

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»**

Шаяхметова Ганна Михайлівна



УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

**ОСОБЛИВОСТІ РЕАЛІЗАЦІЇ ПОБІЧНОЇ ДІЇ
ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ НА ЧОЛОВІЧУ
РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ТА ОБГРУНТУВАННЯ
ПІДХОДІВ ДО ЇЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.03.05 – фармакологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ –2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

Науковий консультант

доктор біологічних наук, професор
КОВАЛЕНКО Валентина Миколаївна,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН
України», м. Київ, завідувача відділом токсикології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **БЄЛЕНІЧЕВ Ігор Федорович**, Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури;

доктор медичних наук, професор **ПОСОХОВА Катерина Андріївна**, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», м. Тернопіль, професор кафедри фармакології з клінічною фармакологією;

доктор медичних наук, професор **АНТОНЕНКО Петро Борисович**, Одеський національний медичний університет, м. Одеса, професор кафедри загальної та клінічної фармакології.

Захист відбудеться «14» листопада 2018 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «10» жовтня 2018 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01
кандидат біологічних наук



І.В. Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Негативна дія лікарських засобів на організм людини продовжує залишатись однією з найбільш актуальних медичних та соціальних проблем. Побічні реакції можуть значно погіршувати якість життя пацієнта, часто спричиняючи патологічні зміни в організмі та смертність. Вважається, що близько 10-20 % всіх лікарських засобів виявляють небажану дію, але їхнє реальне число наразі не відоме і фактичний рівень побічних реакцій може бути набагато вищим, ніж повідомляється [I. Jung and S. Gurzu, 2017]. Існують певні складнощі в їх верифікації внаслідок того, що порушення з боку внутрішніх органів, викликані лікарськими засобами, нерідко важко відрізнити від самостійних нозологічних захворювань, тому їх складно виявити [S. Schatz and R. Weber, 2015]. Також проблемою побічної дії значної кількості препаратів, що давно перебувають на фармацевтичному ринку є недостатній рівень вивчення свого часу їх властивостей [Б.И. Кантемирова и соавт., 2011].

Значне число захворювань потребує застосування довготривалих фармакотерапевтичних схем. До них можна віднести туберкульоз, який за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) дотепер зберігає статус глобальної проблеми [F.C.D.Q. Mello et al., 2018]. На даний час в схемах хіміотерапії туберкульозу застосовується одночасно від чотирьох до семи протитуберкульозних засобів (ПТЗ) протягом від 6 до 24 місяців [С.Б. Вольф, 2016]. Але ПТЗ не володіють абсолютною вибірковістю дії і, пригнічуючи життєдіяльність мікобактерій, одночасно чинять несприятливий вплив і на макроорганізм, викликаючи небажані побічні ефекти. Запровадження поліхіміотерапії туберкульозу з одночасним застосуванням декількох препаратів значно збільшило частоту побічних реакцій [G.H. Min et al., 2017].

Існує велика кількість повідомлень про те, що на тлі протитуберкульозної терапії можуть розвиватись порушення функції органів дихання, шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок, центральної і периферичної нервової системи, імунної системи, серцево-судинної системи, системи кровотворення та ін. [Д.А. Иванова и С.Е. Борисов, 2017; Д.Ю. Щегерцов и соавт., 2018; S. Mathew and A. Joseph, 2017]. Довготривала поліхіміотерапія туберкульозу часто застосовується у пацієнтів молодого віку, однак, проблема побічної дії ПТЗ на репродуктивну функцію, зокрема чоловічу, є практично не дослідженою.

Проте, відомо, що низка лікарських засобів може справляти негативний вплив на чоловічу фертильність, статеву функцію, сперматогенез та/або кількісні і якісні характеристики сперматозоїдів, але для більшості з них рівень наукових доказів все ще недостатній [M. Semet et al., 2017; S.V. Pompe et al., 2016]. Фактори ризику розвитку чоловічого безпліддя вивчені не повною мірою – у 30 % безплідних чоловіків фіксують порушення сперматогенезу невідомої етіології (ідіопатична олігоастенотератозооспермія) [G. Cavallini, 2015]. Етіопатогенетичні методи лікування різноманітних форм секреторного безпліддя в ряді випадків не дають бажаного ефекту у зв'язку з недостатністю інформації про механізми, залучені до патогенезу цього захворювання [К.А. Силуянов, 2017].

Незважаючи на те, що 80 % чоловіків, хворих на туберкульоз легень, є особами репродуктивного віку [K. Said et al., 2017; G.H. Min et al., 2017; J.Y. Feng et al., 2017], а дослідження останніх десятиліть свідчать про значне зниження якості сперми чоловіків та їхньої фертильності [R. Deonandan, and M. Jaleel, 2012; J.L. Girela et al., 2013; S. Keihani et al., 2018; P. Sengupta et al., 2018.], несприятливому впливу ПТЗ на репродуктивний потенціал чоловіків часто не приділяють належної уваги [М.К. Samplaski and A.K. Nangia, 2015]. В науковій літературі існують лише фрагментарні експериментальні [A. Asole et al., 1976; E. Sanati and M. Nikmanesh, 2008; G.P. Trentini et al., 1974; A. Rao et al., 2016] та нечисленні клінічні дані [E.V. Kulchavenya and A.V. Osadchii, 2016; E. Kulchavenya and S. Medvedev, 2011] стосовно несприятливого впливу деяких ПТЗ на чоловічі гонади та репродуктивну здатність, але вони не пояснюють механізми, залучені до розвитку даних порушень. Слід зазначити, що результати, отримані у клінічних дослідженнях є суперечливими. Зокрема, було показано, що комбінована протитуберкульозна терапія не викликає істотних змін показників спермограми у пацієнтів та не призводить до порушень основних компонентів копулятивного акту [E.V. Kul'chavenia et al., 2002]. Пізніше ті ж автори повідомили про негативний вплив хіміотерапії туберкульозу на кількісні та якісні показники еякуляту [E.V. Kulchavenya and A.V. Osadchii, 2016] та встановили, що як легеневий, так і генітальний туберкульоз порушують чоловічу репродуктивну функцію, а тривале сумісне застосування чотирьох ПТЗ I ряду (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід) призводить до поглиблення таких порушень [E. Kulchavenya et al., 2017]. Крім того, виявлено, що частка еякуляційних розладів у чоловіків із легеневим туберкульозом до лікування ПТЗ є такою ж, як у популяції в цілому, проте протитуберкульозна терапія з використанням чотирьох препаратів протягом трьох місяців значно погіршує даний показник у кожного четвертого пацієнта [E. Kulchavenya and S. Medvedev, 2011].

Варто враховувати, що розвиток побічної дії ПТЗ може залежати від ряду причин. З одного боку, має значення тип препарату, форма його застосування, доза і тривалість лікування, поєднання з іншими лікарськими засобами. Зокрема, за сумісного прийому декількох хіміотерапевтичних засобів спостерігається метаболічна взаємодія, внаслідок індукції або інгібування різних ізоформ цитохрому Р-450 [D.M. Burger et al., 2018]. Серед них особливе місце посідає цитохром Р-450 2E1 (CYP2E1) внаслідок його високої здатності до індукції, яка супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК) та токсичних метаболітів [A.A. Caro and A.I. Cederbaum, 2004]. Відомо, що токсичність лікарських засобів, здатних індукувати CYP2E1 зростає за умов їх одночасного прийому та/або застосування на тлі станів, які характеризуються індукцією даної ізоформи [К.А. Колганова, 2008]. З іншого боку, певну роль відіграє стан організму пацієнта – наявність шкідливих звичок, супутніх патологічних станів, характер індивідуальної реакції, вік та ін. [G. Przybylski et al., 2014; M. Chen et al., 2015]. Важливо, що за цих умов результати попередніх клінічних випробувань не дають повної інформації про небажані побічні реакції, оскільки з групи спостереження виключають пацієнтів з коморбідними захворюваннями [Б.И. Кантемирова и соавт., 2011].

Все вищевказане визначає актуальність, а також наукову та практичну значущість поглибленого вивчення механізмів побічної дії відомих ПТЗ I ряду на чоловічу репродуктивну функцію як за самостійного, так і поєднаного використання, а також на тлі станів, що супроводжуються індукцією СYP2E1. Це є важливим для прогнозування порушень чоловічої фертильності внаслідок застосування ПТЗ, їх своєчасної діагностики, визначення підходів до профілактики та фармакологічної корекції, а також адекватного застосування гонадопротекторних засобів, що в кінцевому підсумку сприятиме вирішенню однієї з нагальних проблем у сфері охорони здоров'я.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до планів науково-дослідних робіт ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» в межах тем «Роль індукції цитохрому P-450 2E1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у печінці та гонадах самців щурів» (номер державної реєстрації 0107U000393) та «Механізми гепато- та гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі (експериментальне дослідження)» (номер державної реєстрації 0110U001219), відповідальним виконавцем яких був дисертант.

Мета та задачі дослідження. *Мета роботи* – визначити шляхи реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів I ряду на чоловічу репродуктивну функцію та надати обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції.

Для досягнення поставленої мети було необхідно виконати такі *завдання*:

1. Визначити вплив ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу за умов їх нарізного та сумісного введення на фертильність щурів-самців, стан їх гонад та ембріо-фетальний розвиток потомства.

2. Виявити молекулярно-біохімічні механізми, залучені до розвитку дисфункції сім'яників, за умов нарізного і сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду, етамбутолу щурам.

3. Дати порівняльну оцінку особливостей впливу на репродуктивну функцію щурів-самців двох загальноприйнятих комбінацій ПТЗ, що містять ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол або стрептоміцин.

4. Встановити ступінь морфо-функціональних та метаболічних змін у сім'яниках щурів, а також показників антенатального та постнатального розвитку їх потомства за умов сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу на тлі експериментального алкоголізму.

5. Дослідити особливості впливу на репродуктивну здатність щурів-самців комбінації ПТЗ за умов введення на тлі експериментального діабету I типу.

6. Визначити гонадопротекторну ефективність метаболічних препаратів (метіоніну та Метовітану) за сумісного введення ПТЗ щурам-самцям.

Об'єкт дослідження: побічна дія протитуберкульозних засобів та обґрунтування шляхів її фармакологічної корекції.

Предмет дослідження: побічна дія протитуберкульозних засобів I ряду на чоловічу репродуктивну функцію (репродуктивна здатність, морфо-функціональні порушення стану гонад та молекулярно-біохімічні механізми, що їх обумовлюють),

в тому числі на тлі станів, що характеризуються індукцією CYP2E1 (хронічний алкоголізм та цукровий діабет). Гонадопротекторна ефективність метаболітних препаратів.

Методи дослідження: токсикологічні, фармакологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні, гістопатологічні, комп'ютерне моделювання, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів: Вперше виявлено, що протитуберкульозні препарати I ряду – етамбутол, піразинамід, ізоніазид та рифампіцин – за умов сумісного повторного введення щурам-самцям викликають морфо-функціональні порушення у сім'яниках, які призводять до критичного зниження фертильності та зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності потомства. Сумісне введення ПТЗ, порівняно з нарізним, викликає більш важкі морфологічні порушення у сперматогенному епітелії.

Встановлено, що за сумісного введення ПТЗ у сім'яниках білих щурів відбувається індукція гену ізоформи CYP2E1, що супроводжується порушенням балансу прооксиданти/антиоксиданти та активацією процесів апоптозу в тканинах сім'яників, морфо-функціональними змінами у сперматогенному епітелії та зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові.

Вперше показано, що серед ПТЗ, які застосовуються сумісно, етамбутолу та ізоніазиду належить визначальна роль у порушеннях репродуктивної функції щурів-самців та зростанні рівня індукції CYP2E1. Доведено, що заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ сприяє покращенню показників репродуктивної здатності піддослідних щурів-самців та ембріо-фетального розвитку їх потомства.

Встановлено, що введення комбінації ПТЗ щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до значної транскрипційної активації CYP2E1 в сім'яниках щурів, порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів та 100 % післяімплантаційної загибелі потомства. Отримано свідчення стосовно посилення несприятливого впливу ПТЗ на сім'яники, репродуктивну здатність самців та потомство за їхнього введення на тлі експериментального цукрового діабету.

Експериментально обґрунтовано, що застосування метаболітних препаратів, які володіють антиоксидантною дією та здатні інгібувати CYP2E1, є ефективним та раціональним напрямком фармакотерапії та профілактики чоловічої субфертильності та інфертильності за дії чинників, що призводять до індукції даної ізоформи цитохрому Р-450.

Практичне значення роботи: виходячи з результатів аналізу, узагальнення та систематизації нових фактичних даних обґрунтовано підходи до прогнозування та попередження негативного впливу ПТЗ на чоловічі гонади. Зокрема, визначено гонадопротекторну ефективність препаратів, що володіють антиоксидантною дією та одночасно здатні інгібувати експресію CYP2E1 (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2018).

Встановлення ролі CYP2E1 у розвитку побічної дії ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію поглиблює уявлення про механізми реалізації гонадотоксичної дії ксенобіотиків та слугує підґрунтям для розробки методів

діагностики та попередження негативного впливу на чоловічі гонади речовин, здатних індукувати CYP2E1.

За умов проведення комбінованої терапії туберкульозу з використанням етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду запропоновано здійснювати періодичний аналіз еякуляту з метою прогнозування та попередження порушень репродуктивної функції чоловіків, а також рекомендовано заміну етамбутолу на стрептоміцин, якщо це не знижуватиме ефективність протитуберкульозної терапії, у хворих чоловічої статі репродуктивного віку (Інформаційні листи про нововведення в системі охорони здоров'я №286-2010 і №295-2011).

Розроблено та валідовано експериментальну модель для комплексної оцінки опосередкованих алкоголізмом метаболічних порушень (публікація: Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Kovalenko, V.M., Kharchenko, O.I., Bohun, L.I., & Omelchenko, Y.O. (2015). Multiparameter rodent chronic model for complex evaluation of alcoholism-mediated metabolic violations. *Journal of Basic and Clinical physiology and Pharmacology*, 26(1), 43-51).

Результати дослідження впроваджено у курс лекцій з фармакології вищих навчальних закладів медичного профілю та дослідницький процес профільних науково-дослідних інститутів, а саме Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, ДЗ «Луганський медичний університет МОЗ України», Національного фармацевтичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Харківського національного медичного університету, відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка, Запорізького державного медичного університету, Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. За участю наукового консультанта обраний напрямок дослідження, мета та задачі, а також обсяг методичних підходів. Автором був здійснений інформаційний пошук, проведений аналіз даних літератури за темою дисертації, відпрацьовані моделі та методики, виконані експериментальні дослідження, статистична обробка отриманих даних, аналіз, систематизація і узагальнення отриманих результатів, їх наукова інтерпретація, висновки роботи, підготовка результатів роботи до друку. Оформлення дисертаційної роботи та автореферату виконані дисертантом самостійно. Робота виконана у відділі токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (завідувачка д.б.н., проф. Коваленко В.М.). Проведення морфологічних досліджень виконано за участі провідного наукового співробітника відділу токсикології, к.мед.н Матвієнка А.В. Дослідження вмісту вільних амінокислот та колагену І типу виконано за участі головного наукового співробітника відділу токсикології д.б.н. Бондаренко Л.Б. та вмісту cNOS s iNOS за участі доцента ННЦ «Інститут біології та медицини» Університету імені Т.Г. Шевченка – Харченко О.І., Вестерн-блот аналіз проведено за участі інженера ДУ «Інститут молекулярної біології та генетики НАН України» Рушак В.В. Комп'ютерне моделювання взаємодії

СУР2Е1 з ПТЗ проведено за участі інженера Українського дослідницького інституту з архівної справи та зберігання звітів Кітама В. Отримані результати опубліковано у спільних роботах.

Апробація результатів дослідження. Матеріали дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: 15th North American Regional ISSX Meeting (San Diego, California, USA, October 12-16, 2008); 3rd Ditan International Conference on Infectious Diseases (Beijing, China, 30 July, 2009); Ювілейному X З'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (м. Євпаторія, Україна, 24-27 вересня 2009 р.); XXXVI international Congress of Physiological Sciences – Function of life: Elements and Integration (Kyoto, Japan, July 27-August 1, 2009); XIII Конгресі світової федерації лікарських товариств, (Львів, Україна, 30 вересня – 03 жовтня 2010 р.); International Society for biomedical research of Alcoholism World Congress, Paris, France, September 13-16, 2010); 4th Ditan International Conference on Infectious Diseases (Beijing, China, 14-17 July, 2010); XI З'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (м. Харків, Україна; 28 – 30 вересня 2011 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання медицини: проблеми, гіпотези, дослідження» (Одеса, Україна, 26-27 жовтня 2012 р.); IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, Україна, 10-12 жовтня 2011 р.); III З'їзді токсикологів України «Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини» (Київ, Україна, 18-19 грудня 2011 р.); Міждисциплінарній науковій конференції «Адаптаційні стратегії живих систем» (Новий Світ, АР Крим, Україна, 11-16 червня 2012 р.); 18th North American regional ISSX Meeting (Dallas, Texas, USA, October 14-18, 2012); 14th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism (Warsaw, Poland, September 8-11, 2013); 49th Congress of EUROTOX (Interlaken, Switzerland, 1st-4th September 2013); 19th North American ISSX and 29th JSSX Meeting (San Francisco, California, USA, October 19-23, 2014); Міждисциплінарній науковій конференції «Біологічно активні речовини та матеріали: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування» (Новий Світ, АР Крим, Україна, 27 травня – 1 червня 2013 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Бабенківські читання» (Івано-Франківськ, 29-30 жовтня 2015 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Креативні напрямки в діагностиці патогенезі, лікуванні та профілактиці внутрішніх хвороб» (Запоріжжя, Україна, 29-30 вересня 2016 р.); 29th ECNP Congress (Vienna, Austria, September 17-20, 2016); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 18-20 жовтня, 2017 р.); 38th Annual Meeting of American College of Toxicology (Palm Springs, USA, November 5-8, 2017); Міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances» (м. Київ, Україна, 24-27 квітня 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ столітті» (Одеса, Україна, 20-21 квітня, 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 57 наукових праць, з них: 1 розділ в колективній монографії видавництва Elsever, 30 статей у фахових наукових виданнях (з них 3 оглядові), в тому числі 16 статей у зарубіжних

виданнях, 23 тез доповідей у матеріалах конгресів, з'їздів, науково-практичних конференцій та симпозіумів, видано 3 інформаційні листи.

Обсяг та структура дисертаційної роботи. Дисертаційна робота викладена на 416 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, п'яти розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел (60 кирилицею, 586 латиницею). Робота ілюстрована 55 таблицями і 68 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 762 статевозрілих щурах лінії Вістар (самцях та самицях) з початковою масою тіла 150-170 г, віком 10-12 тижнів, наданих експериментально-біологічною клінікою ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», яких утримували у стандартних умовах віварію за температури 22-24 °С, відносної вологості 30-70 %, з вільним доступом до корму та води, світлим/темним циклом – 12/12 годин. Дослідження проводилося відповідно до Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. та керівних принципів Директиви Ради Європейських Співтовариств від 24.11.1986 р. (86/609 / ЄЕС). План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ «ІФТ АМН України» (№03/10/13), процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Експериментальні моделі. На першому етапі вивчали вплив ПТЗ першого ряду – ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду і етамбутолу за умов їх нарізного та сумісного введення на стан репродуктивної функції щурів-самців. Тварин було розподілено на 6 груп по 12 у кожній: 1) введення етамбутолу; 2) введення рифампіцину; 3) введення ізоніазиду; 4) введення піразинаміду; 5) сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу; 6) контроль (введення 1 % крохмального гелю).

На другому етапі проводили порівняння ефектів на репродуктивну функцію ПТЗ у двох комбінаціях, що містили або етамбутол, або стрептоміцин. Тварин було розподілено на 5 груп: 1) введення етамбутолу (6 тварин); 2) введення стрептоміцину (6 тварин); 3) комбінація 1 – сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу (22 тварини); 4) комбінація 2 – сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та стрептоміцину (16 тварин); 3) контроль – введення 1 % крохмального гелю (22 тварини).

На третьому етапі досліджували репродуктивну здатність щурів-самців за умов введення ПТЗ на тлі екзогенної індукції CYP2E1 (хронічний алкоголізм). Для відтворення експериментальної моделі щурів-самців відбирали за прихильністю до алкоголю з використанням «двопляшкового» тесту [С.Р. Richter and К.Н. Campbell, 1940]. Відібраних щурів використовували для моделювання хронічного алкоголізму, шляхом заміни води 15 % розчином етанолу протягом 150 днів. Інтактних самців щурів (такого ж віку та маси) використовували як контроль. Вони утримувались в тих же умовах, але споживали лише воду *ad libitum*. Прихильних до алкоголю

тварин було розподілено на 3 групи по 14 у кожній: 1) добровільне споживання 15 % розчину етанолу протягом 150 днів (хронічний алкоголізм); 2) сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу на тлі хронічної алкоголізації, починаючи з 91 дня після початку споживання алкоголю; 3) контрольні тварини, які замість алкоголю споживали воду. Цим тваринам в ті ж терміни, що і початок сумісного введення протитуберкульозних лікарських засобів (ПТЗ) розпочинали введення 1 % крохмального гелю.

На четвертому етапі вивчали вплив сумісного введення ПТЗ на печінку та гонади самців-щурів за умов ендогенної індукції CYP2E1 (експериментальний діабет I типу). Для вирішення поставленого завдання відтворювали модель стрептозотоцинового діабету (СТЗД) у щурів [O.O. Erejuwa et al., 2010]. Були використані 3 групи тварин по 12 у кожній: 1) СТЗД; 2) сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу на тлі СТЗД; 3) контроль (введення 1 % крохмального гелю).

На завершальному етапі роботи досліджували коригуючу дію метаболітних препаратів – метіоніну та Метовітану стосовно гонадотоксичних ефектів, викликаних сумісним введенням ПТЗ. Тварин було розподілено на 4 групи по 8 у кожній: 1) сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу; 2) введення ПТЗ за умов лікувально-профілактичного застосування метіоніну; 3) введення ПТЗ за умов лікувально-профілактичного застосування Метовітану; 4) контроль (введення 1 % крохмального гелю).

На всіх етапах дослідження ПТЗ вводили внутрішньошлунково протягом двох місяців у вигляді суспензії на 1 % крохмальному гелі, використовуючи дозовий режим, який застосовується у клініці для короткотермінової терапії туберкульозу та з урахуванням коефіцієнта видової чутливості (ізоніазид – 62 мг/кг; рифампіцин – 74,4 мг/кг; піразинамід – 217 мг/кг; етамбутол – 155 мг/кг; стрептоміцин – 14 мг/кг) [J.M. Jochi, 2011; Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. Of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER]. Стрептоміцин розчиняли у новокаїні та вводили внутрішньом'язево. Метіонін та Метовітан у дозі 50 мг/кг вводили курсами внутрішньошлунково кожний останній тиждень місяця за одну годину до введення ПТЗ щоденно (всього 2 курси).

Методи дослідження репродуктивної функції щурів-самців. На всіх етапах дослідження за 14 днів до термінальної стадії щурів-самців усіх груп парували з інтактними віргінними самицями (у співвідношенні самець : самиця – 1 : 2) протягом 2-3-х естральних циклів. В цей час щурам-самцям продовжували вводити досліджувані ПТЗ. Першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів у вагінальному мазку [K. Boekelheide and R. Chapin, 2005]. Оцінювали запліднювальну здатність самців-щурів [K. Boekelheide and R. Chapin, 2005]. Частину самиць піддавали евтаназії на 20-й день вагітності. Після лапаротомії вилучали роги матки з яєчниками, визначали кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантацій у матці, кількість живих плодів та таких, що знаходяться в стадії резорбції. Ці дані використовували для визначення показників до- та післяімплантаційної загибелі [K. Boekelheide and R. Chapin, 2005].

Методи дослідження стану гонад щурів-самців. У щурів-самців після евтаназії виділяли сім'яники з придатками. Сім'яники зважували, визначали їхні радіуси та вираховували об'єм. Для оцінки морфологічних і морфометричних параметрів та показників сперматогенезу сім'яники фіксували у розчині Буена, зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та занурювали у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм фарбували гематоксиліном і еозином, препарати вивчали і мікрофотографували за допомогою мікроскопу Olimpus BX41. Визначали кількісні показники впливу досліджуваних препаратів на протікання сперматогенезу у звивистих каналцях сім'яників. Визначення індексу сперматогенезу передбачало використання чотирьохбальної системи, згідно якої у кожному поперечному зрізі каналця аналізували наявність 4-х шарів клітин сперматогенного епітелію, властивих нормальному процесу сперматогенезу. Враховували якісні зміни сперматогенного епітелію: відшарування епітелію від базальної мембрани, наявність ділянок у каналцях, позбавлених будь-яких клітин – вакуолі («вікна»), деформацію окремих сім'яних каналців та ін. Функціональний стан сперматозоїдів вивчали, використовуючи суспензію сперматозоїдів з хвостової частини епідидиміса [Б.И. Любимов и др., 2000]. Кількість сперматозоїдів в епідидимальних суспензіях оцінювали згідно К.С. Chitra з співавт. (2010).

Біохімічні методи дослідження. Сім'яники та печінку, призначені для біохімічних досліджень, гомогенізували в 0,05 М Трис-НС1 буфері (pH 7,4), що містив 0,025 М сахарози, 0,005 М $MgCl_2$, 0,025 М KCl , 0,008 М $CaCl_2$ та отримували мікосомну фракцію, проводячи субфракціонування на рефрижераторній швидкісній центрифугі Жоан (Франція) [S.A. Kamath et al., 1971]. У мікосомах сім'яників та печінки оцінювали активність досліджували активність *n*-нітрофенолгідроксилази – маркеру CYP2E1 [D.R. Коор, 1990]. Стан вільнорадикальних процесів у гомогенаті сім'яників визначали за швидкістю індукованого аскорбатом та НАДФН (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений) накопичення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [И.Д. Стальная, 1977]. Вміст відновленого глутатіону в гомогенаті сім'яників оцінювали за рівнем небілкових SH-груп з допомогою реактиву Еллмана [J. Sedlak, 1968]. Вміст SH-груп білків оцінювали за різницею між рівнем загальних та небілкових SH-груп [J. Sedlak, 1968]. Глутатіон-S-трансферазну активність постмітохондріальної фракції сім'яників та печінки визначали з використанням у якості субстрату 1-хлор-2,4-динітробензолу [W.H. Habig, 1974]. Глутатіонредуктазну активність – згідно до керівництва «Current protocols in Toxicology» [B. Mannervik, 1999]. Активність каталази визначали згідно Корольок М.А. зі співавт. (1988). Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за методом Misra та Fridovich у модифікації Т.В. Сироти (1999). Вміст різних фракцій холестеролу в гомогенаті сім'яників визначали згідно методу Н. Станкевічене [В.Г. Колб и В.С. Камышников, 1976]. На амінокислотному аналізаторі ААА-881 (Чехія) визначали вміст вільних амінокислот у сім'яниках, а також амінокислотні композиції фракцій колагену І типу після попередньої екстракції та очищення [L.V. Bondarenko et al., 2011]. Білок визначали за методом

О.Н. Lowry та співавт. (1951) та за допомогою Total Protein Kit, MicroLowry, Onishian and Barr Modification (Sigma-Aldrich) згідно до інструкції виробника.

Молекулярно-біологічні методи дослідження. Виділення сумарної мРНК з сім'яників та печінки проводили з використанням TRI-Reagent виробництва Sigma, США. Синтез комплементарної ДНК (дезоксирибонуклеїнової кислоти) проводили, використовуючи тест-набір фірми Fermentas, Німеччина. Експресію мРНК CYP2E1 визначали методом зворотньо-транскриптазної полімеразної реакції (ПЛР). Склад реакційної суміші для ПЛР, праймери специфічні для ПЛР ампліфікації гену CYP2E1 (форвард 5'-CTTCGGGCCAGTGTTCAC-3' та реверс 5'-CCCATATCTCAGAGTTGTGC-3'), а також протокол ампліфікації були обрані згідно до S.M. Lankford із співавт. (2000). Для внутрішнього контролю проводили ПЛР з праймерами β -актину: форвард 5'-GCTCGTCTGTCGACAACGGCT-3'; реверс 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCT-3'. Усі праймери виробництва «Metabion», Німеччина. Для ампліфікації використовували термоциклер BioRad, США. Електрофорез продуктів ампліфікації (744 п.о. – CYP2E1 та 353 п.о. – β -актин) проводили в 2 % агарозному гелі, забарвлювали розчином бромового етидію, візуалізували в УФ-світлі, фотографували за допомогою системи GelDoc, виробництва BioRAD, США та аналізували, використовуючи програмне забезпечення Quantity One BioRad System (США).

Концентрацію білка CYP2E1 у сім'яниках та печінці визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу, з використанням специфічних поліклональних антитіл миші білка CYP2E1, отриманих в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназу (GAPDH) з поліклональними антитілами (Sigma, США) використовували як внутрішній контроль. Концентрацію білка в клітинному лізаті визначали згідно M.M. Bradford (1976).

Для визначення ступеня фрагментації ДНК заморожені у рідкому азоті проби сім'яників гомогенізували та отримували геномну ДНК [A.W. Hayes, 2007].

Загальний тестостерон в сироватці крові визначали, використовуючи набір Testosterone ELISA виробництва DRG Instruments GmbH (Німеччина), методом твердофазного імуоферментного аналізу згідно інструкції виробника.

Гістохімічні методи дослідження. Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в сім'яниках вивчали методом M.M. Nachlas та ін. (1957), використовуючи нітротетразолій синій як акцептор електронів. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) оцінювали за гістохімічною методикою згідно з R. Hess та ін. (1968). Нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК) виявляли за методом М. Шубича [Пирс Э., 1962]. Імуногістохімічне фарбування для виявлення протеїну тестикулярного CYP2E1 виконували з використанням 4 мм зрізів сім'яників, які попередньо були зафіксовані у розчині Буена та залиті в парафін. Поліклональні антитіла людини проти CYP2E1 (Thermoscientific, Waltham, Массачусетс, США) використовували як первинні антитіла. Для виявлення первинних антитіл CYP2E1 використовували anti-Rabbit IgG-HRP вторинні антитіла. Продукт реакції візуалізували за допомогою 3,3'-діамінобензидинтетрагідрохлориду. Будь яка реакція на CYP2E1 розцінювалась, як позитивна.

Комп'ютерне моделювання взаємодії ПТЗ та CYP2E1. Використовували оптимізовану комп'ютерну модель просторової структури CYP2E1 людини [B.O. Kitam та M.O. Чашин, 2010], що була створена за допомогою веб-сервера SwissModel (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISSMODEL.html>). Для моделювання взаємодії етамбутолу з CYP2E1 було проведено докінг ліганду в активний центр ферменту. Просторову структуру етамбутолу було взято з бази даних PubChem (CID 14052) та оптимізовано за допомогою програми ArgusLab (Mark Thompson and Planaria Software LLC), використовуючи методи молекулярної механіки та силове поле UFF. Докінг ліганду в активний центр CYP2E1 проводили програмою ArgusLab, використовуючи Ламаркіанівський Генетичний Алгоритм (Lamarckian Genetic Algorithm). Пошук активного центру ензиму здійснювали методом Shape Dock. Особливості активного центру передбачено за допомогою програми Fred Receptor.

Статистичні методи дослідження. Отримані дані представляли як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$). Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Стюдента або однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p \leq 0,05$ [S.A. Glantz, 2005]. Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) був використаний для оцінки взаємозв'язків між змінними. При значеннях r близьких до 0 вважали, що кореляція відсутня. Значення r від 0,1 до 0,3 (-0,1 і -0,3) вказували на слабку позитивну (негативну) кореляцію, значення – від 0,3 до 0,7 (-0,3 і -0,7) приймали за свідчення помірної позитивної (негативної) кореляції, та значення – від 0,7 до 1,0 (-0,7 і -1,0) – сильної позитивної (негативної) кореляції. Щоб встановити, чи дійсно коефіцієнт кореляції відрізняється від нуля, і, отже, існує доведений зв'язок між двома змінними використовували t-критерій [S.A. Glantz, 2005].

Результати досліджень та їх обговорення.

Вплив нарізного та сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу на репродуктивну функцію щурів-самців та ембріо-фетальний розвиток їхнього потомства. Показано, що сумісне застосування етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду, порівняно з нарізним їх введенням, викликало більш виражене порушення нормоспермії у щурів самців. А саме, зниження продукції сперматозоїдів – втричі, зменшення їх життєздатності (осморезистентності) – на 74 %, зниження часу рухливості – на 80 % (рис. 1 та табл. 1).

За умов нарізного введення ізоніазиду, етамбутолу та усіх чотирьох препаратів одночасно в сім'яниках щурів спостерігались значні морфологічні порушення (рис. 2), які поглиблювались за сумісного застосування ПТЗ порівняно з нарізним їх введенням.

Зокрема, вони проявлялись зниженням сперматогенного індексу та числа сперматогоній, підвищенням відсотку випадків злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналцях (у 6 разів порівняно з контролем), спустошенням і

деформацією сім'яних каналців, появою багатоядерних синтиців в зоні сперматоцитів I порядку (табл. 2, рис. 2).

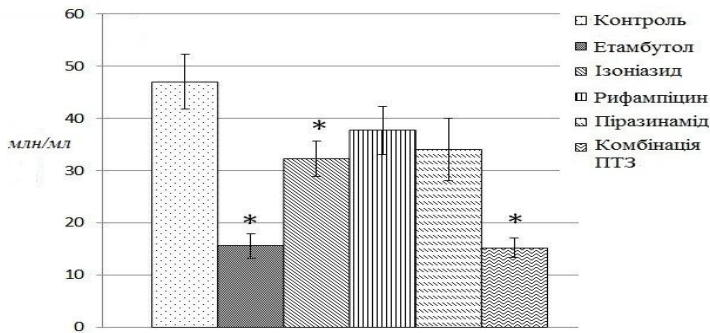


Рис. 1. Кількість сперматозоїдів в хвостовій частині епідидимісів за умов введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка.* – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Таблиця 1

Функціональний стан сперматозоїдів за умов введення протитуберкульозних засобів протягом періоду сперматогенезу ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Експериментальні групи	Показники	
	час рухливості, хв	осморезистентність, % KCL
Контроль	620,58±19,11	2,62±0,11
Етамбутол	238,00±44,99 * #	1,58±0,29 * #
Рифампіцин	572,08±27,93 #	2,13±0,09 * #
Ізоніазид	636,50±12,72 #	2,21±0,07 * #
Піразинамід	614,00±16,15 #	2,54±0,14 #
Комбінація ПТЗ	115,45±24,75 *	0,67±0,28 *

Примітки: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою; # – $p \leq 0,05$ у порівнянні з групою, що отримувала комбінацію ПТЗ.

Таблиця 2

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію за умов введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Експериментальні групи	Індекс сперматогенезу, загальна кількість стадій сперматогенезу / кількість досліджених каналців	Число сперматогоній, на поперечний зріз через каналець	Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	Злушений епітелій, %
Контроль	3,615±0,011	69,393±0,742	3,563±0,365	0,313±0,120
Етамбутол	3,484±0,008*	57,840±0,465*	2,000±0,316*	1,000±0,316
Рифампіцин	3,530±0,012*	59,540±0,901*	2,200±0,510	0,600±0,400
Ізоніазид	3,494±0,007*	62,110±0,936*	2,200±0,663	0,800±0,374
Піразинамід	3,552±0,007*	61,060±1,016*	2,400±0,245	1,000±0,316
Комбінація ПТЗ	3,535±0,014*	59,573±0,861*	2,412±0,508	1,882±0,363*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

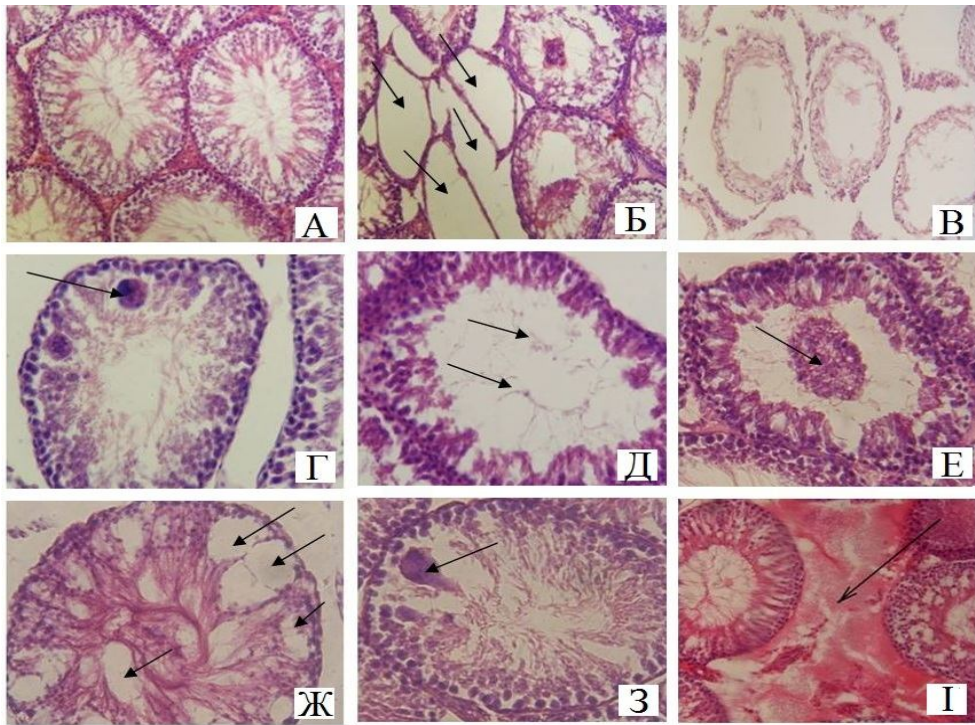


Рис. 2. Структура сім'яних каналців щурів-самців. Фарбування гематоксиліном і еозином. А – Структура сім'яних каналців контрольної тварини не змінена. Зб. х 200. Б – Осередковано розташовані спустошені і деформовані каналці та каналці з десквамованим епітелієм (введення ізоніазиду). Зб. х 200; В – Спустошення гермінативного епітелію та ушкодження оболонки сім'яних каналців (сумісне введення ПТЗ). Зб. х 200; Г – Гігантська багатоядерна клітина в зоні сперматоцитів I порядку (сумісне введення ПТЗ). Зб. х 400; Д – Фрагментація сперматозоїдів в сім'яному каналці (введення ізоніазиду). Зб. х 400; Е – Злущення сперматогенного епітелію в просвіт сім'яного каналця (введення ізоніазиду). Зб. х 400; Ж – Канальці з втратою сперматогенного епітелію – вакуолі (введення ізоніазиду). Зб. х 400; З – Гігантська багатоядерна клітина в зоні сперматоцитів I порядку (введення ізоніазиду). Зб. х 400; І – Міжканальцеві набряки (введення етамбутолу). Зб. х 200.

Результати морфологічних досліджень свідчать, що дистрофічні та деструктивні зміни у статевих залозах щурів-самців, вочевидь, найбільшою мірою обумовлені етамбутолом та ізоніазидом.

Як за умов сумісного введення чотирьох ПТЗ, так і нарізного – етамбутолу та ізоніазиду спостерігалось зменшення плодючості самиць, які були запліднені піддослідними самцями та значне зростання рівня ембріо-фетальної смертності потомства. Найбільш вираженими порівняно з контролем ці зміни були за сумісного введення ПТЗ – плодючість самиць знижувалась на 81 %, а до- і післяімплантаційна летальність на 55 % та 73 % відповідно (табл. 3).

Встановлено, що ключова роль в реалізації негативних ефектів на потомство належить етамбутолу.

Дослідження молекулярно-біологічних та біохімічних показників сім'яників за умов нарізного і сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинамиду, етамбутолу щурам. Виявлено, що сумісне введення ПТЗ призводило до порушень про- та антиоксидантного статусу в сім'яниках (зниження активності СОД на 22 % ($p \leq 0,05$) та вмісту відновленого глутатіону на 12 % ($p \leq 0,05$), зростання активності

глутатіон-*S*-трансферази на 18 % та індукованого аскорбатом та НАДФН утворення продуктів реакції з ТБК відповідно у 1,2 та 1,9 рази ($p \leq 0,05$). За нарізного введення досліджуваних препаратів найбільш помітні порушення біохімічних показників сім'яників щурів спостерігались за умов введення етамбутолу та ізоніазиду.

Таблиця 3

Показники ембріо- та фетогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць (♀) щурів, запліднених самцями, яким протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби

Показники	Експериментальні групи					
	контроль	етамбу- тол	рифампі- цин	ізоніазид	піразина- мід	ПТЗ
Кількість вагітних ♀, абс.	22	4	10	8	10	4
Загальна кількість жовтих тіл, абс.	224	34	116	93	123	75
Кільк. жовтих тіл на одну ♀, $M \pm m$	11,09±0,37	8,50±0,73	11,60±0,59	11,63±0,38	12,3±0,65*	18,75±3,59
Загальна кількість місць імплантації, абс.	219	16	111	86	114	26
Кількість місць імплантації на одну ♀, $M \pm m$	9,95±0,59	4,00±0,45*	11,10±0,46	10,75±0,42	11,40±0,45	6,50±3,33
Доімплантаційна загибель, абс. / %	18 / 10,25	18 / 52,9	5 / 4,3	7 / 7,5	9 / 7,3	48 / 65,3
Доімплантаційна загибель на одну ♀, $M \pm m$	0,82±0,32	4,50±1,03*	0,50±0,31	0,88±0,23	0,90±0,31	12,0±3,89*
Післяімплантацій на загибель, абс. / %	9 / 4,1	1 / 6,25	1 / 0,9	11 / 12,8	13 / 11,4	20 / 76,9
Післяімплантацій на загибель на одну ♀, $M \pm m$	0,41±0,15	0,14±0,14	0,10±0,10	1,38±1,24	1,30±0,30	5,00±3,72
Загальна кількість живих плодів, абс. / %	217 / 99	15 / 94	110 / 99	75 / 87	101 / 89	7 / 27
Кількість живих плодів на одну ♀, $M \pm m$	9,08±0,52	3,75±0,47*	11,00±0,52	9,38±1,41	10,10±0,43	1,75±1,43
Загальна ембріональна/фетальна смертність, %	3,1	55,9	5,2	19,4	17,9	90,7

Примітка. * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Показано, що нарізне застосування етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду, піразинаміду та комбінації ПТЗ призводило до зростання фрагментації ДНК у клітинах сім'яників. З рис. 3-а видно, що основні фракції фрагментів ДНК лежали у діапазоні від понад 1000 п.о. до 600 п.о. При цьому була зафіксована менш

виражена низькомолекулярна фракція, яка у групах тварин, яким вводили етамбутол, рифампіцин, піразинамід та комбінацію ПТЗ складалась з фрагментів довжиною 40-30 п.о., а при введенні ізоніазиду – з фрагментів довжиною 20-30 п.о. Дещо інша картина спостерігалась у епідидимісах (рис. 3-б). За умов нарізного введення етамбутолу відзначено фракції фрагментів ДНК у діапазоні 150-100 п.о. та лише одну низькомолекулярну фракцію – у діапазоні 30-40 п.о. Введення рифампіцину та усіх ПТЗ разом давало найбільш широкий спектр фрагментів від понад 1000 п.о до 20-30 п.о.

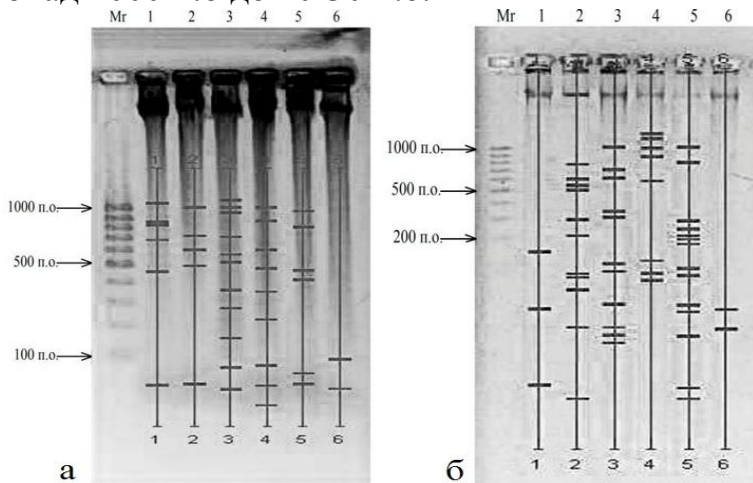


Рис. 3. Рівень фрагментації ДНК у сім'яниках (а) та епідидимісах (б) за умов введення протитуберкульозних засобів (1 – етамбутол; 2 – рифампіцин; 3 – ізоніазид; 4 – піразинамід; 5 – сумісне введення ПТЗ; 6 – контроль). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

За нарізного введення етамбутолу, ізоніазиду та піразинамідів була відсутня низькомолекулярна фракція фрагментів ДНК в діапазоні 20-30 п.о., ймовірно внаслідок її розщеплення до окремих нуклеотидів (які не затримувались за даних умов розділення на електрофореграмі) внаслідок переважання процесів некротичної загибелі клітин над апоптозом. Це припущення узгоджується з отриманими нами даними патоморфологічних досліджень.

На наступному етапі було досліджено профіль експресії гену CYP2E1 у сім'яниках щурів. Не було виявлено значного зростання експресії мРНК CYP2E1 у гонадах тварин за введення рифампіцину та піразинамідів (рис. 4).

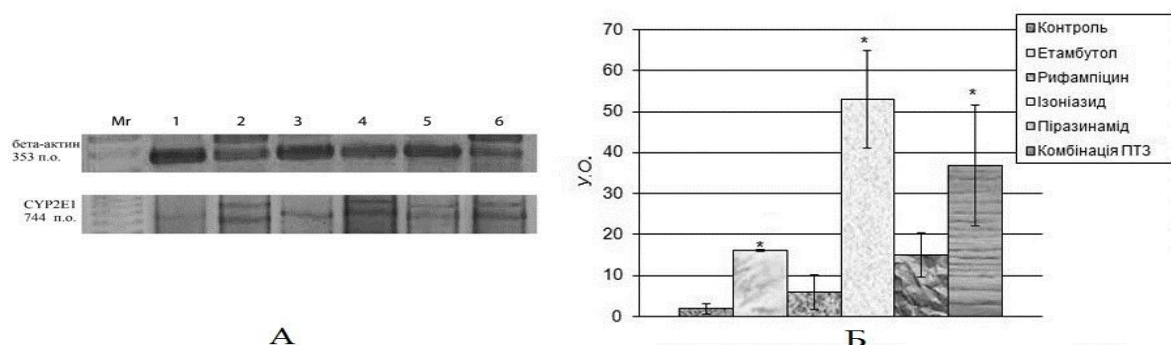


Рис. 4. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення ПТЗ: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β-актину (Mr – ДНК маркер, 1 – контроль; 2 – етамбутол; 3 – рифампіцин; 4 – ізоніазид; 5 – піразинамід; 6 – ПТЗ); Б) відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 – інтенсивність піку β-актину взято за 100 %. Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Одночасно спостерігалось значне підвищення експресії мРНК CYP2E1 після введення ізоніазиду (у 28 разів), етамбутолу (у 8,5 раз) та комбінації всіх чотирьох ПТЗ (у 19 разів). За сумісного введення ПТЗ не виявлено адитивного ефекту стосовно даного показника, що можна пояснити конкурентною взаємодією препаратів, застосованих сумісно [С.Н. Ларина, 2009].

Оцінку експресії білка CYP2E1 в сім'яниках щурів було проведено з використанням імуногістохімічного аналізу, який дозволяв візуалізувати CYP2E1 за допомогою реакції з 3,3'-діамінобензидинтетрагідрохлоридом по наявності коричневого забарвлення різної інтенсивності. Реакцію на даний ізоензим визначали як позитивну, фокальну/слабо позитивну або негативну. Дані, наведені на рис. 5, свідчать про значну експресію протеїну CYP2E1 в сім'яниках щурів, яким вводили етамбутол, ізоніазид та комбінацію ПТЗ. Вона була набагато вищою, ніж за умов введення піразинаміду, рифампіцину та в контролі.

Результати дослідження активності маркерного ензиму CYP2E1 – *p*-нітрофенолгідроксилази – в мікросомальній фракції сім'яників, наведені на рис. 7, цілком узгоджуються з отриманими нами даними стосовно тестикулярної експресії гену та білка даної ізоформи, засвідчуючи зростання її каталітичної активності за введення етамбутолу (в 3 рази), ізоніазиду (в 7 разів) та усіх чотирьох ПТЗ (в 15,5 раз) порівняно з контролем.

Щодо ізоніазиду, то отримані нами дані не суперечать результатам інших авторів, які показали активацію трансляції гену CYP2E1 у гепатоцитах під впливом даного препарату [K.S. Park et al., 1993]. Стосовно ж властивостей етамбутолу виступати індуктором CYP2E1, дане питання раніше не досліджувалось і з огляду на це нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії етамбутолу з CYP2E1. В ході докінгу було відібрано найбільш енергетично-вигідні комплекси CYP2E1-ліганд (табл. 4, рис. 7).

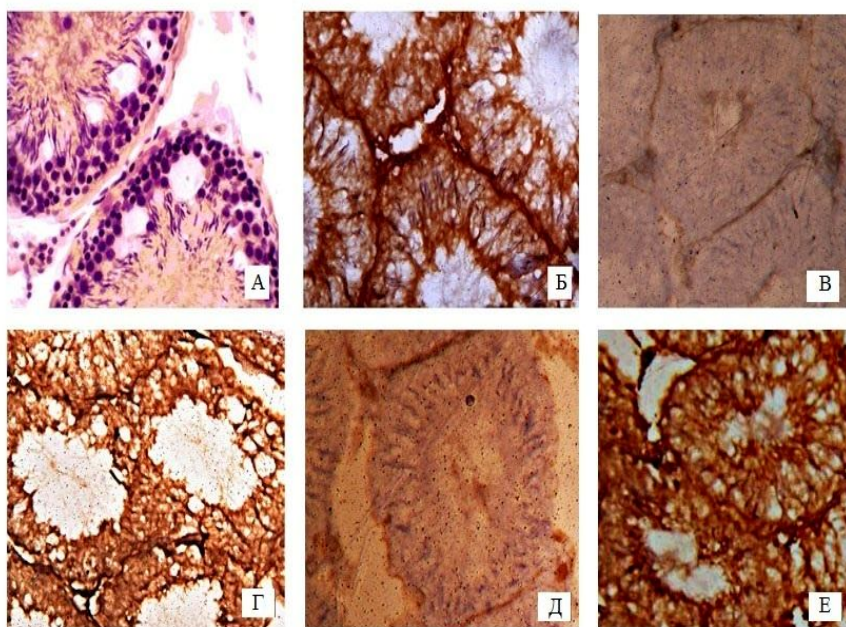


Рис. 5. Імуногістохімічний аналіз експресії протеїну CYP2E1 в сім'яниках за умов введення протитуберкульозних засобів: А – негативна реакція в сім'янику щура контрольної групи; Б, Г, та Е – сильно позитивна реакція в сім'яниках щурів, яким відповідно вводили етамбутол, ізоніазид та комбінацію ПТЗ; В та Д – слабо позитивна реакція в сім'яниках щурів, яким відповідно вводили рифампіцин та піразинамід. Збільшення x 200.



Рис. 7. Активність *n*-нітрофенолгідроксилази в мікросомах сім'яників за умов нарізного та сумісного введення ПТЗ ($M \pm m$, $n = 8$). Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким сумісно вводили ПТЗ.

Розташування ліганду в активному центрі наводить на думку, що він може бути інгібітором CYP2E1. На рис. 9 видно, що етамбутол безпосередньо може взаємодіяти із активним центром і гемом CYP2E1. Зазвичай таке розміщення характерне для субстратів даного ізоферменту. Проте, із гемом ліганд взаємодіє своєю гідроксильною групою, тобто його вже неможливо метаболізувати, а енергія зв'язування ферменту з етамбутолом наближається до рівня взаємодії білок-субстрат, що є більш характерним для слабких конкурентних інгібіторів.

Таблиця 4

Енергія взаємодії (ΔG_{gibs}) та амінокислотні залишки, які можуть взаємодіяти з лігандом

Ліганд	ΔG_{gibs} , ккал/моль	Амінокислотні залишки, які можуть взаємодіяти з лігандом
Етамбутол	6,58	Гем, Leu103, Phe106, Phe207, Leu210, Ser211, Leu215, Gln216, Phe298, Ala299, Thr303, Leu363, Val364, Leu368, Pro369, Phe478

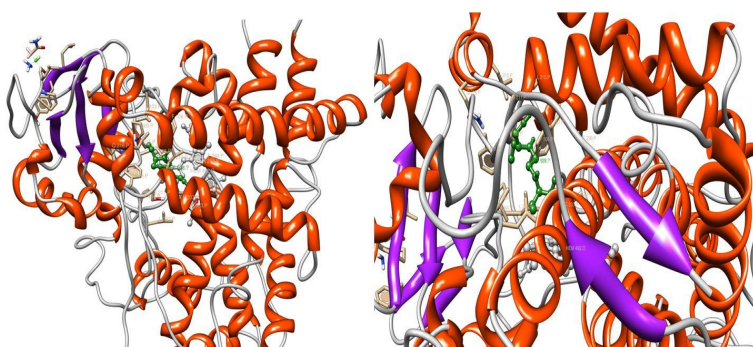


Рис. 7. Розташування етамбутолу (позначено зеленим кольором) в активному центрі CYP2E1. Показано амінокислотні залишки, які можуть взаємодіяти із лігандом.

Тим не менш, результати наших досліджень з використанням тварин свідчать про здатність етамбутолу індукувати CYP2E1 у тестикулярних тканинах. Зважаючи на те, що етамбутол частково піддається окисленню у печінці та його первинна алкогольна група окислюється із залученням тих самих ензимів, що і етилового спирту [C. Dollery, 1999], можна припустити його здатність індукувати CYP2E1 за механізмом подібним для етанолу – пост-транскрипційна стабілізація молекули [C.S. Lieber, 2004].

Враховуючи, що індукція CYP2E1 призводить до зростання рівня генерації АФК та розвитку окисного стресу [A.A. Caro and A.I. Cederbaum, 2004], він може

бути залучений до патогенезу, виявлених нами порушень у сім'яниках. На користь цього свідчать і результати попарного кореляційного аналізу, які показали наявність сильної негативної кореляції між кількістю сперматозоїдів та рівнем експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів, що отримували усі чотири ПТЗ ($r = -0,87$; $p=0,001$), етамбутол ($r = -0,92$; $p=0,001$), ізоніазид ($r = -0,98$; $p=0,001$).

Виявлені нами зміни на клітинному, біохімічному та молекулярному рівнях у сім'яниках щурів за введення етамбутолу, ізоніазиду та комбінації ПТЗ супроводжувались зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові в 1,6-2,8 рази (рис. 8), що є свідченням пригнічення стероїдогенезу клітинами Лейдіга.

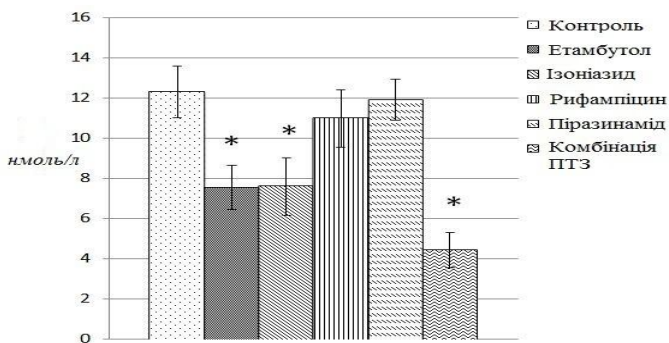


Рис. 8. Рівень загального тестостерону в сироватці крові за умов введення протитуберкульозних засобів.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Отже, ПТЗ викликали порушення андрогенної функції сім'яників, на що одночасно зі зниженням рівня тестостерону, вказують і дегенеративні зміни в каналцях сім'яників, зокрема дегенерація сперматоцитів і округлих сперматид.

Особливості впливу на репродуктивну функцію щурів-самців та ембріо-фетальний розвиток їхнього потомства комбінацій протитуберкульозних препаратів за умов заміни етамбутолу на стрептоміцин. Всі пацієнти з країн, де з високою частотою виявляють стійкі форми *M. Tuberculosis*, отримують як первинну протитуберкульозну терапію комбінацію ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду, разом із щонайменше одним додатковим препаратом (етамбутолом і/або стрептоміцином) [A.Y. Coban et al., 2014]. Враховуючи результати, отримані нами на попередньому етапі, було порівняно ефекти стосовно впливу на чоловічі гонади двох комбінацій ПТЗ, що використовуються в клініці та до складу яких входять рифампіцин, ізоніазид і піразинамід, а четвертою складовою є етамбутол (комбінація 1) або стрептоміцин (комбінація 2). Результати мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії свідчать, що за умов введення ПТЗ в комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, середня кількість сперматозоїдів не виходила за межі норми на відміну від групи, яка отримувала комбінацію 1. Вивчення параметрів, що відображають енергетичний потенціал сперматозоїдів (час рухливості) та їхню стійкість до змін оточуючого середовища (осмотична резистентність), показало, що загальний час рухливості сперматозоїдів після введення комбінацій 1 та 2 скорочувався порівняно з контролем відповідно на 77 % і 34 % (рис. 9). Життєздатність сперматозоїдів у розчинах КСІ зростаючих концентрацій за умов введення комбінації 1 знижувалась на 65 %, а при застосуванні комбінації 2 статистично значущих змін даного показника у порівнянні з контролем не виявлено (рис. 9).

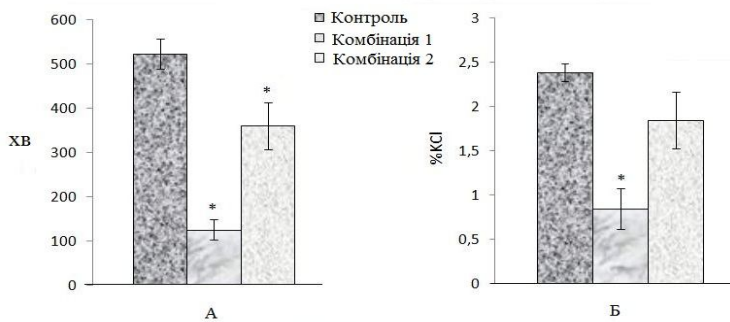


Рис. 9. Якісні показники сперматозоїдів щурів за умов введення ПТЗ в двох комбінаціях: А – час рухливості; Б – осмотична резистентність ($M \pm m$, $n=8$). Примітка.* – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Підсумовуючи дані гістологічних досліджень сім'яників, варто відзначити, що за умов уведення щурам комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, ступінь деструктивних змін у сперматогенному епітелії був нижчим.

За умов застосування комбінації 2 індекс запліднювальної здатності щурів-самців знижувався незначною мірою, в той час як комбінація 1 викликала згубне зниження даного показника (табл. 5).

Таблиця 5

Індекс запліднювальної здатності щурів самців за умов введення протитуберкульозних засобів в різних комбінаціях

Групи самців	Кількість спарованих самиць	Кількість самиць, що завагітніли	Індекс запліднювальної здатності, %
Контроль	44	38	86,36
Комбінація 1	44	4	9,09
Комбінація 2	32	25	78,12

Загалом було важко здійснити адекватний статистичний аналіз антенатального розвитку потомства щурів-самців, яким вводили комбінацію 1, внаслідок дуже малої кількості вагітних самиць, але негативні тенденції були очевидними (табл. 6).

Кількість живих плодів в цій групі зменшувалась, тоді як комбінація 2 не виявила ушкоджуючої дії на даний показник. Порівняння рівня летальності в піддослідних та контрольній групах в різні терміни ембріо-фетального розвитку продемонструвало значний негативний ефект ПТЗ в 1-ій комбінації. В цій групі тварин відсоток опосередкованої самцями до- та післяімплантаційної смертності зростав відповідно в 7 та 24 рази в порівнянні з контролем (табл. 7). Комбінація 2 чинила менший вплив: до- та післяімплантаційна смертність зростала лише в 2 та 4 рази (табл. 7). Таким чином, застосування стрептоміцину в комбінації з іншими ПТЗ, порівняно з етамбутолом, сприяло покращенню морфо-функціонального стану сім'яників, показників репродуктивної здатності піддослідних щурів-самців та ембріо-фетального розвитку їх потомства.

Показано, що в сім'яниках та епідидимісах щурів, які отримували дві різні комбінації ПТЗ, порівняно з контролем зростав відносний вміст фрагментів ДНК, що свідчить про індукцію апоптозу незалежно від наявності стрептоміцину або етамбутолу.

Таблиця 6

Показники ембріо- та фетогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць (♀) щурів, запліднених самцями, яким протягом періоду сперматогенезу вводили ПТЗ в різних комбінаціях

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	комбінація 1	комбінація 2
Кількість вагітних ♀, абс.	38	4	25
Загальна кількість жовтих тіл, абс.	403	50	259
Кількість жовтих тіл на одну ♀, $M \pm m$	$10,60 \pm 0,28$	$12,5 \pm 3,20$	$10,36 \pm 0,38$
Загальна кількість місць імплантації, абс.	380	30	228
Кількість місць імплантації на одну ♀, $M \pm m$	$10,0 \pm 0,31$	$7,50 \pm 3,43$	$9,12 \pm 0,64$
Доімплантаційна загибель, абс. / %	23 / 5,7	18 / 40,0	30 / 12,0
Доімплантаційна загибель на одну ♀, $M \pm m$	$0,61 \pm 0,21$	$4,50 \pm 1,94$	$1,20 \pm 0,41$
Післяімплантаційна загибель, абс. / %	10 / 2,63	19 / 63,33	18 / 12,0
Післяімплантаційна загибель на одну ♀, $M \pm m$	$0,26 \pm 0,08$	$4,75 \pm 3,81$	$0,72 \pm 0,21^*$
Загальна кількість живих плодів, абс. / %	371	11	212
Кількість живих плодів на одну ♀, $M \pm m$	$9,76 \pm 0,32$	$2,75 \pm 2,43$	$8,48 \pm 0,66$
Загальна ембріональна/фетальна смертність, %	7,94	78,0	18,15

Примітка.* – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Одночасно зміни біохімічних показників гонад були більш глибокими за умов введення комбінації 1, де спостерігали зростання швидкості утворення продуктів реакції з ТБК у сім'яниках (+27 %; $p \leq 0,05$) та у суспензії сперматозоїдів з епідидимісів (+38 %; $p \leq 0,05$) щурів, а також зниження вмісту відновленого глутатіону у сім'яниках (-23 %; $p \leq 0,05$) порівняно із контрольною групою. Введення комбінації 2 призводило до підвищення ліпопероксидації лише у сім'яниках.

Результатами, проведених нами досліджень встановлено, що стрептоміцин за умов нарізного введення на відміну від етамбутолу не впливав на експресію мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів. При цьому заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ не запобігала повністю зростанню тестикулярної експресії гену CYP2E1, ймовірно внаслідок наявності ізоніазиду (рис. 10).

Вплив протитуберкульозних засобів на репродуктивну функцію щурів-самців за умов тривалого споживання етанолу. Враховуючи отримані нами дані стосовно внеску індукції етанол-залежної ізоформи CYP2E1 у сім'яниках щурів до розвитку побічних ефектів ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію, можна передбачити зростання ризику застосування ПТЗ на тлі вживання алкоголю. Для дорослих чоловіків ймовірність комбінованого вживання етанолу та фармацевтичних препаратів є досить високою [R. Weathermon and D.W. Crabb, 1999], призводячи до їх фармакокінетичної та фармакодинамічної взаємодії і небажаних побічних ефектів [D. Harris, 2015]. Нами встановлено, що сумісне введення ПТЗ в комбінації 1 тваринам з експериментальним хронічним алкоголізмом призводило до прогресуючого збільшення експресії CYP2E1 в печінці та сім'яниках щурів відповідно у 5 та 5,9 разів (рис. 11).

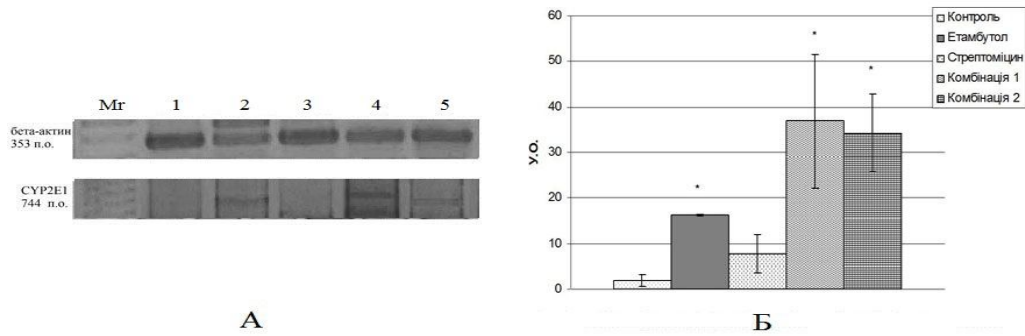


Рис. 10. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (Mr – ДНК маркер, 1 – контроль; 2 – етамбутол; 3 – стрептоміцин; 4 – комбінація 1; 5 – комбінація 2); Б) відносний рівень експресії ізоформи CYP2E1 – інтенсивність піку β -актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$). Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Проте, згідно даних, наведених, на рис. 12 подальшого росту експресії печінкового та тестикулярного протеїну CYP2E1 не виявлено, її рівень у цих щурів був майже таким же, що і у тварин, які споживали лише алкоголь (відповідно у 2,2 та 1,2 рази вище, ніж у контролі).

Введення ПТЗ щурам-самцям з експериментальним алкоголізмом викликало зростання каталітичної активності CYP2E1 у мікросомах клітин печінки в 1,5 ($p \leq 0,05$) рази порівняно з групою «хронічний алкоголізм» та втричі порівняно з контролем за одночасного зростання активності НАДФН-залежного ПОЛ на 82 % ($p \leq 0,05$) та глутатіон-S-трансферази на 44 % ($p \leq 0,05$).

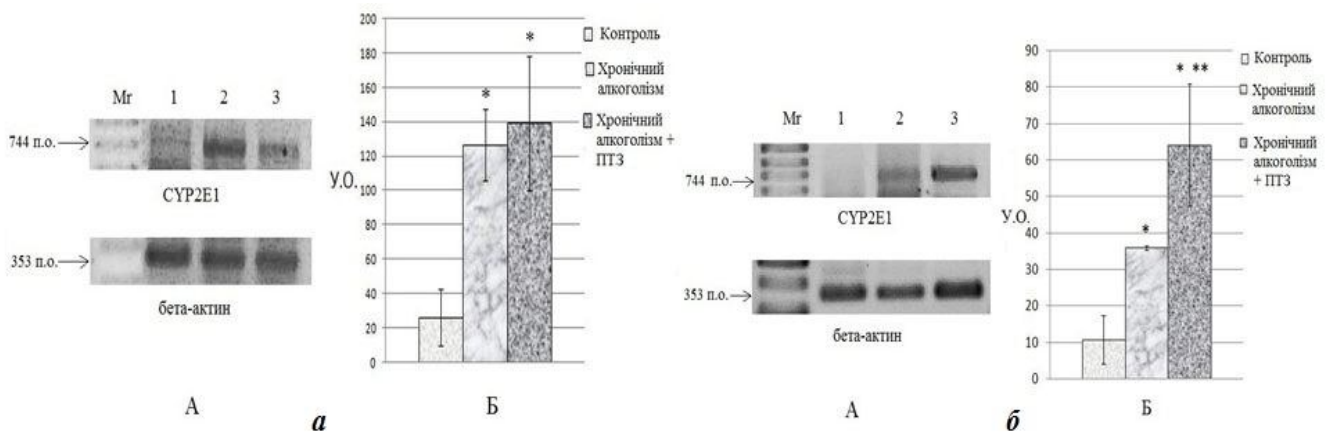


Рис. 11. Рівень експресії мРНК CYP2E1 у печінці (а) та сім'яниках щурів (б) за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (1 – контроль; 2 – хронічний алкоголізм; 3 – введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму); Б) – відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 – інтенсивність піку β -актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$). Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з тваринами з хронічним алкоголізмом.

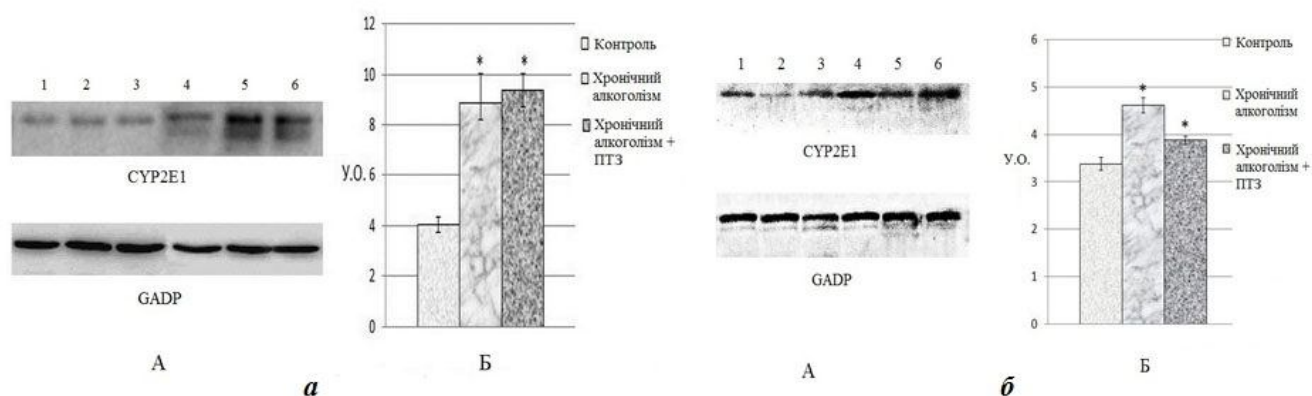


Рис. 12. Вміст білка CYP2E1 у печінці (а) та сім'яниках (б) щурів-самців за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) вміст білка CYP2E1 згідно Вестерн-блот аналізу зі специфічними поліклональними антитілами до рекомбінантного CYP2E1 (1 та 2 контроль; 3 та 4 хронічний алкоголізм; 5 та 6 введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму). Кожна смужка представляє вміст білка в сім'яниках різних тварин; Б) відносний рівень білка CYP2E1 в лізаті сім'яників ($M \pm m$, $n \geq 6$). Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з тваринами з хронічним алкоголізмом

Характерно, що за тривалого вживання етанолу відбувалось компенсаторне підвищення вмісту відновленого глутатіону у гонадах на 40 % порівняно з контролем, а за умов введення ПТЗ його пул вичерпувався та був майже на 30 % нижчим ніж у тварин контрольної групи (табл. 6). Зміни вмісту SH-груп білків мали однакову спрямованість незалежно від того, чи вони отримували ПТЗ на тлі алкоголізму. Даний показник в обох групах знижувався в середньому на 36 % порівняно з контролем (табл. 7).

Таблиця 7

Вміст відновленого глутатіону та SH-груп білків у сім'яниках за введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм + ПТЗ
Відновлений глутатіон, мкмоль/мг тканини	5,75±0,29	9,64±0,81*	3,94±0,39* **
SH-групи білків, мкмоль/мг тканини	9,65±0,49	5,94±0,70*	6,27±1,22*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

За умов введення щурам ПТЗ на тлі експериментального алкоголізму не виявлено суттєвої інтенсифікації фрагментації ДНК, але показано зміну характеру ураження структури ДНК та її деградації до рівня олігонуклеотидів.

Хронічна експозиція етилового спирту викликала зміни в амінокислотному складі сироватки крові, колагену I типу та сім'яників щурів-самців. Зокрема, у сім'яниках щурів показано статистично значущі зміни для 5 амінокислот та їх загальної суми: знижувались вміст лізину (-54 %), аргініну (-52 %), серину (-31 %)

та гліцину (-46 %) за одночасного підвищення вмісту метіоніну (+ 133 %). Загальна сума амінокислот в сім'яниках тварин, що споживали алкоголь знижувалась порівняно з контрольною групою на 20,5 %.

За цих умов в сім'яниках щурів виявлені різноспрямовані зміни активності важливих ферментів енергетичного обміну: пригнічення – СДГ, за одночасного зростання ЛДГ. Зниження активності СДГ, що бере участь у функціонуванні циклу Кребса, призводить до послаблення аеробних окислювальних процесів в гермінативному епітелії та порушення енергетичного забезпечення клітин, що диференціюються. Зміни активності СДГ та ЛДГ поглиблювались за умов синергічної дії алкоголю та ПТЗ, що також мало негативні наслідки для клітинної регуляції процесів сперматогенезу.

Проведені дослідження засвідчують поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів, які на тлі експериментального алкоголізму отримували ПТЗ. Відсоток випадків злушення епітелію в просвіт каналця в групі тварин з хронічним алкоголізмом порівняно з контролем зростав у 4 рази, а групі з введенням ПТЗ у 5 разів; відсоток появи «вікон» збільшувався відповідно у 7 та 9 разів (рис. 13, табл. 8), а кількість сперматогоній знижувалась на 14 % та 20 % (табл. 8).

Крім того, за умов введення ПТЗ порівняно з контролем та тваринами, що вживали алкоголь, знижувались абсолютна і відносна маса епідидимісів ~ 15 % та кількість сперматозоїдів відповідно у 2,4 та 1,6 разів. Встановлено, що рівень експресії гену *CYP2E1* в сім'яниках мав високу негативну кореляцію з величиною сперматогенного індексу ($r = -0,99$; $p = 0,001$) і високу позитивну кореляцію з відсотком випадків злушення епітелію в просвіт каналця ($r = 0,99$; $p = 0,001$).

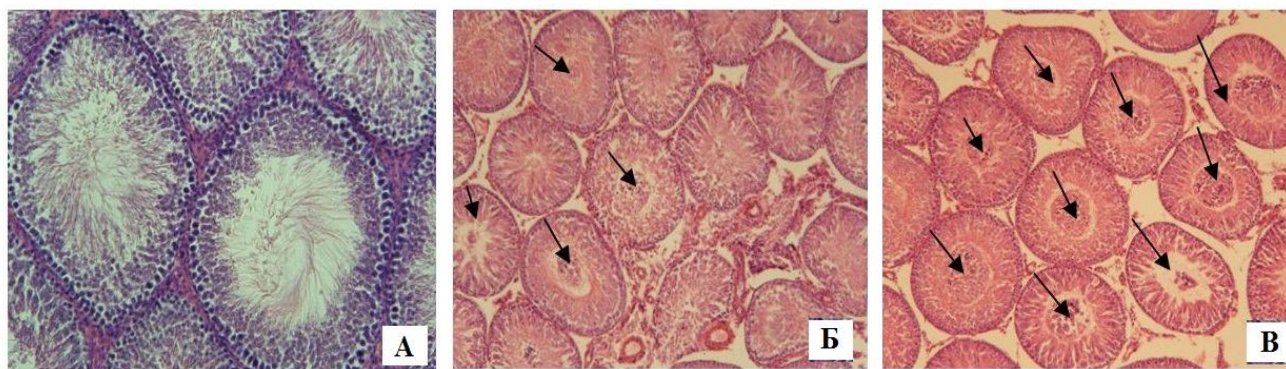


Рис. 13. Структура сім'яних каналців щурів-самців. Фарбування гематоксиліном і еозином. А – Структура сім'яних каналців не змінена. Контрольна тварина. Зб. х 200. Б – Злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналця в сім'янику щура за умов споживання 15 % розчину етанолу протягом 150 днів. Зб. х 100; В – Зростання числа каналців із злушеним сперматогенним епітелієм у просвітах. Сім'яник щура, якому на тлі експериментального хронічного алкоголізму вводили протитуберкульозні засоби. Зб. х 100.

Порушення процесів сперматогенезу та зниження кількості і якості сперматозоїдів у піддослідних щурів-самців призводило до зниження їхньої фертильності. Індекс запліднювальної здатності знижувався порівняно з контролем та групою «хронічний алкоголізм» відповідно у 3,2 та 2,4 разів. За умов парування інтактних самиць із самцями, яким на тлі етанолу вводили ПТЗ, відсоток

доімплантаційної ембріональної загибелі перевищував контрольний рівень більше ніж втричі та дорівнював такому у групі із споживанням самого алкоголю, але постімплантаційна смерть сягала 100 %.

Таблиця 8

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію за введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму ($M \pm m$, $n=6$)

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	Хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм + ПТЗ
Індекс сперматогенезу, загальна кількість стадій сперматогенезу / кількість досліджених каналців	3,623 $\pm$ 0,012	3,523 $\pm$ 0,027*	3,480 $\pm$ 0,019*
Число сперматогоній, на поперечний зріз через каналець	67,605 $\pm$ 0,890	57,845 $\pm$ 1,864*	53,795 $\pm$ 0,697*
Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	2,667 $\pm$ 0,715	2,000 $\pm$ 0,258	1,500 $\pm$ 0,503
Злушений епітелій, %	1,167 $\pm$ 0,447	4,833 $\pm$ 1,537*	6,167 $\pm$ 0,964*
«Вікна», %	0,500 $\pm$ 0,342	3,333 $\pm$ 1,085*	4,667 $\pm$ 0,667*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Отже, введення самцям щурів ПТЗ модулювало вплив довготривалого споживання алкоголю на сперматогенез і посилювало негативні наслідки для потомства.

Вплив протитуберкульозних засобів на репродуктивну функцію самців щурів за умов експериментального діабету I типу. Відомо, що цукровий діабет, як 1 так і 2 типу, є патологією, що супроводжується індукцією CYP2E1 [G.A. Cook et al., 2017; M. Tran and T. Elbarbry, 2016; V. Tomankova et al., 2017]. Відбувається це внаслідок одночасного підвищення рівня кетонових тіл в організмі та зниження рівня інсуліну, здатного пригнічувати транскрипцію гена CYP2E1 [K.J. Woodcroft et al., 2002]. Ефекти діабету на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів, що застосовуються на його тлі, ще не достатньо досліджені і не повністю зрозумілі [M. Tran and T. Elbarbry, 2016].

Дані, наведені на рис. 14 свідчать, що за умов патологічного стану, що супроводжується індукцією CYP2E1 (діабету), сумісне введення ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід) призводило до подальшої стимуляції експресії гену даної ізоформи цитохрому P-450.

У щурів з діабетом було виявлено сильні кореляційні зв'язки між рівнем експресії мРНК CYP2E1 і кількістю сперматогоній ($r = -0,99$; $p = 0,001$) та появою «вікон» ($r = 0,96$; $p = 0,001$), а також середню ($r = 0,65$; $p = 0,01$) та слабку ($r = 0,27$; $p = 0,05$) кореляцію між ступенем експресії гену CYP2E1 та кількістю випадків злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналців і десквамації епітелію від базальної мембрани відповідно. Одночасно посилювався несприятливий вплив ПТЗ на морфо-функціональний стан сім'яників та репродуктивну здатність. Діабет та

ПТЗ, введені на його тлі, викликали кількісні та якісні зміни в сперматогенному епітелії, призводячи до зниження кількості сперматозоїдів відповідно у 1,6 та 2,7 рази порівняно з контролем.

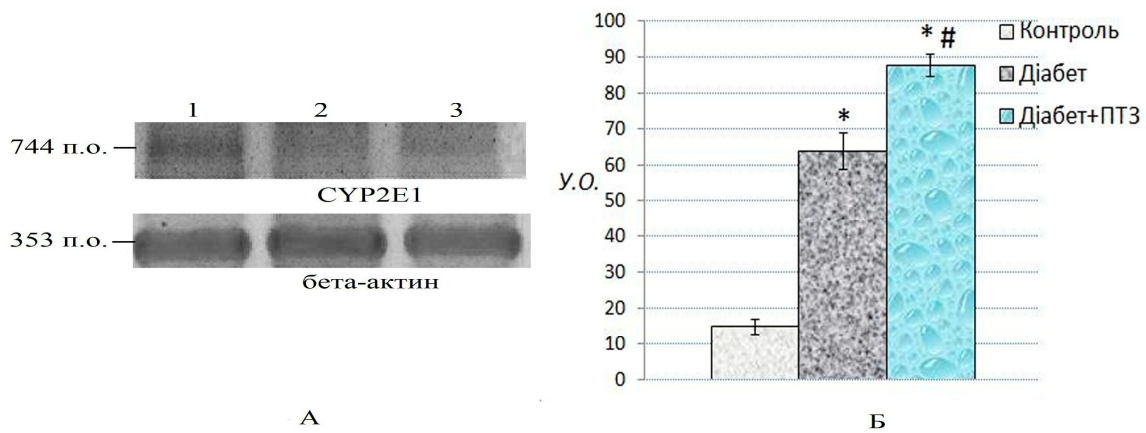


Рис. 14. Рівень експресії мРНК СYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на фоні стрептозотоцинового діабету: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену СYP2E1 та референсного гену β -актину (1 – контроль; 2 – діабет; 3 – діабет + ПТЗ); Б) відносний рівень експресії мРНК СYP2E1 – інтенсивність піку β -актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$). Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Плодовитість самиць, запліднених самцями, яким на тлі СТЗД вводили ПТЗ, порівняно з тваринами з діабетом та контролем знижувалась відповідно на 33 та 47 %. У групі тварин зі СТЗД, яким вводили ПТЗ зафіксована особливо висока летальність плодів після імплантації. Рівень післяімплантаційних втрат в перерахунку на одну самицю був майже в 10 разів вищим ($p \leq 0,05$), ніж у контролі.

Коригуюча дія метіоніну та Метовітану на гонадотоксичні ефекти протитуберкульозних препаратів I ряду та викликані ними порушення репродуктивної функції самців щурів. На підставі встановлених молекулярно-біохімічних механізмів формування тестикулярної дисфункції за введення ПТЗ були визначені пріоритетні мішені фармакологічної корекції. Схема, представлена на рис. 15, узагальнює наші висновки стосовно механізмів ушкодження чоловічої репродуктивної здатності в умовах індукції тестикулярного СYP2E1 ПТЗ. Згідно до неї перспективним є використання препаратів, що володіють антиоксидантними властивостями та одночасно здатні інгібувати СYP2E1.

Нами було оцінено в порівняльному аспекті гонадопротекторні властивості метіоніну та композиції метаболічної дії – Метовітан, що містить у своєму складі метіонін, тіамін, нікотинамід, α -токоферолацетат і сіль цинку, за введення щурам-самцям комбінації ПТЗ.

У таблиці 9 підсумовані дані стосовно тих видів біологічної активності метіоніну та компонентів композиції Метовітан, виходячи з наявності яких нами було передбачено доцільність їх застосування за даних умов експерименту.

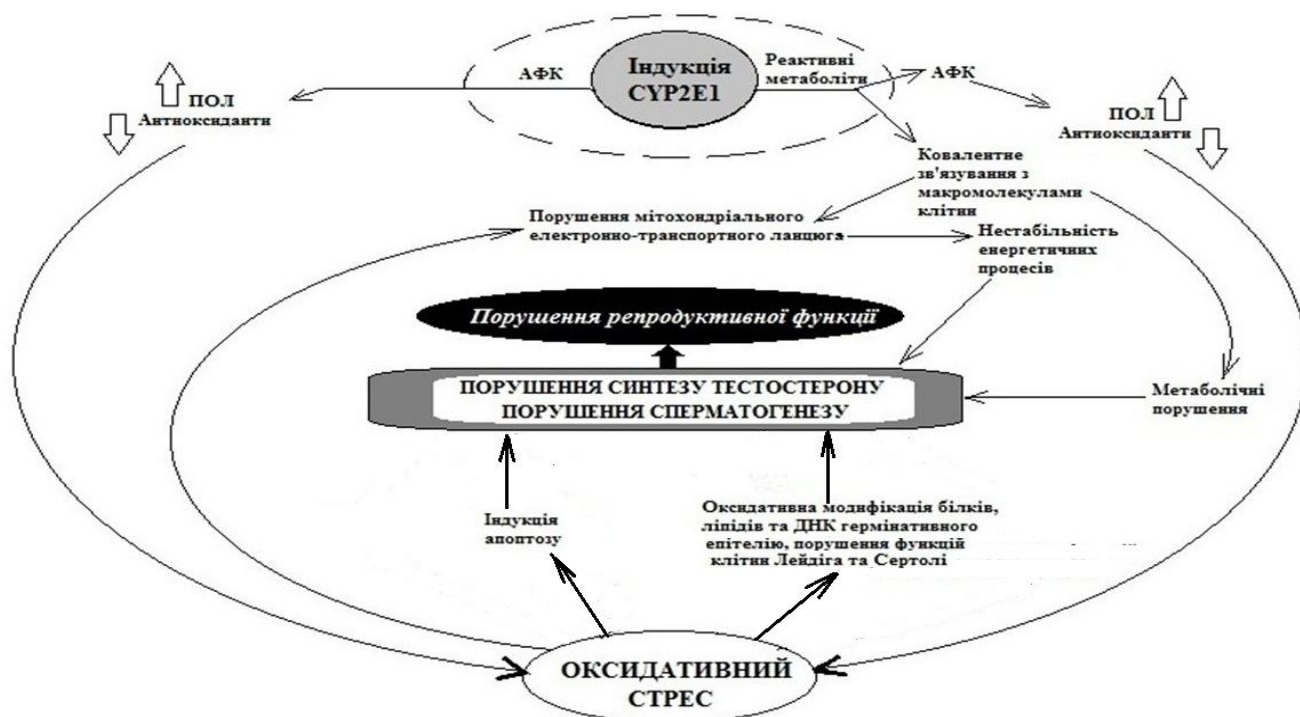


Рис. 15. Індукція CYP2E1 у механізмах побічної дії комбінації ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію.

Таблиця 9

Дані стосовно біологічної активності метіоніну та композиції Метовітан

Речовина	Біологічні властивості
1	2
Метіонін	– попередник синтезу відновленого глутатіону [P.K. Dash et al., 2016]; – регулює метаболічні процеси, приймає участь в ліпідному обміні, активує ендogenous антиоксидантні ферменти [Y. Martínez et al., 2017]; – метаболіт метіоніну – S-аденозилметіонін: неконкурентно та зворотно інгібує CYP2E1 [A.I. Cederbaum, 2010]; донор метильних груп для ДНК [V.M. Kovalenko et al., 2007]; антиоксидант [P.K. Dash et al., 2016]; – гонадопротекторна дія [N.A.M.A. Elnaga, and N.A. Moustafa, 2012].
Тіамін (вітамін B ₁)	– антирадикальна дія [I.L. Jung and I.G. Kim, 2003]; – є критичним для клітинної функції, оскільки його фосфорильована та активна форма – тіамінодифосфат є коензимом для трьох основних ферментів метаболізму глюкози [H. Liu et al., 2017]; – дефіцит тіаміну призводить до індукції CYP2E1 [J.S. Yoo et al., 1990]; – гонадопротекторна дія [K. Oishi et al., 2004].
Нікотин-амід (вітамін B ₃)	– попередник ряду коферментів [N. Philips et al., 2015]; – покращує репарацію ДНК [R. Minocha et al., 2018]; – здатен інгібувати CYP2E1 [C. Gaudineau and K. Auclair, 2004].
α-Токоферолацетат	– антиоксидантна та антирадикальна дія [I.L. Jung and I.G. Kim, 2003] – стабілізатор мембран [P. Poprac et al., 2017]; – гонадопротекторна дія [G.M. Ourique et al., 2016].

1	2
Цинк	– антиоксидантні дія [R.J. Aitken and S.D. Roman, 2008]; – антиапоптотична дія [R.J. Aitken and S.D. Roman, 2008]; – участь в каталітичній функції та/або структурній стійкості ферментів [N.M. Hooper, 2014]; – індукує металіонеїн 2A, попереджуючи розвиток CYP2E1-залежного оксидативного стресу [M.J. Pérez and A.I. Cederbaum, 2003]; – гонадопротекторна дія [K.P. Maremanda et al., 2014].

За умов сумісного введення щурам ПТЗ метіонін та Метовітан показали здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену CYP2E1, а також інгібувати його ензиматичну активність в сім'яниках (рис. 16, 17).

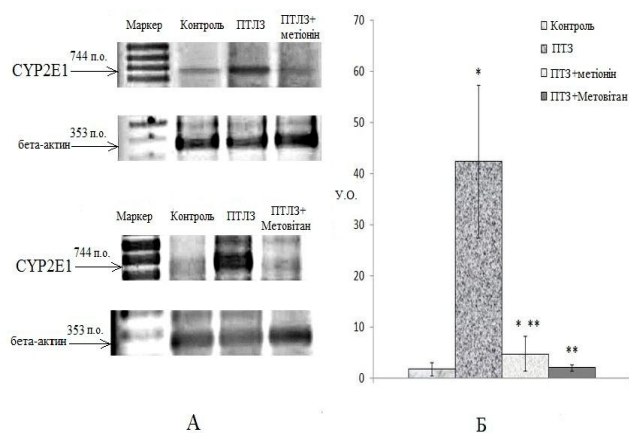


Рис. 16. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення метіоніну та Метовітану на тлі застосування протитуберкульозних засобів: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину; Б) відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 – інтенсивність піку β -актину взято за 100 %.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ.

При цьому, Метовітан виявився більш ефективним у порівнянні з метіоніном. Регуляторний ефект метіоніну та Метовітану стосовно ферментативної активності тестикулярного CYP2E1 реалізується завдяки метаболіту метіоніну – S-аденозилметионіну, який здатен взаємодіяти з CYP2E1, неконкурентно та зворотно інгібуючи його [A.I. Cederbaum, 2010].

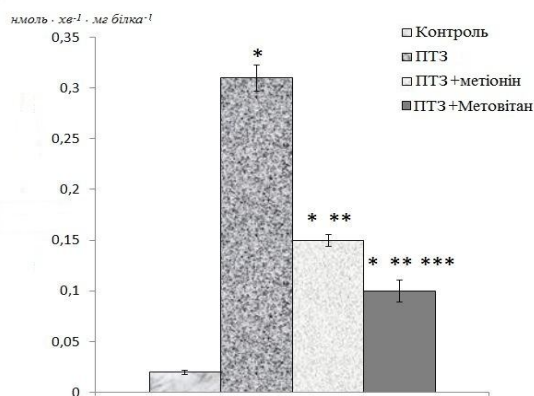


Рис. 17. Активність *n*-нітрофенолгідроксилази в мікросомальній фракції сім'яників щурів за умов введення метіоніну та Метовітану на тлі застосування протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$). Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ; *** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили метіонін.

Більш виражений ефект Метовітану, вочевидь, обумовлений наявністю у складі нікотинаміду, що інгібує ензиматичну активність CYP2E1 шляхом утворення координаційних зв'язків між атомами азоту піридину та заліза гему

[C. Gaudineau and K. Auclair, 2004]. Встановлено також позитивний ефект Метовітану щодо рівня фрагментації ядерної ДНК у сім'яниках щурів, які отримували ПТЗ. За його введення відсоток фрагментації ДНК наближався до контрольних значень. Уведення метіоніну не справляло вираженого впливу на даний показник. Застосування ПТЗ призводило до зниження у сім'яниках активності СОД (-25 % та вмісту відновленого глутатіону (-12 %) за одночасного підвищення швидкості НАДФН-залежного утворення продуктів реакції з ТБК у 1,9 раз. Введення як метіоніну, так і Метовітану попереджало зміни зазначених параметрів (табл. 10).

Таблиця 10

Зміни показників про/антиоксидантної системи сім'яників за умов введення протитуберкульозних засобів та метіоніну або Метовітану, ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показник	Експериментальні групи			
	контроль	ПТЗ	ПТЗ+метіонін	ПТЗ+Метовітан
Активність СОД, У.О. мг білка ⁻¹	124,40±7,17	93,35±5,30*	120,50±3,81**	111,48±2,73**
Відновлений глутатіон, мкмоль мг тканини ⁻¹	3,21±0,06	2,83±0,11*	4,395±0,55**	3,195±0,08**
Швидкість утворення продуктів реакції з ТБК, нмоль хв ⁻¹ мг білка ⁻¹	0,120±0,018	0,223±0,015*	0,112±0,002**	0,114±0,005**

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ.

Згідно даних гістоморфологічних досліджень сім'яників Метовітан більш результативно, ніж метіонін, сприяв збереженню цілісності сперматогенного епітелію (табл. 11).

Таблиця 11

Кількісні зміни у сперматогенному епітелії за умов введення протитуберкульозних засобів та метіоніну або Метовітану, ($M \pm m$, $n=8$)

Показники	Експериментальні групи			
	контроль	ПТЗ	ПТЗ+метіонін	ПТЗ+Метовітан
Індекс сперматогенезу, заг. кільк. стадій сперматогенезу / кільк. досліджених канальців	3,64±0,01	3,53±0,01*	3,55±0,01*	3,62±0,01** ***
Число сперматогоній, на зріз через каналець	69,39±0,75	59,57±0,86*	60,16±0,37*	65,93±1,16** ***
Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	3,56±0,36	2,41±0,28*	5,00±0,41* **	2,33±0,37* ***
Злущений епітелій, %	1,06±0,25	2,88±0,28*	1,00±0,71	1,66±0,54
Відшарування епітелію, %	0,31±0,12	1,88±0,36*	2,00±0,71	0,83±0,48**
«Вікна», %	0,50±0,16	1,76±0,26*	1,24±0,49	0,50±0,25**

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ; *** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили метіонін.

Покращуючи стан сперматогенного епітелію, обидва препарати сприяли підвищенню кількості сперматозоїдів (у 2 рази) та фертильності самців (в середньому на 22 %) порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ. Таким чином, метіонін і Метовітан, послаблювали гонадотоксичні ефекти ПТЗ, що згідно отриманих даних можна пояснити їх модулюючим впливом на тестикулярний CYP2E1, а також потужними антиоксидантними властивостями. Більш виражений вплив Метовітану може бути обумовлений синергічним ефектом його складових. Отримані результати обґрунтовують перспективність використання речовин, які володіють інгібіторними стосовно CYP2E1 та антиоксидантними властивостями у схемах лікування та профілактики чоловічої субфертильності та інфертильності за умов застосування хіміотерапевтичних засобів, здатних індукувати CYP2E1 та станів, що супроводжуються індукцією даного ізоензиму.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено комплексну експериментальну оцінку впливу протитуберкульозних засобів I ряду на чоловічу репродуктивну функцію. Встановлено наявність негативних побічних ефектів на сім'яники, фертильність і антенатальний розвиток потомства та визначено ключові механізми, залучені до їх розвитку. Надано експериментально-теоретичне обґрунтування підходів до фармакологічної корекції, виявлених порушень.

1. Порівняльне дослідження ефектів нарізного та сумісного застосування етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду у терапевтичних дозах протягом періоду сперматогенезу виявило, що сумісне введення викликає найбільш тяжкі морфологічні порушення в сім'яниках щурів та найбільше, порівняно з контролем, зниження продукції сперматозоїдів (втричі), їх життєздатності (-74 %; $p \leq 0,05$) та часу рухливості (-80 %; $p \leq 0,05$), значно обмежує фертильність самців (-80 %; $p \leq 0,05$) та стимулює зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності їх потомства (-55 % та -73 % відповідно; $p \leq 0,05$). Ключова роль в реалізації виявлених порушень належить етамбутолу.

2. Перебіг, викликаних протитуберкульозними засобами порушень чоловічої репродуктивної функції характеризується змінами в сім'яниках щурів на біохімічному рівні, а саме, зниженням активності СОД та зростанням активності глутатіон-S-трансферази (більше ніж на 30 %; $p \leq 0,05$), виснаженням пулу відновленого глутатіону, посиленням ПОЛ, засвідчуючи розбалансування тестикулярної про/антиоксидантної системи. Як нарізне, так і сумісне введення досліджуваних препаратів призводить до зростання фрагментації ДНК у клітинах сім'яників, а отже активації процесів апоптозу.

3. Як за нарізного введення етамбутолу та ізоніазиду, так і за умов введення комбінації протитуберкульозних засобів зростає тестикулярна експресія мРНК і протеїну CYP2E1, а також його ензиматична активність порівняно з групою контролю, що свідчить про індукцію даної ізоформи. Встановлена висока негативна кореляція між рівнем експресії гену CYP2E1 у сім'яниках та кількістю сперматозоїдів ($r = -0,87$; $p = 0,001$).

4. Виявлені на молекулярному та біохімічному рівнях зміни у сім'яниках за умов нарізного введення етамбутолу, ізоніазиду та комбінації протитуберкульозних засобів супроводжуються зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові в 1,6-2,8 рази ($p \leq 0,05$), відносно контролю, що одночасно з дегенерацією сперматоцитів і округлих сперматид є свідченням порушення андрогенної та фертильної функції сім'яників.

5. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації досліджуваних препаратів сприяє зменшенню негативного впливу на сім'яники: зниження відсотку випадків відшарування сперматогенного епітелію (-37 %; $p \leq 0,05$) та його злушення в просвіт каналців (-18 %; $p \leq 0,05$), збільшенню кількості та життєздатності сперматозоїдів до контрольного рівня, а також репродуктивну здатність щурів-самців та загальний рівень ембріо-фетальної смертності їх потомства (відповідно +69 % та -59,5 % порівняно з комбінацією, що містить етамбутол; $p \leq 0,05$). За введення стрептоміцину, на відміну від етамбутолу, не виявлено зростання експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках.

6. Сумісне введення протитуберкульозних засобів за екзогенної індукції CYP2E1 (експериментальний алкоголізм) призводить до поглиблення порушень сперматогенезу та нормоспермії, погіршення фертильності самців і 100 %-ної післяімплантаційної загибелі їх потомства. На цьому тлі, порівняно з групою «хронічний алкоголізм», відбувається прогресуюче зростання печінкової та тестикулярної експресії гену та протеїну CYP2E1 та його каталітичної активності, що супроводжується змінами у сім'яниках на молекулярному та біохімічному рівні: збільшення рівня фрагментації ДНК, порушення про- та антиоксидантної рівноваги, пригнічення активності СДГ.

7. Ендогенна індукція CYP2E1 за умов експериментального діабету I типу призводить до посилення несприятливого впливу на морфо-функціональний стан сім'яників та репродуктивну здатність щурів-самців. Між рівнем експресії гену CYP2E1 і кількістю сперматогоній, а також проявами порушення диференціації клітин сперматогенного епітелію (наявність вакуолей) виявлено сильні кореляційні зв'язки ($r = -0,99$; $p = 0,001$ та $r = 0,96$; $p = 0,001$ відповідно) та кореляцію середнього ступеня з кількістю випадків злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналців ($r = 0,65$; $p = 0,01$).

8. Курсове застосування метіоніну та Метовітану, що мають антиоксидантну дію та здатність інгібувати CYP2E1, на тлі введення протитуберкульозних засобів протягом періоду сперматогенезу сприяє збереженню цілісності сперматогенного епітелію, приводячи до підвищення кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісів (у 2 рази; $p \leq 0,05$) та запліднювальної здатності щурів-самців (+20 %; $p \leq 0,05$) порівняно з групою тварин без лікування.

9. Метіонін та Метовітан за введення щурам протитуберкульозних засобів виявляють здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену CYP2E1 (відповідно у 8,7 та 20 разів; $p \leq 0,05$) та знижувати його ензиматичну активність в сім'яниках (відповідно у 2 та 3 рази; $p \leq 0,05$), попереджуючи порушення стану про/антиоксидантної системи сім'яників завдяки відновленню активності СОД, збільшенню вмісту відновленого глутатіону та нормалізації показника ПОЛ, що

обґрунтовує доцільність лікувально-профілактичного застосування як гонадопротекторів біологічно активних препаратів з антиоксидантними властивостями та здатних інгібувати CYP2E1.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Пропонується за умов проведення фармакотерапії туберкульозу з використанням комбінації етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду здійснювати періодичний аналіз еякуляту та визначати характеристики клітинних елементів сперми з метою прогнозування та своєчасного забезпечення профілактично-лікувальних заходів щодо репродуктивної функції чоловіків (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №286-2010).

2. З метою запобігання ризиків розвитку чоловічого безпліддя та опосередкованого через батька негативного впливу на потомство ПТЗ I ряду (рифампіцину, ізоніазиду, піразинаміду, етамбутолу) за їх сумісного застосування у чоловіків репродуктивного віку, запропоновано прийняти до уваги можливість заміни етамбутолу на стрептоміцин, якщо це не знижуватиме ефективність терапії основного захворювання (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №295-2011).

3. За умов прийому токсичних хіміотерапевтичних засобів, що індукують CYP2E1 та станів, які характеризуються індукцією даної ізоформи для профілактики та лікування чоловічої субфертильності та інфертильності перспективним може бути застосування речовин, які володіють інгібіторними властивостями стосовно CYP2E1 (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2018).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Bondarenko, L.B., Shayakhmetova, G.M., Byshovets, T.F., & Kovalenko, V.M. (2011). Pyrazinamide-mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices. *Acta Poloniae Pharmaceut Drug Res*, 68, 285-290. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків та подальших перспектив, участь у підготовці статті до друку).

2. Шаяхметова, Г.М., Блажчук, І.С., Матвієнко, А.В., & Коваленко, В.М. (2011). Структурно-функціональні показники сім'яників та репродуктивна здатність самців щурів за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 3(22), 67-72 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

3. Шаяхметова, Г. (2011). Експресія цитохрому Р-450 2E1 у сім'яниках та репродуктивна здатність щурів-самців за умов введення ізоніазиду. *Вісник*

Київського національного університету імені Т. Шевченка. Серія: Біологія, 58, 51-53.

4. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, І.С., & Коваленко, В.М. (2011). Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад щурів-самців. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 6(25), 35-40 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

5. Бондаренко, Л.Б., Шаяхметова, А.М., Анисимова, С.И., & Коваленко, В.Н. (2012). Влияние пиразинамида на аминокислотный состав коллагена и показатели сперматогенеза у крыс. *Актуальные проблемы биологии: мат. II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Чуваш. гос. пед. ун-т; под. ред. М.Н. Лежниной. Чебоксары: Чуваш. гос. пед. ун-т*, 42-46 (Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка отриманих даних).

6. Shayakhmetova, G., Bondarenko, L., & Kovalenko, V. (2012). Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(1), 9-14 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

7. Bondarenko, L.B., Shayakhmetova, G.M., Byshovets, T.F., & Kovalenko, V.M. (2012). Pyrazinamide potential effects on male rats DNA fragmentation, bone type I collagen amino acid composition, reproductive capability and posterity antenatal and postnatal development. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69(5), 843-850. (Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка отриманих даних).

8. Bondarenko, L.B., Shayakhmetova, G.M., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.M. (2012). Diabetes-mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*, 19(3), 245-254. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків та подальших перспектив, участь у підготовці статті до друку).

9. Шаяхметова, Г.М. (2012) Роль ізоформ цитохрому Р-450 у механізмах токсичної дії ксенобіотиків на чоловічу репродуктивну функцію. *Современные проблемы токсикологии*, 2, 28-35.

10. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., Матвієнко, А.В., & Коваленко, В.М. (2012). Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках щурів та стан їх сперматогенного епітелію. *Одеський медичний журнал*, 4, 11-14 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

11. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., & Коваленко, В.М. (2012). Зміни структури сполучнотканинних білків та тестикулярної експресії цитохрому Р450

2E1 у щурів з алкоголь-індукованим ушкодженням сперматогенного епітелію. *Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання медицини: проблеми, гіпотези, дослідження» 26-27 жовтня 2012 року*, 114-117 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

12. Shayakhmetova, G.M. Bondarenko, L.B., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.M. (2012). Reproductive Disorders in Streptozotocin-Treated Male Rats Following Co-Administration of Ethambutol, Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*, 19(4), 405-415 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

13. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, І.С., & Коваленко, В.М. (2012). Роль цитохрому Р-450 2E1 у порушенні репродуктивної здатності щурів-самців зі стрептозотоциновим діабетом. *Український морфологічний альманах*, 10(3), 114-116 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

14. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Kovalenko, V.M., & Ruschak, V.V. (2013). CYP2E1 testis expression and alcohol-mediated changes of rat spermatogenesis indices and type I collagen. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(2), 237-245 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

15. Shayakhmetova, G.M., & Bondarenko, L.B. (2013). Cytochrome P4502E1 and other xenobiotics metabolizing isoforms in pathogenesis of male reproductive disorders. *J Physiobiochem Metab*, 2:1. doi: http://dx.doi.org/10.4172/2324_8793_2 (Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції роботи, пошук наукової інформації, аналіз та узагальнення інформації, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

16. Шаяхметова, Г.М. (2013). Вплив етамбутолу на структурно-функціональні показники гонад та фертильність щурів-самців. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 6(36), 45-50.

17. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.M. (2014). Correlation between spermatogenesis disorders and rat testes CYP2E1 mRNA contents under experimental alcoholism or type I diabetes. *Advances in Medical Sciences*, 59(2), 183-189 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

18. Шаяхметова, Г.М. (2014). Зв'язок між експресією мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках і фертильністю щурів за умов окремого та сумісного введення протитуберкульозних засобів. *Досягнення біології та медицини*, 1(23), 17-21.

19. Shayakhmetova, G.M. (2014). Testicular damage in rats after co-administration of antituberculosis drugs in different combinations. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 2(38), 70-76.

20. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.M. (2014). Chronic alcoholism-mediated metabolic disorders in albino rat testes. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(3), 165-172 (*Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку*).

21. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Kovalenko, V.M., Kharchenko, O.I., Bohun, L. I., & Omelchenko, Y. O. (2015). Multiparameter rodent chronic model for complex evaluation of alcoholism-mediated metabolic violations. *Journal of Basic and Clinical physiology and Pharmacology*, 26(1), 43-51 (*Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку*).

22. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Voronina, A.K., Anisimova, S.I., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.M. (2015). Induction of CYP2E1 in testes of isoniazid-treated rats as possible cause of testicular disorders. *Toxicology Letters*, 234(2), 59-66 (*Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку*).

23. Shayakhmetova, G.M. (2015) Disorders of antenatal and postnatal development in long-term alcohol exposed male Wistar rats' offspring. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 1(69), 82-87.

24. Shayakhmetova, G.M., & Bondarenko, L.B. (2016). Chapter 27 – Metabolic Changes in Alcohol Gonadotoxicity. In *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition*. Ed. By Vinood B. Patel. Elsevier: London, 337-354 (*Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції роботи, пошук наукової інформації, її аналіз та узагальнення, проведення експериментів, формулювання висновків, підготовка розділу в колективній монографії до друку*).

25. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Kovalenko, V.M., & Ruschak, V.V. (2016). Anti-Tuberculosis Drugs Co-Administration Aggravates the Testicular Toxicity of Ethanol in Rats. *Annals of Public Health and Research*, 3(1), 1032 (*Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку*).

26. Shayakhmetova, G. (2016). Comparative investigation of anti-tuberculosis drugs effects on testicular CYP2E1 expression and male reproductive parameters under separate and combined administration in male rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Biology*, 72(2), 80-85.

27. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Voronina, A.K., Matvienko, A.V., Kitam, V., & Kovalenko, V.M. (2017). Repeated administration of ethambutol in therapeutic dose causes testes alteration and spermatogenesis disruption in Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology*, 36(5), 520-533 (*Особистий внесок дисертанта:*

планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

28. Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Voronina, A.K., & Kovalenko, V.M. (2017). Comparative investigation of methionine and novel formulation Metovitan protective effects in Wistar rats with testicular and epididymal toxicity induced by anti-tuberculosis drugs co-administration. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 222-230 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку).

29. Шаяхметова, Г.М. (2017). Етанол-індукована перебудова метаболізму: наслідки для репродуктивної функції. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 6(56), 3-14.

30. Шаяхметова, Г.М. (2018). Порівняльна оцінка впливу протитуберкульозних засобів на експресію CYP2E1 і стан сперматогенного епітелію за умов введення щурам-самцям у двох комбінаціях, що містять етамбутол або стрептоміцин. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 2(38), 79-85.

31. Шаяхметова, Г.М. Коваленко, В.М., & Ципкун А.Г. (2010). Контроль стану спермограми за умов фармакотерапії туберкульозу етамбутолом, рифампіцином та ізоніазидом та піразинамідом (експериментальні дані). Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №286-2010 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, аналіз і узагальнення отриманих даних, формулювання висновків, підготовка інформаційного листа до друку).

32. Шаяхметова, Г.М. Коваленко, В.М. (2011). Зниження негативного впливу комбінації протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну здатність шляхом заміни етамбутолу на стрептоміцин (експериментальне дослідження). Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №295-2011 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, аналіз і узагальнення отриманих даних, формулювання висновків, підготовка інформаційного листа до друку).

33. Шаяхметова, Г.М. Коваленко, В.М. (2018). Корируюча дія метіоніну та метовітану стосовно побічних ефектів на сім'яники протитуберкульозних засобів I ряду. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2018 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, аналіз і узагальнення отриманих даних, формулювання висновків, підготовка листа до друку).

34. Shayakhmetova G., Byshovetz T., Voronina A., Matvienko, A., & Kovalenko V. (2008). Cytochrome P450 2E1-mediated reproductive toxicity of pyrazinamide in male and female rats. *Drug Metabolism Reviews: abstracts from the 15th North American Regional ISSX Meeting abstracts from the 15th North American Regional ISSX Meeting, San Diego, California, October 12-16, 2008*, 40, 187-188 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

35. Shayakhmetova, G., Bondarenko, L., Byshovetz, T., Matvienko, A., & Kovalenko, V. (2009). Male and female reproductive toxicity of antitubercular agent mediated by cytochrome P450 2E1. *International Journal of Infectious Diseases: Abstracts of 3rd Ditan International Conference on Infectious Diseases, 30 July 2009 - 02 August 2009, 13, S104* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

36. Шаяхметова, Г.М., Бишовець, Т.Ф., Блажчук, І.С., & Коваленко, В.М. (2009). Токсична дія протитуберкульозних засобів, введених у режимі ДОТС-терапії на фертильність та життєздатність потомства білих щурів-самців. *Матеріали Ювілейного X З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, м. Євпаторія, 24-27 вересня 2009 року, 385* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

37. Shayakhmetova, G., Byshovetz, T., Voronina, A., & Kovalenko, V. (2009). Possible role of CYP450 2E1-induction in adverse reaction on reproductive system of male and female rats. In *Journal of Physiological Sciences, Proceedings of the XXXVI international Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) Function of life: Elements and Integration, July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan, 59, 335* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

38. Shayakhmetova, G.M., Shvachko, L.P., Bondarenko, L.B., Blazchuk, I.S., Anisimova, S.I., Matata, O.V., & Kovalenko, V.M. (2010). Possible Role of CYP2E1 in Effects of Paternal Exposure to Alcohol on Offspring Development: p095. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research, abstracts of 2010 ISBRA World Congress, 34(8), 113A* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

39. Шаяхметова Г.М. Блажчук, І.С. Матвієнко, А.В., & Коваленко, В.М. (2010). Можлива роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у розвитку репродуктивної токсичності (експериментальне дослідження). *Матеріали XIII Конгресу світової федерації лікарських товариств, м. Львів, 30 вересня – 03 жовтня 2010 р. Київ: КПП «Друкар», 619* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

40. Bondarenko, L.B. Shayakhmetova, G.M., Byshovetz, T.F., & Kovalenko, V.M. (2010). Antitubercular agent mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices. *International Journal of Infectious Diseases: Abstracts of 4th DICID 30 July 2010, Begin, 14, S89* (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків, участь у підготовці тез доповіді).

41. Bondarenko, L., Shayakhmetova, G., Byshovets, T., & Kovalenko, V. (2011). PP-197 Pyrazinamide-mediated alterations in male rats DNA fragmentation processes, bone collagen amino acid composition, reproductive capability and posterity antenatal

and postnatal development. *International Journal of Infectious Diseases: Abstracts of 5th DICI 14-17 July 2011, Begin*, 15, S99-S100 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків, участь у підготовці тез доповіді).

42. Шаяхметова, Г.М. (2011). Репродуктивна здатність самців-щурів та експресія мРНК цитохромів Р-450 2Е1, 2С23 та 3А2 у сім'яниках умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину. *Фармакологія та лікарська токсикологія. Тези доповідей IV Національного з'їзду фармакологів України, Київ, 10-12 жовтня 2011 р.*, 5(24), 350-352.

43. Шаяхметова, Г.М., Анісімова, С.І., Блажчук, І.С., Карацуба, Т.А., Вороніна, А.К., Волошина, О.С., Сайфетдінова, Г.А., ...Бондаренко, Л.Б. (2011). Вплив ізоніазиду на експресію цитохрому Р-450 2Е1 у сім'яниках та репродуктивну здатність щурів-самців. *Українські медичні вісті. Матеріали XI з'їзду ВУЛТ, м. Харків, 28 вересня – 30 вересня 2011 р.*, 9, 287 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

44. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, І.С., & Коваленко, В.М. (2011). Вплив сумісного введення протитуберкульозних лікарських засобів на фрагментацію ДНК в сім'яниках і епідидимісах та фертильність щурів-самців. *Сучасні проблеми токсикології. Матеріали III з'їзду токсикологів України, м. Київ, 18 вересня – 19 грудня 2011 р.*, 5, 134-135 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

45. Шаяхметова, А.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, І.С., Матвиенко, А.В., & Коваленко, В.М. (2012). Изменения в сперматогенном эпителии крыс, вызванные модуляцией экспрессии изоферментов цитохрома Р-450 в семенниках. *Тезисы докладов междисциплинарной научной конференции «Адаптационные стратегии живых систем», Новый Свет, Крым, Украина, 11-16 июня 2012. К: MavisPublisher*, 195-196 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

46. Shayakhmetova, G., Bondarenko, L., Matvienko, A., & Kovalenko, V. (2012). Effects of antitubercular agents co-administration on the expression of cytochrome P450 isoforms and spermatogenic epithelium state in rats testes. *Drug Metabolism Reviews: Abstracts of 18th North American regional ISSX Meeting, October 14-18, 2012, Dallas, Texas*, 44, 111 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

47. Шаяхметова, А.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, І.С., Матвиенко, А.В., & Коваленко, В.Н. (2013). Гонадопротекторное действие метионина и композиции биологически активных веществ «Метовитана» при введении комбинации противотуберкулёзных препаратов белым крысам самцам. *Тезисы докладов конференции «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Новый Свет, Крым, Украина, 27*

мая – 1 июня 2013 г., К: Mavis Publisher, 293-294 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

48. Anisimova S.I., Shayakhmetova, G.M., Bondarenko L.B., Matvienko, A.V., & Kovalenko, V.N. (2013) Correlation between spermatogenesis disorders and CYP2E1 mRNA expression in rats testes following chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, 48, P.i29 (Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих даних).

49. Shayakhmetova, G., Voronina, A., Bondarenko, L., & Kovalenko, V. (2013). Role of alcohol-mediated rat testes CYP2E1 induction in changes of spermatogenesis indices and type I collagen. *Toxicology Letters: Abstracts of the 49th Congress of EUROTOX, Interlaken, Switzerland, 1st-4th September 2013*, 221, S214 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

50. Shayakhmetova, G.M., Voronina, A.K., Anisimova, S.I., Kovalenko, V.M., & Kitam, V. (2015). Ethambutol induces CYP2E1: computational modeling and in vivo investigation. *Drug Metabolism Reviews: Abstract from 19th North American ISSX and 29th JSSX Meeting, October 19-23, 2014, San Francisco, California, USA*, 47, 76. (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

51. Shayakhmetova, G.M. Bondarenko, L.B., Blazchuk, I.S., & Kovalenko, V.M. (2015) Composition of biologically active substances and microelements «Metovitan» alleviates gonadotoxic effects of antituberculosis drugs in albino male rats. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Бабенківські читання», Івано-Франківськ, 29-30 жовтня 2015 року*, 122 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді).

52. Voronina, A.K., Shayakhmetova, G.M., & Kovalenko, V.M. (2016). Behavioral disorders in long-term alcohol exposed male rats' offspring. *European Neuropsychopharmacology*, 26, S670 (Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих даних, підготовка тез доповіді).

53. Шаяхметова, Г.М., Блажчук, І.С., & Коваленко, В.М. (2016). Попередження індукованих введенням протитуберкульозних засобів порушень про- та антиоксидантної системи сім'яників щурів при застосуванні метіоніну та Метовітану. *Тези за матеріалами Всеукраїнської науково-практичної конференції «Креативні напрямки в діагностиці патогенезі, лікуванні та профілактиці внутрішніх хвороб», 29-30 вересня 2016 р., Запоріжжя*, 25 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді до друку).

54. Shayakhmetova, G.M. (2017). Role of CYP2E1 induction in pathogenesis of testicular toxicity. *Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України, 18-20 жовтня 2017, м. Запоріжжя*, 137-138.

55. Shayakhmetova, G., Bondarenko, L., Rushchak, V., & Kovalenko, V. (2018). Modulation of Ethanol Negative Impacts on Testes and Reproductive Function of Alcoholic Rats Treated With Antituberculosis Drugs. *International Journal of Toxicology Abstracts of American College of Toxicology 38th Annual Meeting, November 5-8, 2017, Palm Springs, California, USA*, 37(1), 72-73 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді до друку).

56. Басовська, О., Калачінська, М., Шаяхметова, Г., & Бондаренко, Л. (2018) Рівень фрагментації ДНК за умов різних патологічних станів та лікарських засобів. «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances»: збірник тез XVI Міжнародної конференції студентів та молодих вчених, м. Київ, 24-27 квітня 2018 р. Київ: ПАЛИВОДА А.В., 120-121 (Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, планування та проведення експериментів).

57. Шаяхметова, Г.М., Блажчук, І.С., Карацуба, Т.А., Бондаренко, Л.Б., & Коваленко В.М. (2018). Вплив сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину на репродуктивну здатність самців щурів та експресію мРНК цитохромів Р-450 2E1, 2C23, та 3A2 у їх сім'яниках. *Збірник тез наукових робіт міжнародної науково-практичної конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI столітті», 20-21 квітня, м. Одеса, 7* (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді до друку).

АНОТАЦІЯ

Шаяхметова Г.М. Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ – 2018.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному визначенню особливостей реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів (ПТЗ) І ряду на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтуванню підходів до її фармакологічної корекції.

В дослідях на щурах-самцях встановлено, що комбіноване застосування етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду в терапевтичних дозах протягом періоду сперматогенезу виявляє побічну дію на чоловічу репродуктивну

функцію (пригнічення тестостерон-продукуючої функції сім'яників, порушення диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії, зниження фертильності, зростання ембріо-фетальної смертності потомства). Важливу роль в цих порушеннях відіграє індукція CYP2E1 в сім'яниках, яка призводить до розбалансування про/антиоксидантної системи та слугує тригером апоптотичних процесів. За умов екзогенної та ендогенної індукції CYP2E1 (експериментальні хронічний алкоголізм та діабет) негативні ефекти ПТЗ зростають. Визначено пріоритетні мішені фармакологічної корекції, виявлених порушень та обґрунтовано доцільність профілактично-лікувального застосування, як гонадопротекторів біологічно активних препаратів, що мають антиоксидантні властивості, а також здатні інгібувати CYP2E1.

Ключові слова: етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, стрептоміцин, експериментальний хронічний алкоголізм, стрептозотоциновий діабет, метіонін, Метовітан, цитохром P-450 2E1, сім'яники, епідидиміси, чоловіча репродуктивна функція.

SUMMARY

Shayakhmetova G.M. The particularities of the adverse antituberculosis drugs reactions on male reproductive function and proof of the approaches to their pharmacological correction (experimental study). – Manuscript.

Thesis for scientific degree of Doctor of Biological Sciences in specialty 14.03.05 – Pharmacology. – SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine», Kyiv – 2018.

The dissertation describes the experimental foundation of the particularities of the adverse antituberculosis drugs reactions on male reproductive function and proof of the approaches to their pharmacological correction.

Apparently, it has been established that combination of the first line anti-tuberculosis drugs (ATD) – ethambutol, isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide (in comparison with single administration) significantly increased in severity of morphological disorders in spermatogenic epithelium; decreased in the sperm production (threefold); decreased in sperm viability (by 74%) and mobility time (by 80%). These changes altogether led to a fatal limitation of male rats fertility (fertilization index dropped to 17%), a decreasing of the fertility of the females that were previously fertilized by the male rats by 81% and a significant increasing of the levels of pre- and post-implantational embryonic mortality by 55% and 73%, respectively. Importantly, among the ATD drugs, ethambutol and isoniazid play a major role in reproductive toxicity formation. Overall, the obtained data make it possible to conclude that co-administration of ATD drugs in male rats leads to a testicular CYP2E1 induction. That has been proven by a significant increase in expression of CYP2E1 mRNA as well as protein itself, moreover its enzymatic activity has been also elevated in testicular cells.

It was also found out that among the ATD used as a combination in tuberculosis polychemotherapy, the highest potency to induce CYP2E1 production and the most severe testicular toxicity were found for isoniazid and ethambutol. Apart from the

induction of testicular CYP2E1 enzyme, the co-administration of 4 antituberculosis drugs, as well as a single administration of ethambutol and isoniazid were accompanied by several pathological processes, namely an imbalance between pro- and antioxidant systems in the testes tissues (decrease in SOD activity and quantity of reduced glutathione; increase in glutathione-*S*-transferase activity as well as lipid peroxidation activation), an intensification in the testes cells of the DNA fragmentation, and a decrease in total serum testosterone 1.6-2.8 folds.

In contrast, it was observed that a single administration of streptomycin, unlike ethambutol, did not influence on expression of CYP2E1 mRNA in testes. Furthermore, the replacement of ethambutol by streptomycin, when combined with ATD, even reduced the negative influence on biochemical parameters of rats' testes, their morpho-functional state, reproductive capacity of the male rats and embryo-fetal development of their offspring.

Basically, administration of the ATD combination into male rats having experimental chronic alcoholism led to a progressive increase in hepatic and testicular CYP2E1 gene expression level 5 and 5.9 folds, respectively, as well as an elevation 1.5 folds of *p*-nitrophenol hydroxylase (a marker of CYP2E1) activity in microsomal fraction of liver cells as compared with rats, which consumed alcohol without ATD, and tripled elevation in comparison with the control group.

In general, the results of the investigations evident the worsening in abnormalities of spermatogenic epithelium cells differentiation and disturbances in normospermia in alcoholic rats, that received a combination of ATD. The histological examination of spermatogenic epithelium revealed that in group of animals with chronic alcoholism proportion of epithelium exfoliation into the lumen of tubules was increased 4 folds, while in the group with administration of ATD – 5 folds; proportion of the vacuoles occurrences rose 7 and 9 folds in each group, respectively; the number of spermatogonia decreased in 14% and 20% in comparison with control. Spermatogenetic disorders as well as reduction of sperm quantity and quality in male rats receiving ATD with ethanol exposure, led to a significant decrease in fertility and 100% post-implantation death of offspring, when mated with intact females.

Additionally, it has been demonstrated that experimental streptozotocin diabetes in rats caused an increase in CYP2E1 mRNA expression in the testes threefold in comparison with control. This was accompanied by a significant increase in testicular DNA damage. Interestingly, the co-administration of ATD drugs under diabetes led to further stimulation of CYP2E1 gene expression and changes in level and nature of nuclear DNA fragmentation in gonads. Taking all these facts into consideration, the obtained data proved more severe adverse reactions of ATD on testes morpho-functional state and reproductive capacity of male rats with diabetes.

More than that, it has been found on different experimental models, that an expression level of CYP2E1 gene in testes had a high negative correlation with the value of spermatogenic index ($r = -0.99$, $p = 0.001$), the number of spermatogonia ($r = -0.99$, $p = 0.001$) and the number of spermatozoa ($r = -0.87$, $p = 0.001$), as well as a high positive correlation with the percentage of epithelium exfoliation into tubules' lumens ($r = 0.99$; $p = 0.001$) and vacuoles occurrence ($r = 0.96$; $p = 0.001$). Overall, our data,

including the data regarding the correlation between CYP2E1 mRNA expression in testis and spermatogenic abnormalities, indicate the involvement of this enzyme in pathogenetic mechanisms of testicular disorders and male infertility.

Finally, the investigations of the drugs capable to inhibit CYP2E1 demonstrated that effects on reproductive function of male rats with ATD administration included following: 1. Methionine and a composition of biologically active substances – Metovitan inhibited transcriptional activation of CYP2E1 gene and its enzymatic activity in testes, thereby preventing changes in testicular pro/antioxidant systems. Moreover, Metovitan inhibited expression of CYP2E1 mRNA and its catalytic activity more efficiently compared with methionine. Accordingly, it contributed to the maintenance of the seminiferous epithelium integrity, the increase of sperm count and the enhance of male rats fertility. As such, these promising results are serving as the experimental proof of prospective use of substances that inhibit such enzyme isoform and have antioxidant properties in the treatments of male subfertility and infertility, especially in the case of receiving chemotherapeutic agents capable to induce CYP2E1 and conditions associated with its induction.

Key words: ethambutol, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, streptomycin, experimental chronic alcoholism, streptozotocin diabetes, methionine, Metovitan, cytochrome P-450 2E1, testicles, epididymis, male reproductive function.

АННОТАЦИЯ

Шаяхметова А.М. Особенности реализации побочного действия противотуберкулезных средств на мужскую репродуктивную функцию и обоснование подходов к ее фармакологической коррекции (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев – 2018.

Диссертационная работа посвящена экспериментальному определению особенностей реализации побочного действия противотуберкулезных средств (ПТС) и ряда на мужскую репродуктивную функцию и обоснованию подходов к ее фармакологической коррекции.

В опытах на крысах-самцах установлено, что комбинированное применение этамбутола, изониазида, рифампицина и пиразинамида в терапевтических дозах на протяжении периода сперматогенеза имеет побочное действие на мужскую репродуктивную функцию (угнетение тестостерон-продуцирующей функции семенников, нарушение дифференциации клеток сперматогенного эпителия и нормоспермии, снижение фертильности, возрастание эмбрио-фетальной смертности потомства). Важную роль в этих нарушениях играет индукция CYP2E1 в семенниках, которая приводит к дисбалансу про/антиоксидантной системы и служит триггером апоптотических процессов. В условиях экзогенной и эндогенной индукции CYP2E1 (экспериментальные хронический алкоголизм и диабет) отрицательные эффекты ПТС возрастают. Определены приоритетные мишени

фармакологической коррекции, выявленных нарушений и обоснована целесообразность профилактически-лечебного применения, как гонадопротекторов биологически активных препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, а также способных ингибировать CYP2E1.

Ключевые слова: этамбутол, изониазид, рифампицин, пиразинамид, стрептомицин, экспериментальный хронический алкоголизм, стрептозотоцинового диабет, метионин, Метовитан, цитохром P450 2E1, семенники, эпидидимисы, мужская репродуктивная функция.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– активні форми кисню
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ПТЗ	– протитуберкульозні лікарські засоби
СДГ	– сукцинатдегідрогеназа
СОД	– супероксиддисмутаза
СТЗД	– стрептозотоциновий діабет
ТБК	– тіобарбітурова кислота
СУР2Е1	– цитохром Р-450 2Е1