

УДК 615:611-013.1.2

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ GPR-119 (СОЕДИНЕНИЯ ZB-16) НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩУЮ ФУНКЦИЮ КРЫС-САМЦОВ

Л.И. Бугаева, Е.А. Кузубова, М.В. Мальцев, Е.Б. Лаврова, И.Н. Тюренок, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин, Г.П. Дудченко

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

В экспериментах на беспородных красках-самцах 4-месячного возраста изучено влияние нового соединения ZB-16 (агониста рецептора GPR-119), с гипогликемической активностью [6], на процессы сперматогенеза и оплодотворяющую функцию. Соединение ZB-16 вводили животным опытных групп интрагастрально в течение 2 месяцев (приравнивается к одному циклу сперматогенеза) в дозах: 0,5 мг/кг (экспериментальная терапевтическая доза) и 100 мг/кг (высшая доза, превышающая терапевтическую в 200 раз), контрольной группе самцов интрагастрально вводили растворитель соединения дистиллированную воду. Установлено, что под действием ZB-16 у самцов в обеих опытных группах умеренно повышается индекс сперматогенеза (на 3,0 %, $p > 0,05$), общее количество сперматозоидов (на 44,4 %, $p > 0,05$ и 19,2 %, $p > 0,05$, соответственно 1-я и 2-я опытные группы), снижается число канальцев со слущенным эпителием, и не изменяется количество патологических форм сперматозоидов и число канальцев с 12-й стадией мейоза. По результатам спаривания исследуемых групп самцов с интактными самками выявляется у самок относительно контроля отчетливая тенденция повышения индекса беременности и снижение у них постимплантационной гибели эмбрионов.

Ключевые слова: гипогликемические средства, агонист рецепторов GPR-119, генеративная функция, сперматогенез, фертильность.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-3(75)-103-106

THE INFLUENCE OF THE AGONIST OF RECEPTORS GPR-119 (COMPOUNDS ZB-16) ON SPERMATOGENESIS AND FERTILIZATION FUNCTION OF MALE RATS

L.I. Bugaeva, E.A. Kuzubova, M.V. Maltsev, E.B. Lavrova, I.N. Tyurenkov, D.V. Kurkin, E.V. Volotova, D.A. Bakulin, G.P. Dudchenko

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

In experiments on outbred male beauty 4 months of age, the effect of the new compound ZB-16 (GPR 119 receptor agonist), with hypoglycemic activity [6], on spermatogenesis and fertilizing function was studied. Compound ZB-16 was administered intragastrically to animals of the experimental groups for 2 months (equivalent to one spermatogenesis cycle) in doses: 0.5 mg/kg (experimental therapeutic dose) and 100 mg/kg (higher dose than 200 times the therapeutic dose), the control group of males was intragastrically injected with a solvent of the compound – distilled water. It was found that under the influence of ZB-16, in males in both experimental groups, the spermatogenesis index is moderately increased (by 3.0 %, $p > 0,05$), the total number of spermatozoa (by 44.4 %, $p > 0,05$ and 19.2 %, $p > 0,05$, respectively, the 1st and 2nd experimental groups), the number of tubules with desquamated epithelium decreases, and the number of pathological forms of spermatozoa and the number of tubules with 12th stage of meiosis are not changed. According to the results of mating of the studied groups of males with intact females, a clear tendency towards an increase in the pregnancy index and a decrease in the post-implantation death of the embryos is revealed in the females relative to the control.

Key words: hypoglycemic agents, GPR-119 receptor agonist, generative function, spermatogenesis, fertility.

В настоящее время сахарный диабет (СД) находится среди лидирующих социально-значимых болезней сердечно-сосудистой системы и онкологии [1, 8]. Выбор гипогликемической терапии у больных СД проблематичен, поскольку ориентирован и на степень выраженности заболевания, и на сопутствующие осложнения [7, 9]. В этой связи поиск гипогликемических препаратов с поливалентным типом действия является актуальным. Большой интерес представляют противодиабетические препараты с инкретиновой активностью (ингибиторы дипептидилпептидазы-4 и аналоги глюкагоноподобного пептида-1), которые помимо гипогликемического действия способны снижать риск развития

сердечно-сосудистых осложнений и церебральных последствий инсульта у пациентов с СД. В этом отношении обращает на себя внимание новое малотоксичное соединение ZB-16 (агонист рецептора GPR-119), которое в экспериментах на животных при интрагастральном введении в дозе 0,5 мг/кг (1/800 ЛД₅₀) проявляло выраженную гипогликемическую активность [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Учитывая факт высокой распространенности заболевания СД у лиц репродуктивного возраста, а также и то, что патология СД, прежде всего, негативно отражается на репродуктивном здоровье,

в настоящей работе сочли целесообразным проанализировать в эксперименте влияние соединения ZB-16 (агонист рецептора GPR-119) на отдельные фрагменты генеративной функции крыс-самцов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 120 половозрелых конвенциональных крысах обоего пола массой 230–250 г, доставленных из питомника ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН и прошедших 2-недельный карантин в виварии НИИ фармакологии ВолгГМУ. Содержание животных в период карантина и эксперимента проводилось в соответствии с приказом министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и требованиями директивы 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г по охране животных. Проводимое исследование одобрено региональным независимым этическим комитетом (ГУ Волгоградский медицинский научный центр): протокол № 140-2011 от 11.06.2011 г.

После 2-недельного карантина крысы-самцы были расформированы на 3 равные группы (по 20 особей) – 2 опытные и 1 контрольную. Опытным группам соединение ZB-16 вводили внутривентрикулярно в течение 2 месяцев (соответствует 1-му циклу сперматогенеза [3]): 1-й группе в дозе 0,5 мг/кг (экспериментально доказанная терапевтически эффективная доза); 2-й группе – 100 мг/кг (высшая доза, превышающая терапевтическую в 200 раз). Контрольной группе крыс-самцов внутривентрикулярно вводили дистиллированную воду (10 мл/кг), используемую в качестве растворителя исследуемого вещества. По окончании курса введения соединения ZB-16 у крыс-самцов исследовали состояние сперматогенеза и оплодотворяющую функцию.

Для оценки состояния сперматогенеза часть (по 6 особей из каждой группы) испытуемых крыс-самцов по окончании курса введения соединения ZB-16 подвергали эвтаназии (метод декапитации на гильотине) и некропии брюшной полости с извлечением эпидидимисов и семенников. Из эпидидимисов извлекали семенную жидкость [3, 4], в которой подсчитывали: общее количество сперматозоидов (1×10^6), содержание в них дегенеративных форм (%), кислотную (pH) и осмотическую (%) резистентности и время их подвижности (мин). Семенники после фиксации в забуференном растворе формалина подвергали специфической гистологической проводке для изготовления препаратов тканей гонад. При микроскопическом обследовании на препаратах гонад подсчитывали общее количество сперматогоний, число канальцев со слущенным эпителием и 12-й стадией мейоза, рассчитывали индекс сперматогенеза [4].

При исследовании оплодотворяющей функции у крыс-самцов (по 10 самцов каждой исследуемой группы) оценивали результаты их спаривания

с интактными самками (в соотношении 1:2). Спаривание животных проводили в течение 10 дней, затем самок отсаживали, а еще через 10 дней всех самок подвергали эвтаназии (метод дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом). На вскрытии у крыс-самок определяли наличие беременности, на основании полученных данных у самок рассчитывали индекс беременности. Выделяли яичники и рога матки: в яичниках подсчитывали количество желтых тел беременности, в рогах матки – количество резорбций и плодов. У плодов определяли их возраст, по которому рассчитывали ориентировочные дни зачатия. По количеству имплантированных живых и резорбированных плодов рассчитывали до- и постимплантационную гибель [2, 3].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Статистическую значимость различий в опытных группах по отношению к группе контроля оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у самцов, получавших 2-месячным курсом соединение ZB-16 в дозе 0,5 мг/кг (1-я опытная группа) достоверно, но отчетливо повышалось общее количество сперматозоидов на 44,4 % ($p > 0,05$) и их осмотическая резистентность на 12,5 % ($p > 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние соединения ZB-16 (внутривентрикулярно, 2 месяца) на функциональное состояние семяродного эпителия крыс ($M \pm m$)

Показатели, единицы измерения	Контрольная группа дистиллированная вода, 10 мл/кг	Опытная группа 1, ZB-16, 0,5 мг/кг	Опытная группа 2, ZB-16, 100 мг/кг
Общее количество сперматозоидов, 1×10^6	$31,3 \pm 3,8$	$45,20 \pm 8,77$	$37,30 \pm 2,22$
Патологические формы, %	$11,90 \pm 0,78$	$10,60 \pm 0,88$	$12,00 \pm 0,62$
Время подвижности, мин	$281,70 \pm 37,63$	$275,30 \pm 32,26$	$331,70 \pm 20,72$
Кислотная резистентность, pH	$5,20 \pm 0,36$	$4,30 \pm 0,46$	$4,50 \pm 0,33$
Осмотическая резистентность, %	$1,60 \pm 0,08$	$1,80 \pm 0,11$	$1,60 \pm 0,08$
Индекс сперматогенеза, у. е.	$3,10 \pm 0,06$	$3,20 \pm 0,05$	$3,20 \pm 0,03$
Количество сперматогоний	$54,4 \pm 1,97$	$50,80 \pm 1,80$	$49,50 \pm 1,73$
Число канальцев со слущенным эпителием	$5,00 \pm 0,37$	$4,00 \pm 0,37$	$4,20 \pm 0,31$
Число канальцев с 12-й стадией мейоза	$2,30 \pm 0,42$	$2,30 \pm 0,33$	$2,20 \pm 0,31$

*Результаты статистически достоверны относительно группы контроля при $p < 0,05$.

При этом содержание в них патологических форм и время подвижности сперматозоидов не изменялось относительно контрольной группы, тогда как кислотная резистентность сперматозоидов у этих самцов снижалась на 17,3 % ($p > 0,05$). У самцов, получавших соединение ZB-16 в дозе 100 мг/кг (2-я опытная группа), также отмечалось повышение общего количества сперматозоидов на 19,2 % ($p > 0,05$) и времени их подвижности на 17,7 % ($p > 0,05$). Однако содержание патологических форм сперматозоидов у самцов данной группы и их осмотическая резистентность не различались с контрольными величинами, тогда как кислотная резистентность сперматозоидов у этих самцов снижалась на 13,5 % ($p > 0,05$). Снижение кислотной резистентности, вероятно, может свидетельствовать о выбросе молодых форм сперматозоидов в эпидидимисы [4], что подтверждается результатами спермиограммы и морфометрическими исследованиями.

При оценке функционального состояния семяродного эпителия гонад у исследуемых опытных групп крыс-самцов обнаружены недостоверные, но отчетливые однонаправленные тенденции повышения индекса сперматогенеза на 3,0 % ($p > 0,05$). Общее количество сперматогоний и число канальцев с 12-й стадией мейоза у самцов опытных групп практически не различались с данными контроля, а количество же канальцев со слущенным эпителием снижалось на 20,0 % ($p > 0,05$) в 1-й опытной группе и на 16,0 % ($p > 0,05$) во 2-й, что, вероятно, может свидетельствовать о положительном влиянии исследуемого вещества на функциональное состояние семяродного эпителия. В какой-то степени данные согласуются с результатами спермиограммы: повышением общего количества сперматозоидов и отсутствием изменений в количестве их патологических форм.

По результатам дальнейших исследований по оценке оплодотворяющей способности у крыс-самцов в опытных группах обнаружено повышение индекса оплодотворяющей способности сперматозоидов – количество забеременевших самок, спаренных с самцами 1-й и 2-й опытных групп, увеличивалось относительно контроля на 19,0 % ($p > 0,05$) и 14,9 % ($p > 0,05$) соответственно (табл. 2). Кроме того, на вскрытии у забеременевших самок, спаренных с самцами опытных групп, выявлена недостоверная относительно контроля, но дозозависимая тенденция: повышение количества желтых тел беременности на 8,9 % ($p > 0,05$) и 14,9 % ($p > 0,05$) соответственно группам и плодовитости – на 21,1 % ($p > 0,05$) и 17,1 % ($p > 0,05$) соответственно.

Одновременно у этих самок выявлялось и снижение количества резорбированных плодов на 69,2 % ($p < 0,05$) в 1-й опытной группе и на 23,1 % ($p > 0,05$) во 2-й, что, в свою очередь, положительно сказалось и на общей эмбриональной гибели плодов. Так, если доимплантационная гибель эмбрионов у самок, спаренных с самцами

опытных групп, практически соответствовала контролю, то обращает на себя внимание постимплантационная гибель плодов у этих самок, которая снижалась на 69,3 % ($p < 0,05$) в 1-й опытной группе и 32,1 % ($p > 0,05$) во 2-й.

Таблица 2

Влияние вещества ZB-19 (внутрижелудочно, 2 месяца) на оплодотворяющую функцию самцов, в опытах с интактными самками ($M \pm m$)

Регистрируемые показатели, единицы измерения	Группы животных ($n = 10$)		
	Контрольная группа, дистиллированная вода, 10 мл/кг	Опытная группа 1, ZB-16, 0,5 мг/кг	Опытная группа 2, ZB-16, 100 мг/кг
Индекс беременности, %	70,00 $\pm$ 9,15	83,30 $\pm$ 8,33	75,00 $\pm$ 9,45
Возраст эмбриона, дни	14,00 $\pm$ 0,38	14,70 $\pm$ 0,94	14,0 $\pm$ 1,0
Количество желтых тел	10,10 $\pm$ 0,35	11,0 $\pm$ 0,8	11,60 $\pm$ 0,91
Количество мест имплантаций	8,90 $\pm$ 0,41	9,70 $\pm$ 0,78	9,8 $\pm$ 0,7
Количество плодов	7,60 $\pm$ 0,45	8,90 $\pm$ 1,05	8,90 $\pm$ 0,61
Количество резорбций	1,30 $\pm$ 0,37	0,40 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,42
Доимплантационная гибель, %	12,70 $\pm$ 2,35	12,50 $\pm$ 2,43	14,30 $\pm$ 4,03
Постимплантационная гибель, %	13,70 $\pm$ 3,85	4,20 $\pm$ 1,67*	9,30 $\pm$ 3,96

*Результаты статистически достоверны относительно группы контроля при $p < 0,05$.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что соединение ZB-16 в терапевтической дозе (0,5 мг/кг) и превышающей ее в 200 раз (100 мг/кг) при 2-месячном интрагастральном введении не повреждает процессы сперматогенеза и положительно сказывается на оплодотворяющей функции самцов. Отмеченное умеренно активирующее влияние соединения ZB-16 на процессы сперматогенеза (повышение общего количества сперматозоидов и индекса сперматогенеза, снижение количества канальцев со слущенным семяродным эпителием) было статистически незначимым, но отчетливым относительно контроля. При этом у самок, спаренных с самцами, получавшими соединение ZB-16, индекс беременности повышался и существенно снижалась постимплантационная гибель эмбрионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремникова В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. – М.: Медицина, 2005. – 512 с.
2. Бугаева Л.И., Спасов А.А., Кузубова Е.А.. Влияние препарата бромантан на половое поведение и процессы зачатия у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 3. – С. 58–60.

3. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под. ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 80–92.

4. Руководство по андрологии / под ред. О.Л. Тиктинского. – Ленинград, 1990. – 416 с.

5. Саночкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. – М.: Медицина, 1979. – 390 с.

6. Тюренков И.Н., Д Бакулин.А., Куркин Д.В. и др. Агонисты GPR119 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 28–37.

7. Шестакова М.В. Многокомпонентный подход к лечению сахарного диабета и его осложнений // Терапевтический архив. – 2006. – № 10. – С. 33–36.

8. Kuritzky L., Umpierrez G., Ekoé J.M. et al. Safety and efficacy of dulaglutide, a once weekly GLP-1 receptor agonist, for the management of type 2 diabetes // Postgrad Med. – 2014. – Vol. 126 (6). – P. 60–72.

9. Montero R. M., Covic A., Gnudi L., Goldsmith D. Diabetic nephropathy: What does the future hold? // Int Urol Nephrol. – 2016. – № 48. – P. 99–113.

REFERENCES

1. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. Lechenie saharnogo diabeta i ego oslozhnenij [Treatment of diabetes mellitus and its complications]. Moscow: Medicina, 2005. 512 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Bugaeva L.I., Spasov A.A., Kuzubova E.A. Vliyanie preparata bromantan na polovoe povedenie i processy zachatiya u krys [The effect of the drug bromantane on sexual behavior and conception in rats]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and clinical

pharmacology], 2004, vol. 67, no. 3, pp. 58–60. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu reproductivnoj toksichnosti lekarstvennyh sredstv / *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv* [Guidelines for the study of reproductive toxicity of drugs / Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1]. Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012, pp. 80–92. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. *Rukovodstvo po andrologii* [Guide to Andrology]. Ed. O. L. Tiktinsky. Leningrad, 1990. 416 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Sanockij I.V., Fomenko V.N. Otdalennye posledstviya vliyaniya himicheskikh soedinenij na organism. Moscow: Medicina, 1979. 390 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Tyurenkov I.N., Bakulin D.A., Kurkin D.V., et al. Agonisty GPR119 receptorov: harakteristika, fiziologicheskaya rol' i perspektivy ispol'zovaniya v terapii saharnogo diabeta 2 i metabolicheskogo sindroma [GPR119 receptor agonists: characteristics, physiological role and prospects for use in the treatment of diabetes mellitus 2 and metabolic syndrome]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* [Advances in physiological sciences], 2015, vol. 46, no. 4, pp. 28–37. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Shestakova M.V. Mnogokomponentnyj podhod k lecheniyu saharnogo diabeta i ego oslozhnenij [A multi-component approach to the treatment of diabetes mellitus and its complications]. *Terapevticheskij arhiv* [Therapeutic archive], 2006, no.10, pp. 33–36. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Kuritzky L., Umpierrez G., Ekoé J.M., et al. Safety and efficacy of dulaglutide, a once weekly GLP-1 receptor agonist, for the management of type 2 diabetes // Postgrad Med., 2014, vol. 126 (6), pp. 60–72.

9. Montero R.M., Covic A., Gnudi L., Goldsmith D. Diabetic nephropathy: What does the future hold? Int Urol Nephrol, 2016, no 48, pp. 99–113.

Контактная информация

Тюренков Иван Николаевич – член-корр. РАН, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации Института НМФО, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: fibfuv@mail.ru