, драже, емульсій, суспензій, мазей, гелів і будь-яких інших лікарських форм.

Як наповнювачі можуть бути використані різні речовини, такі як сахариди, наприклад, глюкоза, лактоза або сахароза, маніт або сорбіт, похідні целюлози і/або фосфати кальцію, наприклад, трикальцій фосфат або кислий фосфат кальцію, як зв'язувальний компонент можуть бути використані, такі як крохмальна паста, наприклад, кукурудзяний, пшеничний, рисовий, картопляний крохмаль, желатин, трагакант, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза і/або полівінілпіролідон. За необхідністю можуть бути використані розпушувальні агенти, такі як згадані вище крохмалі і карбоксиметилкрохмаль, поперечноштитий полівінілпіролідон, агар або альгінова кислота або її сіль, така як альгінат

натрію. Можуть бути використані необов'язкові домішки, такі як агенти, що регулюють плинність, і змащувальні агенти, такі як діоксид кремнію, тальк, стеаринова кислота і її солі, такі як стеарат магнію або стеарат кальцію, і/або пропіленгліколь. Ядро драже звичайно покривають шаром, який стійкий до дії шлункового соку. Для цієї мети можуть бути використані концентровані розчини сахаридів, які можуть необов'язково містити аравійську камедь, тальк, полівінілпіролідон, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, і придатні органічні розчинники або їх суміші.

Як домішки можуть бути також використані стабілізатори, загусники, барвники і віддушки.

Як мацева основа можуть бути використані вуглеводневі мазеві основи, такі як вазелін білий і жовтий (Vaselinum album, Vaselinum flavum), вазелінова олія (Oleum Vaselini), мазь біла і рідка (Unguentum album, Unguentum flavum), а як домішки для додавання більш густої консистенції такі як твердий парафін і віск; абсорбтивні мазеві основи, такі як гідрофільний вазелін (Vaselinum hydrophylicum), ланолін (Lanolinum), кольдкрем (Unguentum leniens); мазеві основи, що змиваються водою, такі як гідрофільна мазь (Unguentum hydrophylum); водорозчинні мазеві основи, такі як поліетиленгліколева мазь (Unguentum Glycolis Polyethyleni), бентонітові основи і інші.

Як основа для гелів можуть бути використані метилцелюлоза, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, оксипропілцелюлоза, поліетиленгліколь або поліетиленоксид, карбопол.

Як основа для супозиторія можуть бути використані основи, не розчинні у воді, такі як олія какао; основи, розчинні у воді або змішувані з водою, такі як желатино-гліцеринові або поліетиленоксидні; комбіновані основи мильно-гліцеринові.

Під час готування стандартної дозованої форми кількість активного інгредієнта, використовуваного у комбінації з носієм, може варіюватися залежно від реципієнта, що піддається лікуванню, від конкретного способу введення лікарського засобу.

Так, наприклад, під час використання сполук наданого винаходу у вигляді розчинів для ін'єкцій, вміст активного агента в них становить до 5% за масою. Як розріджувачі можуть бути використані 0,9% розчин хлориду натрію, дистильована вода, розчин новокаїну для ін'єкцій, розчин Рінгера, розчин глюкози, специфічні домішки для розчинення.

Під час введення в організм сполук наданого винаходу у вигляді таблеток і супозиторіїв, їх кількість становить до 200 мг на стандартну лікарську форму.

Дозовані форми наданого винаходу одержують за стандартними методиками, такими як, наприклад, процеси змішування, гранулювання, формування драже, розчинення і ліофілізація.

Далі ефективність Треаміду підтверджена у наведених експериментальних прикладах, які призначені для ілюстрації реалізації винаходу і не обмежують його обсяг.

Усі дані, отримані в експериментальних дослідженнях, були оброблені статистично за допомогою непараметричного U критерію Манна-Уїтні. У дослідженнях вважали достовірним рівень значущості 0,05.

Приклад 1

Дослідження ефективності Треаміду по відновленню рухливості сперматозоїдів під час астеноспермії

Астеноспермію моделювали шляхом використання препарату Етопозид, що володіє вираженими прооксидантними властивостями. Використовування препарату, індукує підвищення рівня вільних радикалів, обумовлено тим, що згідно з сучасними уявленнями, безпосередньою причиною астеноспермії є окисний стрес (Kao S. H. et.al. Increase of oxidativestress in human sperm with lower motility. Fertil. and Steril. 2008; 89:5: 1183-1190).

Треамід вводили у дозі 5 мг/кг лікувальним курсом і лікувально-профілактичним курсом щурам-самцям, що мають знижену рухливість зрілих спермій.

Експерименти проводили на 50 щурах-самцях породи Вістар (вік - 3 міс). Етопозид вводили однократно внутрішньовенно у максимально-переносимій дозі - 30 мг/кг.

Дослідження проводили у двох серіях.

У першій серії Треамід вводили у дозі 5 мг/кг, - протягом за 5 днів до і 5 днів після введення Етопозиду (лікувально-профілактичний курс).

У другій серії Треамід вводили протягом 10 днів після введення Етопозиду (лікувальний курс).

Ефективність Треаміду оцінювали за відсотком рухливих форм сперматозоїдів, виділених з придатка сім'яника.

У першій серії результати досліджень порівнювали з такими під час введення препарату порівняння Спеман, який вводили внутрішньошлунково у дозі 140 мг/кг.

Результати досліджень наведені в таблицях 1-2.

Таблиця 1

Кількість рухливих спермій (у %) у тварин, що одержували Треамід за 5 днів до і 5 днів (лікувально-профілактичний курс) після введення Етопозиду

№	Фон	Контроль	Треамід 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 #*

Примітки: тут і далі:

- відмінності достовірні у порівнянні з фоном;

* - відмінності достовірні у порівнянні з контролем;

◇ - відмінності достовірні у порівнянні з препаратом порівняння

Таблиця 2

Кількість рухливих спермій (у %)

Назва групи № самця	Фон	Контроль	Треамід 5,0 мг/кг протягом 10 днів після введення Етопозиду
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*

- 5 Наведені експериментальні дані показали, що на 5-й і 10 день після введення Етопозиду (контроль) відсоток рухливих спермій достовірно знижувався і становив - 73-74% від фонових значень. У кожній з серій експерименту відсоток рухливих спермій на фоні введення Треаміду достовірно зростав у порівнянні з контролем (Етопозид), у першій серії - ще і у порівнянні з препаратом Спеман. У другій серії експерименту відсоток рухливих спермій у дослідних групах не відрізнявся від такого у інтактних тварин (фон). Отримані дані свідчать про те, що Треамід є ефективним засобом відновлення рухливості сперматозоїдів.

Приклад 2

Дослідження ефективності Треаміду по відновленню рухливості сперматозоїдів під час гіпогонадотропного гіпогонадізму

- 15 Гіпогонадотропний гіпогонадізм моделювали введенням синестролу. Естрогени здатні інгібувати секрецію ЛГ (Лютеїнізуючий гормон) і ФСГ (фолікулостимулювальний гормон). Підвищення концентрації естрогенів у чоловічому організмі супроводжується збільшенням вмісту сексстероїдзв'язувальних глобулінів, що веде до зниження концентрації вільного тестостерону і виникнення астеноспермії.

- 20 Експерименти проводили на 36 щурах породи Вістар (вік 3 міс). Протягом 30 днів після початку експерименту всім щурам-самцям (крім групи фон) внутрішньом'язово вводили Синестрол у дозі 50 ОД/кг/доб. Далі з 31-го по 45-й дні досліду тваринам дослідної групи, крім Синестролу, внутрішньошлунково вводили Треамід у дозі 0,5 мг/кг або препарат порівняння Трибестан у дозі 70 мг/кг. Оцінювання ефективності Треаміду проводили за кількістю рухливих форм спермій (відсотком рухливих форм сперматозоїдів) виділених з придатка сім'яника.
- 25 Результати досліджень порівнювалися з такими під час введення Синестролу (контроль) і препарату порівняння Трибестан.

Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Кількість рухливих спермій (і %)

№	Фон	Контроль	Треамід	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#

Примітка:

- відмінності достовірні у порівнянні з фоном;

* - відмінності достовірні у порівнянні з контролем;

◇ - відмінності достовірні у порівнянні з препаратом порівняння

Наведені експериментальні дані показують, що відсоток рухливих форм сперматозоїдів у інтактних щурів склав $81,20 \pm 1,55$, що відповідає видовій нормі. Введення Синестролу тваринам (контрольна група) призвело до достовірного зниження кількості рухливих форм сперматозоїдів до $46,38 \pm 7,27\%$, що склало 57% від фону. У групі експериментальних тварин цей показник статистично значущо перевищував контрольні значення на 49%. Трибестан ефекту не виявив.

Таким чином, Треамід ефективно відновлює рухливість сперматозоїдів, під час гіпогонадотропного гіпогонадізму.

Приклад 3

Дослідження ефективності Треаміду по відновленню копулятивної активності

Зниження копулятивної активності, обумовленої андрогенною недостатністю, моделювали шляхом введення щурам-самцям Синестролу.

Модель основана на антогонізмі андрогенних і екстрогенних гормонів. Введення Синестролу щурам-самцям призводить до пригнічення статевої активності тварин.

Експерименти проводили на 36 щурах породи Вістар (вік 3 міс). Протягом 30 днів після початку експерименту всім щурам-самцям (крім інтактної групи (Фон)) внутрішньом'язово вводили Синестрол у дозі 50 ОД/кг/доб. Далі з 31-го по 45-й дні дослідів тваринам дослідних груп, крім Синестролу, внутрішньошлунково вводили Треамід у дозі 1,5 мг/кг і препарат порівняння Трибестан у дозі 70 мг/кг. Оцінювання статевої активності проводили в тесті парної статевої поведінки. Для цього в експерименті використовували щурів-самок, що знаходилися в стадії еструс, який викликали попереднім 4-кратним введенням Синестролу. Ефективність Треаміду оцінювали за показниками: латентний період першої спроби до спарювання (ЛППС), кількість спроб до спарювання (сідань), кількість еякуляцій. Отримані дані порівнювали з такими у цих самих тварин до початку дослідів (перше тестування) і з такими у контролі (друге тестування).

Результати дослідження наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Вплив Треаміду на показники статевої поведінки щурів-самців, що одержували Синестрол

№	Перше тестування			Друге тестування		
	ЛППС, сек	кількість сидань, абс.	Тварини, що еякують у %	ЛППС, сек	кількість сидань, абс.	Тварини, що еякують у %
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#
Треамід 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*

Примітка: # - відмінності достовірні у порівнянні з фоном при $P \leq 0.05$ під час порівняння в одному тестуванні;

* - відмінності достовірні у порівнянні з контролем при $P \leq 0.05$ під час порівняння в одному тестуванні; ;

◇ - відмінності достовірні при $P \leq 0.05$ всередині групи під час порівняння першого і другого тестувань.

Наведені експериментальні дані показали, що щури-самці, що одержували тільки Синестрол, характеризувалися відсутністю еякуляцій, зростанням ЛППС. У тварин, що одержували Треамід, еякуляції виявлялися у 44% випадків (так само, як і у інтактних тварин). Їх кількість перевищувала контрольні значення і такі у цих самих тварин під час першого тестування. Крім того, кількість спроб до спарювання в дослідній групі відновлювалася до контрольного рівня. Ефективність препарату порівняння Трибестан була виражена меншою мірою. Таким чином, лікарський засіб Треамід ефективно відновлює копулятивну активність у тварин, що знаходяться в умовах андрогенної недостатності.

Приклад 4

Дослідження ефективності Треаміду по відновленню копулятивної функції і статевої мотивації, знижених віковими змінами, у щурів-самців

Ерективну дисфункцію моделювали шляхом використання тварин пізнього і старечого репродуктивного віку (14-19 міс.). Пригнічення статевої мотивації моделювали використанням тварин пізнього репродуктивного віку (14 міс.).

Експерименти по вивченню впливу Треаміду на копулятивну активність проведені на 76 щурах, породи Вістар (вік 14 міс., 19 міс.). Треамід вводили внутрішньошлунково, протягом 14 днів у дозі 5 мг/кг. Препарат порівняння, Силденафіл (100 мг, PFIZER PGM, Франція), також вводили внутрішньошлунково, що відповідає клінічному застосуванню, у дозі 3 мг/кг два рази на тиждень. Оцінювання статевої активності проводили в тесті парної статевої поведінки. Для цього в експерименті використовували щурів-самок, що знаходилися в стадії еструс, який викликали попереднім 4-кратним введенням Синестролу. Ефективність Треаміду оцінювали за показниками: латентний період першої спроби до спарювання (ЛППС), кількість спроб до спарювання (КС), кількість еякуляцій (КЕ). Отримані дані порівнювали з такими у цих самих тварин до введення Треаміду і з такими у контролі (друге тестування).

Експерименти по вивченню впливу Треаміду на статеву мотивацію проведені на 40 щурах-самцях породи Вістар (вік 14 міс.). Як експериментальна модель сексуального потягу щурів була використана модель, призначена для цілеспрямованого пошуку нових засобів терапії цієї патології [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]. Ця модель основана на тому, що щури є суспільними тваринами і прагнуть не тільки до сексуальних, але і до соціальних контактів. Визначення статевої мотивації припускає визначення часу знаходження біля сексуального стимулу і бала переваги у тварин без безпосередніх контактів з «соціальним» і «сексуальним» стимулами. Як сексуальний стимул використовували самку, що знаходиться у стадії еструс, соціальний - самця.

Результати досліджень по вивченню впливу Треаміду на копулятивну поведінку і статеву мотивацію, проведених на тваринах пізнього репродуктивного і старечого віку, наведені в таблицях 5, 6, 7 і 8.

Таблиця 5

Показники копулятивної поведінки щурів-самців пізнього репродуктивного віку (14 міс.)

Вік тварин (місяці)	Група	1 тестування - до введення препаратів		
		ЛППС	КС	КЕ
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 #
	Треамід (5 мг/кг)	559,08±93,55#	1,42±0,50 #	0,00±0,00 #
	Силденафіл (3 мг/кг)	610,08±88,34 #	1,58±0,56 #	0,00±0,00 #

5

Таблиця 6

Показники копулятивної поведінки щурів-самців пізнього репродуктивного віку після введення Треаміду (14 міс)

Вік тварин (місяці)	Група	2 тестування- Після 14-денного курсу введення		
		ЛППС	КС	КЕ
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 #
	Треамід (5 мг/кг)	364,80±127,66	6,90±1,88 ◇	0,60±0,22 ◇ *
	Силденафіл (3 мг/кг)	171,09±78,08 ◇ *	6,27±1,27 ◇ #	0,00±0,00 #

Примітки:

1 - ЛППС - латентний період першого сидання,

2 - КС - кількість сидань,

3 - КЕ - кількість еякуляцій,

4 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

5 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

6 - ◇ - відмінності достовірні під час порівняння всередині групи з першим тестуванням (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні)

Наведені в таблицях 5 і 6 дані показали, що у щурів пізнього репродуктивного віку спостерігається зниження показників статевої активності (збільшення латентного часу першого сидання, зниження кількості сидань, тварини, що еякують, не виявлялися, табл. 5). У тварин, що одержували Треамід, достовірно скорочувався латентний час першого сидання, збільшувалася кількість сидань, виявлялися тварини, що еякують (табл. 6). Введення силденафілу покращувало статеву активність тварин, але меншою мірою: латентний період першого сидання знижувався, кількість сидань зростало, але тварини, що еякують, не виявлялися.

Таким чином, Треамід є ефективним засобом відновлення копулятивної активності у тварин пізнього репродуктивного віку.

Результати досліджень, проведених на тваринах передстаречого віку (19 міс), наведені в таблиці 7.

Таблиця 7

Показники копулятивної поведінки щурів-самців передстаречого віку (19 міс)
до введення і після 14-денного введення Треаміду

Вік тварин (місяці)	Назва групи	1 тестування (до введення препаратів)			2 тестування (після 14-денного курсу введення)		
		ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЕ (абс.)	ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЕ (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 #
	Треамід (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 ◇ *

Примітки:

1 - ЛППС - латентний період першого сидання,

2 - КС - кількість сидань,

3 - КЕ - кількість еякуляцій,

4 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

5 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

6 - ◇ - відмінності достовірні під час порівняння всередині групи з першим тестуванням (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні).

5 Наведені в Таблиці 7 дані показують, що у тварин контрольної групи виявився підвищеним латентний час першого сидання, знижувалася кількість сидань, тварини, що еякують, були відсутні. Після 14-денного введення Треаміду у дозі 5 мг/кг відзначалося достовірне зростання кількості сидань, виявлялися тварини, що еякують.

Таким чином, проведене дослідження показало, що Треамід під час введення у дозі 5 мг/кг протягом 14 днів, призводить до відновлення копулятивної активності щурів пізнього і передстаречого віку.

10

Таблиця 8

Показники сексуальної мотивації щурів-самців пізнього репродуктивного віку до введення і після 14-денного введення Треаміду

Вік тварин (місяці)	Група	2 тестування - після введення досліджуваної речовини					
		А, сек	Б, сек	БП, умов. од.	А, сек	Б, сек	БП, умов. од.
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#
	Треамід (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 ◇
	Силденафіл (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#

Примітки:

1 - А - час знаходження в зоні «сексуального» стимулу,

2 - Б - час знаходження в зоні «соціального» стимулу,

3 - БП - бал переваги = $\frac{A}{A+B} \times 100$,

4 - КК - кількість перетнутих квадратів,

5 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

6 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні

($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

7 - \diamond - відмінності достовірні під час порівняння всередині групи з першим тестуванням ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Наведені в таблиці 8 дані показують, що час знаходження біля сексуального стимулу і бал переваги в контролі виявилися зниженими у порівнянні з такими у інтактних тварин (перше тестування). Отримані дані свідчать про те, що в контролі отримана модель пригнічення статевої мотивації, обумовлена використанням 14-ти місячних тварин. Це дозволяє проводити тестування лікарського засобу.

Визначення часу знаходження досліджуваних щурів-самців у зоні сексуального стимулу і підрахунок бала переваги до початку експерименту показали, що значення цих показників у досліді і контролі достовірно не відрізнялися один від одного. Це підтверджує коректність проведеної рандомізації і той факт, що щури-самки не уникали самців і були до них сприйнятливі.

Під час аналізу середніх показників часу знаходження інтактних щурів-самців (фон) у зонах соціального і сексуального стимулів і бала переваги, отриманих під час першого і другого тестування, виявлено, що вони статистично значущо не відрізнялися один від одного. Це свідчить про стабільність мотиваційної поведінки щурів-самців, взятих у експеримент, і підтверджує дані літератури про те, що сексуальна мотивація залишається на тому самому рівні протягом визначеного періоду часу (до 55 діб).

Аналіз досліджуваних показників першого і другого тестування щурів контрольної групи показав, що рівень сексуальної мотивації тварин залишається незмінним.

Під час введення Треаміду у дозі 5 мг/кг час знаходження біля «сексуального» стимулу зростав у порівнянні з таким у цих самих тварин до введення лікарського засобу. Одночасно з цим знижувався (у 2 рази) у порівнянні з контролем час перебування в зоні «соціального» стимулу. Бал переваги статистично значущо зростав у порівнянні з таким під час першого тестування і досягав $0,64 \pm 0,09$. Отримані дані свідчать про те, що введення Треаміду у дозі 5 мг/кг впливає на сексуальну мотивацію щурів-самців пізнього репродуктивного періоду. Слід зазначити, що бал переваги в цій групі щурів статистично значущо не відрізнявся від такого у інтактних щурів, тобто у «молодих» тварин.

В групі щурів, яким водили препарат порівняння Силденафіл (3 мг/кг), середнє значення часу перебування у самки не зростав. Однак при цьому збільшувався час перебування біля соціального стимулу. Бал переваги практично не відрізнявся від вихідного рівня. Це свідчить про те, що Силденафіл не впливав на статеву мотивацію щурів-самців.

Таким чином, тестування Треаміду як стимулятора статевої мотивації щурів-самців зрілого репродуктивного віку (14 місяців) показало, що субстанція стимулює статеву мотивацію тварин пізнього репродуктивного віку. Дія проявляється у дозі 5 мг/кг, оптимальний строк терапії - 14 днів.

Препарат порівняння, Силденафіл, у тесті на статеву мотивацію не виявив свою активність. У тесті на копулятивну активність його ефекти виявилися недостатньо вираженими і короточасними.

Приклад 5

Дослідження ефективності Треаміду по відновленню копулятивної активності щурів-самців інтактних тварин, що знаходяться в умовах сезонного пригнічення копулятивної активності

Сезонне пригнічення репродуктивної активності моделювали проведенням експериментів у зимовий період (кінець грудня). Як фонову групу використовувалися інтактні тварини (вік 3 міс) протестовані у червні-місяці.

Експерименти проведені на 27 щурах-самцях репродуктивного віку (3 міс) породи Вістар. Треамід у дозі 5 мг/кг і препарат порівняння Силденафіл (у дозі 3 мг/кг 2 рази на тиждень), вводили внутрішньошлунково 1 раз на добу протягом 15 днів. Оцінювання статевої активності проводили в тесті парної статевої поведінки. Тестування проводили двічі: до початку введення і через 1 г після останнього введення Треаміду. Щури контрольних груп, що одержували розчинник, тестувалися у ті самі строки, що і тварини дослідних груп.

В експерименті використовували щурів-самок, що знаходилися в стадії еструс, який викликали попереднім 4-кратним введенням Синестролу. Ефективність Треаміду оцінювали за показниками: латентний період першої спроби до спарювання (ЛППС), кількість спроб до спарювання (КС), кількість еякуляцій (КЕ). Отримані дані порівнювали з такими у цих самих тварин до введення сполуки, що тестується, і з такими в контролі (друге тестування).

Результати порівняння копулятивної активності тварин контрольної і дослідної груп наведені в таблиці 9.

Таблиця 9

Вплив Треаміду на показники копулятивної поведінки щурів-самців на моделі її сезонного пригнічення

№	Перше і друге тестування					
	ЛППС, сек	кількість сидань, абс.	кількість еякуляцій, у %	ЛППС, сек	кількість сидань, абс.	кількість еякуляцій, у %
Контроль	466,56±114,21	3,44±1,23	0%	331,11±116,11	4,56±1,28	11%
Треамід 5,0 мг/кг	462,00±117,81	3,67±1,34	0%	251,33±103,86♦	6,56±1,68	33%♦
Віагра	473,00±137,58	3,33±1,27	0%	308,22±117,73	5,67±1,76	0%

♦ - відмінності достовірні у порівнянні з 1-м тестуванням, тобто до і після введення похідної.

- 5 Результати тестування щурів-самців фонові групи показали, що тварини характеризуються достатньо високими і стабільними показниками статевої активності. Середній латентний період першого сидання склав 114 сек, кількість сидань - 14,7, кількість спарювань - 0,33. Порівняння показників, що тестуються, в «літню» пору року з таким у «зимовий період» показує, що латентний період першої спроби до спарювання зріс у 4 рази, кількість спроб до спарювання знизилася у 3,4 рази ($P \leq 0,05$). Крім того, самці контрольної групи, у зимовий період не здійснили жодної еякуляції ($P \leq 0,05$).

- 10 Введення Силденафілу не виявило істотного впливу на статеву поведінку щурів-самців, що знаходяться в умовах сезонного пригнічення їх статевої активності. До і після його введення досліджувані показники не відрізнялися від таких один від одного і з такими в контрольній групі.
- 15 Під час спостереження за статевою активністю щурів-самців, яким вводили Треамід у дозі 5мг/кг було встановлено, що латентний період першого сидання після введення достовірно знизився у 1,8 рази у порівнянні з таким до тестування, що свідчить про стимулюючий вплив лікарського засобу на центри статевого потягу і, деякою мірою, і на копулятивну активність. Загальна кількість спроб до спарювання зросла у 1,8 рази, але відмінності виявилися статистично не
- 20 значущими. Під час підрахування кількості тварин у групі, що здійснили еякуляції, було встановлено, що після введення Треаміду вони виявлялися у 33%, у той час, як до введення препарату, ці тварини не еякулювали ($P \leq 0,05$).

- Таким чином, отримані переконливі докази здатності Треаміду відновлювати статеву активність щурів-самців, що знаходяться в умовах сезонного зниження її активності.

25 Приклад 6

- Дослідження ефективності Треаміду по регенерації і нормалізації структури тканини передміхурової залози на під час хронічного абактеріального простатиту (ХАП) або доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ)

- 30 Це проявляється в зменшенні ступеня вираженості морфологічних змін, характерних для цих захворювань. ХАП моделювали прошиванням вентральної частки залози шовковою ниткою, ДГПЗ моделювали введенням Сульпіриду. Як препарат порівняння використовувався Простамол Уно.

Тваринам з ХАП Треамід вводили внутрішньошлунково у дозі 0,5 мг/кг протягом 15 днів.

Тваринам з ДГПЗ Треамід вводили внутрішньошлунково протягом 2-х місяців у дозі 0.5 мг/кг.

- 35 1. Дослідження ефективності Треаміду по регенерації і нормалізації структури тканини передміхурової залози на моделі хронічного абактеріального простатиту (ХАП)

- 40 Експерименти проведені на 40 щурах-самцях популяції Вістар (вік 3 міс). Під час моделювання хронічного абактеріального простатиту шовковою ниткою прошивалася (під наркозом) вентральна частка передміхурової залози. Для реалізації моделі доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ) у щурів викликали гіперпролактинемію, для чого щурам-самцям внутрішньочеревинно вводили Сульпірид у дозі 40 мг/кг щодня протягом 2-х місяців (еглоніл; «Санові Вінтроп Індустрія», Франція).

Через 1 місяць після операції тваринам експериментальної групи внутрішньошлунково вводили Треамід у дозі 0.5 мг/кг 1 раз на добу протягом 15 днів. По закінченню курсу введення

визначали масу тіла тварин, проводили їх евтаназію у CO₂-камері. Потім препарували вентральну частку залози, вимірювали масу, об'єм, визначали ваговий коефіцієнт і проводили морфологічний аналіз. Для цього простату фіксували у формаліні, заливали у парафін. Парафінові зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали на з'єднувальну тканину по Ван-Гізону, для підрахунку відносної площі епітелію - гематоксилін-еозином. Далі проводили кількісне оцінювання вираженості атрофічних процесів і склерозу, що розвивається. Оцінювання проводили на стандартній площі зрізу залози за допомогою комп'ютерного графічного аналізу (мікрофотографії послідовних 10 полів зору, виконані відеокамерою «AxioCam Erc5s», встановленої на мікроскопі «AxioLab A1» (об'єктив × 10, окуляр × 10), з програмою передачі зображення на комп'ютер фірми «AxioVision LE», Carl Zeiss). Визначали площу, що займається секреторними відділами, колагеновими волокнами з'єднувально-тканинних прошарків. Ефективності лікарського засобу оцінювали за наступними критеріями: менший ступінь вираженості морфологічних ознак хронічного абактеріального простатиту (атрофії і склерозу): площа, що займається секреторними відділами, колагеновими волокнами з'єднувально-тканинних прошарків.

Результати дослідження наведені в таблицях 10-11.

Таблиця 10

Вплив Треаміду на масу і об'єм передньої частки передміхурової залози щурів на фоні ХАП

Група	Маса тварини наприкінці експерименту, г	Маса передньої частки передміхурової залози, мг	Ваговий коефіцієнт передньої частки передміхурової залози мг/г	Об'єм передньої частки передміхурової залози, см ³
Фон	517,40±34,24	682,00±91,56	1,33±0,20	0,66±0,10
Контроль	454,40±36,34	536,00±111,29	1,15±0,22	0,49±0,11
Треамід у дозі 0,5 мг/кг	497,60±34,03	976,00±226,62	1,97±0,47	0,90±0,20
Простамол-Уно 50 мг/кг	518,40±24,82	728,00±61,27	1,40±0,09	0,71±0,06

Примітки:

- 1 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном в (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні)
- 2 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем в (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),
- 3 - Ω - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою Простамол-Уно (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні).

Таблиця 11

Морфометричні показники передньої частки передміхурової залози щурів, на фоні хронічного асептичного запалення передміхурової залози, %

Група	Площа колагенових волокон	Площа епітелію ацинусів
Фон	0,66 ±0,27	33,08±4,12
Контроль	3,12 ±0,63 #	21,89±2,45#
Треамід у дозі 0,5 мг/кг	2,64±0,12#	26,33±2,63
Простамол-Уно 50 мг/кг	4,12 ±0,74#	24,84±3,62#

Примітки:

- 1 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні)
- 2 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),
- 3 - Ω - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою Простамол-Уно (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні).

Наведені експериментальні дані показують, що маса залози, її ваговий коефіцієнт, об'єм у всіх порівнюваних групах достовірно не відрізнялися один від одного (табл. 10). Морфологічний аналіз (табл. 11) показав, що в передміхуровій залозі щурів контрольних тварин достовірно знижувалася площа епітелію ацинусів (атрофія) і зростала (площа колагенових волокон (склероз)). Ведення Треаміду щурам-самцям у дозі 0,5 мг/кг призводило до зростання (на 22%) площі епітелію ацинусів. Значення цього показника достовірно не відрізнялося від фонових значень, у той час як у контролі він був значущо знижений у порівнянні з фоном. Площа колагенових волокон мала тенденцію до зниження. Під час порівняння отриманих даних з такими під час введення Простамолу Уно, встановлено, що Простамол Уно не виявляє впливу на площу епітелію ацинусів. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що використання Треаміду у дозі 0,5 мг/кг у щурів з ХАП сприяє регенерації епітеліальної тканини передміхурової залози. Це виражається у зниженні ступеня вираженості атрофічних процесів. Останнє, очевидно, призведе до зростання функціональної активності епітелію ацинусів і буде сприяти відновленню якісних характеристик еякуляту.

2. Дослідження ефективності Треаміду по регенерації і нормалізації структури тканини передміхурової залози на моделі доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ)

Вивчали здатність Треаміду нормалізувати структуру передміхурової залози на фоні введення Сульпіриду, Треамід вводили внутрішньошлунково протягом 2-х місяців у дозі 0.5 мг/кг одночасно з Сульпіридом. Контрольні тварини одержували розчинник (2% крохмальний слиз) у еквівалентному об'ємі. Тваринам групи порівняння внутрішньошлунково вводили розчин препарату Простамол Уно у дозі 50 мг/кг. По закінченню курсу введення визначали масу тіла тварин, проводили їх евтаназію у CO₂-камері. Відомо, що Сульпірид викликає розвиток ДГПЗ у бічній частці залози щурів [Van Coppenolle Fabien, Christian Slomianny, Francoise Carpentier Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno - dependence. // Physiol.Endocrinol. Metab. -2001. -P.120-129]. У зв'язку з цим, препарували цю частку. Визначали її масу, ваговий коефіцієнт, об'єм. Далі проводили морфологічне дослідження. Бічну частку передміхурової залози фіксували у 10% формаліні, заливали у парафін, готували зрізи товщиною 5 мкм. Депарафіновані зрізи залози забарвлювали гематоксиліном і еозином. На гістологічних зрізах визначали наявність проліферативних центрів і наявність дочірніх ацинусів на стандартну площу зрізу. Крім того, на стандартній площі гістологічного зрізу вимірювали площу епітеліальних і стромальних структур. Ці показники визначали за допомогою комп'ютерного графічного аналізу на стандартній площі гістологічного зрізу (мікрофотографії послідовних 10 полів зору, виконані відеокамерою «AxioCam Erc5s», встановленої на мікроскопі «AxioLab A1» (об'єктив × 10, окуляр × 10), з програмою передачі зображення на комп'ютер фірми «AxioVision LE», Carl Zeiss). Стромально-епітеліальне співвідношення визначали як відношення площі строми до площі епітелію.

Ефективність сполуки, що тестується, визначали за наступними критеріями: менший ступінь вираженості морфологічних ознак доброякісної гіперплазії передміхурової залози: - зниження кількості центрів проліферації і дочірніх ацинусів, зниження площі епітелію.

Результати експериментів наведені в таблицях 12-16.

Таблиця 12

Маса тіла; маса і об'єм бічної частки передміхурової залози щурів на фоні її доброякісної гіперплазії (ДГПЗ)

Назва групи	Маса тварини наприкінці експерименту, г	Маса бічної частки передміхурової залози, мг	Ваговий коефіцієнт бічної частки передміхурової залози, мг/г	Об'єм бічної частки передміхурової залози, см ³
Фон	559,00±13,39	74,00±9,27	0,13±0,02	0,16±0,02
Контрольний препарат	564,17±28,17	363,33±31,69 #	0,59±0,08 #	0,67±0,07 #
Треамід у дозі 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 #

Примітки:

1 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні)

2 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),
 3 - Ω - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою Простамол-Уно ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Таблиця 13

Відносна площа (%) епітелію ацинусів на стандартній площі зрізу бічної частки передміхурової залози щурів-самців в умовах гіперплазії

Група № тварини	Фон	Контроль	Треамід у дозі 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 \pm m	15,43 \pm 2,43	20,59 \pm 1,15 #	13,89 \pm 2,08 *	21,56 \pm 2,26

Примітки: тут і далі

1 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні)

2 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

3 - Ω - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою Простамол Уно ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Таблиця 14

Кількість структур (абс.), що складаються з 2-3 щільно прилеглих одна до одної залозок, на стандартній площі зрізу бічної частки передміхурової залози щурів-самців в умовах гіперплазії

Група № тварини	Фон	Контроль	Треамід у дозі 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 \pm m	0,00 \pm 0,00	2,20 \pm 0,58 #	1,60 \pm 0,81 #	1,80 \pm 1,20

Таблиця 15

Кількість дочірніх проліферативних центрів (абс.) на стандартній площі зрізу бічної частки передміхурової залози щурів-самців в умовах гіперплазії

Група № тварини	Фон	Контроль	Треамід у дозі 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 \pm m	0,00 \pm 0,00	4,20 \pm 0,97 #	1,60 \pm 0,60 # *	1,80 \pm 0,37 # *

Таблиця 16

Відносна площа (%) строми на стандартній площі зрізу бічної частки передміхурової залози щурів-самців в умовах гіперплазії

Група № тварини	Фон	Контроль	Треамід у дозі 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 #

Примітки:

1 - # - відмінності достовірні під час порівняння з фоном у цьому самому тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні)

2 - * - відмінності достовірні під час порівняння з контролем у цьому самому тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

3 - Ω - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою Простамол Уно ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Наведені експериментальні дані показали, що маса простати, її ваговий коефіцієнт в усіх порівнюваних групах достовірно не відрізнялися один від одного (табл. 12). Кількісний морфологічний аналіз показав, що введення Сульпіриду призводило до достовірного зростання на 33% площі епітелію ацинусів на стандартній площі зрізу (табл. 13), що свідчить про його посилену проліферацію. Морфологічно це виражається, насамперед, у численному розростанні папілярних виростів епітелію. У простаті щурів, що одержували Сульпірид, відзначалася поява структур, що складаються з 3-х прилеглих одна до одної залозок (табл. 14). Крім того, на стандартній площі зрізу виявлялося близько 3-х - 8-ми дочірніх центрів проліферації (табл. 15). Відносна площа стромальних структур достовірно зростала на 22%.

Під час введення Треаміду ознаки ДГПЗ були виражені меншою мірою. Так, у простаті тварин цієї групи виявлялося достовірне зниження площі епітелію ацинусів (табл. 14), зниження кількості дочірніх проліферативних центрів (табл. 15). Ці дані свідчать про наявність антипроліферативних властивостей сполуки, що тестується. Препарат порівняння Простамол Уно так само мав терапевтичний ефект. Так, його введення щурам-самцям, що одержували Сульпірид, призводило до зниження кількості дочірніх проліферативних центрів (табл. 15). Однак його ефективність виявилася нижче такої в сполуці, що тестується, про що свідчить здатність останньої призводити до зниження площі епітелію, що не виявлялося на фоні введення препарату порівняння.

Таким чином, Треамід у дозі 0,5 мг/кг ефективно відновлює морфологічний стан передміхурової залози на фоні введення Сульпіриду, що проявляється у зниженні ступеня вираженості ДГПЗ у експериментальних тварин. Його ефективність перевищує таку препарату порівняння Простамол Уно.

Приклад 7

Дослідження ефективності Треаміду по посиленню процесів репаративної регенерації тестикулярної тканини і лікуванню тестикулярної недостатності, обумовленої виснаженням проліферативного пулу сперматогенезу

Останнє моделювали однократним введенням щурам-самцям (вік 3 місяців) цитостатичного препарату Паклітаксел (Мітотакс, Dr. Reddy's, Індія). Вибір препарату обумовлений тим, що він належить до лікарських засобів, що ушкоджують попередники сперматогенезу - стовбурові клітини.

Паклітаксел вводили тваринам контрольної і дослідної групи однократно внутрішньовенно, у максимально переносимій дозі - 7,6 мг/кг. Треамід вводили тваринам дослідних груп внутрішньощлунково у дозі 5 мг/кг у вигляді суспензії у 2% крохмальному слизу протягом 15 днів через 1 місяць після введення Паклітакселу. Контрольні тварини замість досліджуваної речовини одержували розчинник (2% крохмальний слиз) у еквівалентному об'ємі.

Для вивчення впливу Треаміду на глибокий резерв регенерації сперматогенної тканини був використаний метод оцінювання колонієутворювальної здатності, що дозволяє визначати кількість кометованих стовбурових сперматогенних клітин [A.J. Richards, G.C. Enders, J.L. Resnick // Biol. Reprod. -1999. -Vol. 61. -P. 1146-1151.].

На 1-й (через 24 г) день, а також на 45-й і 65-й день після введення Паклітакселу проводили евтаназію тварин і препарування сім'яників. Далі методом клонування *in vitro* визначали вміст клітин-попередників сперматогенезу в сім'яниках. Для культивування клітин-попередників досліджуваного органа використовували підшар, який був відображений клітинами адгезуючої фракції. Для готування підшару клітин, що прилипають, в умовах 5% CO₂ і 37 °C один сім'яник інтактною тварини гомогенізували в середовищі DMEM і відмивали центрифугуванням (1500 об/хв, 10 хв). Далі отриману завись клітин розділяли на адгезуючу і неадгезуючу фракції. Для цього в 24-ямковому планшеті в кожну яку поміщали по 0,5 мл приготовленої суспензії клітин у концентрації 1×10^6 /мл у середовищі для культивування клітин-попередників, і далі інкубували протягом 1 години на CO₂-інкубаторі при 37°C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Після інкубування збирали неадгезуючу частину клітин. У ямки, що містять фракцію прилипих клітин, поміщали 0,5 мл середовища для культивування сперматогенних клітин-попередників і інкубували протягом 7 діб у CO₂-інкубаторі при 37°C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Через 7 діб проводили заміну культурального середовища з подальшим нашаруванням поверх отриманої строми неадгезуючих клітин сім'яників дослідних тварин. Для цього, за описаною вище методикою, клітини розділяли на адгезуючу і неадгезуючу фракції. У чашках Петрі інкубували гомогенат органа протягом 1 години на CO₂ інкубаторі при 37°C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Далі збирали не прилипли фракцію клітин, у камері Горяєва підраховували кількість клітин/мл. Нашарування не прилипих клітин проводили у концентрації 2×10^5 /мл поверх отриманої строми в об'ємі 0,5 мл на ямку. Інкубували протягом 7 діб в CO₂-інкубаторі при 37°C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Після інкубації підраховували кількість колонієутворювальних одиниць сперматогенних (КУО-Сп) – скупчення більше 30 клітин округлої форми і різного діаметра. Критерієм ефективності використовованого засобу було достовірне збільшення кількості клітин, що дають початок КУО-Сп, в тканині сім'яників дослідних тварин у порівнянні з таким у контролі.

Визначення колонієстимулювальної активності клітин мікрооточення сперматогенної тканини (продукція клітинами Сертолі гуморальних регуляторів сперматогенезу) проводили наступним чином. За допомогою описаної вище методики одержували гомогенат сім'яника, з подальшим виділенням адгезуючої фракції клітин. Клітини, що прилипають, культивували 24 години на повному культуральному середовищі при 37 °C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Через добу збирали супернатант, який зберігали при температурі 20°C. Для тестування рівня гуморальних факторів сперматогенезу у супернатанті використовували тест-систему КУО-Сп сім'яників інтактних щурів. Отримані результати виражалися кількістю колоній, що вирости з кількості нашарованих неадгезуючих клітин (10^5 кл/ямка).

Ефективність Треаміду визначали за достовірним збільшенням колоній, що вирости з клітин тест-системи під дією супернатанта клітин сім'яників дослідних тварин у порівнянні з таким у контролі.

Для культивування клітин-попередників досліджуваного органа використовували підшар (відображений клітинами адгезуючої фракції), попередньо приготовлений в 96-ямковому планшеті, за описаною вище методикою.

Далі, від двох груп тварин (інтактні тварини, і тварини, яким за 24 години до дослідження вводили Паклітаксел внутрішньовенно) виділяли неадгезуючу фракцію клітин сперматогенної тканини і переносили на отриманий підшар у повному культуральному середовищі (80% DMEM, 20% ЕТС, L-глутамін, антибіотики, гепарин) у концентрації 2×10^5 /мл. Перед інкубуванням у повне культуральне середовище додавали Треамід у концентраціях 1 нг/мл, 3 нг/мл, 10 нг/мл, 30 нг/мл, 100 нг/мл, 300 нг/мл і 1000 нг/мл. Інкубували протягом 7 діб у CO₂-інкубаторі при 37°C, 5% CO₂ і 100% вологості повітря. Після інкубації підраховували кількість колонієутворювальних одиниць сперматогенних (КУО-Сп) - скупчення більше 30 клітин округлої форми і різного діаметра.

Ефективність Треаміду визначали за достовірним збільшенням кількості клітин, що дають початок КУО-Сп, у культурі під час додавання досліджуваної речовини, у порівнянні з таким у контролі.

Морфологічний і функціональний стан сперматогенної тканини проводили з метою додаткового підтвердження ефективності стимуляції утворення стовбурових комітованих клітин.

Його оцінювали за наступними показниками: чисельність клітинної популяції сперматогоній, середня кількість клітин Сертолі, ступінь зрілості сперматогенного шару, кількість клітин Лейдіга, ендокринна активність сім'яника, загальна кількість сперматозоїдів, що припадають на епідидиміс, відсоток рухливих форм спермій. Для цього під час евтаназії на 45 і 65 день 90 день експерименту, під час розтину виділялися хвостові частини епідидимісу і сім'яник. Придаток одного сім'яника гомогенізували у теплому (37 °C) фізіологічному розчині і у суспензії клітин епідидимісу визначили кількість рухливих форм сперматозоїдів. Під час підрахунку загальної кількості сперматозоїдів, що припадають на придаток (ЗКС), була використана гомогенізована клітинна суспензія другого епідидимісу у дозованій кількості фізіологічного розчину з застосуванням лейкоцитарного меланжера і камери Горяєва.

Для морфологічного дослідження сім'яники щурів фіксували у рідині Карнуа і готували парафінові зрізи. Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм забарвили гематоксилін-еозин. На зрізі сім'яника визначили чисельність клітинної популяції сперматогоній, кількість клітин Сертолі, кількість клітин Лейдіга, визначали ендокринну активність клітин Лейдіга. На підставі підрахунку клітин Сертолі обчислювали ступінь зрілості сперматогенного шару. Розрахунки проводили за формулою для експериментальних груп $y=5,95-0,18x$; для групи інтактних тварин $y=6,7-0,23x$, де x - середня кількість клітин Сертолі на поперечному зрізі звивистого сім'яного канальця, y - індекс, що характеризує ступінь зрілості сперматогенного шару. Під час вибору строків досліджень враховувалася тривалість сперматогенезу у щурів, яка становить півтора місяця. Строки 45 і 65 доба після введення Паклітакселу відповідає проявленню ефектів впливу на клітинну популяцію сперматогоній.

Критеріями стимуляції процесу регенерації тестикулярної тканини були: - збільшення чисельності клітинної популяції сперматогоній, кількості клітин Сертолі, зниження ступеня зрілості сперматогенного шару, збільшення продуктивності сперматогенезу. Критерієм функціональної активності спермій є відсоток їх рухливих форм.

Результати експериментів наведені в таблицях 17 і 18.

Таблиця 17

Динаміка вмісту КУО-Сп в сім'яниках щурів під час введення Паклітакселу і досліджуваної речовини Треамід

Строки дослідження, доба	Група	КУО-Сп, на 2×10^5 (М; SD, n=10)
	Фон	5,8; 0,70
1-а	Паклітаксел	3,5; 0,69*
45-а	Паклітаксел	2,9; 0,48*
	Треамід	4,2; 0,29#
65-а	Паклітаксел	2,3; 0,42*
	Треамід	3,4; 0,4#

Примітки:

1. * відзначена достовірність відмінностей показника з інтактним контролем (фон), тестуванні ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні)

2. # - відзначена достовірність відмінностей між контролем (Паклітаксел) і дослідними групами ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Наведені експериментальні дані показали, що у результаті вивчення вмісту кількості попередників сперматогенної тканини в сім'яниках щурів після введення Паклітакселу, було виявлено статистично значуще зниження кількості клітин, що дають початок колоніям (КУО-Сп) на 1-у, 45-у і 65-у добу досліду (табл. 17). Так, до кінця досліду кількості колонієутворювальних клітин скоротилися майже на 40%.

Введення Треаміду супроводжувалося достовірним збільшенням (на 44-48%) кількості колонієутворювальних клітин в усі досліджувані строки (на 45 і 65-і дні досліду) у порівнянні з цитостатичним контролем (табл. 17).

Таблиця 18

Зміна рівнів колонієстимулювальної активності кондиційних - середовищ клітин сім'яників ($\times 10^5$ клітин) під час введення Паклітакселу і досліджуваної речовини Треамід

Строки дослідження, доба	Група	КУО-Сп, на 2×10^5 (M; SD, n=10)
Фон		9,25; 0,67
1-а	Паклітаксел	3,0; 0,53*
45-а	Паклітаксел	6,37; 0,32*
	Треамід	6,12; 0,29*
65-а	Паклітаксел	3,25; 0,45*
	Треамід	5,88; 0,52*#

Примітки:

1. *- відзначена достовірність відмінностей показника з інтактним контролем ($p < 0,01$, U-критерій Манна-Уїтні),
2. # - відзначена достовірність відмінностей між контролем (Паклітаксел) і дослідними групами ($p < 0,01$, U-критерій Манна-Уїтні).

Дослідження механізмів знижування колонієутворювальної активності стовбурових клітин після введення Паклітакселу виявило зниження продукції клітинами мікрооточення сперматогенної тканини гуморальних факторів, що стимулюють зростання колоній з попередників сперматогенної тканини, на 1-у, 45 і 65-у добу дослідження (табл. 18). Найбільш істотне пригнічення гормональної регуляції (у 2,8 і 3 рази) процесів колонієутворення комітованих сперматогенних клітин виявлялося на 1-й і 65-й день досліду. Отримані дані свідчать про те, що Паклітаксел виявляв не тільки пряму токсичну дію на стовбурові сперматогонії, але і пригнічував функціональну активність клітин мікрооточення, тим самим знижував їхній стимулюючий вплив на процеси відновлення клітин, що складають глибокий резерв сперматогенної тканини. Це свідчить про пригнічення під дією Паклітакселу гормональної регуляції функціонування стовбурових сперматогоніїв.

На 65-у добу досліду в групі щурів, що одержувала Треамід, було відзначено статистично значуще збільшення (на 80%) секреторної активності клітин мікрооточення у порівнянні з контролем (табл. 18). Це свідчить про активацію під дією Треаміду функціонального стану клітин мікрооточення.

Для вивчення прямої дії Треаміду на попередники сперматогенної тканини було проведено дослідження *in vitro* з додаванням Треаміду у культури клітин у концентраціях 1, 30, 100, і 1000 нг/мл.

Результати експерименту наведені в таблиці 19.

Таблиця 19

Вплив Треаміду на зростання колоній з КУО-Сп під час додавання *in vitro*
(M;SD, n=6)

Концентрація ТРЕАМІДУ в культурі	КУО-Сп на 4×10^4 нуклеарів	
	Клітини сім'яників інтактних щурів	Клітини сім'яників щурів на 1-у добу після введення Паклітакселу в/в
Контроль	7,0 \pm 0,58	2,67; 0,33 *
Треамід (1 нг/мл)	6,83 \pm 0,48	6,83; 0,60 #
Треамід (30 нг/мл)	6,0 \pm 0,36	5,17; 0,65 #
Треамід (100 нг/мл)	8,50 \pm 0,42*	4,67; 0,61 #
Треамід (1000 нг/мл)	11,67 \pm 1,81*	5,67; 0,33 #

Примітки:

1. *- відмінності достовірні під час порівняння з інтактним контролем ($p < 0,05$, U-критерій

Манна-Уїтні);

2. # - відмінності достовірні під час порівняння з цитостатичним контролем на ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

У результаті визначення вмісту попередників сперматогенної тканини в сім'яниках щурів після введення Паклітакселу, було виявлено статистично значуще (табл. 19) зниження колонієутворювання на 1-у добу, що відповідає раніше отриманим даним.

5 Під час додавання Треаміду (у концентраціях 100 і 1000 нг/мл) у повне культуральне середовище, що містить попередники сперматогенної тканини інтактних тварин, було виявлено достовірне збільшення вмісту КУО-Сп.

10 Вивчення прямого впливу Треаміду in vitro на формування сперматогенних колоній з клітин, взятих з сім'яників щурів на 1-у добу після внутрішньовенного введення Паклітакселу, виявило збільшення колонієутворювання під впливом досліджуваної речовини під час введення її в усіх досліджуваних концентраціях (табл. 19).

Отримані дані свідчать про наявність у Треаміду здатності безпосередньо стимулювати функціональну активність клітин-попередників сперматогенної тканини.

15 Таким чином, введення Паклітакселу призводило до знижування регенеративного потенціалу сім'яника, що виражається у зменшенні кількості комітованих колонієутворювальних сперматогенних клітин. Це обумовлено не тільки безпосередньою токсичною дією Паклітакселу на джерела проліферативного пулу сперматогенезу, але і пригніченням гуморальних факторів, що стимулюють проліферацію цих клітин. Введення Треаміду підвищувало регенераторний потенціал тканини. При цьому Треамід не тільки безпосередньо стимулював утворення нових

20 джерел проліферативного пулу сперматогенезу (стовбурових клітин), але і підсилював дію гуморальних факторів, що стимулюють їх утворення. Під час вивчення морфологічного і функціонального стану сперматогенної тканини через 45 днів після початку досліді було виявлено, що введення Паклітакселу призводило до достовірного знижування (більше ніж на 30%) чисельності клітинної популяції сперматогоній, продуктивність сперматогенезу, судячи з ЗКС, знижувалася у порівнянні з фоном більше ніж на

25 40% (табл. 19).

Таблиця 20

Оцінювання стану сперматогенезу щурів через 45 днів після введення Паклітакселу

Група	Середня кількість сперматогоній (абс.)	Середня кількість клітин Сертолі (абс.)	Ступінь зрілості сперматогенного шару (умов.од.)	Загальна кількість сперматозоїдів (млн.)	Кількість рухливих сперматозоїдів (%)
Фон (інтактні тварини)	18,47±0,28	1,07±0,03	6,45±0,01	213,00±0,81	80,05±3,20
Контроль (Паклітаксел)	11,88±0,35*	1,51±0,02*	5,68±0,00*	125,00±5,82*	63,68±1,50*
Дослід Паклітаксел+Треамід	14,56±0,19*#	1,61±0,03*#	5,66±0,01#	146,00±9,53*	71,57±3,19#

Примітка:

* - відмінності достовірні у порівнянні з фоном

- відмінності достовірні у порівнянні з контролем.

30 Одночасно зі зниженням загальної кількості зрілих статевих клітин виявлялося і статистично значуще зменшення відсотка їх рухливості. Таким чином, через 45 діб після введення Паклітакселу відзначалася тестикулярна недостатність у вигляді патоспермії, що є однією з причин чоловічої безплідності. Строк 45 діб відповідає проявленню токсичної дії на клітинну популяцію сперматогоній. Враховуючи, що при цьому спостерігається зниження (на 40%) кількості клітин-попередників сперматогенезу, то у наданому дослідженні отримана модель

35 тестикулярної недостатності, обумовленої виснаженням джерел проліферативного пулу сперматогенезу. Судячи з таких показників, як ступінь зрілості сперматогенного шару і кількість

клітин Сертолі, у контрольних тварин виявляються ознаки активації процесів репаративної регенерації тестикулярної тканини. Так, кількість клітин мікрооточення зростає, а ступінь зрілості сперматогенного шару падає (табл. 20). Однак, функціональна активність клітин мікрооточення є зниженою. Отримані дані свідчать про низький регенераційний потенціал

сперматогенної тканини тварин, що одержували один Паклітаксел.
Через 45 діб після поєднаного введення Паклітакселу і Треаміду (табл. 20), середня кількість сперматогоній статистично значущо зростала у порівнянні з контролем (Паклітаксел), продуктивність сперматогенезу достовірно не збільшувалася, але збільшувався відсоток рухливих форм спермій. Зростання загальної кількості сперматогоній, очевидно, пов'язано зі зростанням кількості комітованих колонієутворювальних клітин сперматогенної тканини. В дослідній групі виявлялося достовірне зростання у порівнянні з контролем середньої кількості клітин Сертолі, але їх функціональна активність залишалася зниженою як у контролі. Ступінь зрілості сперматогенного шару не знижувався у порівнянні з контрольними значеннями. Таким чином, введення лікарського засобу призводило до зниження вираженості патоспермій (судячи з відсотка рухливих форм), зростання кількості сперматогоній.

Під час вивчення морфологічного функціонального стану сперматогенної тканини щурів, що одержували тільки Паклітаксел, було встановлено, що через 65 днів дослідження чисельність клітинної популяції сперматогоній, продуктивність сперматогенезу знижувалася (табл. 21).

Таблиця 21

Оцінювання стану сперматогенезу щурів через 65 днів після введення Паклітакселу

Група	Середня кількість сперматогоній (абс.)	Середня кількість клітин Сертолі (абс.)	Ступінь зрілості сперматогенного шару (умов.од.)	Загальна кількість сперматозоїдів (млн.)	Ендокринна активність сім'яників	Кількість клітин Лейдіга	Кількість рухливих сперматозоїдів (%)
Фон (інтактні тварини)	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 (Паклітаксел)	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*
Дослід Паклітаксел+Треамід	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*

Примітка * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном

- відмінності достовірні у порівнянні з контролем.

Це, очевидно, є наслідком, відзначеного вище виснаження популяції клітин-попередників сперматогенезу і пригнічення гуморальних факторів, що стимулюють їхню проліферацію. Залишався зниженим і відсоток рухливості зрілих статевих клітин, що свідчить про їхню часткову неповноцінність. Таким чином, і у даний строк спостереження (через 65 днів дослідження) виявлялася тестикулярна недостатність, обумовлена зниженням джерел проліферативного пулу сперматогенезу, тобто відтворювалася експериментальна модель патологічного процесу. Кількість клітин Лейдіга залишалася на колишньому рівні. Ендокринна активність клітин Лейдіга зростала. Інтенсивність процесів репаративної регенерації, не підсилювалися. Так, ступінь зрілості сперматогенного шару (хоча і був знижений у порівнянні з контролем), але не зменшувався у порівнянні з попереднім строком дослідження, не зростала також і кількість клітин Сертолі. Відсутність позитивної динаміки протягом регенераторних процесів, очевидно, пов'язано з низькою кількістю комітованих колонієутворювальних клітин сперматогенної тканини.

У тварин, що одержували терапію Треамідом на 65 добу дослідження, чисельність клітинної популяції сперматогоній не зростала у порівнянні з контролем, але продуктивність сперматогенезу, судячи з ЗКС, збільшувалася (на 43%) (табл. 21). Зростав також (на 32%) і відсоток рухливих форм спермій. Цей показник статистично значущо не відрізнявся від фонових значень. Кількість клітин Лейдіга знаходилася на рівні контрольних значень. Ендокринна активність клітин Лейдіга нормалізувалася і досягала контрольних значень. Під час оцінювання ступеня вираженості процесів репаративної регенерації тканини було встановлено, що кількість клітин Сертолі зростала, а ступінь зрілості сперматогенного шару знижувався. Ступінь зрілості сперматогенного шару, навпаки, достовірно знижувався. Ці дані, разом з даними про зростання кількості клітин-попередників сперматогенезу свідчать про те, що

введення Треаміду щурам, що одержували Паклітаксел, стимулювало процеси репаративної регенерації сперматогенної тканини. Тестикулярна недостатність, судячи з відсотка рухливих форм, проявлялася меншою мірою. Слід зазначити, що відсутність позитивного впливу на чисельності клітинної популяції сперматогоній, незважаючи на збільшення кількості клітин-попередників сперматогенезу і посилення гуморальної регуляції їх життєдіяльності, очевидно, свідчить про те, що для проявлення ефекту на клітини-попередники необхідний більш тривалий проміжок часу. З цієї метою був досліджений морфологічний і функціональний стан сперматогенної тканини на 90-й день досліду.

Під час вивчення морфологічного і функціонального стану сперматогенної тканини на 90-й день досліду було встановлено, що чисельність клітинної популяції сперматогоній, ЗКС, відсоток рухливих форм у щурів, що одержували один Паклітаксел, були зниженими у порівнянні з контролем і не зростали у порівнянні з попередніми строками дослідження (табл. 22). Ці дані свідчать про збереження тестикулярної недостатності, обумовленої виснаженням джерел проліферативного пулу сперматогенезу. Кількість клітин Лейдіга достовірно знижувалася, але їх ендокринна активність зростала. Кількість клітин Сертолі (табл. 22) не збільшувалася і була зниженою у порівнянні з контролем. Однак, судячи зі ступеня зрілості сперматогенного шару (цей показник знижений на 10% від фону, табл. 22), можна говорити про деяку активність процесів репаративної регенерації тканини, але інтенсивність їх є явно недостатньою для відновлення вихідної кількості клітин-попередників і всього процесу сперматогенезу в цілому.

Таблиця 22

Оцінювання стану сперматогенезу щурів через 90 днів після введення Паклітакселу

Група	Середня кількість сперматогоній (абс.)	Середня кількість клітин Сертолі (абс.)	Ступінь зрілості сперматогенного шару (умов.од.)	Загальна кількість сперматозоїдів (млн.)	Середня кількість клітин Лейдіга	Ендокринна активність	Кількість рухливих сперматозоїдів (%)
Фон (інтактні тварини)	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 (Паклітаксел)	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*
Дослід Паклітаксел+Треамід	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*#

Примітка * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном.

У групі тварин, що одержували терапію Треамідом, кількість сперматогоній виявилася статистично підвищеною у порівнянні з контролем, що є, очевидно, результатом, відзначеного раніше, збільшення кількості джерел проліферативного пулу сперматогенезу і посилення гуморальних факторів, що стимулюють їхню проліферацію. Продуктивність сперматогенезу, судячи з ЗКС, зростала (на 46 %) у порівнянні з контролем і досягала фонових значень. Збільшилася і функціональна активність спермійв (число рухливих спермійв достовірно перевищувало контрольні значення). Ці дані свідчать про ефективність проведеного лікування. Кількість клітин Лейдіга була подібна з контрольними значеннями. Їхня ендокринна активність нормалізувалася. Інтенсивність процесів репаративної регенерації тканини, судячи зі ступеня зрілості сперматогенного шару і кількості клітин Сертолі, статистично значущо збільшувалася у порівнянні з контролем. Це свідчить про те, що регенераційні можливості тканини на фоні введення лікарського засобу залишаються на високому рівні і ще до кінця не вичерпані.

Наведені дані свідчать про те, що Треамід дозволяє ефективно стимулювати репаративну регенерацію тестикулярної тканини, пригнічення якої було обумовлено зниженням кількості комітованих колонієутворювальних клітин. Ефективність Треаміду підтверджується даними морфологічного аналізу тестикулярної тканини.

Приклад 8.

Дослідження впливу Треаміду на регенерацію клітин підшлункової залози на моделі стрептозотозин-індукованого ураження підшлункової залози.

Дослідження проводили на мишах-самцях лінії C57BL/6 у віці 4 тижнів. Ураження підшлункової залози індукували внутрішньочеревинним введенням стрептозотоцину у дозі 40 мг/кг в 0,25 мл фосфатного буфера щодня протягом 5-и днів [Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas// Physiological Research. -2001. - Vol. 50. -P. 536-546].

Треамід у дозі 1 мг/кг вводили щодня внутрішньошлунково один раз на день на 7-20у добу дослідження.

На 0, 6, 10, 13, 16, 19, 21, 24 і 28 добу дослідження проводили оцінювання рівня глюкози в крові. Рівень глюкози в крові визначали після 4-х годинної депривації корму за допомогою глюкометра (глюкометр SencoCard, "77 Електроніка Кфт", Угорщина).

На 28-у добу дослідження тварин евтаназували в CO₂-камері, проводили морфологічне дослідження підшлункової залози і імуноферментний аналіз на загальний колаген і колаген 1-го типу у гомогенаті підшлункової залози.

Для морфологічного дослідження частину підшлункової залози, прилеглу до селезінки, фіксували у 10 % формаліні, заливали у парафін. Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином. На зрізах визначали площу 10 послідовних островців Лангерганса методом графічного комп'ютерного аналізу і підраховували в них загальну кількість клітин і кількість пікнотизованих клітин. Потім обчислювали кількість клітин на одиницю площі островця і відсоток пікнотизованих клітин.

Для виявлення клітин запалення (нейтрофіли, лімфоцити, макрофаги) в тканині підшлункової залози і їх складу використовували забарвлення гістологічних зрізів гематоксилін-еозином і азур-еозином.

Рівень мишиного колагену типу I у гомогенаті легень визначали методом імуноферментного твердофазного аналізу з використанням комерційного набору (Cusabio Biotech CO., LTD, Китай). Гомогенат тканини легень готували згідно з протоколом виробника Cusabio Biotech CO., LTD (Китай).

Рівень загального колагену у гомогенаті легень визначали з використанням набору для визначення колагену шляхом зв'язування його з барвником і обробки кислотою і розчином пепсину SIRCOL Collagen Assay (Biocolor Ltd, Великобританія) згідно з інструкціями виробника. Гомогенат тканини легень готували згідно з протоколом виробника тест-системи.

Результати проведеного дослідження наведені в таблицях 23-25.

Таблиця 23

Вплив ХС-268-БГ на рівень глюкози в крові (мМоль/л) у мишей лінії C57BL/6 в умовах введення стрептозотоцину (M±m)

Групи	Вихідний рівень	Строки дослідження (доба після останнього введення стрептозотоцину)							
		6	10	13	16	19	21	24	28
Контроль патології	5,8(0,4)	11,7±1,7*	14,0±1,8*	15,0±2,3*	12,3±1,9*	13,9±1,6*	15,3±1,4*	17,2±1,8*	16,4±1,7*
Треамід, 1 мг/кг	5,1(0,1)	10,8±0,4*	11,2±0,2*	11,6±0,3*	10,4±1,4*	12,0±0,1*	12,1±0,4*	12,2±1,0*	12,6 ± 1,1*

Примітка. * - достовірність відмінності (P<0,05) з вихідним рівнем,

- - достовірність відмінності (P<0,05) з патологічним контролем.

Таблиця 24

Вплив Треаміду на загальну кількість клітин, площа острівця Лангерганса і кількість пікнотизованих клітин в острівці Лангерганса у мишей лінії C57Bl/6 в умовах введення стрептозотоцину на 28-у добу дослідження ($M \pm m$)

Групи	Загальна кількість клітин в острівці Лангерганса ($\times 10^4$)	Площа острівкової тканини (піксель)	Кількість пікнотизованих клітин в острівці (піксель)
Інтактні	$116,2 \pm 7,55$	695404 ± 49971	$0,97 \pm 0,11$
Контроль патології	$54,7 \pm 5,4^*$	$314295 \pm 30521^*$	$3,50 \pm 0,40^*$
Треамід, 1 мг/кг	$109,9 \pm 12,6^-$	$635770 \pm 56163^-$	$1,75 \pm 0,14^-$

Примітка: * - достовірність відмінності ($P < 0,05$) з інтактним контролем,
 - - достовірність відмінності ($P < 0,05$) з патологічним контролем.

Таблиця 25

Вплив Треаміду на вміст загального колагену і колагену типу I в підшлунковій залозі у мишей лінії C57BL/6 в умовах ушкодження підшлункової залози на 28-у добу дослідження ($M \pm m$)

Групи дослідження	Колаген I типу (нг/мл)	Загальний колаген (мг/мл)
Інтактні	341 ± 28	33 ± 36
Контроль патології	$856 \pm 76^*$	$57 \pm 5^*$
Треамід, 1 мг/кг	$665 \pm 55^*-$	$41 \pm 4^-$

Примітка: * - достовірність відмінності ($P < 0,05$) з інтактним контролем,
 - - достовірність відмінності ($P < 0,05$) з патологічним контролем.

Курсове введення стрептозотоцину мишам у значній мірі підвищило рівень глюкози в крові тварин протягом усього періоду спостереження (6, 10, 13, 16, 19, 21, 24, 28-а доба після останнього введення стрептозотоцину) (Таблиця 23). Морфологічні дослідження дозволили встановити, що у строки піка гіперглікемії (21, 28-а доба) в тканині підшлункової залози відзначалися набряк і гіперемія, реєструвалася інфільтрація підшлункової залози нейтрофілами, макрофагами і лімфоцитами. Крім цього, починаючи з 6-ї доби після останнього введення стрептозотоцину, у мишей дослідної групи спостерігалось наростаюче зниження площі острівкової тканини у порівнянні з інтактним контролем. На 28-у добу падіння показника було найбільш вираженим: загальна клітинність острівця була знижена більше ніж на 50 % у порівнянні з інтактними мишами, відсоток пікнотизованих клітин, навпаки, значно зростав (у 2,3 рази), у травмованих острівцях з'являлися фібробласти, що свідчило про розвиток склерозу інсулярного апарату (таблиця 24). Методом імуноферментного аналізу гомогенатів підшлункової залози в групі патологічного контролю виявлено підвищення рівнів колагену типу I і загального колагену у порівнянні з інтактними тваринами контролем на 28-у добу дослідження (таблиця 25).

Введення Треаміду у дозі 1 мг/кг достовірно знижувало рівень глюкози в крові у мишей в умовах введення Стрептозотоцину на 13, 21, 24-у добу дослідження (таблиця 1). Морфологічне дослідження підшлункової залози, проведене на 28-у добу дослідження показало, що Треамід знизив число пікнотизованих панкреатоцитів в острівцях Лангерганса хворих тварин, збільшив площу і клітинність острівкової тканини (таблиця 24), знижував концентрацію загального колагену і колагену типу I в підшлунковій залозі у експериментальних тварин відносно до патологічного контролю (таблиця 25).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що на моделі стрептозототин-індукованого ушкодження підшлункової залози Треамід виявляє регенеративну дію відносно тканини підшлункової залози. У результаті відновлюється кількість клітин в острівцях Лангерганса, збільшується площа острівкової тканини, нормалізується кількість пікнотизованих клітин в острівці Лангерганса, відбувається зниження фібротичних змін в тканині підшлункової

залози, як наслідок знижується рівень глюкози в крові. Треамід може застосовуватися під час лікування порушення толерантності до глюкози.

Приклад 9. Дослідження впливу Треаміду на регенерацію клітин підшлункової залози і відновлення функції тестикулярної тканини у самців мишей на моделі метаболічного синдрому.

5 Метаболічні порушення моделювали наступним чином: на 2 день після народження самцям мишей лінії 357Bl/6 вводили стрептозоцин у дозі 200 мг/кг, однократно, підшкірно у ділянку холки, об'єм розчину, що вводиться, 30 мкл. З 4-тижня після народження, тварин переводили на раціон з високим вмістом жиру. Для цього використовували корм, збагачений важкими насиченими жирами (30 % жиру) (Siff EF R/M with 30 % Fat кат. № E15116-34, Germany).

10 Тривалість призначення корму з високим вмістом жиру склала 42 доби (з 28-ї по 70-у добу експерименту). Треамід вводили у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково щодня один раз на добу з 49-ї по 70-у добу експерименту. Контрольні тварини замість досліджуваної речовини одержували розчинник у еквівалентному об'ємі.

На 28, 35, 42, 49, 56, 63 і 70 добу експерименту проводили оцінювання рівня глюкози в крові. Рівень глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра (Accu-Chek Performs Nano ("Roche Diagnostes GmbH", Germany). Вимірювання вихідного рівня глюкози в крові у тварин проводили після 16-годинної депривації корму, усі подальші вимірювання рівня глюкози також робили після 16-годинної депривації їжі.

На 70-у добу дослідження тварин евтаназували в CO₂-камері. Потім досліджували рівень вільного тестостерону в сироватці, проводили морфологічне дослідження підшлункової залози.

Рівень вільного тестостерону в сироватці оцінювали імуноферментним аналізом згідно з протоколом виробника тест-систем.

Для морфологічного дослідження частину підшлункової залози, прилеглу до селезінки, фіксували у 10 % формаліні, заливали у парафін за стандартною методикою.

25 Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином. На зрізах визначали площу 10 послідовних островців Лангерганса методом графічного комп'ютерного аналізу і підраховували в них загальну кількість клітин і кількість пікнотизованих клітин. Потім обчислювали кількість клітин на одиницю площі островця і відсоток пікнотизованих клітин. Для виявлення клітин запалення (нейтрофіли, лімфоцити, макрофаги) в тканині підшлункової залози і їх складу використовували забарвлення гістологічних зрізів гематоксилін-еозином.

30 Результати проведеного дослідження показали, що моделювання метаболічного синдрому викликало набряк і гіперемію в тканині підшлункової залози у мишей самців лінії 357Bl/6 на 70 добу експерименту (Фіг. 1). Крім цього, у мишей в модельних умовах реєструвалася дрібно і середньо-краплинна жирова дистрофія ацинарних клітин, потовщення і розростання міжчасточкових перегородок, інфільтрація островкової тканини клітинами запалення, відзначалося зменшення загальної кількості островців Лангерганса, зниження їх площі і клітинності. у порівнянні з такими тварин інтактного контролю, тим часом, відсоток пікнотизованих клітин в островцях зростав (Фіг. 2, таблиця 26).

40 Внутрішньошлункове введення Треаміду у дозі 10 мг/кг з 49 по 70 добу дослідження перешкоджало руйнуванню підшлункової залози у мишей в умовах моделювання метаболічних порушень. Треамід збільшував кількість островців Лангерганса в підшлунковій залозі і їх клітинність, перешкоджав розвитку жирової дистрофії ацинарних клітин і значно зменшував кількість пікнотизованих клітин в островцях Лангерганса у мишей в умовах з метаболічних порушень. Крім цього, Треамід знижував інтенсивність набряку і інфільтрацію островкової тканини клітинами запалення (Фігури 1 і 2, таблиця 26).

Таблиця 26

Морфологія підшлункової залози мишей на 70у добу моделювання метаболічних порушень (M±m)

Група	Кількість островців на 30 полях зору	% пікнотизованих клітин в островці Лангерганса	Кількість клітин в островці Лангерганса	Площа островця (піксели)
Інтактні (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*
Треамід, 10 мг/кг (n=8)	7,4±0,37-	0,99±0,06-	101,8± 3,0*-	743399 ± 21134*-

Примітки:

1 - * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

2 - - - відмінності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

5 Результати дослідження глюкози в сироватці крові мишей показали, що моделювання метаболічних порушень призводило до стійкого збільшення рівня глюкози в крові у мишей самців лінії C57BL/6, починаючи з 42 доби експерименту. Високий рівень глюкози зберігався до 70 доби. Максимальні значення показника були виявлені на 63 добу експерименту і перевищили вихідний рівень у 3,8 рази, на 70 добу - у 4,2 рази (Таблиця 27).

Внутрішньошлункове введення Треаміду у дозі 10 мг/кг з 49 по 70 добу експерименту знижувало рівень глюкози в крові мишей на 56 і 63 добу експерименту (Таблиця 27).

10 Таким чином, курсове введення Треаміду у дозі 10 мг/кг викликало гіпоглікемічну дію у мишей самців лінії C57BL/6 в умовах моделювання метаболічних порушень.

Таблиця 27

Концентрація глюкози (ммоль/л) в сироватці крові мишей в умовах моделювання метаболічних порушень і застосування Треаміду у дозі 10 мг/кг ($M \pm m$)

Строк проведення аналізу	Інтактні (n=10)	Патологічний контроль (n=10)	Треамід, 10 мг/кг (n=8)
28 доба	4,72±0,81	6,02±2,02	5,36±1,28 *
35 доба	4,6±0,87	4,74±1,87	4,21±1,81 *
42 доба	4,91±0,96	10,84±1,97 *	12,75±2,6 *
49 доба	5,33±0,89	10,47±1,96 *	13,59±2,41 *
56 доба	5,07±0,86	19,58±6,34 *	12,91±4,48 * -
63 доба	5,43±0,81	20,51±3,85 *	14,47±3,21 * -
70 доба	4,64±0,92	19,77±4,99 *	21,82±5,83 *

Примітки:

1 - * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

2 - - - відмінності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

15 Результати дослідження вільного тестостерону в сироватці крові мишей показали зниження (у 1,6 рази) гормону у самців групи патологічного контролю у порівнянні з інтактними тваринами. Отримані дані говорять про сформований на фоні метаболічних порушень гіпогонадізм у самців лабораторних тварин, що відтворює клінічну картину у людей.

20 Курсове введення ТРЕАМІДУ у дозі 10 мг/кг відновило концентрацію вільного тестостерону в крові до рівня інтактних тварин (Таблиця 28). Таким чином, досліджувана фармацевтична субстанція запобігла розвитку гіпогонадізму, індукованого метаболічними порушеннями.

Таблиця 28

Рівень вільного тестостерону в сироватці крові мишей на 70у добу моделювання метаболічних порушень ($M \pm m$)

Групи	Вільний тестостерон (пг/мл)
Інтактні (n=10)	3,06±0,49
Патологічний контроль (n=10)	1,97±0,31 *
Треамід, 10 мг/кг (n=8)	3,70±0,46 -

Примітки:

1 - * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні),

2 - - - відмінності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$, U-критерій Манна-Уїтні).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що на моделі метаболічного синдрому у самців мишей Треамід виявляє регенеративну дію відносно тканини підшлункової залози. У результаті відновлюється кількість клітин в острівцях Лангерганса, збільшується площа острівкової тканини, нормалізується кількість пікнотизованих клітин в острівці Лангерганса, відбувається зниження фібротичних змін в тканині підшлункової залози, як наслідок знижується рівень глюкози в крові. Також Треамід відновлює функцію тестикулярної тканини, відвертаючи розвиток гіпогонадізму. Таким чином, Треамід може застосовуватися під час лікування метаболічного синдрому і гіпогонадізму.

Приклад 10. Дослідження впливу Треаміду на регенерацію клітин підшлункової залози і відновлення функції тестикулярної тканини у самців щурів на моделі метаболічного синдрому.

Метаболічний синдром моделювали у самців щурів лінії Вістар (260-280 г) шляхом утримування тварин на раціоні високожирової дієти ("дієти кафетерію") протягом 12-и тижнів. "Дієта кафетерію" збалансована згідно з Current Protocols in Pharmacology [Current Protocols in Pharmacology (2005) Animal Models of Disease//Contributed by Petter Hedlund, Kenshi Matsumoto, and Karl-Erik Andersson]. Дієта містила 25-35 % жирів і 25-30 % легкозасвоюваних вуглеводів на додаток до стандартного раціону гризунів. Треамід вводили у дозі 0,5 мг/кг внутрішньошлунково щодня один раз на добу на 7-11-й тижнях дієти. Препарат порівняння Метформін вводили у дозі 200 мг/кг внутрішньошлунково у тому самому режимі.

Оцінювання розвитку патології і терапевтичної дії Треаміду проводили за наступними показниками: біохімічні показники крові (рівень глюкози, холестерину (ЗХС), тригліцеридів (ТГ), ЛПВЩ, ЛПНЩ, індекс атерогенності), глюкозотолерантний тест, маса вісцерального жиру, загальна кількість і відсоток рухливих форм сперматозоїдів.

Визначення глюкози проводили за допомогою глюкометра "OneNouch Select" (Швейцарія).

Рівень тригліцеридів, ЗХС і ЛПВЩ визначали за допомогою діагностичного набору (Ольвекс діагностікум, Росія).

Рівень ЛПНЩ визначався за формулою 2.

$$\text{ЛПНЩ} = \text{ЗХС} - (\text{ЛПВЩ} + \text{ТГ}/2.2) \quad (1),$$

де ЛПНЩ - холестерин ліпопротеїнів низької щільності;

ЛПВЩ - холестерин ліпопротеїнів високої щільності;

ЗХС - загальний холестерин;

ТГ - тригліцериди.

Коефіцієнт атерогенності (КА) розраховували за формулою 3.

$$\text{КА} = (\text{ЗХС} - \text{ЛПВЩ})/\text{ЛПВЩ} \quad (2),$$

де КА - коефіцієнт атерогенності;

ЛПВЩ - холестерин ліпопротеїнів високої щільності.

Індекс атерогенності розраховували для кожної тварини індивідуально, потім рахували середнє арифметичне значення по групі.

Для проведення аналізу сперми тварин наркотизували внутрішньочеревинним введенням суміші Золетилу і Ксілі (0,2 мл Золетилу + 0,8 мл Ксілі) в об'ємі 70 мкл/100 г маси. Виділяли епідидиміс. Голівку епідидимісу відрізали від хвоста, зважували, робили 5 надрізів (для покращення виходу сперми) і поміщали у пробірку, що містить 10 мл фосфатно-сольового буфера, підігрітого до 37 °С. Протягом 10 хвилин пробірку витримували при 37 °С. Далі пробірку струшували на шейкері, відбирали 20 мкл рідини, наносили на підігріте до 37 °С предметне скло і під мікроскопом оцінювали кількість рухливих сперматозоїдів. Підрахунок вели до 100 сперматозоїдів.

Для оцінювання загальної кількості сперматозоїдів з пробірки з епідидимісом брали 20 мкл рідини після струшування і вносили у пробірку, що містить 400 мкл фіз. розчину. Після струшування пробірки відбирали вміст (20 мкл) і вносили у камеру Горяєва. Рахували кількість сперматозоїдів у 100 великих квадратах. Кількість сперматозоїдів в голівці епідидимісу розраховували за формулою:

$$\text{Кількість сперматозоїдів} = \text{кількість сперматозоїдів у 100 великих квадратах камери Горяєва} \cdot 0,525 \text{ (коефіцієнт з розрахунку розведення і об'єму камери Горяєва)}/\text{маса голівки епідидимісу}.$$

Результати проведеного дослідження наведені в таблицях 29-32.

Вимірювання маси вісцерального жиру у експериментальних тварин показало, що на фоні високожирової дієти вісцеральний жир біля нирок, кишечника і сім'яників наростає рівномірно: у 1,7, 1,5 і 2,0 рази, відповідно (таблиця 29). Загальна маса вісцерального жиру в групі контролю збільшилася приблизно у 1,7 рази у порівнянні з інтактними тваринами. Отримані результати дали підставу зробити висновок, що у експериментальних тварин, що утримуються на раціоні високожирової дієти, розвилася абдомінальне ожиріння - одна з ознак метаболічного синдрому.

Введення Треаміду (у дозі 0,5 мг/кг) самцям щурів знизило приріст маси вісцерального жиру у 1,3 рази у порівнянні з групою контролю. Метформін виявив подібний ефект (Таблиця 29).

Таблиця 29

Відносна маса вісцерального жиру, % до маси тіла ($M \pm m$, $n=8$)

Група	Жир біля нирок	Жир біля кишечника	Жир біля сім'яників	Весь жир
Інтактні	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*
Треамід (0,5 мг/кг)	0,48±0,05 &	0,94±0,07	1,03±0,14*	2,46±0,15*&
Метформін (200 мг/кг)	0,52±0,05 &	1,07±0,08*	0,98±0,12*	2,57±0,18*&

Примітка -

* - відмінності статистично значущі у порівнянні з інтактними ($p < 0,05$);

&- відмінності статистично значущі у порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$)

5 Результати вимірювання рівня глюкози (натще) в суцільній крові щурів наведено в таблиці 30. Перше вимірювання проводилося до введення препаратів тваринам на строку 6 тижнів дослідження. З таблиці 30 видно, що у інтактних щурів, що утримуються на стандартному раціоні харчування, рівень глюкози на строку 6 тижнів дієти склав 3,9±0,3 ммоль/л, на строку 12 тижнів дієти - 6,8±0,93 ммоль/л. У свою чергу, у щурів, що утримуються на високожировій дієті, рівень глюкози на строку 6 тижнів дієти склав 6,7±0,3 ммоль/л, на строку 12 тижнів дієти - 11,6±0,9 ммоль/л. Таким чином, у тварин, що одержували високожирову дієту, спостерігалася виражена гіперглікемія, яка є ще однією ознакою метаболічного синдрому.

10 Внутрішньошлункове введення Треаміду експериментальним тваринам, починаючи з 7-го тижня високожирової дієти, стримувало збільшення рівня глюкози в крові. Треамід виявив ефект через 3 тижні терапії і зберіг його до кінця дослідження (Таблиця 30).

Таблиця 30

Динаміка рівня глюкози в крові щурів-самців, ммоль/л

Група	Рівень глюкози в крові щурів-самців, ммоль/л			
	до введення препаратів	через 3 тижні введення препаратів	через 5 тижнів введення препаратів	через тиждень після скасування препаратів
Інтактні	3,9±0,3	3,7±0,2	4,5±0,2	6,8±0,9
Контроль	6,7±0,3*	8,7±0,4*	9,1±0,4*	11,6±0,9*
Треамід (0,5 мг/кг)	6,4±0,2*	6,5±0,2*&	7,8±0,2*&	8,3±0,7 &
Метформін (200 мг/кг)	6,2±0,1*	6,9±0,3*&	8,0±0,2*&	7,8±0,6 &

Примітки:

1 - * - відмінності статистично значущі і порівнянні з інтактними ($p < 0,05$);

2 - & - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$).

20 Для оцінювання впливу Треаміду на ліпідний обмін були виміряні ЗХС, ТГ, ЛПНЩ, ЛПВЩ, індекс атерогенності на 12ому тижні дослідження.

Застосування раціону "дієти кафетерію" у тварин призводило до вираженого статистично значущого збільшення рівня загального ХС, ТГ, ЛПНЩ і зниження рівня ЛПВЩ відносно інтактних тварин (таблиця 31). Розрахунковий показник - індекс атерогенності у тварин групи контролю був у 4,2 рази вище, ніж у інтактних тварин. Внутрішньошлункове введення Треаміду

підвищило рівень ЛПВЩ з $1,5 \pm 0,2$ до $1,9 \pm 0,2$ і знизило індекс атерогенності з $2,1 \pm 0,4$ до $0,9 \pm 0,2$. Це дає підставу зробити висновок, що під час тривалого застосування Треамід виявляє антиатерогенну дію (таблиця 31).

Таблиця 31

Ліпідний спектр крові самців щурів, що утримувалися на високожировій дієті протягом 12ти тижнів ($M \pm m$, $n=8$)

Оцінюваний показник	Інтактні (стандартна дієта)	Контроль (високожирова дієта)	Треамід (0,5 мг/кг)	Метформін (200 мг/кг)
Холестерин загальний, ммоль/л	$2,6 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2^*$	$3,5 \pm 0,1^*$	$2,8 \pm 0,3$
ЛПВЩ, ммоль/л	$1,7 \pm 0$	$1,1 \pm 0,1^*$	$1,9 \pm 0,2 \&$	$1,8 \pm 0 \&$
ЛПНЩ, ммоль/л	$0,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3^*$	$1,2 \pm 0,2^*$	$0,7 \pm 0,3 \&$
Індекс атерогенності	$0,5 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,4^*$	$0,9 \pm 0,2^* \&$	$0,6 \pm 0,1 \&$
Тригліцериди, ммоль/л	$0,7 \pm 0$	$1,1 \pm 0,0^*$	$0,9 \pm 0,1^*$	$0,7 \pm 0,1 \&$

Примітка -

* - відмінності статистично значущі у порівнянні з інтактними ($p < 0,05$);

& - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$)

5

З таблиці 31 видно, що в групі, що одержувала "дієту кафетерію", загальна кількість сперматозоїдів і відсоток рухливих форм сперматозоїдів були у 2 рази нижче, ніж у тварин, що утримуються на стандартному раціоні. Це узгоджується з клінічними даними про зниження якості сперми у чоловіків, що страждають метаболічними розладами. Внутрішньошлункове введення Треаміду збільшило у 1,7 рази загальну кількість сперматозоїдів і у 1,5 рази відсоток рухливих форм сперматозоїдів, довівши ці показники до рівня інтактних. Таким чином, можна зробити висновок, що Треамід виявляє терапевтичну дію не тільки відносно основних ознак метаболічного синдрому, але і відновлює якість сперми, що знизилася на фоні патології.

10

Терапія Метформіном також у 1,8 рази збільшила загальну кількість сперматозоїдів, але на відміну від Треаміду не вплинула на відсоток рухливих форм сперматозоїдів (Таблиця 32).

15

Таблиця 32

Загальна кількість сперматозоїдів і відсоток рухливих форм сперматозоїдів у самців щурів на моделі метаболічного синдрому, індукованого високожировою дієтою ($M \pm m$, $n=8$)

Група	Загальна кількість сперматозоїдів	Відсоток рухливих форм сперматозоїдів
Інтактні (стандартна дієта)	$304,2 \pm 46,2$	$42,43 \pm 4,09$
Контроль (високожирова дієта)	$154,5 \pm 17,6^*$	$22,71 \pm 3,13^*$
Треамід (0,5 мг/кг)	$260,0 \pm 38,7 \&$	$34,43 \pm 3,15 \&$
Метформін (200 мг/кг)	$276,6 \pm 44,6 \&$	$24,43 \pm 3,99^*$

Примітка -

* - відмінності статистично значущі у порівнянні з інтактними ($p < 0,05$);

& - відмінності статистично значущі у порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$)

Таким чином, на моделі метаболічного синдрому у самців щурів Треамід знизив підвищення рівня глюкози в крові, знизив індекс атерогенності, знизив збільшену на фоні патології кількість вісцерального жиру і відновив знижену внаслідок ендокринних порушень загальну кількість сперматозоїдів і відсоток їх рухливих форм. Це підтверджує здатність Треаміду відновлювати

20

функцію підшлункової залози і тестикулярної тканини. Треамід рекомендується застосовувати під час метаболічного синдрому і зниженої функції тестикулярної тканини.

Приклад 11. Дослідження впливу Треаміду на фертильність самців мишей на моделі метаболічного синдрому.

5 Метаболічні порушення моделювали наступним чином: на 2 день після народження самцям мишей лінії 357Bl/6 вводили стрептозотоцин у дозі 200 мг/кг, однократно, підшкірно у ділянку холки, об'єм розчину, що вводиться, 30 мкл. З 4-тижня після народження, тварин переводили на раціон з високим вмістом жиру. Для цього використовували корм, збагачений важкими насиченими жирами (30 % жиру) (Siff EF R/M with 30 % Fat кат. № E15116-34, Німеччина).
10 Тривалість утримування тварин на високожировій дієті склала 42 доби (з 28-ї по 70-у добу дослідження). Треамід вводили у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково щодня один раз на добу з 49-ї по 80-у добу експерименту. Контрольні тварини замість досліджуваної речовини одержували розчинник у еквівалентному об'ємі.

15 Для оцінювання фертильності до самців експериментальних груп підсаджували інтактних самок у співвідношенні 1:2 на період з 70ї по 80у добу дослідження. У цей період самцям дослідної групи продовжували вводити внутрішньошлунково один раз на добу Треамід у дозі 10 мг/кг.

20 По закінченню строку спарювання на 80-у добу дослідження самців евтаназували в CO₂-камері. У тварин відбирали кров і в сироватці методом імуноферментного аналізу визначали рівень вільного тестостерону. Евтаназія проводилася в ранковий години з 9:30 до 11:00.

Самок умертвляли в CO₂-камері на 18 день вагітності. Досліджували плоди в матці. Для оцінювання плідності обчислювали індекс плідності (ІП):

ІП = число запліднених самок/число самок, зсаджених з самцями × 100 %.

25 Результати дослідження вільного тестостерону в сироватці крові у мишей самців лінії 357Bl/6 після моделювання метаболічних порушень і застосування Треаміду у дозі 10 мг/кг наведені на 80 добу експерименту в таблиці 33. Моделювання метаболічних порушень викликало зниження концентрації вільного тестостерону в сироватці крові на 80 добу експерименту у 1,8 рази у порівнянні з групою інтактних тварин (таблиця 33).

30 Курсове введення Треаміду у дозі 10 мг/кг підвищувало рівень вільного тестостерону в сироватці крові мишей з метаболічними порушеннями у 2 рази у порівнянні з патологічним контролем і на 16 % у порівнянні з інтактними тваринами.

Таким чином, Треамід у дозі 10 мг/кг відновлював рівень вільного тестостерону в сироватці крові у мишей з метаболічними порушеннями.

Таблиця 33

Вміст вільного тестостерону в сироватці крові мишей з гіпогонадізмом, викликаним метаболічними порушеннями (M±m, n=10)

Група	Вільний тестостерон в сироватці крові (пг/мл)
Інтактні	2,99±1,89
Патологічний контроль	1,66±0,43 *
Треамід (10 мг/кг)	3,46±1,87 *-

Примітки:

1 - * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні),

2 - - - відмінності достовірні у порівнянні з контролем (p<0,05, U-критерій Манна-Уїтні).

35

Результати дослідження фертильності мишей на 70-80 добу після моделювання метаболічних порушень і застосування Треаміду у дозі 10 мг/кг наведені в таблиці 34.

40 Встановлено, що індекс плідності самців з метаболічними порушеннями на 70-80 добу дослідження був знижений у 2,8 рази у порівнянні з інтактним контролем. У самців з метаболічними порушеннями, що одержували Треамід у дозі 10 мг/кг з 49-80 добу, індекс плідності був у 1,8 рази вище, ніж у самців з метаболічними порушеннями, що не одержували лікування (патологічний контроль) (Таблиця 34).

Таблиця 34

Індекс плідності мишей-самців в умовах моделювання метаболічних порушень і застосування Треаміду у дозі 10 мг/кг (n=20)

Група	Індекс плідності, %
Інтактний контроль	85
Контроль патології	30*
Треамід (10 мг/кг)	55*-

Примітки:

- * - відмінності достовірні у порівнянні з фоном (p<0,05, по Фішеру);
- - відмінності достовірні у порівнянні з контролем (p<0,05, по Фішеру).

Таким чином, на моделі метаболічного синдрому Треамід ефективно відновив функцію тестикулярної тканини самців мишей, що призвело до підвищення фертильності тварин. Треамід рекомендується застосовувати під час лікування метаболічного синдрому, гіпогонадізму і чоловічої безплідності.

Приклад 12. Дослідження впливу Треаміду на відновлення тканини печінки на моделі хронічного токсичного гепатиту.

Хронічний токсичний гепатит викликали у мишей-самців лінії CBA/CaLac внутрішньошлунковим введенням 20 % розчину тетрахлорвуглецю (CCl₄) на оливковій олії у об'ємі 0,2 мл/миша на 0, 3, 7, 10, 14 і 17 добу дослідження. Треамід вводили у дозі 10 мг/кг щодня внутрішньошлунково один раз на добу з 14 по 27 день дослідження. На 28 добу дослідження тварин евтаназували в CO₂-камері і забирали біоптат печінки на гістологічний аналіз.

Для гістологічних досліджень печінку фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну і потім заливали у парафін за стандартною методикою. Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали: 1) гематоксиліном і еозином за стандартною методикою для рутинного гістологічного дослідження; 2) пікрофуксином для визначення площі з'єднувальної тканини, за допомогою засобів комп'ютерної обробки графічних даних.

Результати дослідження показали, що через 2 тижня після останнього введення CCl₄ в печінці мишей виявляються морфологічні зміни, характерні для токсичного гепатиту. Так, на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, відзначалася дрібно і середньокраплинна жирова дистрофія, моноцелюлярні і мостоподібні некрози гепатоцитів, а також розвиток інфільтрації клітинами запалення (переважно макрофагами і лімфоцитами) печінкової паренхіми різного ступеня вираженості (Фіг. 3). Крім цього, спостерігалось порушення балкової будови печінки внаслідок набряку і венозне повнокров'я. Останнє вказує на гемодинамічні порушення в печінці у мишей в умовах курсового введення CCl₄.

Забарвлення пікрофуксином препаратів печінки дозволило виявити у тварин з індукованим токсичним гепатитом збільшення вмісту з'єднувальної тканини в перипортальних зонах і розростання колагену з портальних просторів у вигляді септ (Фіг. 3).

Внутрішньошлункове введення Треаміду тваринам у дозі 10 мг/кг істотно знижувало вираженість інфільтрації клітинами запалення хворої печінки, зменшувало кількість моноцелюлярних некрозів і інтенсивність жирової дистрофії, виражено зменшувало вміст з'єднувальної тканини в печінці хворих тварин у порівнянні з патологічним контролем. Гістологічна картина печінки лікованих тварин на 28 добу експерименту не відрізнялася від такої інтактного контролю (Фіг. 3).

Таким чином, на моделі хронічного токсичного гепатиту Треамід виявляв регенеративну дію відносно тканини печінки: знижував фіброз, знижував інтенсивність жирової дистрофії, перешкоджав розвитку некрозу. Це дозволяє зробити висновок, що Треамід може застосовуватися як препарат, що відновлює структурні і функціональні характеристики тканини печінки.

Приклад 13. Дослідження впливу Треаміду на відновлення тканини легені на моделі емфіземи легені.

Емфізему легень викликали у мишей-самок лінії C57Bl/6 однократним інтратрахеальним введенням еластази (Sigma, США) у дозі 0,6 Е/миша в 30 мкл NaCl 0,9 % [Lüthje L., Raupach T., Michels H. et al. // Respiratory Research 2009, 10:7]. День операції прийняли за 0 день

експерименту. Треамід вводили у дозі 10 мг/кг щодня внутрішньошлунково один раз на добу з 7 по 60 добу дослідження. На 7, 14, 30 і 60 добу дослідження тварин евтаназували в CO₂-камері і виділяли легені.

Для оцінювання динаміки і вираженості розвитку емфіземи в тканині легень виготовлялися гістологічні препарати. Для цього легені фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну і потім заливали у парафін за стандартною методикою. З депарафінованих зрізів одержували препарати верхівки легені, середнього легеневого поля і нижнього легеневого поля товщиною 5 мкм і забарвлювали гематоксиліном і еозином за стандартною методикою. Далі робилися фотографії верхівки легені, середнього легеневого поля і нижнього легеневого поля, досліджували локалізацію і площу емфіземи за допомогою засобів комп'ютерної обробки графічних даних. Як оцінювальний показник розвитку емфіземи вимірялася площа емфізематозно-розширеної тканини легень (% від нормальної тканини), з розрахунків виключалися судини і 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, Erzsébet Bartolák-Suki, Harikrishnan Parameswaran, Hiroshi Hamakawa¹ and Béla Suki. Scale dependence of structure-function relationship in the emphysematous mouse lung//Front. Physiol. 6:146. doi: 10.3389/fphys.2015.00146].

В ході проведених експериментів виявлено, що еластаза стоншувала стінки альвеол і бронхіол, значно збільшувала площу просвіту, викликала розриви альвеолярних стінок на 7-у добу (таблиця 13). Слизова оболонка бронхів і бронхіол мала фестончасті обриси і була вистелена циліндричним і кубічним (у бронхіолах) епітелієм респіраторного типу, мали місце помірні десквамативні зміни. Додатково на гістологічних препаратах легень виявляли помірну гіперемію капілярів міжальвеолярних перегородок і порушення мікроциркуляції: відзначалося помірно виражене повнокров'я судин мікроциркулярного русла, капілярів міжальвеолярних перегородок у легенях.

Таблиця 35

Площа емфізематозно-розширеної тканини легень (% від нормальної) у мишей-самок лінії C57Bl/6 в умовах інтратрахеального введення еластази (M±m, n=10).

Групи	Верхівка легені	Середнє легеневе поле	Нижнє легеневе поле
Інтактний контроль	0	0	0
7 доба експерименту			
Емфізема легень	1,3 ± 0,03 *	6,5 ± 0,98 *	43,0 ± 5,85 *
Емфізема легень, лікована Треамідом (10 мг/кг)	0,9 ± 0,12 * -	5,4 ± 0,55 *	41,3 ± 1,82 *
14 доба експерименту			
Емфізема легень	1,9 ± 0,06 *	34,1 ± 4,42 *	53,6 ± 6,57 *
Емфізема легень, лікована Треамідом (10 мг/кг)	0,7 ± 0,09 * -	29,03 ± 1,76 *	42,6 ± 1,79 * -
30 доба експерименту			
Емфізема легень	11,8 ± 1,83 *	26,2 ± 1,84 *	68,2 ± 7,61 *
Емфізема легень, лікована Треамідом (10 мг/кг)	2,4 ± 1,6 * -	18,5 ± 2,91 *	32,8 ± 3,78 * -
60 доба експерименту			
Емфізема легень	7,7 ± 0,68 *	23,8 ± 2,51 *	56,9 ± 6,41 *
Емфізема легень, лікована Треамідом (10 мг/кг)	3,6 ± 0,26 * -	24,9 ± 3,11 *	40,0 ± 3,57 * -

Примітки:

* - достовірність відмінності з інтактним контролем (P<0,05);

- - достовірність відмінності з патологічним контролем (емфізема легені) (P<0,05).

Значна частина тканини еластазних легень була зайнята емфізематозно-розширеними альвеолами зі зруйнованими міжальвеолярними перегородками. Площа емфізематозно-

розширеної тканини в нижньому легеновому полі досягала 43 % від площі нормальних легень, у середньому легеновому полі - 6,5 %, у верхівці легені - 1,3 %. Як видно емфізема локалізувалася переважно в нижньому легеновому полі. Нарівні з розтягуванням альвеол спостерігалися розриви альвеолярних перегородок. Емфізематозно розширені альвеоли викликали стискування незмінених альвеол, внаслідок чого в легенях розвивалися вогнищеві ателектази. В еластичних легенях площа з'єднувальної тканини зменшувалася більше ніж у 3 рази ($P < 0,05$) у порівнянні з інтактним контролем на 7-у добу. Додатково було відзначено, що еластаза призводила до потовщення стінок альвеол за рахунок лімфо-макрофагальної інфільтрації і запальна інфільтрація інтерстиціальної тканини. Просвіт окремих альвеол також був заповнений макрофагами і лімфоцитами (таблиця 35).

До 14-ї доби відбувалося прогресування емфіземи: відзначається збільшення площі емфізематозно розширених альвеол у середньому і нижньому легеновому полі до 34,1 % і 53,6 % відповідно, і стоншення їх стінок (таблиця 35, фіг. 4). Це призводило до стоншування альвеолярних капілярів і їх запустівання. До 30-ї доби спостереження % емфізематозно розширеної тканини у верхівці легені і у нижньому легеновому полі збільшувався. На 60-у добу величина показника була незначно нижче у порівнянні з 30-ю добою.

Введення Треаміду мишам викликало зниження інтенсивності запальної інфільтрації паренхіми легень протягом усього періоду спостереження. Препарат зменшував площу емфізематозно-розширених альвеол у верхівці легені (7, 14, 30, 60 доба) і в нижньому легеновому полі (14, 30, 60 доба) у порівнянні з групою патологічного контролю (таблиця 35, Фіг. 4).

Таким чином, на моделі еластаза-індукованої емфіземи легені пероральне застосування Треаміду виявляло регенеративну дію відносно тканини легень: відзначалося зменшення площі емфізематозно-розширеної тканини легень. Це дозволяє зробити висновок, що Треамід може застосовуватися як препарат, що відновлює структурні і функціональні характеристики легень.

Приклад 14. Дослідження впливу Треаміду на розвиток легенового фіброзу.

Токсичне ушкодження альвеолярного епітелію легень, що викликає легеновий фіброз, моделювали інтратрахеальним введенням цитостатика блеоміцину однократно у дозі 80 мкг/миша в 30 мкл фізіологічного розчину. Для анестезії під час операції використовували інгаляційний ефірний наркоз. Операційне поле дезінфікували 70 % розчином етанолу і звільняли від волоссяного покриву. По середній лінії шиї розсікали шкіру, підшкірну клітковину і власну фасцію шиї. Методом тупого розсування тканин розсовували м'язи на вентральному боці трахеї. По ходу течії повітря на вдиху робили ін'єкцію блеоміцину за допомогою шприца Гамільтона. Після ушивання рани операційне поле обробляли антисептиком. Введення блеоміцину приймали за 0 день експерименту.

Ефективність дії Треаміду і відтворення легенового фіброзу оцінювали за кількістю і інтенсивністю синтезу з'єднувальної тканини в легенях, а також за гісто-архітектонікою легень.

В ході проведених експериментів виявлено, що зміни морфологічної картини легень мишей-самців лінії C57BL/6 після однократного інтратрахеального введення блеоміцину були подібні до змін, характерних для фіброзу легень. Так, забарвлення гістологічних препаратів легень мишей лінії C57BL/6 пікрофуксином по Ван-Гізоні і подальша візуалізація з'єднувальної тканини дозволили виявити значне розростання з'єднувальної тканини в основному навколо судин і бронхіол (Фіг. 5; таблиця 36). Додатково імуноферментним аналізом були досліджені гомогенати легень тварин інтактного контролю і патологічного контролю. Як видно з таблиці 37, інтратрахеальне введення блеоміцину достовірно підвищувало рівні колагену типу I, загального колагену і гідроксипроліну.

Таблиця 36

Вміст з'єднувальної тканини (%) в легенях у мишей лінії C57BL/6 в умовах легенового фіброзу на 21-у добу досліді ($M \pm m$, $n=10$).

Інтактний контроль	Легеновий фіброз (патологічний контроль)	Легеновий фіброз, лікований ХС-268-БГ у дозі 10 мг/кг
0,91 \pm 0,09	2,29 \pm 0,13 *	1,17 \pm 0,20 -

Примітки:

* - достовірність відмінності з інтактним контролем ($P < 0,05$);

- - достовірність відмінності з патологічним контролем (легеновий фіброз) ($P < 0,05$).

Таблиця 37

Рівень загального колагену, колагену типу I і гідроксипроліну в гомогенаті легень у мишей лінії C57BL/6 в умовах легеневого фіброзу на 21-у добу досліджу (M±m, n=10).

Групи дослідження	Колаген I типу (ng/ml)	Загальний колаген (mg/ml)	Гідроксипролін (mkg/ml)
Інтактний контроль	204 ± 17	22,3 ± 1,5	26,12 ± 2,3
Легеневий фіброз, (патологічний контроль)	248,4 ± 21 *	32,6 ± 2,2 *	39,01 ± 2,6 *
Легеневий фіброз, лікований ХС-268-БГ у дозі 10 мг/кг	201,6 ± 18 -	23,4 ± 1,7 -	27,97 ± 2,2 -

Примітки:

* - достовірність відмінності з інтактним контролем (P<0,05);

- - достовірність відмінності з патологічним контролем (легеневий фіброз) (P<0,05).

Треамід у дозі 10 мг/кг був ефективний у лікуванні легеневого фіброзу: кількість депонованих колагенових волокон навколо судин і бронхіол знижувалася до рівня інтактного контролю (Фіг. 5, таблиця 37). Додатковою характеристикою антифібротичної дії Треаміду виступало значне падіння концентрації колагену, колагену типу I і гідроксипроліну у гомогенатах легень мишей з легеневим фіброзом (таблиця 37).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що в умовах легеневого фіброзу Треамід виявляє антифібротичну дію, що проявляється в нормалізації продукції фібробластами колагенових волокон. Це свідчить про здатність Треаміду регенерувати фіброblastи тканини легень. Таким чином, Треамід може застосовуватися як препарат, що перешкоджає розвитку фіброзу легень і сприяє регенерації легеневої тканини.

Приклад 15. Дослідження впливу Треаміду на розвиток кахексії у тварин з пухлиною.

Кахексія розвивалася у мишей-самців лінії C57Bl/6 під час моделювання гематогенно метастазуючої карциноми легень Льюїс (LLC). Пухлинні клітини вводили мишам однократно підшкірно у концентрації 5×10^6 у 0,1 мл фіз. розчину (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 введення пухлинних клітин прийняли за 1 день експерименту. Треамід вводили курсом у дозі 10 мг/кг щодня внутрішньошлунково один раз на добу з 15 по 28 добу дослідження. Зважування тварин проводили за добу до введення пухлинних клітин (0 доба) і на 28-у добу експерименту. На 28 добу дослідження тварин евтаназували в CO₂-камері і відбирали кров. У сироватці крові методом імуноферментного аналізу визначали рівень вільного тестостерону.

У результаті дослідження встановлено, що маса тварин на 28 добу після перевивки карциноми легень Льюїс (патологічний контроль) з урахуванням відрізування маси первинного пухлинного вузла достовірно знизилася у 1,2 рази у порівнянні з цим показником у групі здорових тварин (таблиця 38). Внутрішньошлункове введення Треаміду повністю запобігало втраті маси тіла тварин з карциномою легень Льюїс (таблиця 38).

Таблиця 38

Маса тіла мишей-самців лінії C57Bl/6 з кахексією, індукованою карциномою легень Льюїс, з урахуванням відрізування первинного пухлинного вузла (г) на 28 добу експерименту (M±m, n=10)

Групи	Маса тіла тварин з урахуванням відрізування маси пухлини
Інтактний контроль	23,95 ± 0,39
Карцинома легень Льюїс	20,44 ± 0,88 *
Карцинома легень Льюїс, лікована Треамідом (10 мг/кг)	23,83 ± 0,57 -

Примітки:

* - достовірність відмінності з інтактним контролем ($P < 0,05$);

- - достовірність відмінності з патологічним контролем (Карцинома легень Льюїс) ($P < 0,05$).

- 5 Імуноферментний аналіз сироватки крові показав, що у тварин патологічного контролю на фоні карциноми легень Льюїс на 28у добу дослідження відбувається виражене зниження рівня тестостерону в сироватці крові (до 14,8 % від інтактного контролю) (таблиця 39). Курсове введення Треаміду значно підвищувало концентрацію вільного тестостерону в сироватці крові тварин з LLC.

Таблиця 39

Рівень вільного тестостерону (pg/ml) в сироватці крові мишей-самців лінії C57Bl/6 з кахексією, індукованою карциномою легень Льюїс, на 28 добу експерименту ($M \pm m$, $n=10$)

Параметри	Інтактний контроль	Карцинома легень Льюїс	Карцинома легень Льюїс, лікована Треамідом (10 мг/кг)
Вільний тестостерон	$11,36 \pm 1,2$	$1,68 \pm 0,22^*$	$3,2 \pm 0,3^* -$

Примітки:

* - достовірність відмінності з інтактним контролем ($P < 0,05$);

- - достовірність відмінності з патологічним контролем (Карцинома легень Льюїс) ($P < 0,05$).

- 10 Таким чином, в умовах розвитку карциноми легень Льюїс пероральне застосування Треаміду перешкоджало розвитку кахексії. Терапевтичний ефект Треаміду обумовлений відновленням функції м'язової і тестикулярної тканини, що виражалось у відновленні рівня вільного тестостерону в сироватці крові уражених тварин. Це дозволяє зробити висновок, що Треамід може застосовуватися як препарат, що перешкоджає розвитку кахексії.
- 15 Приклад 40
Фармацевтична композиція
Склад на одну таблетку, мг

Компонент	мг	мг
Треамід (активна речовина)	5,00	50,00
Допоміжні речовини:		
Целюлоза мікрокристалічна (NF, Ph.Eur., JP)	60,00	300,00
Крохмаль прежелатинізований (Ph.Eur., USP, NF)	27,80	114,00
Карбоксиметилкрохмаль натрію (Ph.Eur., NF, JP)	4,00	20,00
Тальк (Ph.Eur., USP, JP)	2,00	10,00
Магнію стеарат (USP, NF)	1,00	5,00
Кремнію діоксид колоїдний (Ph.Eur.)	0,20	1,00
Плівкова оболонка Opadry® II 31F280007	3,00	15,00
Маса таблетки, покритої оболонкою	103,00	515,00

- 20 Заявником було встановлено, що Треамід сприяє регенерації тканини і нормалізації структури тканини передміхурової залози на моделях хронічного абактеріального простатиту (ХАП) і доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ). Отримані дані дозволяють зробити висновок, що використання Треаміду сприяє регенерації епітеліальної тканини передміхурової залози. Це виражається у знижуванні ступеня вираженості атрофічних процесів.
- 25 Останнє, очевидно, призведе до зростання функціональної активності епітелію ацинусів і буде сприяти відновленню якісних характеристик еякуляту.

Також заявником експериментально *in vivo* показано, що під час введення Треаміду ознаки ДГПЗ були виражені меншою мірою. Отримані дані свідчать про наявність антипроліферативних властивостей Треаміду.

Також заявником виявлено, що Треамід є засобом посилення процесів репаративної регенерації тестикулярної тканини і може використовуватися для лікування тестикулярної недостатності, обумовленої виснаженням проліферативного пулу сперматогенезу.

Отримані заявником експериментальні дані свідчать про наявність у Треаміду здатності безпосередньо стимулювати функціональну активність клітин-попередників сперматогенної тканини.

Також заявником експериментально підтверджено, що Треамід є перспективним для відновлення регенеративного потенціалу сім'яника. Введення Треаміду підвищувало регенераторний потенціал тканини. При цьому лікарський засіб не тільки безпосередньо стимулював утворення нових джерел проліферативного пулу сперматогенезу (стовбурових клітин), але підсилював дію гуморальних факторів, що стимулюють їх утворення.

Також заявником експериментально доведено, що Треамід відновлює рухливість сперматозоїдів, знижену внаслідок введення Паклітакселу.

Наведені заявником дані свідчать про те, що Треамід дозволяє ефективно стимулювати репаративну регенерацію тестикулярної тканини, пригнічення якої було обумовлено зниженням кількості комітованих колонієутворювальних клітин.

Крім того, заявником показана здатність Треаміду відновлювати рухливість сперматозоїдів під час астеноспермії. Отримані дані свідчать про те, що Треамід є ефективним засобом відновлення рухливості сперматозоїдів.

Також заявником було показано, що Треамід відновлює рухливість сперматозоїдів, що виявляється під час гіпогонадізму.

Численні експерименти підтверджують, що Треамід є ефективним засобом відновлення копулятивної активності різної етіології (у тому числі вікове зниження активності, сезонне зниження активності і інші).

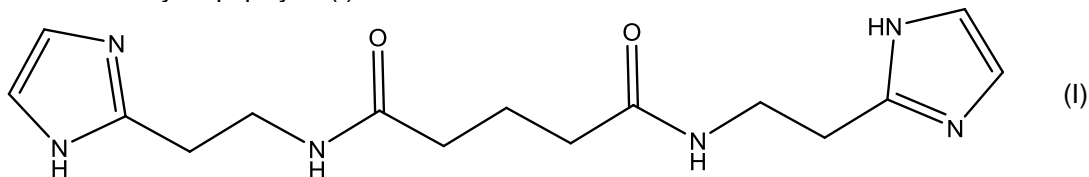
Показано, що Треамід виявляє регенеративну дію відносно тканини підшлункової залози. Треамід може застосовуватися для лікування порушення толерантності до глюкози і метаболічного синдрому.

Також експериментально показано, що Треамід може застосовуватися як препарат, що відновлює структурні і функціональні характеристики тканини печінки.

Також показано, що Треамід може застосовуватися як препарат, що відновлює структурні і функціональні характеристики тканини легень.

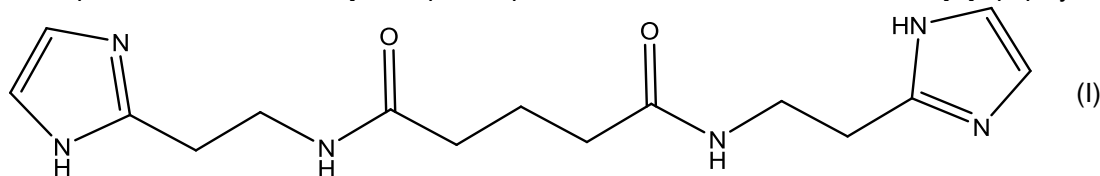
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція для стимуляції регенерації тканин, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



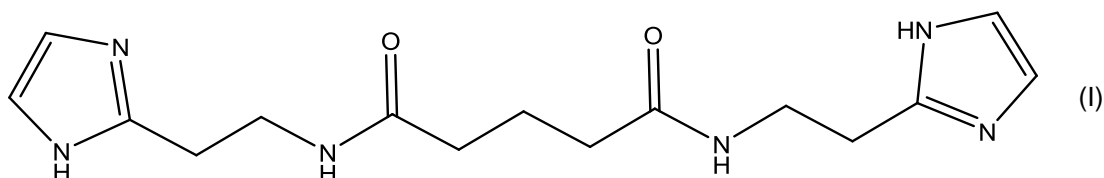
або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій, де тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

2. Лікарський засіб для стимуляції регенерації тканин, що являє собою сполуку формули (I)



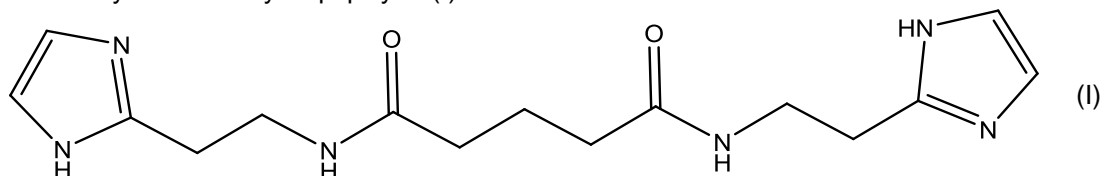
або її фармацевтично прийнятну сіль, де тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

3. Спосіб регенерації тканин, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, ефективної кількості сполуки формули (I)



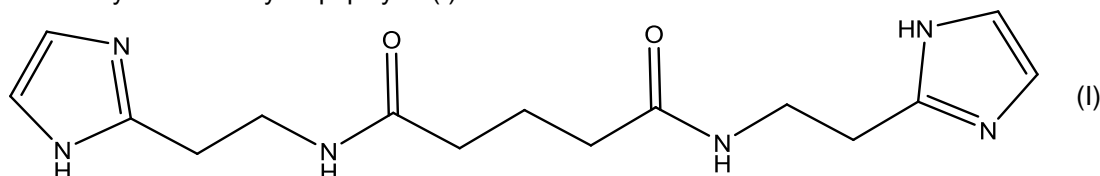
або її фармацевтично прийнятної солі, де тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

4. Застосування сполуки формули (I)



5 або її фармацевтично прийнятної солі для регенерації тканин, де тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

5. Застосування сполуки формули (I)

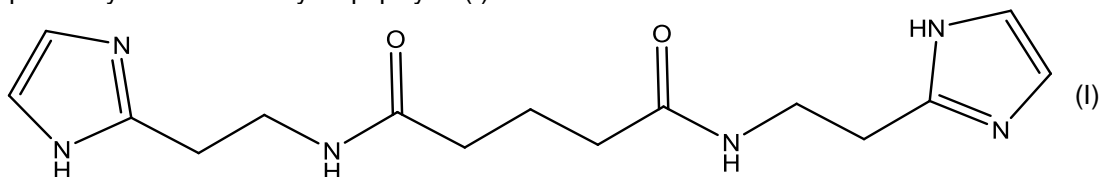


10 або її фармацевтично прийнятної солі для лікування патологічних станів, пов'язаних з порушеннями структури і функцій тканин, де тканина вибрана з групи, що включає тканину підшлункової залози, печінки, легені, м'язової тканини, сперматогенної тканини, тестикулярної тканини і тканини передміхурової залози.

15 6. Застосування за п. 5, де патологічний стан вибраний з групи, що включає метаболічний синдром, порушення толерантності до глюкози, гепатит, ідіопатичний фіброз легені, емфізему легень, хронічну обструктивну хворобу легень, кахексію, гіпогонадізм, простатит, доброякісну гіперплазію передміхурової залози, корелятивну недостатність яєчок і аутоімунний орхіт.

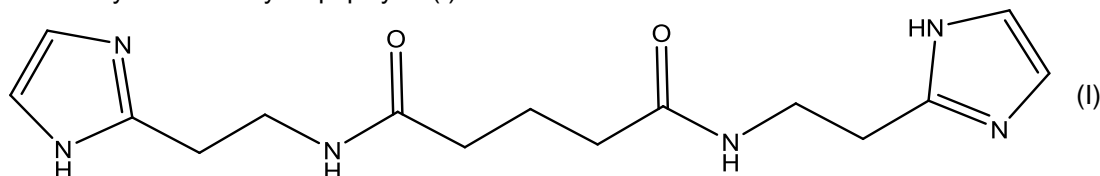
7. Застосування за п. 6, де простатит являє собою хронічний простатит, зокрема абактеріальний хронічний простатит, або простатит категорії 3Б, або аутоімунний простатит.

20 8. Фармацевтична композиція для нормалізації зниженої чоловічої фертильності, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій.

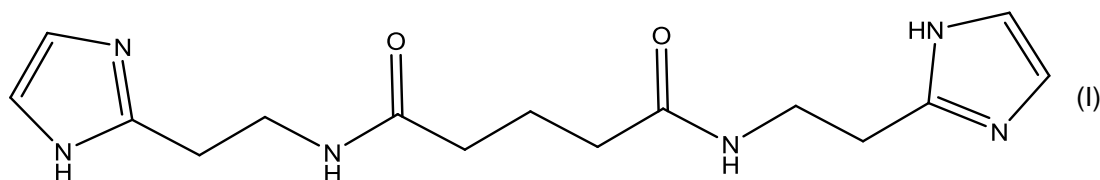
9. Застосування сполуки формули (I)



або її фармацевтично прийнятної солі для нормалізації зниженої чоловічої фертильності.

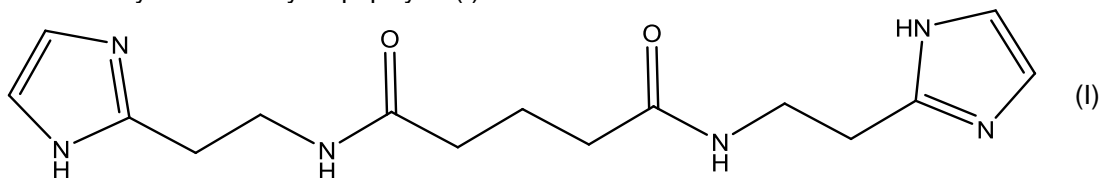
25 10. Застосування за п. 9, де зниження чоловічої фертильності обумовлено патологічним станом, вибраним з групи, що включає гіпогонадізм, астеноспермію, еректильну дисфункцію, корелятивну недостатність яєчок і тестикулярну недостатність.

11. Фармацевтична композиція для відновлення рухливості сперматозоїдів, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій.

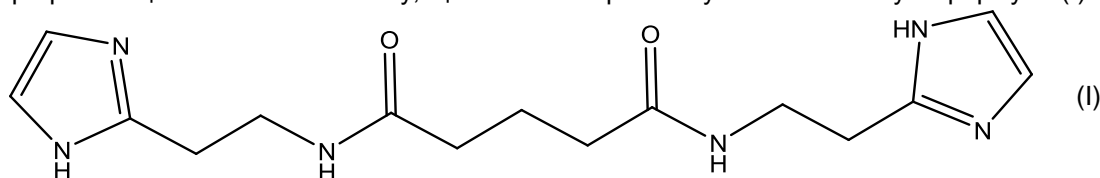
12. Застосування сполуки формули (I)



або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення рухливості сперматозоїдів.

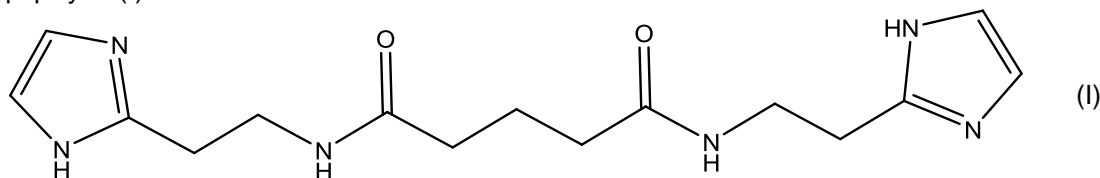
13. Застосування за п. 12, де зниження рухливості сперматозоїдів обумовлено патологічним станом, вибраним з групи, що включає гіпогонадізм, астеноспермію, корелятивну недостатність яєчок і тестикулярну недостатність.

14. Фармацевтична композиція для зниження рівня глюкози в крові у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



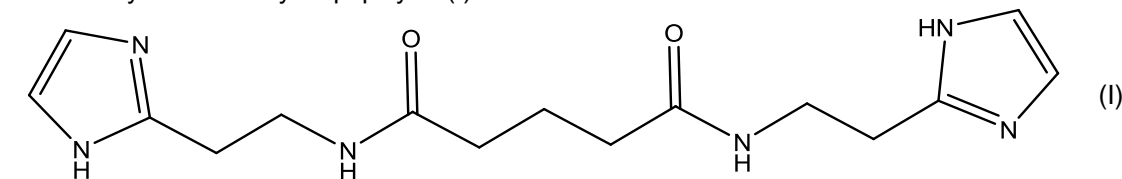
або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій, де патологічний стан вибраний з групи, що складається з метаболічного синдрому і порушення толерантності до глюкози.

15. Спосіб зниження рівня глюкози в крові у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки формули (I)



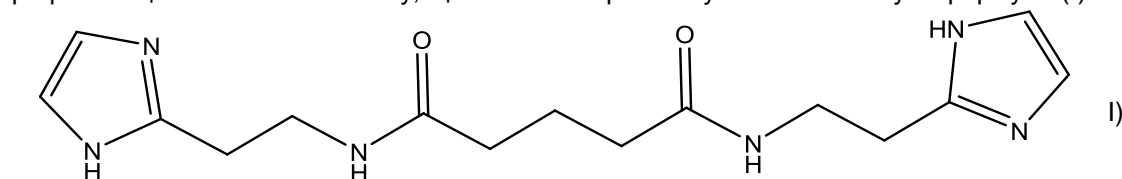
або її фармацевтично прийнятної солі, де патологічний стан вибраний з групи, що включає метаболічний синдром і порушення толерантності до глюкози.

16. Застосування сполуки формули (I)



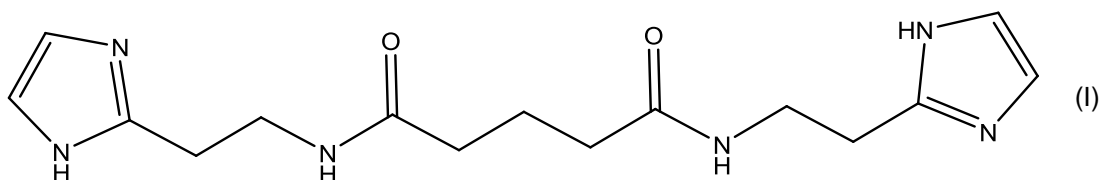
або її фармацевтично прийнятної солі для зниження рівня глюкози в крові, де підвищений рівень глюкози обумовлений патологічним станом, вибраним з групи, що складається з метаболічного синдрому і порушення толерантності до глюкози.

17. Фармацевтична композиція для відновлення структури і функції печінки у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



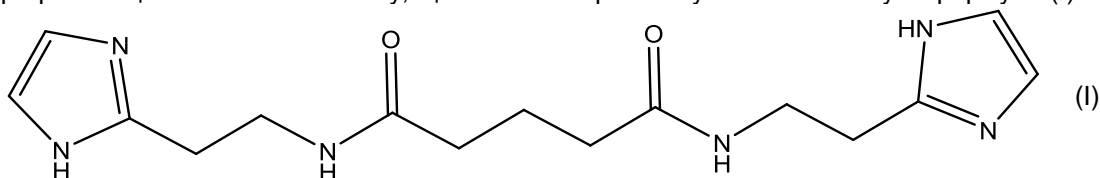
або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій, де патологічний стан вибраний з групи, що включає гепатит, зокрема хронічний гепатит і токсичний гепатит.

18. Застосування сполуки формули (I)



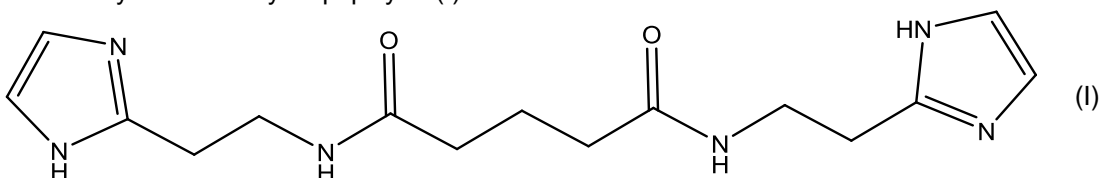
або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення функції печінки у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, де патологічний стан, вибраний з групи, що включає гепатит, зокрема хронічний гепатит і токсичний гепатит.

19. Фармацевтична композиція для відновлення структури і функції легені у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)



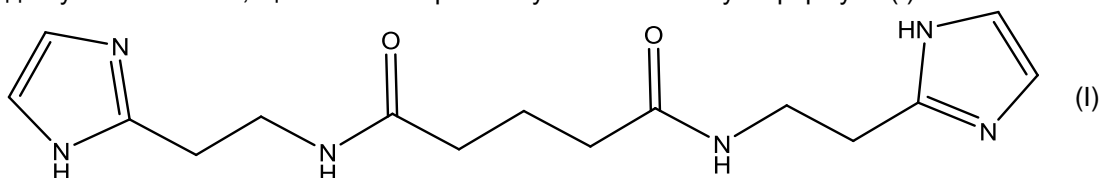
або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій, де патологічний стан вибраний з групи, що включає хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), емфізему легень і ідіопатичний фіброз легені.

20. Застосування сполуки формули (I)



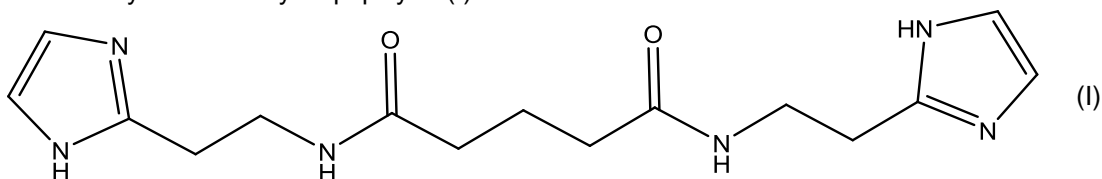
- 10 або її фармацевтично прийнятної солі для відновлення структури і функції легені у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, де патологічний стан вибраний з групи, що включає хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), емфізему легень і ідіопатичний фіброз легені.

21. Фармацевтична композиція для відновлення структури і функції підшлункової залози у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, обумовленого порушенням структури і функції підшлункової залози, що включає ефективну кількість сполуки формули (I)

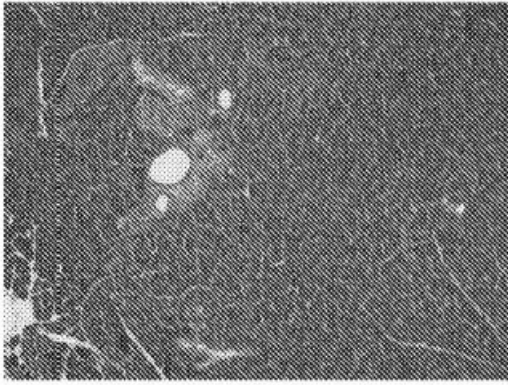


або її фармацевтично прийнятної солі, і фармацевтично прийнятний носій.

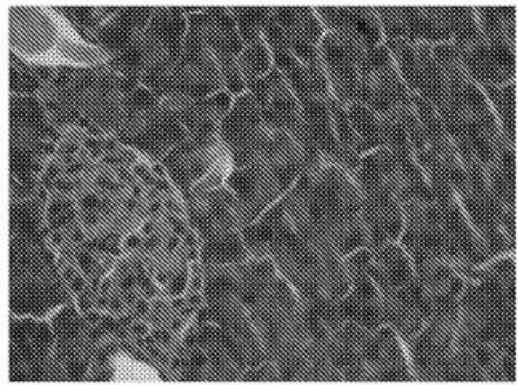
22. Застосування сполуки формули (I)



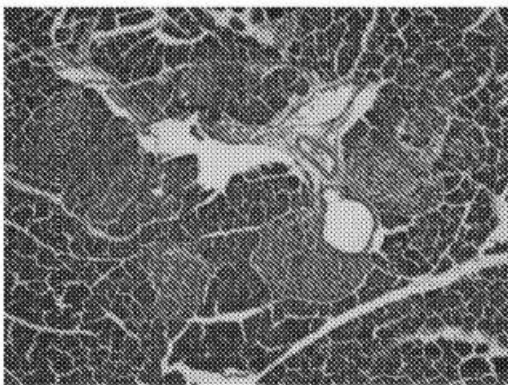
або її фармацевтично прийнятної солі у лікуванні і/або профілактиці патологічного стану, обумовленого порушенням структури і функції підшлункової залози.



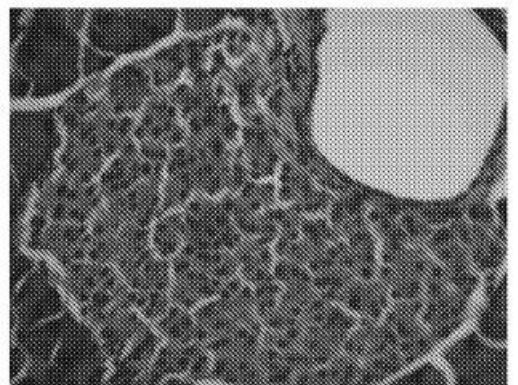
A



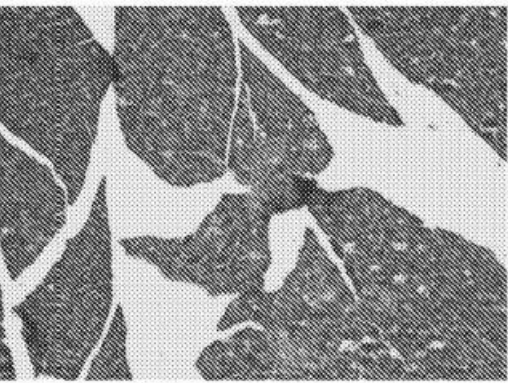
D



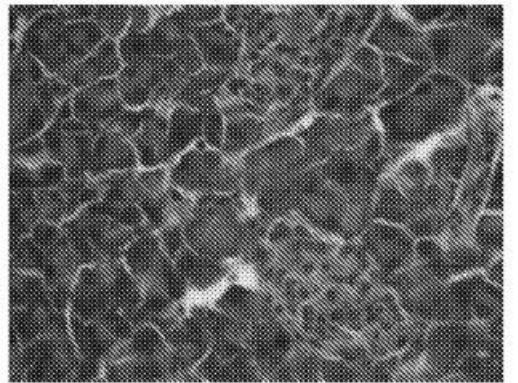
B



E

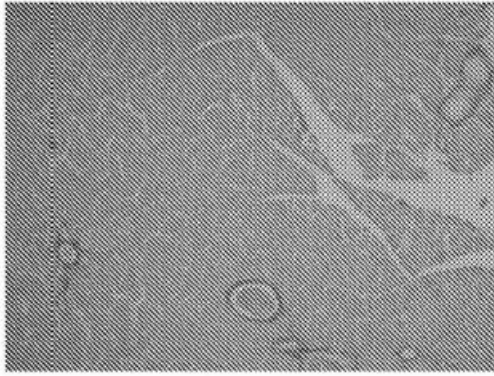


C

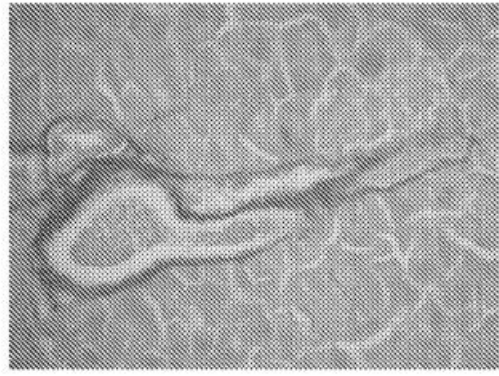


F

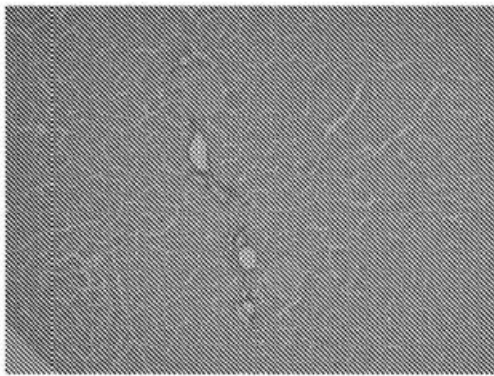
ΦΙΓ. 1



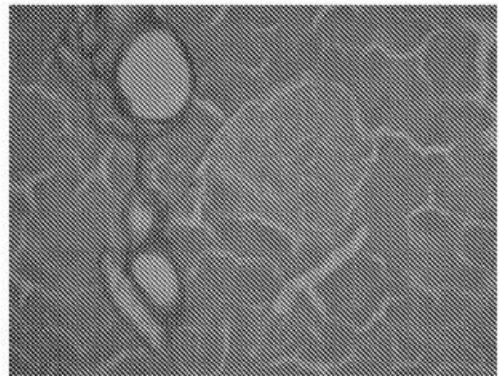
A



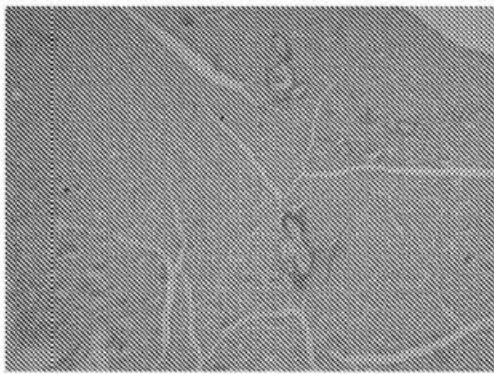
D



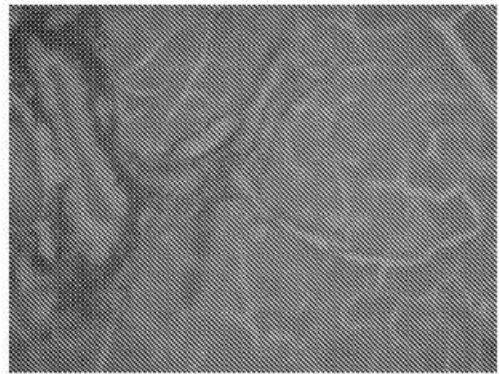
B



E

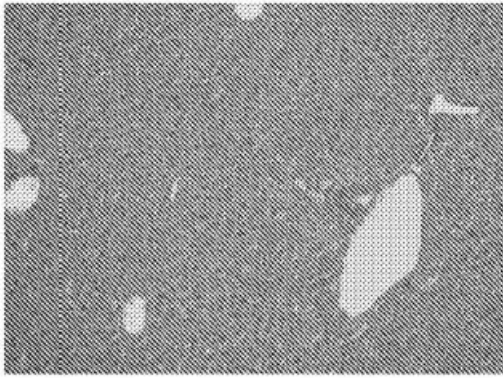


C

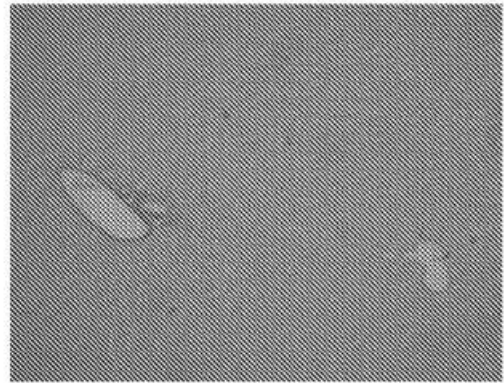


F

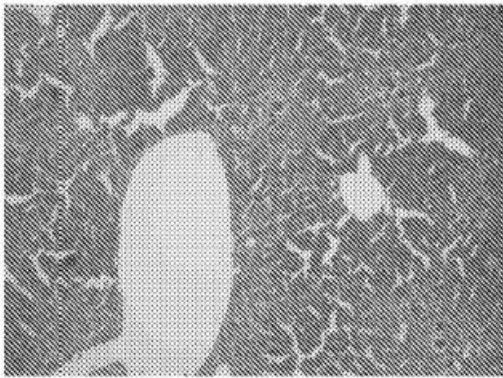
Фиг. 2



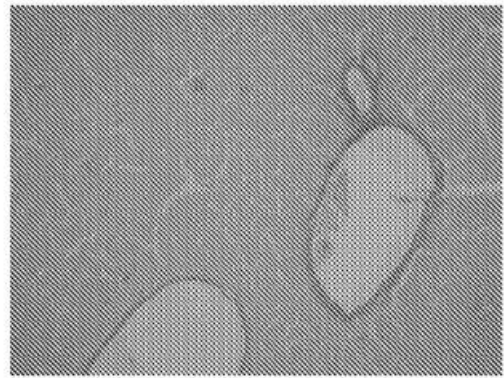
A



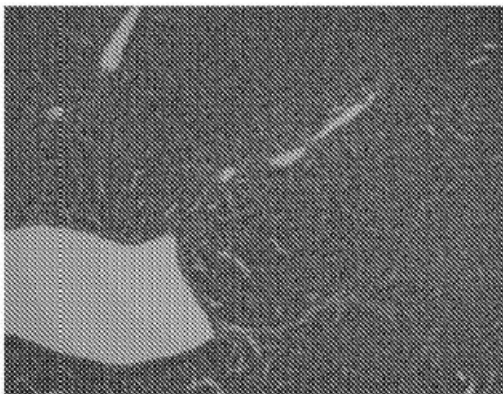
D



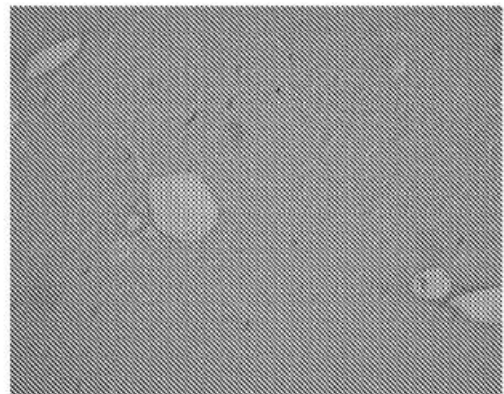
B



E

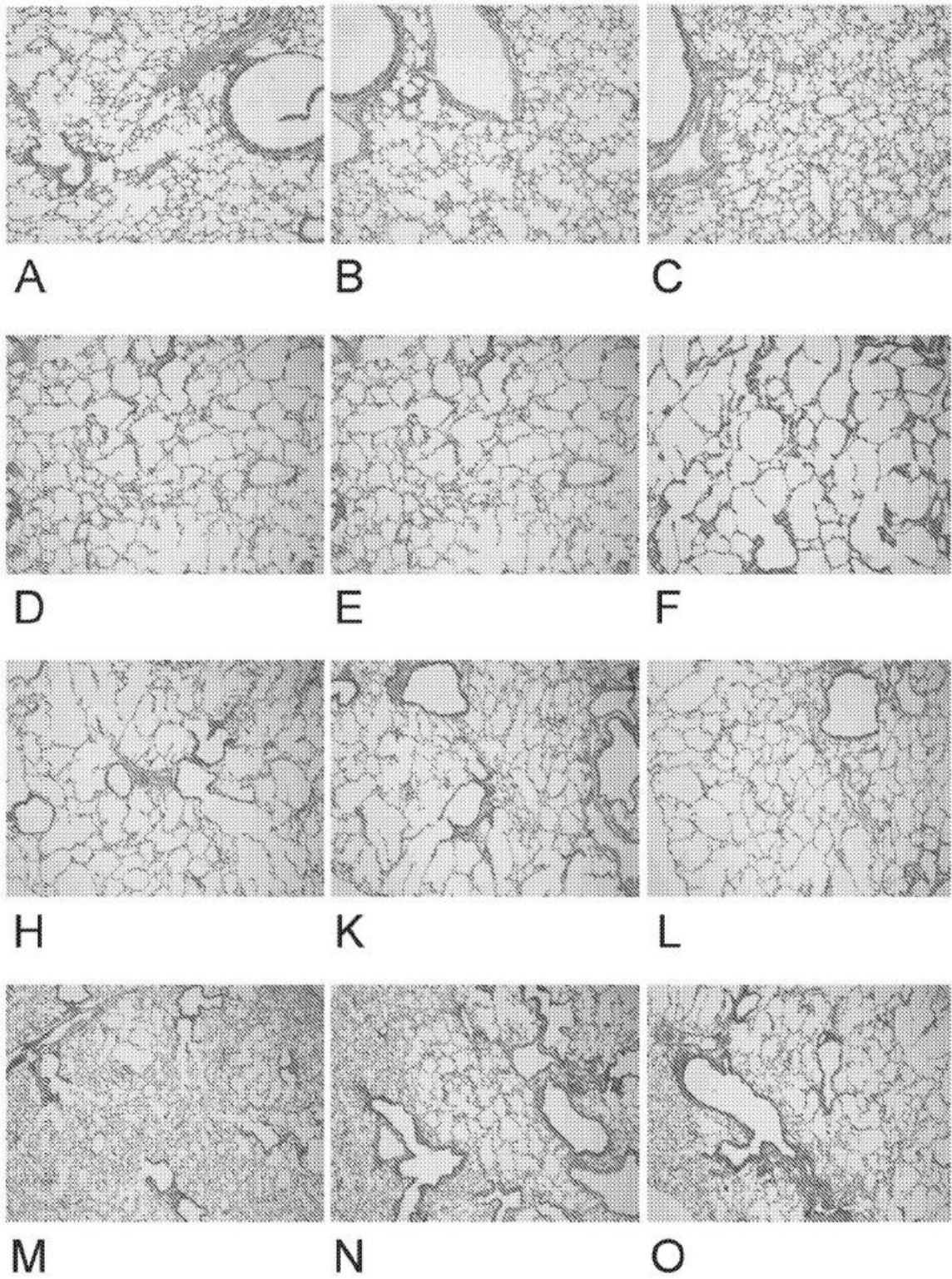


C

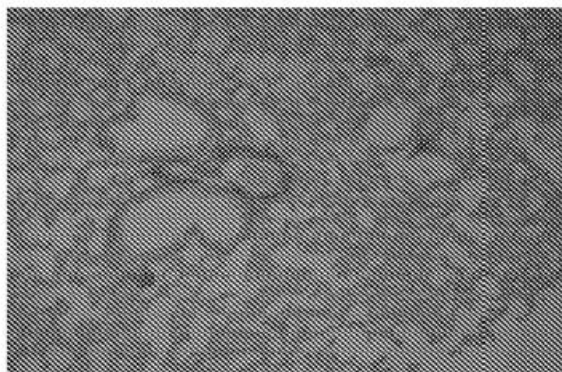


F

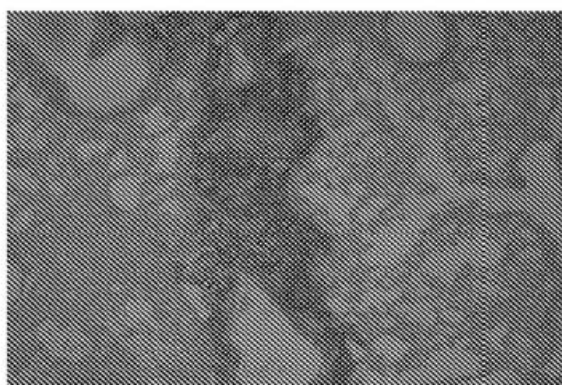
ΦΙΓ. 3



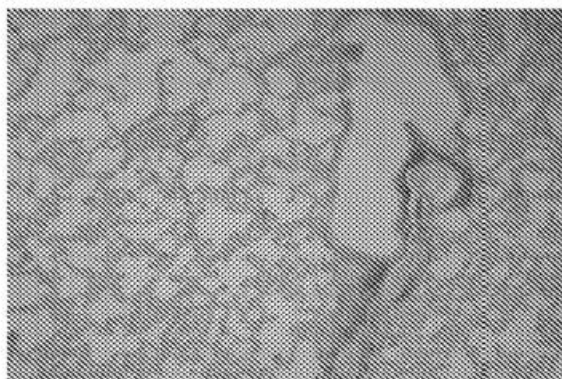
ΦΙΓ. 4



A



B



C

ФІГ. 5