

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШАЯХМЕТОВА Ганна Михайлівна

Гриф
Прим № _____
УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

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

14.03.05 – фармакологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Г.М. Шаяхметова

Науковий консультант: **Коваленко Валентина Миколаївна,**
доктор біологічних наук, професор

Київ - 2018

АНОТАЦІЯ

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

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

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

Побічна дія лікарських засобів продовжує залишатись одним з найбільш актуальних питань. Фактичний рівень небажаних реакцій може бути набагато вищим, ніж повідомляється. Існують певні складнощі в їх верифікації внаслідок того, що порушення з боку внутрішніх органів, викликані ліками нерідко важко відрізнити від самостійних нозологічних захворювань і тому вони не реєструються. Також проблемою побічної дії значної кількості препаратів, що давно перебувають на фармацевтичному ринку є недостатній рівень вивчення свого часу їх властивостей.

Значне число захворювань потребує застосування довготривалих фармакотерапевтичних схем. До них можна віднести туберкульоз, що дотепер зберігає статус важливої медичної та соціальної проблеми. Застосування поліхіміотерапії туберкульозу, значно збільшило число появи побічних реакцій. За сумісного прийому декількох хіміотерапевтичних засобів спостерігається метаболічна взаємодія, внаслідок індукції або інгібування різних ізоформ цитохрому Р-450, серед яких особливе місце посідає цитохром Р-450 2E1 (CYP2E1) внаслідок його високої індукцибельності. Токсичність лікарських, засобів, здатних індукувати CYP2E1 зростає за умов їх одночасного прийому

та/або застосування на тлі станів, які характеризуються індукцією даної ізоформи.

Незважаючи на те, що 80 % чоловіків, хворих на туберкульоз легень, є особами репродуктивного віку, несприятливому впливу протитуберкульозних засобів (ПТЗ) на репродуктивний потенціал чоловіків часто не приділяють уваги та недостатньо вивчають. В науковій літературі існують лише фрагментарні експериментальні та нечисленні суперечливі клінічні дані.

Вищевказане визначило наукову та практичну значимість поглибленого дослідження шляхів реалізації побічної дії ПТЗ I ряду на чоловічу репродуктивну функцію, як при самотійному так і поєднаному використанні, в тому числі на тлі патологічних станів, що характеризуються індукцією CYP2E1. Результати роботи слугують підґрунтям для визначення підходів до прогнозування негативної дії ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію та її фармакологічної корекції.

Для досягнення мети роботи були використані наступні експериментальні умови: сумісне та нарізне введення ПТЗ (ізоніазид, піразинамід, рифампіцин, етамбутол або стрептоміцин) щурам-самцям; сумісне введення ПТЗ на тлі станів, що характеризуються індукцією CYP2E1 (експериментальні алкоголізм та цукровий діабет); введення препаратів метаболітної дії (метіонін та Метовітан) на тлі комбінації ПТЗ. На всіх етапах дослідження ПТЗ вводили тваринам у дозовому режимі, який застосовується у клініці для короткотермінової терапії туберкульозу. Дози для тварин розраховували виходячи з коефіцієнта видової чутливості. Проведено оцінку морфо-функціонального стану сім'яників та показників антенатального та постнатального розвитку потомства, отриманого від експериментальних самців та інтактних самиць, рівня експресії мРНК та протеїну CYP2E1, а також його каталітичної активності в сім'яниках, проаналізовано біохімічні параметри сім'яників, рівень фрагментації нуклеарної ДНК в сім'яниках та епідидимісах.

Встановлено, що сумісне застосування ПТЗ, порівняно з нарізним, викликає значно важчі морфологічні порушення у сперматогенному епітелії, а

також зниження продукції сперматозоїдів (втричі), зменшення їх життєздатності (на 74 %), зниження часу рухливості (на 80 %), що веде до фатального обмеження фертильності щурів-самців (індекс запліднювальної здатності знижується до 17 %), зменшення плодючості, запліднених ними інтактних самиць на 81 % та значного зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності ембріонів на 55 % та 73 % відповідно. Ключова роль в реалізації даних порушень належить етамбутолу та ізоніазиду.

Показано, що нарізне введення ізоніазиду, етамбутолу та сумісне усіх чотирьох ПТЗ призводить до зростання експресії мРНК та протеїну CYP2E1 в сім'яниках, а також підвищення його ензиматичної активності, що свідчить про індукцію даної ізоформи. Індукція тестикулярного CYP2E1 за сумісного введення 4-х ПТЗ, а також нарізного - етамбутолу та ізоніазиду супроводжується порушеннями балансу прооксиданти/антиоксиданти в тканинах сім'яників (зниження активності СОД та вмісту відновленого глутатіону, зростання активності глутатіонтрансферази, активація ПОЛ), інтенсифікацією фрагментації ДНК у їхніх клітинах, а також зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові в 1,6-2,8 рази порівняно з контролем.

За умов нарізного введення стрептоміцину, на відміну від етамбутолу, експресія мРНК CYP2E1 в сім'яниках не зростає. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ знижує їх негативну дію на морфо-функціональні параметри сім'яників, репродуктивну здатність щурів-самців і ембріо-фетальний розвиток їх потомства.

Виявлені за умов ексцесивного споживання етанолу дегенеративні порушення сперматогенного епітелію та погіршення кількісних і якісних показників сперматозоїдів супроводжуються серйозними змінами у сім'яниках та печінці щурів на молекулярному та біохімічному рівні. Встановлено, що тривале (протягом 150 днів) вживання етанолу щурами викликає індукцію CYP2E1 у печінці та сім'яниках. За цих умов в організмі відбуваються складні метаболічні зміни: розвиток оксидативного/нітрозативного стресу у печінці; порушення в амінокислотному складі сироватки крові, сім'яників та колагену I

типу; зростання в сім'яниках вмісту загального та етерифікованого холестерину, зниження вмісту SH-груп білків; пригнічення ензиматичної активності тестикулярної СДГ за одночасного зростання ЛДГ. В тестикулярних клітинах суттєво інтенсифікується фрагментація ДНК, що свідчить про запуск процесів апоптозу, який є кінцевим результатом дерегуляції систем контролю сперматогенезу.

Введення комбінації ПТЗ щурам-самцям на тлі експериментального хронічного алкоголізму призводить до прогресуючого зростання рівня експресії CYP2E1 в печінці та сім'яниках щурів у 5 та 5,9 разів, а також зростання активності *p*-нітрофенолгідроксилази (маркера CYP2E1) у мікросомній фракції клітин печінки в 1,5 рази порівняно з щурами, які вживали лише алкоголь, та втричі порівняно з контрольною групою.

Проведені дослідження засвідчують поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів, які на тлі вживання етанолу отримували комбінацію ПТЗ. У групі тварин з хронічним алкоголізмом порівняно з контролем відсоток випадків злучення епітелію в просвіт каналця зростає у 4 рази, а у групі з введенням ПТЗ у 5 разів; відсоток появи вакуолей збільшується відповідно у 7 та 9 разів; кількість сперматогоній знижується на 14 % та 20 % відповідно. Порушення процесів сперматогенезу та зниження кількості і якості сперматозоїдів у щурів-самців, які на тлі експозиції етанолу отримували ПТЗ, призвело до значного зниження їхньої фертильності за умов парування з інтактними самицями та 100%-ної післяімплантаційної загибелі потомства.

Показано, що за умов стрептозотоцинового діабету в сім'яниках щурів втричі порівняно з контролем зростає експресія мРНК CYP2E1, що супроводжується підвищенням ушкодження тестикулярної ДНК. Сумісне введення ПТЗ на тлі діабету призводить до подальшої стимуляції експресії гену CYP2E1 та змін рівня і характеру фрагментації нуклеарної ДНК у гонадах. Отримані дані свідчать про посилення несприятливого впливу ПТЗ на морфо-функціональний стан сім'яників та репродуктивну здатність щурів із діабетом.

Діабет та ПТЗ викликають патологічні зміни в сперматогенному епітелії щурів-самців, призводячи до значного зниження кількості сперматозоїдів, а також мають шкідливий вплив на потомство таких самців.

На застосованих експериментальних моделях виявлено, що рівень експресії гену *CYP2E1* в сім'яниках має високу негативну кореляцію з величиною сперматогенного індексу ($r = -0,99$; $p = 0,001$), кількістю сперматогоній ($r = -0,99$; $p = 0,001$) та кількістю сперматозоїдів ($r = -0,87$; $p = 0,001$), а також високу позитивну кореляцію з відсотком випадків злущення епітелію в просвіт каналця ($r = 0,99$; $p = 0,001$) і появою вакуолей ($r = 0,96$; $p = 0,001$).

Результати досліджень стосовно впливу препаратів, здатних інгібувати експресію *CYP2E1*, на репродуктивну функцію самців щурів на тлі введення ПТЗ показали наступне: метіонін та композиція біологічно активних речовин - Метовітан виявили здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену *CYP2E1* та інгібувати його ензиматичну активність в сім'яниках, тим самим попереджуючи зміни параметрів про/антиоксидантної системи тестикулярних тканин. Метовітан більш ефективно, у порівнянні з метіоніном, інгібував експресію мРНК *CYP2E1* і його каталітичну активність, сприяючи збереженню цілісності сперматогенного епітелію. Покращуючи стан сперматогенного епітелію, метіонін та Метовітан сприяли підвищенню кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісів та фертильності щурів.

Отримані нами дані, включаючи встановлену кореляцію між рівнем експресії мРНК *CYP2E1* в сім'яниках та аномаліями сперматогенезу, свідчать про залучення даного ізоферменту до патогенетичних механізмів тестикулярних порушень та чоловічого безпліддя. Індукція *CYP2E1* в сім'яниках призводить до утворення великої кількості вільних радикалів та інших токсичних аддуктів, порушуючи нормальні метаболічні процеси та, головним чином, негативно впливаючи на обмін нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів, а також порушує енергетичний обмін та біосинтез низькомолекулярних біорегуляторів. Подібний каскад, у свою чергу, призводить до патологічних змін у сім'яниках,

служуючи тригером апоптотичних процесів. Кінцевим результатом є інгібування андрогенної функції, порушення нормальної диференціації статевих клітин та втрата фертильності.

Результати стосовно гонадопротекторної дії метіоніну та композиції біологічно активних речовин – Метовітану при введенні на тлі протитуберкульозних засобів, що індукують CYP2E1, експериментально обґрунтовують перспективність використання речовин, які володіють ефективними інгібіторними стосовно даної ізоформи та антиоксидантними властивостями у схемах лікування та профілактики чоловічої субфертильності та інфертильності, особливо за умов застосування хіміотерапевтичних засобів, здатних індукувати CYP2E1 та станів, що супроводжуються індукцією цього ізоензиму.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в узагальненні та систематизації нових фактичних даних, що дозволили обґрунтувати підходи до прогнозування та попередження негативного впливу протитуберкульозних засобів на чоловічі гонади. Зокрема, визначено гонадопротекторну ефективність препаратів, що володіють антиоксидантною дією та одночасно здатних інгібувати експресію та активність CYP2E1 за умов введення протитуберкульозних засобів. З'ясування внеску ізоформи CYP2E1 у розвиток побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію в цілому поглиблює уявлення про механізми реалізації негативної дії ксенобіотиків на гонади та слугує підґрунтям для розробки методів діагностики та попередження чоловічої субфертильності. Практична значимість підтверджена інформаційними листами (№286-2010, №295-2011 та №212-2018).

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

ANNOTATION

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). - Qualifying scientific work published as a 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" (implementation of the thesis), Kyiv; - SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine" (defense), 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.

It is well known that drug's side effects continue to be the most prominent medical and social problem. Apparently, the actual level of adverse reactions may be much higher than reported. There are certain difficulties in their verification due to the fact that changes in internal organs caused by medicines are often difficult to distinguish from the independent diseases which subsequently are not recorded. Beside this, the huge problem of a significant number of drugs that have long been in the pharmaceutical market is associated with an inadequate level of investigation their side effects. Clinically, a significant number of diseases require the use of long-term pharmacotherapeutic regimens. One of them is tuberculosis, which still preserves the status of an important medical and social problem. The extensive use of polychemotherapy for tuberculosis ultimately led to a substantial increase in number of adverse reactions. The co-administration of several chemotherapeutic agents causes their metabolic interaction predominantly due to induction or inhibition of various isoforms of cytochrome P-450, such as highly inducible cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1). The toxicity of the drugs (CYP2E1 inducers) increase in case of their combined administration and/or use under conditions, which are characterized by the induction of this isoform.

At the same time, despite the fact that 80 % of men with pulmonary

tuberculosis are individuals of reproductive age, the adverse effects of anti-tuberculosis drugs (ATD) on their reproductive potential are often have been neglected and insufficiently studied. In the scientific literature there are only fragmentary experimental and few contradictory clinical data. Obviously, all of the above has determined the scientific and practical significance of an in-depth study of the 1st line ATD' adverse effects on male reproductive function both in single and combined use, as well as under the pathological states accompanied by induction of CYP2E1. The results of the current work serve as the proof for establishing approaches to predict the side effects of drugs on male reproductive function and its further pharmacological correction.

The following experimental conditions were used to achieve the goal: the combined and single administration of AND (isoniazid, pirazinamide, rifampicin, ethambutol or streptomycin) in male rats; the co-administration of antituberculosis drugs into the rats with induced CYP2E1 (experimental alcoholism and diabetes mellitus); the administration of the supplements with metabolic action (methionine and Metovitan) into the rats received the combination of antituberculosis drugs. Through the all stages of the study, the antituberculosis drugs were administered to animals at a dose regimen equivalent to the one used in clinic for short-term treatment of tuberculosis. The doses were calculated based on the coefficient of species sensitivity. Besides that, an assessment of the morphological and functional status of the testicles and the parameters of the antenatal and postnatal development of the offspring, obtained from experimental male and intact female, the level of CYP2E1 mRNA and protein expression, as well as its catalytic activity in the testicles, the biochemical parameters of the testicles, and the level nuclear DNA fragmentation in the testes and epididymis has been established.

Apparently, it has been demonstrated 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 ATD, 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.

Degenerative disorders in spermatogenic epithelium and deterioration of sperm quantitative and qualitative parameters detected under the condition of excessive ethanol consumption were accompanied by serious changes in rats' testes and liver at the molecular and biochemical levels.

Particularly it was established that long-continued use of ethanol by rats

during the spermatogenesis period caused significant increase in expression of CYP2E1 mRNA and protein in the liver and testes, as well as its enzymatic activity. Under these conditions, complex metabolic changes occur in the organism. According to our results, ethanol chronic exposure leads to the development of oxidative/nitrosative stress in the liver; changes in serum, testes and type I collagen amino acid composition; increase in testicular total and esterified cholesterol contents, decrease in content of proteins' SH-groups; inhibition of the enzymatic activity of testicular SDH with the simultaneous growth of LDH. The revealed metabolic disturbances in testes have negative consequences for the cellular regulation of spermatogenesis processes. Testicle cells' DNA fragmentation processes significantly intensify under experimental chronic alcoholism indicating the initiation of apoptosis, the final stage of the deregulation of spermatogenesis control. The testicular abnormalities were observed at the molecular as well as biochemical levels and accompanied by degenerative changes in spermatogenic epithelium and deterioration of sperm quantitative and qualitative indices.

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. Administration of ATD combination in male rats under experimental chronic alcoholism leads to a progressive increase in hepatic and testicular CYP2E1 expression level 5 and 5.9 folds, as well as growth in activity of *p*-nitrophenol hydroxylase (a marker of CYP2E1) in microsomal fraction of liver cells 1.5 folds as

compared with rats, which consumed only alcohol, and triple as compared with the control group.

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 anti-tuberculosis drugs on testes morpho-functional state and reproductive capacity of male rats with diabetes. As such, diabetes and ATD caused pathological changes in the spermatogenic epithelium of male rats leading to significant decrease in the number of spermatozoa, and also have a harmful effect on the offspring of such males.

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 ($r = 0.96$; $p = 0.001$).

The investigations of the drugs capable to inhibit CYP2E1 demonstrated that effects on reproductive function of male rats with ATD administration included following: 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.

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. Induction of CYP2E1 in the testes results in the formation of large amounts of free radicals and other toxic adducts, breaking the normal metabolic processes and mainly negatively influencing the metabolism of nucleic acids, proteins, lipids, carbohydrates, as well as disturbs energy metabolism and biosynthesis of low molecular bioregulators. Such cascade, in turn, leads to pathological changes in the testes and serves as a trigger for apoptotic processes in testicular cells. The final result is the inhibition of androgen function, the disruption of germ cells normal differentiation and the loss of fertility.

The results referred to the gonadoprotective action of methionine and the composition of biologically active substances - Metovitan administered after use of CYP2E1 inducers, experimentally proved the perspective of using the substances (that have effective inhibitory for this isoform and antioxidant properties) in the therapeutic schemes of male subfertility and infertility, especially in the case of receiving chemotherapeutic agents capable to induce CYP2E1 and conditions associated with that induction.

The practical significance of the thesis includes systematization new factual data that allowed to proof the approaches to predicting and preventing the ATD' negative impact on male gonads. In particular, it was determined the gonadoprotective efficacy of preparations with antioxidant activity capable to inhibit both expression and activity of CYP2E1 during ATD administration. The unrevealing of the isoform CYP2E1 contribution to development of ATD adverse reactions on male reproductive function in general add the knowledge to the concept of mechanisms for xenobiotics' negative effects on gonads and serves as the basis for the developing methods for diagnosis and prevention of male subfertility. The practical significance is confirmed by newsletters (№286-2010, №295-2011 and №212-2018).

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

Список публікацій здобувача

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 2Е1 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 2Е1 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 2Е1 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 P450E1 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](http://dx.doi.org/10.4172/2324.8793) (*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). Коригуюча 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., Бишовец, 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 DICID 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., Матвиєнко, 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, И.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., 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).

ЗМІСТ

	С.
АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	27
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	31
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	33
ВСТУП.....	33
РОЗДІЛ 1. ПОБІЧНА ДІЯ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ: СТАН ПРОБЛЕМИ, МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ТА ФАКТОРИ РИЗИКУ (огляд літератури).....	43
1.1. Особливості побічної дії протитуберкульозних засобів та ймовірні ризики стосовно чоловічої репродуктивної функції, пов'язані з індукцією цитохрому Р-450 2Е1.....	43
1.2. Алкоголізм та цукровий діабет, як фактори ризику стосовно порушень чоловічої репродуктивної функції.....	68
1.3. Перспективи застосування інгібіторів цитохрому Р-450, як фармакологічних засобів.....	84
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	94
2.1. Матеріали досліджень.....	94
2.2. Методи досліджень.....	97
2.2.1. Експериментальні моделі.....	97
2.2.2. Методи дослідження репродуктивної функції щурів-самців.....	101
2.2.3. Методи дослідження стану гонад щурів- самців.....	102
2.2.4. Біохімічні методи дослідження.....	104
2.2.5. Молекулярно-біологічні методи дослідження.....	111
2.2.6. Гістохімічні методи дослідження.....	115
2.2.7. Комп'ютерне моделювання взаємодії	

	протитуберкульозних лікарських засобів та	
	CYP2E1.....	116
	2.2.8. Статистичні методи дослідження.....	117
РОЗДІЛ 3.	ВПЛИВ НАРІЗНОГО ТА СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ	
	ІЗОНІАЗИДУ, РИФАМПІЦИНУ, ПІРАЗИНАМІДУ ТА	
	ЕТАМБУТОЛУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-	
	САМЦІВ ТА ЕМБРІО-ФЕТАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ЇХНЬОГО	
	ПОТОМСТВА	119
	3.1. Репродуктивна здатність щурів-самців	119
	3.2. Ембріо-фетальний розвиток потомства щурів-самців	125
	3.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників.....	128
	3.4. Резюме.....	141
РОЗДІЛ 4.	ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ та	
	БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СІМ'ЯНИКІВ ЗА УМОВ	
	НАРІЗНОГО І СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ,	
	РИФАМПІЦИНУ, ПІРАЗИНАМІДУ, ЕТАМБУТОЛУ	
	ЩУРАМ.....	143
	4.1. Дослідження індукції CYP2E1 в у сім'яниках	143
	4.2. Біохімічні показники стану сім'яників.....	151
	4.3. Фрагментація ДНК в гонадах.....	155
	4.4. Резюме.....	158
РОЗДІЛ 5.	ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ	
	ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-САМЦІВ ТА ЕМБРІО-ФЕТАЛЬНИЙ	
	РОЗВИТОК ЇХНЬОГО ПОТОМСТВА КОМБІНАЦІЙ	
	ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА УМОВ	
	ЗАМІНИ ЕТАМБУТОЛУ НА СТРЕПТОМІЦИН.....	161
	5.1. Репродуктивна здатність щурів-самців.....	161
	5.2. Ембріо-фетальний розвиток потомства щурів-самців ...	164
	5.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників.....	166
	5.4. Експресія мРНК CYP2E1 та фрагментація ДНК у	

сім'яниках	173
5.5. Біохімічні показники стану сім'яників.....	178
5.6. Резюме.....	179
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ (ІЗОНІАЗИД, РИФАМПІЦИН, ПІРАЗИНАМІД, ЕТАМБУТОЛ) НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ- САМЦІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО СПОЖИВАННЯ ЕТАНОЛУ.....	181
6.1. Репродуктивна здатність щурів-самців.....	182
6.2. Ембріо-фетальний та постнатальний розвиток потомства щурів-самців	185
6.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників.....	191
6.4. Експресія мРНК та протеїну СYP2E1 у печінці та сім'яниках щурів.....	196
6.5. Стан фрагментації ДНК у печінці та сім'яниках щурів....	202
6.6. Метаболічні зміни в організмі щурів-самців	205
6.7. Резюме	222
РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ (ІЗОНІАЗИД, РИФАМПІЦИН, ПІРАЗИНАМІД, ЕТАМБУТОЛ) НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ- САМЦІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДІАБЕТУ І ТИПУ.....	226
7.1. Репродуктивна здатність щурів-самців.....	227
7.2. Ембріо-фетальний розвиток потомства щурів-самців ...	230
7.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників.....	237
7.4. Експресія мРНК СYP2E1 та стан фрагментації ДНК у сім'яниках.....	243
7.5. Біохімічні показники сім'яників щурів	246
7.6. Резюме	252
РОЗДІЛ 8. КОРИГУЮЧА ДІЯ МЕТІОНІНУ ТА МЕТОВІТАНУ НА	

ГОНАДОТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ І РЯДУ ТА ВИКЛИКАНІ НИМИ ПОРУШЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ ЩУРІВ- САМЦІВ.....	254
8.1. Репродуктивна здатність щурів-самців	255
8.2. Морфологічні дослідження стану сім'яників.....	257
8.3. Експресія мРНК СYP2E1 та стан фрагментації ДНК у сім'яниках.....	261
8.4. Біохімічні показники сім'яників..... ..	265
8.6. Резюме.....	268
РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	270
ВИСНОВКИ.....	303
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	306
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	307
ДОДАТКИ.....	378

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДГ	-	алкогольдегідрогеназа
АЛДГ	-	альдегіддегідрогеназа
АТФ	-	аденозинтрифосфат
АФК	-	активні форми кисню
ГТБ	-	гемато-тестикулярний бар'єр
ДНК	-	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДОТС	-	Directly Observed Treatment Short-course
ЕДТА	-	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	-	зворотньо-транскриптазна ланцюгова реакція
кДНК	-	комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
ЛГ	-	лютеїнізуючий гормон
ЛДГ	-	лактатдегідрогеназа
МДА	-	малоновий діальдегід
мРНК	-	матрична рибонуклеїнова кислота
НАД	-	нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДФН	-	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
НТС	-	нітротетразолій синій
ПОЛ	-	перекисне окислення ліпідів
ПТЗ	-	протитуберкульозні засоби
РБ	-	розчин Буена
СДГ	-	сукцинатдегідрогеназа
СОД	-	супероксиддисмутаза
СТЗ	-	стрептозотоцин
СТЗД	-	стрептозотоциновий діабет
ТБЕ	-	трис-борат-етилендіамінова кислота
ТБК	-	тіобарбітурова кислота
ТХО	-	трихлороцтова кислота
ФСГ	-	фолікуло-стимулюючий гормон
ЦНС	-	центральна нервова система

ЩК	- щільні контакти
cNOS	- конститутивна синтаза оксиду азоту
CYP	- цитохром P-450
eNOS	- ендотеліальна синтаза оксиду азоту
GAPDH	- гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа
GLUT	- переносники глюкози
HSD	- гідроксистероїддегідрогеназа
IL	- інтерлейкін
iNOS	- індукцибельна синтаза оксиду азоту
mTOR	- мішень рапаміцину ссавців
nNOS	- нейрональна синтаза оксиду азоту
NOS	- синтаза оксиду азоту
P450scc	- фермент розщеплення бічного ланцюга цитохрому P-450
pAkt	- фосфорильована протеїнкіназа B
StAR	- стероїдогенний гострий регуляторний білок
TNF- α	- фактор некрозу пухлин α

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

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 [1]. 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 [2]. Також проблемою побічної дії значної кількості препаратів, що давно перебувають на фармацевтичному ринку, є недостатній рівень вивчення свого часу їх властивостей [3].

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 [4]. На даний час в схемах хіміотерапії туберкульозу застосовується одночасно від чотирьох до семи протитуберкульозних засобів (ПТЗ) протягом від 6 до 24 місяців [5]. 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 [6].

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. [7, 8, 9]. 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 [10, 11]. Фактори ризику розвитку чоловічого безпліддя вивчені не повною мірою - у 30 % безплідних чоловіків фіксують порушення сперматогенезу невідомої етіології (ідіопатична олігоастенотератозооспермія) [12]. 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 [13].

Незважаючи на те, що 80 % чоловіків, хворих на туберкульоз легень, є особами репродуктивного віку [6, 14, 15], а дослідження останніх десятиліть свідчать про значне зниження якості сперми чоловіків та їхньої фертильності [16, 17, 18, 19], несприятливому впливу ПТЗ на репродуктивний потенціал чоловіків часто не приділяють належної уваги [20]. В науковій літературі існують лише фрагментарні експериментальні [21, 22, 23, 24] та нечисленні клінічні дані [25, 26] 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 [27]. Пізніше ті ж автори повідомили про негативний вплив хіміотерапії туберкульозу на кількісні та якісні показники еякуляту [25] 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 [28]. 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 [26].

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 [29]. 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 [30]. 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 [31]. З іншого боку, певну роль відіграє стан організму пацієнта – наявність шкідливих звичок, супутніх патологічних станів, характер індивідуальної реакції, вік та ін. [32,33]. 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 [3].

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 CYP2E1. 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 Р-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 метаболічних 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 конститутивної синтази оксиду азоту (сNOS) і ендотеліальної синтази оксиду азоту (іNOS) 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” Рущака В. В. Комп’ютерне моделювання взаємодії CYP2E1 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 Х 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 on 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 Elsevier, 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.

РОЗДІЛ 1

ПОБІЧНА ДІЯ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ: СТАН ПРОБЛЕМИ, МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ТА ФАКТОРИ РИЗИКУ

(огляд літератури)

2.1. Особливості побічної дії протитуберкульозних засобів та ймовірні ризики стосовно чоловічої репродуктивної функції, пов'язані з індукцією цитохрому P-450 2E1

В останні роки відзначається невпинне зростання частки чоловічого фактору в безплідних шлюбах, яка складає 30-50 %. Разом з тим, за даними літератури відсоток позитивних результатів в лікуванні чоловічої неплідності знаходиться на рівні лише 16-32 %. Невисока ефективність терапії неплідності у чоловіків є наслідком того, що до теперішнього часу причини чоловічої інфертильності та субфертильності досліджені недостатньо [16, 17, 18, 19]. Необхідно також відзначити, що не менш ніж в 25 % випадків чоловічої неплідності сучасні методи обстеження не дозволяють виявити причину порушень [34]. Для підвищення успіхів в лікуванні чоловічої неплідності, розробки правильної тактики та оптимальних схем лікування необхідна верифікація різних факторів даної патології. Від точності встановлення причини чоловічої неплідності залежить подальше вивчення патогенезу порушень репродуктивної функції, що буде сприяти розробці ефективних методів терапії. Серед багатьох факторів ризику на чоловічу фертильність та чоловічу статеву функцію можуть негативно впливати лікарські засоби. Значне число захворювань потребує застосування довготривалих фармакотерапевтичних схем у пацієнтів молодого віку, однак, несприятливому впливу лікарських засобів на репродуктивний потенціал чоловіків часто не приділяють уваги та недостатньо

досліджують [10]. До таких захворювань можна віднести туберкульоз, що дотепер зберігає статус важливої медичної та соціальної проблеми [4].

Дані доповіді ВООЗ 2016 року стосовно боротьби з туберкульозом свідчать про те, що дії світової спільноти, спрямовані на ліквідацію епідемії туберкульозу, в значній мірі не виправдовують очікування [35]. Туберкульоз залишається однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем у XXI столітті.

З початку 90-х років до 2006 року захворюваність на туберкульоз та смертність від нього в Україні збільшилися майже втричі. В результаті реалізації кількох національних програм, починаючи з 2006 року, вдалося домогтися певної стабілізації, але рівень захворюваності залишається досить високим (67–68 випадків на 100 тис. населення в рік) та майже в 10 разів перевищує такий у провідних країнах Євросоюзу, що відносить Україну до групи країн з високою поширеністю туберкульозу [36].

Одним із завдань, що були визначені в рамках мети забезпечити сталий розвиток суспільства на період до 2030 року, є припинення глобальної епідемії туберкульозу. «Стратегія з ліквідації туберкульозу», розроблена ВООЗ та схвалена Всесвітньою асамблеєю охорони здоров'я в 2014 році, закликає знизити смертність від туберкульозу порівняно з 2015 роком на 90 % і захворюваність - на 80 % до 2030 року [37].

Не викликає сумніву той факт, що хіміотерапія займає провідне місце в лікуванні пацієнтів з туберкульозом як етіотропний метод, спрямований на знищення мікобактеріальної популяції або пригнічення її розмноження. Тільки при елімінації мікобактерій можливий запуск адаптаційних механізмів, спрямованих на активацію репаративних процесів і створення в організмі пацієнта умов для повноцінного клінічного лікування [5]. Згідно до епідеміологічної класифікації ВООЗ мікобактерії туберкульозу можуть бути:

- монорезистентними - до одного протитуберкульозного препарату;
- полірезистентними – до двох і більше протитуберкульозних засобів, але не для комбінації ізоніазиду і рифампіцину;

- множинно лікарсько-стійкі - як мінімум до поєднання ізоніазиду і рифампіцину;

- широко лікарсько-стійкі - як мінімум до комбінації ізоніазиду, рифампіцину, фторхінолонів та ін'єкційних препаратів (канамицину, амікацину, капреоміцину) [38].

З огляду на вищевикладене в сучасних умовах виникла необхідність внесення відповідних змін до схем хіміотерапії туберкульозу. В даний час використовується одночасно від 4 до 7 ПТЗ. При цьому тривалість їх застосування становить 6-24 місяці [5]. Але ПТЗ не володіють абсолютною вибірковістю дії і, пригнічуючи життєдіяльність мікобактерій, одночасно чинять несприятливу дію і на макроорганізм, викликаючи небажані побічні ефекти. Застосування ж схем лікування пацієнтів з туберкульозом, запропонованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), зокрема поліхіміотерапії, значно збільшило число появи побічних реакцій [6]. 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. [6, 6, 15].

Кожний з фармакологічних засобів може викликати свої побічні ефекти та взаємодіяти з іншими фармпрепаратами. Одночасне застосування двох препаратів призводить до лікарської взаємодії та небажаних наслідків у 6 % пацієнтів. Призначення п'ятьох та більше лікарських засобів підвищує її частоту до 50 %. При застосуванні десяти препаратів негативні наслідки лікарської взаємодії сягають 100 % [39]. З цієї точки зору особливої уваги заслуговують ПТЗ, здатні індукувати або інгібувати ряд ізоформ цитохрому Р-450 (ізоніазид, піразинамід, рифампіцин) та посилювати негативні ефекти один одного або інших препаратів за умов комбінованого введення [40].

Не останнє місце у структурі захворювання на туберкульоз займають дорослі чоловіки репродуктивного віку, зокрема на туберкульоз легень – 80% [6, 6, 15]. Одночасно дані щодо побічної дії ПТЗ, особливо їх комбінацій, на

чоловічу репродуктивну функцію залишаються неоднозначними. В науковій літературі існують фрагментарні експериментальні [21, 22, 23, 24] та нечисленні клінічні дані [26, 28] стосовно деяких ПТЗ. Хоча треба зазначити, що інші побічні ефекти вивчені досить добре і суперечності можуть стосуватись хіба що механізмів певних видів токсичності.

Затверджена ВООЗ стандартна схема терапії туберкульозу включає комбінацію ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу – препаратів I ряду (основних). Окрім зазначених 4-х засобів до I ряду належить також стрептоміцин. До препаратів II ряду (резервних) належать етіонамід, протіонамід, канаміцин, амікацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, циклосерин, капреоміцин, рифабутин, парааміносаліцилова кислота, тіоацетазон. Така систематизація обумовлена різницею у їхній активності та токсичності. Серед клініцистів загалом прийнятно вважати, що препарати I ряду поєднують високу активність проти *Micobacteria tuberculosis* та помірну токсичність [41]. Але, незважаючи на останнє положення, накопичено значний масив даних щодо побічної дії при застосуванні зазначених засобів, в тому числі і такої, що може бути пов'язаною з індукцією цитохромів Р-450. Розглянемо побічні ефекти препаратів I ряду, в тому числі і ті, що можуть стосуватись теми даного дослідження.

Ізоніазид є одним з найважливіших препаратів при лікуванні туберкульозу, що використовується, починаючи з 1952 року. Структура його проста, він містить піридиновий цикл і гіdraзинову групу [42]. Як показано експериментальними, а також клінічними дослідженнями, ізоніазид здатний індукувати цитохром Р-450 2Е1 [43].

Ізоніазид відноситься до проліків і для вияву специфічної дії повинен активуватися каталазою-пероксидазою *M. tuberculosis*. За цих умов утворюються активні форми кисню (АФК) (супероксид, пероксид водню та пероксинітрит) та органічні вільні радикали, які гальмують утворення міколієвих кислот стінки бактеріальної клітини, викликають пошкодження ДНК і, як наслідок, загибель бактерії [44].

Основним ферментом, відповідальним за метаболізм ізоніазиду в організмі, вважають N-ацетилтрансферазу, іншими можливими – цитохром P-450 2E1 та глутатіон-S-трансферазу [45]. Біотрансформація ізоніазиду протікає, в основному, в печінці, де відбувається його N-ацетилювання з утворенням ацетилізоніазиду, та у слизовій оболонці тонкого кишківника. Подальше перетворення ацетилізоніазиду йде шляхом його розщеплення до ізонікотинової кислоти та ацетилгідразину, який ацетилюється до діацетилгідразину. Всі метаболіти надалі виводяться з сечею у вигляді гідразону піровиноградної кислоти, гідразону α -кетоглутарової кислоти, ацетилізоніазиду, ізонікотинової кислоти, ізоніакотинілгліцину, ацетилгідразину та діацетилгідразину [46].

Досліджуючи механізми, залучені до активації ізоніазидом цитохрому P-450 2E1, K. S. Park та D. H. Sohn показали у своїх експериментах активацію трансляції гену CYP2E1 з відповідним збільшенням мРНК CYP2E1 під впливом ізоніазиду, а саме гідразидної групи у складі його молекули, що є прикладом регуляції ізоформи цитохрому P-450 2E1 на рівні трансляції [47].

З іншого боку було показано, що ізоніазид здатний інгібувати ряд ізоформ цитохрому P-450, серед них CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP3A, CYP2C9, а також і CYP2E1 [48]. Причому, ізоформи CYP3A та CYP2C19 ізоніазид інгібував дозозалежно та досить виражено, а для CYP2E1 виступав, як слабкий неконкурентний інгібітор. Інгібування одної або обох ізоформ CYP3A та CYP2C19 можливо є механізмом, за яким даний препарат сповільнює виведення лікарських засобів, що вводяться одночасно з ним [49]. Такі суперечливі дані можуть бути пов'язані з відмінностями експериментальних моделей та режимів введення зазначеного фармакологічного засобу. Але такі індукуючі та інгібіторні ефекти ізоніазиду доводять, що він може мати значний внесок до вияву токсичних ефектів при сумісному введенні з іншими препаратами.

Застосування ізоніазиду часто призводить до виникнення периферичних нейропатій, м'язової слабкості, втрати рефлексів, а також може спровокувати напад епілепсії [50]. Відмічено випадки порушення зору за рахунок розвитку

неврити зорового нерву при гострому отруєнні ізоніазидом у клініці [51]. Серед інших побічних проявів: лихоманка, висипи, аутоімунні реакції [52], гострий панкреатит [53], різноманітні порушення ЦНС [54]. За різними даними, застосування ізоніазиду супроводжується серйозними порушеннями з боку печінки у 10 % - 20 % пацієнтів [55, 56]. у дітей цей показник складає 61,5% [57]. Ізоніазид викликає розвиток гепатоцелюлярного некрозу, запалення та гепатити: хронічний, часто з клінічними проявами, подібними до вірусного, дисфункцію печінки з проявами жовтяниці, а також блискавичний гепатит зі смертельними наслідками, що в кінцевому результаті вимагає трансплантації печінки [58, 59]. Прояви гепатотоксичності, викликані ізоніазидом, залежать від таких чинників, як вік, спосіб життя, супутні захворювання тощо. У пацієнтів з такими факторами ризику, як хронічні захворювання печінки, алкоголізм, недоїдання, антитуберкульозна терапія викликає порушення роботи печінки значно частіше [60].

Дослідженнями останніх років встановлено, що генетичний поліморфізм основного метаболізуючого ізоніазид ензиму – N-ацетилтрансфери не впливає на прояви гепатотоксичності даного лікарського засобу, навпаки, було показано суттєвий взаємозв'язок між CYP2E1 *1A/*1A генотипом та зростанням у сироватці крові пацієнтів маркерних ферментів ураження печінки. Ці дані свідчать на користь провідної ролі цитохрому P-450 2E1 у гепатоушкоджуючій дії ізоніазиду та доводять корисність визначення генів CYP2E1 у гетерогенній людській популяції для передбачення ізоніазид-індукованої гепатотоксичності [61]. У досліджах *in vitro* показано, що один з метаболітів ізоніазиду – моноацетилгідазин підвищував кількість ревертантних мутацій у лініях *Salmonella typhimurium* TA100 і TA1535 та сприяв зростанню частоти мікроядер у поліхроматофільних еритроцитах, що свідчить про його мутагенну дію [61]. В експериментах з використанням мишей також були доведені слабкі мутагенні та канцерогенні властивості ізоніазиду, а також його здатність викликати ушкодження ДНК у гермінативних клітинах кролів [62]. З іншого боку, існують роботи, де зазначена відсутність генотоксичності у ізоніазиду та будь-яких

негативних ефектів щодо сперматогенезу у лабораторних тварин та людини [63, 27].

Синтетичний препарат піразинамід широко застосовується при комбінованій терапії туберкульозу. Піразинамід - похідне нікотинової кислоти, молекулярна структура якої аналогічна ізоніазиду [52]. Піразинамід, як і ізоніазид належить до проліків – для вияву специфічної дії повинен перетворюватись бактеріальними ферментами (нікотинамидаза/піразинамідаза), в активну форму піразинових кислоти. Механізм його дії ще не визначено [64]. Піразинамід метаболізується у печінці та в організмі також здатний утворювати під впливом дезамінази ендоплазматичного ретикулулу активний метаболіт – піразинову кислоту з подальшим перетворенням її за дії ксантиноксидази в 5-гідроксипіразинову кислоту. При цьому найбільша кількість випадків побічної дії піразинаміду стосується гепатотоксичності, раннім проявом якої є підвищення рівня активності трансаміназ у сироватці крові. Може відзначатись жовтяниця, гепатит, лихоманка, больові відчуття в області печінки, гепато- та спленомегалія [65,66]. Серед інших побічних ефектів за клінічними даними відзначено властивість піразинаміду пригнічувати екскрецію уратів, що проявляється гіперурикемією майже в усіх пацієнтів, випадками розвитку подагри, артралгією, анорексією, нудотою та блюванням, дизурією, дисфорією та лихоманкою [67].

На мишах *in vivo* було досліджено генотоксичність піразинаміду. Досліджували три дози (125, 250 та 500 мг/кг маси тіла, що відповідає 5, 10 та 20-кратному перевищенню терапевтичної дози). Мітотичний індекс та частоту хромосомних аберацій досліджували у трьох часових точках взяття зразків (3, 6 і 24 год) після однократного інтраперитонеального введення. Вивчали також частоту виникнення патологічних форм сперматозоїдів. Показано зниження мітотичного індексу у тварин, що отримували препарат. Кількість клітин з хромосомними абераціями була у діапазоні 4 % - 8 %. Максимальна частота хромосомних аберацій виявлялась через 3 години після введення. Крім того, показано дозозалежне зростання частоти випадків патологічних форм

сперматозоїдів. Ці спостереження свідчать про наявність у піразинаміді властивостей слабкого генотоксиканту в застосованих дозах [68]. З іншого боку, у культурах лімфоцитів людини піразинамід не викликав хромосомних аберацій та не проявляв мутагенних властивостей у тесті Еймса [66]. Варто зазначити, що піразинамід, введений щурам протягом 45 діб у дозах 250 мг/кг, 500 мг/кг та 1000 мг/кг, призводив до раннього та стійкого зниження метилювання ДНК по цитозину та аберантної активації гіперметилювання генів плацентарної форми глутатіон-S-трансферази та p16(INK4A) у печінці. При цьому у сироватці крові піддослідних тварин зростала активність амінотрансфераз та вміст білірубіну. Зміни у метилюванні ДНК можуть слугувати предикторними маркерами для оцінки токсичності [69].

Загалом механізми токсичності, індукованої піразинамідом невідомі. Невідомо, які ферменти відповідальні за його токсичність і чи викликана ця токсичність самим піразинамідом або його метаболітами. У дослідях на щурах було показано, що піразинамід пригнічував активність декількох ізоферментів CYP450 (2B, 2C, 2E1, 3A) [70], але дослідження з використанням мікросом печінки людини не виявили інгібуючої дії даного лікарського засобу на ізоензими CYP450 [71]. В той же попередніми дослідженнями колективу авторів відділу загальної токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» було виявлено, що за умов введення щурам самцям піразинамід у дозах 1000 мг/кг та 2000 мг/кг протягом 60 днів відбувалось дозозалежне зростання *n*-нітрофенолгідроксилазної активності мікросом печінки, маркера ізоформи CYP2E1. Одночасно збільшувався загальний вміст цитохрому Р-450 та швидкість НАДФН-залежного окислення в ендоплазматичному ретикулумі печінки, що свідчить про активацію процесів утворення токсичних інтермедіатів та активних форм кисню. За цих умов в сім'яниках знижувалась відносна інтенсивність сигналів електронного парамагнітного резонансу, притаманних негемовим заліzosірчаним білкам та трансферину. Зниження процесів транспорту заліза в організмі та вмісту негемових заліzosірчаних білків (переважно мітохондріальних ферментів)

здатне призводити до порушення передачі енергії між клітинами Сертолі та статевими клітинами. Виявлено дозозалежні порушення морфометричних показників сперматогенного епітелію (зростання числа сперматогоній, дегенеративні зміни у звивистих каналцях), зменшення кількості статевих клітин у придатках сім'яників щурів, порушення ембріогенезу у запліднених ними самиць (загибель плодів в до- та післяімплантаційний період), а також новонароджених щурят [72]. Застосування дисульфіраму, інгібітору цитохрому Р-450 2E1, в комбінації з піразинамідом запобігало активації *n*-нітрофенолгідроксилази, порушенню мейотичної активності сперматоцитів, процесів імплантації у самиць (показник доімплантаційної смертності залишався на рівні інтактної групи). Загибель новонароджених при цьому зменшувалась на 33 %, а їх життєздатність в постнатальний період підвищувалась. Дані стосовно зниження негативної дії піразинаміду на сперматогенез та ембріо-фетальний розвиток потомства самців за умов інгібування CYP2E1 дали авторам підставу припустити залучення даної ізоформи до патогенетичних механізмів, виявлених порушень [73].

Наступний широко застосовуваний у комбінованій терапії туберкульозу препарат рифампіцин є напівсинтетичним бактерицидним антибіотиком із широким спектром дії. Механізм його дії заснований на пригніченні транскрипції генів мікобактерій за рахунок блокади ДНК-залежної РНК-полімерази, що порушує синтез мРНК і білка, викликаючи загибель бактеріальних клітин [65].

Застосування рифампіцину супроводжується рядом побічних ефектів, одним з яких є гепатотоксичність [65]. При передозуванні рифампіцину спостерігається нудота, блювання, апатія, а також дозозалежне коричнево-червоне або оранжеве забарвлення шкіри, сечі, слини, поту, сліз та фекалій. При значному передозуванні розвиваються симптоми, що свідчать про ураження печінки, а саме збільшення органу, що супроводжується болем, жовтяницею, швидким зростанням вмісту загального і прямого білірубіну, активності лужної фосфатази та амінотрансфераз сироватки крові, втратою свідомості. До групи

ризикую належать пацієнти з алкоголізмом та/або хворобами печінки у анамнезі. Серед інших побічних ефектів можна назвати тромбоцитопенію, лейкопенію, пурпуру, гемолітичну анемію, гемоглобінурію, гематурію та підвищення концентрації гемоглобіну [66].

Приблизно 85% цього препарату метаболізується в печінці за допомогою мікосомальних ферментів системи CYP450 [42]. Основним шляхом метаболізму рифампіцину є дезацетилювання до дезацетилрифампіцину та незалежно від цього під час гідролізу утворюється 3-форміл-рифампіцин [74,75]. Механізми рифампіцин-індукованої гепатотоксичності невідомі, ніяких доказів стосовно токсичних метаболітів немає [76].

Особливої уваги з точки зору нашого дослідження заслуговує властивість рифампіцину індукувати ряд ізоформ цитохрому P-450 [77]. Показано, що найсуттєвіший ефект рифампіцин має на експресію CYP3A4, тому при застосуванні з іншими препаратами він найбільше змінює фармакокінетику субстратів даної ізоформи. Крім того, рифампіцин індукує CYP2C9-залежний метаболізм [78]. Слід зазначити, що стосовно CYP2E1 дані досить неоднозначні та суперечливі, оскільки є повідомлення про пригнічення експресії гену CYP2E1 в мікосомах печінки мишей під дією рифампіцину, чим автори пояснюють його інгібуючу дію по відношенню до вільнорадикальних процесів та здатність до захисту ДНК гепатоцитів від пошкоджуючого впливу CCl₄ [79]. При цьому показано, що застосування рифампіцину сумісно з ізоніазидом збільшує продукцію ацетилгідразину, і саме цей факт може бути причиною значного посилення токсичних уражень печінки за умов комбінованого прийому цих протитуберкульозних засобів [80,81].

Під впливом ізоніазиду сумісно з рифампіцином та піразинамідом, які вводились тваринам перорально протягом шести тижнів, виявлено значне підвищення як НАДФН- так і аскорбат-залежної швидкості утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) на тлі активації монооксигеназної системи мікосом печінки [82].

Дослідження генотоксичності рифампіцину виявило підвищення частоти

обмінів сестринських хроматид у клітинах кісткового мозку за умов його введення у дозах 160, 240 та 310 мг/кг та збільшення частоти хромосомних аберацій у сперматоцитах за умов введення у дозі 80 мг/кг. Причому, останній показник складав у контролі 3,5 %, після одноразового введення рифампіцину – 14 %, а після повторних введень протягом 7 днів –34,5 % [83]. Рифампіцин не вважають канцерогеном для людини, але при цьому існують повідомлення про його канцерогенність для тварин [84].

Для кролів було показано ембріотоксичну дію рифампіцину, а саме його здатність викликати дефекти остеогенезу. У дослідах на гризунах при щоденному введенні у дозах від 150 до 250 мг/кг маси тіла виявлена здатність рифампіцину призводити до виникнення у потомства інших природжених вад, в першу чергу вовчої пащі та *spina bifida* [85].

Вплив рифампіцину на чоловічу репродуктивну систему вивчений недостатньо, але показано, що даний антибіотик стимулює активність 17 альфа-гідроксилази у мікосоммах сім'яників щурів, призводячи до підвищення синтезу тестостерону та андростендіолу [86]. Цей факт може цікавити нас з огляду на останні дослідження, де показана здатність тетрахлорметану та ацетамінофену викликати при однаковому рівні пошкодження печінки більш виражене ураження нирок у самців-щурів порівняно з самицями. При цьому рівень експресії CYP2E1 був безумовно вищим також у нирках самців. Кастрація самців, або введення тестостерону самицям значно знижували міжстатеві відмінності у ступені ушкодження нирок та печінки. Ці результати свідчать, що зниження метаболізуючої здатності печінки, викликане її ураженням, може компенсуватись вторинними органами мішенями, чутливими до дії хімічних субстанцій, що підлягають біоактивації у цих органах. Даний ефект, можливо, є статевоспецифічним, залежить від рівня чоловічих статевих гормонів, та повинен враховуватись для належної оцінки потенційної небезпеки ксенобіотиків [87].

Етамбутол ((+)-N,N'-етилєн-біс-(2-амінобутан-1-ол), або (+)-N,N'-біс-[1-(оксиметил)-пропіл]-етилєндиіміноди-гідрохлорид) – це синтетичний

антибіотик для перорального застосування, похідне етилендіаміду. Етамбутол перешкоджає біосинтезу арабіногалактану, головного полісахариду на мікобактеріальній клітинній стінці, за рахунок інгібування ферменту – арабіносилтрансферази [65]. У процесі біотрансформації етамбутолу у щурів, собак та людини утворюється невелика кількість альдегідів та основний метаболіт і кінцевий продукт окиснення – (+)-2,2'-(етилен-ди-іміно)-ди-1-масляна кислота [88]. До 15 % етамбутолу екскретується у вигляді альдегідів та похідних дикарбонової кислоти [89]. При хронічному введенні етамбутол може викликати розлади зору та неврологічні розлади, психіатричні симптоми, алергічні реакції, порушення шлунково-кишкового тракту та, у деяких випадках, зворотну печінкову недостатність. Відзначали збільшення вмісту сечової кислоти у сироватці крові та гострі подагричні артрити. Гостре передозування може викликати розлади шлунково-кишкового тракту, болі у животі, нудоту, лихоманку, галюцинації, сплутаність свідомості та неврит зорового нерву. Серед інших побічних ефектів можна назвати жовтяницю, зворотне порушення функції печінки, дисфорію [90]. За деякими даними при введенні тваринам у високих дозах етамбутол виявляв тератогенні властивості [21]. Є повідомлення, що при введенні у дозах 25 мг/кг та 250 мг/кг щурам та півням етамбутол викликав пошкодження сперматогенного епітелію з наступним блокуванням сперматогенезу [21].

Важливим засобом для лікування туберкульозу лишається стрептоміцину сульфат [91]. Він застосовується у хворих з важкими формами туберкульозу. Особливо при менінгіті, міліарній дисемінації та серйозних туберкульозних ураженнях органів [92]. Стрептоміцин – антибіотик, що утворюється в процесі життєдіяльності променистих грибів роду *Streptomyces*. Органічна основа: N-метил-а-L-глюкозамідо-б-2-стрептозидо-стрептидин. Молекулу стрептоміцину можна розглядати як трисахарид, утворений з стрептидину (аміноциклітол), І-стрептози і N-метил-L-глюкозаміну. За хімічною структурою стрептоміцин належить до антибіотиків класу аміноглікозиди. А аміноглікозиди належать до аміноциклітолів (циклогексан з гідроксильними і

аміно- чи гуанідіно-замісниками) з глікозильними замісниками за однією чи кількома гідроксильними групами. Залежно від природи аміноциклітолу аміноглікозидні антибіотики поділяють на кілька груп. Стрептоміцин належить до основних аміноцикловмісних антибіотиків [93].

Побічні реакції при застосуванні стрептоміцину спостерігаються у 10–20 % пацієнтів. Найбільш характерними для цього лікарського засобу є нефротоксичні і нейротоксичні побічні реакції [94]. Нефротоксичні побічні реакції зустрічаються в 5–25 % у хворих у залежності від супутніх захворювань пацієнта, вибору препарату й режимів дозування, однак у порівнянні з іншими широко застосовуваними аміноглікозидами (наприклад, гентаміцином) стрептоміцин рідше спричиняє нефротоксичну дію, яка зазвичай проявляється неолігуричною гострою нирковою недостатністю [94,95]. Накопичуючись у корковому шарі нирок, стрептоміцин зв'язується з фосфоінозитами клітинних мембран у проксимальних каналцях і клубочках, пригнічуючи функцію ряду ферментів (Na^+ , K^+ АТФази, простагландинсинтетази, дихальних ферментів мітохондрій та ін.). У результаті цього зменшуються процеси фільтрації й секреції [95]. Нефротоксичність проявляється альбумінурією, мікрогематурією, циліндрурією, порушенням концентраційної здатності нирок, олігурією аж до анурії. Факторами ризику виникнення нефротоксичних реакцій від стрептоміцину є низький артеріальний тиск, дегідратація, гіпокаліємія, одночасне або попереднє застосування петльових діуретиків (фуросеміду, кислоти етакринової), інших нефротоксичних препаратів (цефалоспоринів, ванкоміцину, амфотеріцину В), літній вік пацієнта, захворювання печінки, печінкова недостатність. До факторів ризику, які потребують особливої уваги, варто віднести захворювання нирок і ниркову недостатність. Остання сприяє кумуляції стрептоміцину, внаслідок порушення виведення, створенню його високих концентрацій у крові та у тканині нирок, що значно погіршує їх стан. Ураження нирок носить зворотний характер. Нейротоксичність стрептоміцину проявляється пригніченням судинорухового та дихального центру, йому властиві гангліоблокуюча та курареподібна дії (у високих концентраціях) за

рахунок блокади передачі імпульсу у нервово м'язових синапсах шляхом пригнічення виділення Ca^{2+} і ацетилхоліну із пресинаптичних закінчень. Що стосується ото- і вестибулотоксичної дії, то ці побічні реакції є наслідком іноді незворотних порушень структури й функції волоскових клітин та еферентних волокон VIII пари черепних нервів у результаті взаємодії стрептоміцину із фосфоінозитами клітинних мембран структур внутрішнього вуха [96]. Ототоксичність проявляється зникненням сприйняття слуху на високих частотах, внаслідок чого хворі можуть відчувати дзвін у вухах; із подальшим розвитком часткової або повної втрати слуху. При лікуванні стрептоміцином ці реакції бувають здебільшого тимчасовими, лише в окремих випадках може виникнути стійке та прогресуюче ураження VIII пари черепномозкових нервів. Крім перерахованих вище побічних реакцій, стрептоміцин викликає вестибулярні розлади (запаморочення, нудоту, блювання, ністагм, порушення рівноваги, хиткість ходи); ураження зорового нерва (затуманення, неясність бачення, затемнення полів зору); поліневрити, парестезії, головний біль; ураження центральної нервової системи (ЦНС), зокрема у результаті прямої токсичної дії при інтралюмбальному введенні (галюцинації, епілептиформні напади, судоми окремих груп м'язів і загальний гіпертонус скелетної мускулатури); нервово-м'язову блокаду (порушення, пригнічення дихання, м'язову слабкість) [96].

На сьогодні є багато матеріалів про здатність протитуберкульозних засобів проникати трансплацентарно від матері до плода. Ці дані підтверджені при обстеженні породіль, що лікувалися стрептоміцином із приводу туберкульозу. Дослідження крові пуповини, взятої в момент її перерізання, виявили стрептоміцин у всіх випадках, крім одного. Концентрація препарату в крові плода була у 2 рази нижчою, ніж у крові матері. Стрептоміцин швидко потрапляє у фетоплацентарну циркуляцію та амніотичну рідину. Негативним наслідком, як виявилось в дослідях на тваринах різних видів, є його ототоксичність для плода. Завдяки дії стрептоміцину в немовлят виявлялася уроджена глухота [97].

Вважається, що стрептоміцин може мати негативний вплив на чоловічу фертильність, оскільки в дослідях на щурах була показана його здатність знижувати кількість сперматозоїдів, їхню життєздатність і рухливість та підвищувати кількість апоптотичних клітин у сім'яниках [22].

Слід зазначити, що всі розглянуті вище препарати використовуються у комбінованій терапії туберкульозу – Directly Observed Treatment Short-course (ДОТС). Проблема їх токсичності є унікальною, оскільки майже всі протитуберкульозні препарати першої лінії мають побічні ефекти, які розрізняються за ступенем тяжкості залежно від лікарського засобу і режиму. Крім того, всі схеми лікування активного туберкульозу включають комбінацію ліків, які, як правило, вводять протягом не менше 6 місяців, щоб гарантувати повне виліковування від хвороби і звести до мінімуму розвиток бактеріальних штамів, стійких до лікарських препаратів [98]. На основі протитуберкульозних засобів I ряду – ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду, етамбутолу – створено ряд комбінованих таблетованих препаратів, таких як рифінаг, рифатер, рифакомб, майрин, майрин II, фтізоетам, фтізопірам та ін. [99].

Механізми взаємодії застосовуваних у ДОТС-терапії препаратів є досить складними. Більшість протитуберкульозних препаратів є жиророзчинними і їхня елімінація вимагає біотрансформації до більш водорозчинних сполук. В основному це здійснюється за допомогою печінкових ферментів I фази і II фази біотрансформації. Під час реакцій I фази, як правило, відбувається окислення або деметилювання сполук із залученням ферментів цитохрому Р-450. Утворені метаболіти також можуть бути недостатньо розчинними у воді, що вимагає подальшого метаболізму. Крім того в реакціях першої фази біотрансформації часто утворюються токсичні проміжні продукти. На II фазі біотрансформації водорозчинні сполуки піддаються глюкуронізації або сульфатації, що веде до утворення нетоксичних метаболітів. На даній фазі детоксикації бере участь глутатіон, який може ковалентно зв'язуватися з токсичними сполуками за допомогою ферменту глутатіон-S-трансферази [100]. Транспортери (наприклад, Р-глікопротеїн) і ядерні рецептори (наприклад, прегнанові Х-рецептори) також

відіграють важливу роль у виведенні ліків та їх метаболітів. Ці процеси іноді називають III фазою метаболізму [101].

Наразі невідомо, чому поєднання рифампіцину і піразинаміду є більш токсичним, ніж ізоніазид або комбінація з ізоніазиду, рифампіцину і піразинаміду. Деякі автори припускають, що піразинамід може бути основною причиною. У ряду пацієнтів з латентним туберкульозом може спостерігатись більш високе споживання алкоголю під час комбінованої лікарської терапії, що підвищує ризик розвитку гепатотоксичних ефектів. Є припущення, що внаслідок лікарської взаємодії ізоніазид знижує гепатотоксичний потенціал рифампіцину і піразинаміду, але механізми цього феномену незрозумілі [102].

Пошук джерел наукової літератури, присвячених проблемі побічної дії комбінацій ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію в базах даних Medline/PubMed та Google Scholar дав дуже мало результатів, що свідчить про недостатню дослідженість даного питання. Тим не менш у одному ретроспективному дослідженні для оцінки статевої функції було зареєстровано 98 пацієнтів з легеневим туберкульозом. Була проведена оцінка до лікування та через 3 місяці протитуберкульозної терапії. На базовій лінії 14,3 % пацієнтів з легеневим туберкульозом мали еякуляторні порушення: 10,2 % - передчасну еякуляцію та 4,1 % - затримку еякуляції. Решта 85,7% пацієнтів мали нормальну еякуляцію [26, 103]. Через три місяці терапії 4 протитуберкульозними препаратами (ізоніазидом, рифампіцином, піразинамідом та стрептоміцином) спектр сексуальної дисфункції значно змінився. Частка пацієнтів з нормальною еякуляцією знизилася до 61,2 %, і частота передчасної еякуляції збільшується вдвічі (20,4 %), Затримка еякуляції була діагностована в 4,5 рази частіше (18,4 %) [26]. Автори вищенаведених досліджень підкреслюють, що частка еякуляторних розладів у чоловіків з туберкульозом легень загалом була на рівні популяції в цілому, а отже туберкульоз як хвороба не впливав на еякуляторну функцію. При цьому тривала антитуберкульозна терапія чотирма ПТЗ значно погіршувала еякуляторну функцію кожного четвертого пацієнта.

Крім того, є повідомлення, що лікування туберкульозу негативно

змінювало показники еякуляту пацієнтів, а саме, двомісячний курс протитуберкульозної терапії призводив до зменшення кількості сперми на 23,9 %, зменшенні кількості активно рухливих сперматозоїдів на 10,6 % та кількості морфологічно нормальних сперматозоїдів на 32,3 % [28].

Враховуючи досить широкий спектр побічної дії для кожного з протитуберкульозних засобів особливого значення набуває вивчення їхніх небажаних ефектів за комбінованої дії, оскільки останні можуть призводити не тільки до неадекватної і нерегулярної терапії, відмови від лікування, а і до непередбачених небажаних ефектів, зокрема на гонади.

Варто відзначити, що нормальна чоловіча репродуктивна здатність є результатом складних взаємодій багатьох механізмів, залучених до продукції сперматозоїдів та їхнього транспорту з гонад до еякуляту. Гіпоталамо-гіпофізарна система, продукуючи гонадотропін, фолікуло-стимулюючий гормон (ФСГ) та лютеїнізуючий гормон (ЛГ), регулює функціонування клітин Сертолі сперматогенного епітелію та продукцію андрогенів клітинами Лейдіга. Функціонування клітин, розташованих поза сім'яними канальцями (клітини Лейдіга та міоепітеліальні клітини) забезпечує відповідний рівень продукції сперматозоїдів. Для збереження унікального мікросередовища де відбувається мейоз та розвитку постмейотичних гермінативних клітин важливим аспектом також є цілісність гемато-тестикулярного бар'єру (ГТБ), який ізолює ці події від системного кровотоку [104]. На запліднювальний потенціал сперматозоїдів можуть впливати і фактори, що зачіпають функціонування допоміжних статевих залоз — епідидимісів, простати та сім'яних пухирців [105].

Первинні причини порушення якості та кількості сперматозоїдів безсумнівно є мультифакторними та включають широкий спектр основних передумов, що пов'язані з генетикою, стилем життя, факторами оточуючого середовища, які частіше мають комбінований вплив [106].

До розвитку негативних ефектів хімічних сполук, включаючи лікарські засоби, стосовно чоловічої репродуктивної функції залучено багато механізмів: 1) втручання гормоно- або антигормоноподібних речовин до нормальної

ендокринної або параендокринної регуляції; 2) пряма або опосередкована метаболічними перетвореннями деструктивна дія на специфічні типи клітин, такі як гермінативні клітини, клітини Сертолі та клітини Лейдіга; 3) ушкодження гематотестикулярного бар'єру; 4) індукція або інгібування ферментативних систем гонад і печінки, що може призвести до зростання або секреції чи кліренсу стероїдних гормонів; 5) мутагенний вплив на гермінативні клітини, який спричиняє продукцію сперматозоїдів з низьким запліднювальним потенціалом або нездатних до запліднення, вади розвитку або генетичні захворювання у потомства; 6) нейротоксична дія, яка супроводжується порушенням ерекції/емісії/еякуляції [107]. Причому, шкідлива дія хімічних речовин на чоловічу репродуктивну функцію може реалізуватись більше ніж за одним механізмом. Наприклад, відомо, що галогеновані поліциклічні гідрокарбони можуть діяти опосередковано через індукцію мікросомальних монооксигеназ та трансфераз, або напряду, взаємодіючи з рецепторами стероїдних гормонів. До розвитку репродуктивних порушень, викликаних поліциклічними ароматичними гідрокарбонами залучені два механізми - метаболізм до хімічно активних диол-епоксидів та індукція Р-450-залежних монооксигеназ у печінці та інших органах [108].

Як свідчать наведені вище дані наукової літератури для вияву негативної дії на печінку, ряд ПТЗ потребує метаболічних перетворень з залученням цитохрому Р-450 (зокрема ізоформи СYP2E1), які ведуть до продукції інтермедіатів, здатних зв'язуватись з життєво важливими макромолекулами клітин, такими як ДНК або протеїни. Не виключено, що метаболізм ПТЗ в організмі може призводити до модуляції залежних від цитохрому Р-450 процесів і в сім'яниках. Тому ми вважаємо за потрібне зосередитись на питанні можливості метаболізму хімічних речовин безпосередньо в гонадах та даних, відомих з наукової літератури стосовно залучення до цих процесів різних ізоформ цитохрому Р-450.

Відомо, що значна кількість хімічних сполук, включаючи лікарські засоби, в організмі ссавців піддається метаболічній активації із залученням

цитохрому Р-450. У системі даних ензимів часто виділяють два найбільших класи — цитохроми Р-450 (індукуються фенobarбіталом) та цитохроми Р-448 (індукуються 3-метилхолантеном) [109]. В. G. Lake та співавт. визначили активність ізозимів цих двох класів у супернатанті сім'яників, отриманому при 10000 g з використанням біфенілу, як субстрату. За утворенням 4-гідрокси біфенілу була виявлена активація цитохрому Р-450, в той же час цитохром Р-448 лишався неактивним [110]. Більше того, G. I. Murray зі співавт. з імуноцитохімічним методом з використанням моноклональних антитіл довели наявність цитохрому Р-450 в клітинах Лейдіга сім'яників людини [111]. Пізніше було визначено ізоформний склад та рівень експресії 31 ізоформи цитохрому Р-450 у гонадах чоловіків. Показано, що в сім'яниках людини експресуються наступні ізозими: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6/7, CYP2A7, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP3A3/4, CYP3A4, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP5A1, CYP7B1, CYP8A1, CYP8B1, CYP11A, CYP17, CYP19, CYP27B1, CYP39A1, CYP46, CYP51 [112]. Слід підкреслити, що сім'яники містять два окремих набори ферментів цитохрому Р-450: стероїдогенні (наприклад, CYP11A1 і CYP17A1), які каталізують ключові реакції біосинтезу андрогенів [113] та ті, що беруть участь у біотрансформації гідрофобних ксенобіотиків у більш водорозчинні метаболіти [114]. Фізіологічна роль ізоферментів Р-450, які метаболізують хімічні сполуки в сім'яниках остаточно не з'ясована. Припускають, що вони можуть відповідати за окислювальну біотрансформацію ліпофільних ксенобіотиків або ендогенних сполук в цих тканинах [115]. Найзначніший внесок у метаболізм ксенобіотиків, включаючи лікарські засоби, належить ізоформам CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C28, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 [116].

Було досліджено експресію ферментів Р-450 у експериментальних тварин, що найчастіше використовуються в різноманітних дослідженнях (щури та миші). Тільки три ізоформи сімейства цитохромів: 1 (1A1, 1A2, 1B1) та одна ізоформа сімейства 2 (2E1) – присутні як у людини, так і у зазначених видів

тварин. Незважаючи на це, для них також характерна певна видова специфічність, що, очевидно, пояснюється відмінностями амінокислотного складу. Так, Р-450-1В1 людини ефективно каталізує О-деетилювання етоксирезорфіну, в той час як аналогічна ізоформа мишей абсолютно неактивна в цих реакціях [117]. Варто зазначити, що експресія даної ізоформи в сім'яниках знаходиться під ендокринним контролем та є відповідальною за активацію ряду прокарциногенів та інших хімічних речовин. Примітно, що білок СYP1B1 в сім'яниках щурів експресується на відносно високому рівні (57 пмоль/мг). Можливо, що це навіть найбільш поширений ізоензим Р-450 в мікросомах сім'яників дорослих щурів. Причина настільки високої експресії СYP1B1 в цих тканинах невідома [118]. Відомо, що СYP1B1 каталізує утворення генотоксичного 4-гідроксиестрадіолу та біоактивує про-канцерогени з навколишнього середовища (наприклад, поліциклічні ароматичні вуглеводні, гетероциклічні ароматичні аміни). Експресію СYP1B1 і формування 4-гідроксиестрадіолу пов'язують з утворенням естроген-залежних пухлин у багатьох тканинах різних видів тварин [119].

Загалом на даний час стосовно можливої участі у механізмах розвитку чоловічих репродуктивних розладів є повідомлення для невеликої кількості перелічених ізоформ. Зокрема цікавими є результати нещодавнього дослідження диференційної експресії СYP3A4 у тканинах простати які показали, що зниження експресії цієї ізоформи може сприяти розвитку раку даного органу [120]. Для певних комбінації гаплотипів СYP3A4/СYP3A5 також продемонстровано диференційну чутливість стосовно виникнення даного захворювання. Нещодавно відкрита ізоформа СYP3A43 виявляє незначний рівень експресії у печінці, але в великій кількості експресується у простаті та сім'яниках. Її субстратна специфічність до кінця не з'ясована [121].

У дослідях на мишах для речовин різної хімічної структури – мірексу (індуктор СYP1A2, СYP2B10, СYP2E1 та СYP3A), 2,2-біс(*n*-хлорфеніл)-1-1-дихлоретилену (індуктор СYP1A2 та СYP2B10), вінклозоліну та флутаміду (індуктори 3A та СYP1A2) знайдено зв'язок між СYP-індукуючим потенціалом

та здатністю втручатись у метаболізм тестостерону, що може пояснювати їхні антианδροгенні ефекти [122].

В будь якому випадку серед ізоформ цитохрому, які експресуються у чоловічих гонадах, однією з найважливіших є CYP2E1, враховуючи його високу індукцибельність та здатність до значної генерації реактивних форм кисню, таких як, наприклад, супероксидний радикал [123]. На даний час встановлено, що CYP2E1 бере участь у метаболізмі досить широкого спектру ксенобіотиків, які входять до таких класів як: спирти, альдегіди, кетони, ароматичні сполуки, ефіри, жирні кислоти, галогенізовані та негалогенізовані алкани та алкени, нітрозаміни, азосполуки, відновлюючі речовини, і включають досить поширені в промисловості та побуті розчинники, лікарські засоби, сполуки ендогенного походження, тощо [124]. Здебільшого увага дослідників приділяється впливу індукторів та субстратів цитохрому CYP2E1 на печінку, хоча окислювальний метаболізм ксенобіотиків із залученням цієї ізоформи звичайно може відбуватись не тільки у цьому органі. Показано присутність CYP2E1 у нирках, наднирниках, легенях, мозку, слизовій носової порожнини, сім'яниках, простаті, матці, плаценті людини [125].

У 1998 році Y. Jiang та співавт. ідентифікували білок CYP2E1 у сім'яниках та активність його маркерного ферменту CYP2E1 - *n*-нітрофенолгідроксилази [126]. Пізніше S. B. DuTeaux із співавт. та P. G. Forkert зі співавт. показали присутність CYP2E1 у сім'яиносних каналцях сім'яників, клітинах Лейдіга та в епідидимісі у щурів. Автори зробили висновок, що ці тканини також, окрім печінки та ін., можуть бути відповідальними за окислювальний метаболізм ксенобіотиків [127, 128, 129]. Цей факт є дуже важливим з огляду на визначну роль епідидимісу та сім'яиносних каналців у відтворенні репродуктивної функції самців. Сім'яиносні каналці з'єднують яєчка з епідидимісом та поглинають більше ніж 75 % рідинної фракції під час проходження сперми до епідидимісів [130]. Під час проходження через протоки епідидимісів мембрана сперматозоїдів модифікується, що необхідно для набуття гаметами рухливості та здатності

запліднювати яйцеклітину. Статеві клітини, вилучені безпосередньо із сім'яних каналців, нерухливі та не можуть проникнути через оболонку ооциту. Таким чином, у каналцях епідидимісів відбувається завершальне дозрівання сперматозоїдів та не підлягає сумніву важливість даної стадії для рівня фертильності самців [131, 132].

Існують факти, які наводять на думку, що експозиція речовин, здатних індукувати ізоформу CYP2E1 може викликати ураження репродуктивних органів та підвищувати ризик несприятливої дії інших речовин завдяки модуляції їх метаболізму безпосередньо в чоловічих гонадах. Наприклад, було визначено участь CYP2E1 в біоактивації таких гонадотоксичних речовин, як ацетон, бензол, стирол. Для ацетону та стиролу показана здатність певною мірою впливати на якість сперми тварин, знижуючи відсоток сперматозоїдів з нормальною формою голівки та підвищуючи відсоток нерухливих статевих клітин [133, 134].

Ряд епідеміологічних даних щодо впливу на організм чоловіків хлорованих розчинників, включаючи трихлоретилен, виявив зменшення концентрації сперматозоїдів у спермі та їхньої рухливості, підвищення відсотку аномальних статевих клітин, зниження фертильності та опосередковане батьком підвищення ризику спонтанних абортів та відтермінованого зачаття [135]. Враховуючи, що метаболізм трихлоретилену відбувається переважно за участі цитохрому P-450 2E1, можна також припустити можливість його токсичної біоактивації безпосередньо у чоловічих статевих органах. Наприклад, за умов уведення самцям-щурам трихлоретилену було показано CYP2E1-залежне утворення його реактивних інтермедіатів із наступним їх ковалентним зв'язуванням з білками клітин [128]. Ці тварини виявляли дозозалежне зниження запліднювальної здатності за відсутності будь-яких змін маси сім'яників і епідидимісів, кількості та рухливості сперматозоїдів. Не було виявлено і порушень мітохондріального мембранного потенціалу сперматозоїдів та акросомальної стабільності. Проте, в епітелії сім'явиносних каналців сім'яників трихлоретилен викликав певні гістологічні зміни,

локалізація яких співпадала з локалізацією цитохрому P-450 2E1. Також було виявлено дозозалежне збільшення ліпопероксидації у спермі щурів, що, можливо, пов'язано саме із активацією вищезгаданої ізоформи [127]. Методом імуноблотингу підтверджено, що вміст протеїну P-450 2E1 в епітелії епідидимісів переважав його кількість у клітинах Лейдіга сім'яників, і, відповідно, у першому випадку була вищою і його каталітична активність, визначена за *n*-нітрофенолгідроксилюванням. Саме в епідидимісах і визначали найбільшу концентрацію хлоралу – основного метаболіту трихлоретилену [129]. Метаболізм трихлоретилену інгібувався на 77 % у разі преінкубації мікросом сім'явиносних каналців з антитілами до CYP2E1 [128].

Експериментальні дані стосовно метаболізму трихлоретилену в чоловічих гонадах були підтверджені результатами клінічних досліджень. Провели дослідження зразків сперми восьми механіків, що протягом двох років використовували трихлоретилен, як чистильну рідину та мастило і звернулися до медичного центру зі скаргами на безпліддя. У всіх суб'єктів в спермі був виявлений трихлоретилен та його метаболіти [136].

Зв'язок між метаболізмом 1-бромпропану в системі CYP2E1 та наявністю репродуктивних порушень у самців був досліджений з використанням мишей дикого типу та мишей *Cyp2e1* *-/-*. За умов інгаляційного введення період напіввиведення [1,2,3-(13)C-1-бромпропану] був довшим у тварин *Cyp2e1* *-/-* порівняно з мишами дикого типу. В той же час у сечі мишей дикого типу основним метаболітом 1-бромпропану була меркаптурова кислота 1-бром-2-гідроксипропану, а у нокаутних мишей – продукти кон'югації 1-бромпропану з глутатіоном. Незважаючи на те, що мишей *Cyp2e1* *-/-* піддавали майже вдвічі довшій експозиції 1-бромпропану, ніж тварин дикого типу, у них не було виявлено жодних негативних ефектів стосовно репродуктивних органів та якості сперматозоїдів. Отримані результати дозволили авторам зробити висновок, що саме CYP2E1-залежне окислення 1-бромпропану є відповідальним за його сперматотоксичність [137].

Добре відома здатність етанолу негативно впливати на продукцію тестостерону та призводити до тестикулярної дистрофії [138]. Одна з гіпотез пов'язує даний феномен з перетворенням алкоголю до ацетальдегіду безпосередньо у сім'яниках. Вивчення механізмів окислення етанолу до ацетальдегіду у фракції мікросом сім'яників виявило його ензиматичну природу та залежність від присутності нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого (НАДФН) та кисню. Показано здатність препаратів тестикулярних мікросом в присутності НАДФН також продукувати гідроксильний та 1-гідроксиетильний вільні радикали. Причому їхня генерація модулювалась речовинами, що знижують продукцію ацетальдегіду — дифеніленіодоніумом, госсіполом та дефроксаміном. До метаболізму етилового спирту у чоловічих гонадах можуть бути залучені, в тому числі, цитохром Р-450 2Е1, цитохром Р-450 редуктаза, та ферменти з ліпооксигеназною та пероксидазною активністю [139]. Отримано докази того, що мікросомні ферментативні системи метаболізму етанолу в сім'яниках локалізовані в клітинах Лейдіга. Інгібітори активності алкогольдегідрогенази та каталази (4-метилпіразол та ціанід калія) не справляли ефекту на інтенсивність окислення алкоголю в мікросомах клітин Лейдіга та в них активність мікросомної етанол-окиснюючої системи була вдвічі вищою, ніж в інтерстиціальних клітинах [140].

Відомо, що цитохром Р-450 2Е1 бере участь у перетворенні інгаляційних анестетиків — галотану (фторотану), севофлурану і енфлурану на високотоксичні метаболіти (трифтороцтову кислоту, трифторацетилхлорид та ін.), які ацилюють білки і спричиняють утворення неоантигенів [141]. Показано присутність аддуктів галотану у мікросомах сім'яників щурів [142]. Після субхронічної експозиції галотану в сім'яниках щурів відзначали підвищення *n*-нітрофенолгідроксилазної активності у 3,2 рази та збільшення вмісту апо-протеїну CYP2E1 у 7 разів, хоча у печінці цих тварин дані показники збільшувались відповідно у 2,3 та 1,4 рази. Метаболіти галотану визначались не тільки у печінці, сім'яниках і плазмі, а і у сперматозоїдах піддослідних тварин (акросомі та/або області перинуклеарної теки, дистальному відділі хвоста), що

може бути результатом токсичної біоактивації галотану у репродуктивному тракті самців [141].

Присутність цитохрому Р-450 2Е1 у чоловічих гонадах та його індукцибельність, на наш погляд, можуть мати велике значення у продукції генотоксичних метаболітів. Зокрема, можна зробити припущення щодо залучення ізоформи СYP2Е1 до розвитку віддалених ефектів на потомство чоловіків, які піддавались хронічній експозиції інгаляційних анестетиків. Так, було зафіксовано, що у дружин анестезіологів, які не мали доступу до середовища операційної кімнати, рівень спонтанних абортів та передчасних пологів був відповідно в 3 та 4 рази вищий ніж у контрольній групі. Крім того, у цієї ж групи жінок спостерігали значне підвищення випадків появи дітей з уродженими вадами [143]. Цитогенетичний аналіз показав зростання частоти хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові людей за умов хронічної експозиції інгаляційних анестетиків, що підтверджує кластогенний ефект цих речовин [143].

Є припущення, що СYP2Е1 відіграє важливу роль у біоактивації 1,3-бутадієну до ДНК реактивного епоксидного метаболіту, який може індукувати генотоксичність *in situ* у соматичних та гермінативних клітинах мишей, оскільки було зафіксовано наявність СYP2Е1 у інтерстиціальних клітинах сім'яників цих тварин [144].

Показано, що акриламід-індуковані мутації в статевих клітинах самців пов'язані із цитохром Р-450 2Е1-залежною епоксидацією акриламіду. У інтактних самиць мишей, парованих з самцями *Cyp2e1*^{+/+}, що отримували акриламід підвищувалася кількість ембріонів з хромосомними абераціями з наступним пропорційним зниженням кількості живих плодів, місць імплантації та плодючості. Однак, у самиць, спарованих з самцями *Cyp2e1*^{-/-} не було виявлено будь-яких негативних ефектів, що свідчить про залежність мутагенних ефектів акриламіду від СYP2Е1-залежного метаболізму. Можливо, що у людській популяції чутливість до токсичних ефектів акриламіду є результатом поліморфізму СYP2Е1 [145]. Виявлено, що токсичні ефекти

акриламиду на статеві клітини мишей зростають за умов ожиріння — стану, що характеризується підвищенням експресії генів CYP2E1 [145].

З огляду на все вищезазначене можна стверджувати, що закономірності найбільш раннього метаболічного прояву віддалених наслідків впливу хімічних сполук, що метаболізують із залученням цитохрому Р-450 2Е1 щодо чоловічої репродуктивної системи можуть бути універсальними. Враховуючи здатність ряду ПТЗ викликати індукцію у печінці CYP2E1, можна припустити ймовірність модуляції експресії та активності даної ізоформи в чоловічих гонадах.

1.2 Алкоголізм та цукровий діабет, як фактори ризику стосовно порушень чоловічої репродуктивної функції

Застосування ПТЗ досить часто відбувається на тлі системних патологій, перебіг яких може опосередковано, через вплив на активність цитохрому Р-450, посилювати побічні ефекти. До таких захворювань, зокрема, належать хронічний алкоголізм та цукровий діабет, коли має місце індукція цитохрому Р-450 2Е1. Треба відзначити, що хворі на алкоголізм та діабет віднесені до групи ризику захворювання на туберкульоз [146, 147, 148, 149, 150, 151].

Результати останніх клініко-епідеміологічних досліджень свідчать про зростання ризику туберкульозної інфекції у людей з високим рівнем споживання алкоголю. За даними мета-аналізу у порівнянні з людьми з низьким споживанням алкоголю або без нього, ризик туберкульозу у людей з високим або будь-яким споживанням алкоголю значно зростає (95 % КІ: 1,2-23). При цьому аналіз реакція-експозиція показав, що за умов кожних 10-20 грамів щоденного споживання алкоголю, ризик захворюваності на туберкульоз зростає на 12 % [152]. За даними досліджень *in vivo* та *in vitro* це пов'язано з тим, що вживання алкоголю суттєво порушує імунну відповідь, підвищуючи схильність до захворювань дихальних шляхів, таких як туберкульоз [153]. Таким чином, збільшується і ризик застосування ПТЗ та тлі алкогольної інтоксикації.

Враховуючи задачі нашого дослідження варто розглянути дані наукової літератури, які на сьогодні накопичено стосовно негативної дії етанолу на чоловічі гонади.

Добре відомо, що надмірне споживання алкоголю веде до порушень основних метаболічних шляхів [154]. Етанол метаболізується, в основному, за двома шляхами - окиснювальним (головним чином, у печінці) і не окислювальним (в основному, в позапечінкових тканинах) [155]. Головним шляхом метаболізму етанолу є окиснення цитозольною алкогольдегідрогеназою (АДГ). У результаті утворюється токсичний і високореакційний ацетальдегід. Ця реакція супроводжується відновленням нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД⁺) до НАДН. Завдяки цьому формується високо відновлене цитозольне середовище [155]. Проте, ключову роль в окисненні етанолу в ацетальдегід відіграє система СYP, у тому числі ізоферменти СYP2E1, 1A2 і 3A4, а також каталаза [154, 155]. Причому за умов хронічного споживання етанолу в його метаболізмі переважно беруть участь ізоферменти цитохрому P450. Метаболізм алкоголю за допомогою СYP2E1 призводить до генерації АФК, в тому числі гідроксиетилу, супероксиданіону та гідроксильних радикалів. Для них характерне недовге існування, нестабільність і активна взаємодія з молекулами клітин [155]. Окиснення етанолу пероксисомальною каталазою вважається мінорним шляхом його метаболізму [155]. Ацетальдегід, що утворився в результаті окиснення спирту швидко метаболізується, головним чином, за допомогою мітохондріальної АЛДГ в ацетат і НАДН. Мітохондріальний НАДН використовується в електрон-транспортному ланцюзі [155].

Неокиснювальний метаболізм етанолу є незначним і призводить до утворення етилових ефірів жирних кислот і фосфатидил-етанолу. Ці метаболіти, як відомо, мають середній період напіврозпаду і тенденцію до накопичення в печінці, порушуючи сигнальні шляхи в клітинах [156]. Другий неокиснювальний шлях метаболізму вмикається за високих рівнів циркулюючого етанолу, і до нього залучена фосфоліпаза D, яка перетворює фосфатидилхолін на фосфатидну кислоту, а потім на фосфатидил-етанол [154].

Фосфатидил-етанол погано метаболізується та його вплив на клітини невідомий, проте, він може заважати утворенню фосфатидної кислоти та руйнувати клітинну сигналізацію [154].

Як зазначено D. Wu та A.I. Cederbaum, важко виділити основний механізм, що враховуватиме всі можливі впливи алкоголю на організм або навіть на один конкретний орган. Багато різних механізмів діють узгоджено, відображаючи спектр реакцій організму на незліченну кількість прямих і непрямих дій етилового спирту. Одним з факторів, який був запропонований як такий, що відіграє центральну роль у розвитку викликаного алкоголем ушкодження клітин, є надмірне утворення вільних радикалів та окисний стрес [157]. Механізми, за допомогою яких окиснювальний стрес викликає етанол-індуковану гонадотоксичність, вивчаються екстенсивно з 1980-х років.

У щурів, які споживали алкоголь протягом 50 днів, було показано зменшення вмісту полієнових кислот і компенсаторне збільшення насичених жирних кислот в сім'яниках, що супроводжувалося збільшенням формування дієнових кон'югатів і малонового диальдегіду (МДА) у тестикулярних мітохондріях, а також зниженням вмісту відновленого глутатіону [158]. Вичерпання тестикулярного пулу відновленого глутатіону спостерігали також у щурів, що хронічно споживали алкоголь (2,5 г 50 % етанолу / кг маси тіла внутрішньошлунково протягом 90 днів) [159]. Є повідомлення щодо зростання продуктів окиснення ліпідів і білків та зниження ферментативної антиоксидантної активності, а також вмісту неферментативних антиоксидантів у сім'яниках на різних експериментальних моделях алкоголізму [160, 161, 162].

Селен, як частина системи відновленого глутатіону виконує ключові функції захисту від АФК. У потомства самиць, які зазнали впливу етанолу під час вагітності та лактації, було показано зменшення пулу тестикулярного селену [163]. Цей елемент необхідний для синтезу тестостерону, утворення та дозрівання сперматозоїдів [164, 165]. Він є складовою частиною селенопротеїнів GPx1, GPx3, mGPx4, cGPx4 і GPX5, які захищають сперматозоїди від окисного пошкодження протягом усього процесу дозрівання,

а також mGPx4 і snGPx4, які є структурними компонентами зрілих сперматозоїдів [164]. Дефіцит селену може вплинути на масу сім'яників та супроводжуватись пошкодженням середньої частини сперматозоїдів, змінами їх рухливості і форми [166].

Перевантаження залізом спостерігається не тільки у разі алкогольних захворювань печінки, але виявлено, що одноразове введення етанолу (50 ммоль/кг) викликало накопичення заліза в сім'яниках щурів. Це супроводжувалось активацією ПОЛ і зниженням вмісту альфа-токоферолу. Ці дані підтверджують гіпотезу про причетність заліза до паракринної регуляції етанол-індукованих тестикулярних розладів [167].

L. M.Wallock-Montelius та ін. повідомляють, що споживання етанолу призводило до зростання концентрації фолієвої кислоти в сім'яниках у міні-свиней. На думку авторів, це може призводити до зменшення кількості гермінативних клітин і, як наслідок, розмірів сім'яників. Одночасно хронічне споживання етанолу знижувало активність метіонін-синтази у сім'яниках, що свою чергу, впливало на гормональну регуляцію сперматогенезу [168].

У щурів, які споживали етанол, виявлене зростання рівнів фактору некрозу пухлин α (TNF- α) й інтерлейкіну (IL) 6 у гіпоталамусі, гіпофізі та сім'яниках [169].

Примітно, що гостра алкогольна інтоксикація призводила до підвищення рівня імунореактивного β -ендорфіну та тестостерону в тестикулярній інтерстиціальній рідині, а також зниження її обсягу. Також у сироватці крові спостерігалось різке зниження ЛГ і тестостерону в поєднанні з різкими змінами рівня β -ендорфіну в гіпофізі, крові і сім'яниках. Навпаки, за умов хронічного введення алкоголю рівень імунореактивного β -ендорфіну в гіпоталамусі та сім'яниках значно пригнічувався [170].

Здатність етанолу пригнічувати продукцію тестостерону і викликати тестикулярну дистрофію може бути пов'язана з метаболічною трансформацією спирту в ацетальдегід безпосередньо в сім'яниках [139]. Показано, що основними локалізаціями активності АДГ були ядерні та цитозольні фракції

тестикул. І навпаки, в придатках активність АДГ була відсутня. Тестикулярну альдегіддегідрогеназу (АЛДГ) визначали в усіх субклітинних фракціях - ядерній, мітохондріальній, цитозольній і мікросомальній [168]. Несподівано було виявлено активність АЛДГ в епідидимісах, вона була рівномірно розподілена поміж їхньою головною та хвостовою частинами. АЛДГ сім'яників і придатків може відігравати певну роль у токсичній дії ацетальдегіду на гонади [171].

За тривалого споживання алкоголю в сім'яниках тварин посилюється активність НАД⁺-залежної АДГ [160, 172]. У свою чергу можливо, що перетворення етанолу в ацетальдегід за допомогою АДГ знижує секрецію андрогенів клітинами Лейдіга [172]. У цих структурах зростання перетворення дигідротестостерону в 3 β і 3 α -діоли було в прямій залежності від дози етанолу та блокувалося 4-метилпіразолом або підвищенням концентрації НАДФН [173].

Було виявлено, що у тестикулярній мікросомальній фракції можливе ферментативне НАДФН- і кисень-залежне перетворення етанолу на ацетальдегід. До мікросомальної трансформації етанолу в ацетальдегід частково можуть бути залучені CYP2E1, P450-редуктаза та інші ферменти з дією подібною до ліпоксигеназ / пероксидаз [139].

Показано, що активність мікросомальної етанолокиснюючої системи у клітинах Лейдіга з сім'яників щурів складала близько 47 нмоль ацетальдегіду за 20 хв на мг білка, в той час як активність в неочищених інтерстиціальних клітинах становила близько 26 нмоль. Інгібітори активності АДГ та каталази (4-метилпіразол та ціанід калія) не справляли ефекту на інтенсивність окиснення алкоголю в мікросомах клітин Лейдіга, та в них активність мікросомальної етанолокиснюючої системи була вдвічі вищою, ніж в інтерстиціальних клітинах [139].

Деякі дослідження показали, що ацетальдегід характеризується більшою токсичністю, ніж етанол щодо продукції тестостерону, безпосередньо інгібуючи протеїнкіназу C - ключовий фермент біосинтезу тестостерону [174],

або викликаючи порушення про-/антиоксидантного балансу в клітинах сім'яників [175].

Встановлено, що опосередковане АФК-залежними сигнальними системами зростання експресії білка c-Jun (є частиною ранньої відповіді формування фактора транскрипції) пригнічує експресію генів стероїдогенезу шляхом супресії транзактивації ферменту Nur77 (один з головних транскрипційних факторів, що регулюють експресію генів стероїдогенних ферментів), призводячи до зниження тестикулярного стероїдогенезу [176]. Показано залежну від часу білково-специфічну зміну рівнів StAR, рецептора бензодіазепінів периферичного типу і P450_{ssc} у клітинах Лейдіга щурів, які зазнали впливу етанолу. Слід зазначити, що здатність клітин Лейдіга вивільняти тестостерон не виявляла простої кореляції зі змінами вищезазначених білків [177].

Зміни в окиснювально-відновному співвідношенні НАДН/НАД⁺ у клітинах сім'яників, які відбуваються за метаболізму алкоголю, можуть відігравати важливу роль у викликаних ним порушеннях. Ряд досліджень пропонує як механізм, за яким відбувається пригнічення синтезу тестикулярного тестостерону, спричинене метаболізмом етанолу підвищення співвідношення НАДН/НАД⁺ у клітинах Лейдіга. Індуковане етанолом високе співвідношення НАДН/НАД⁺ у мітохондріях може призводити до зниження концентрації мітохондріального оксалоацетата з подальшим інгібуванням активності декількох транспортних ланцюгів і перериванням потоку мітохондріального цитрату до гладкого ендоплазматичного ретикулуму. Такі події позначаються на швидкості стероїдогенезу [178].

Y. B. Chiao та співавт. припускають, що основним ефектом на ферменти, необхідні для стероїдогенезу за хронічного споживання етанолу, може бути зниження активності 3 β -гідроксистероїддегідрогеназної/ізомеразної активності (лімітуюча стадія на етапі синтезу статевих стероїдів з прегненолону) [179]. Опосередковане етанолом збільшення співвідношення НАДН/НАД⁺ у клітинах Лейдіга викликає пригнічення реакцій, які каталізуються даним ензимом [180].

З іншого боку, етанол можливо заважає тестикулярному стероїдогенезу шляхом пригнічення щонайменше двох стадій на цьому метаболічному шляху, а саме, перетворення прегненолону на прогестерон, яке каталізується НАД⁺-залежною 5-ен-3-гідроксистероїддегідрогеназою/ізомеразою, та перетворення 17-гідроксипрогестерону в андростендіон, яке каталізується НАД⁺-незалежною ліазою C17,20 [181].

Припускають, що етанол одночасно зі стимуляцією активності 17 α -гідроксилази може пригнічувати нормальну координацію активності 17,20-ліази з активністю 17-кетостероїд-редуктази [182]. За іншими даними індуковане етанолом пригнічення біосинтезу тестостерону не залежить від зовнішньотестикулярного підвищення окиснювально-відновного потенціалу або зовнішньо- чи внутрішньотестикулярного ацетальдегіду *per se*. Воно супроводжується змінами тестикулярного метаболізму кетонових тіл [183].

У сім'яниках щурів, які протягом 8 тижнів отримували 3% розчин етанолу знижувалась концентрація АТФ [184], а внаслідок 10 тижневого споживання щурами етанолвмісної рідкої дієти (36% етанолу від загальної кількості калорій) знижувалось співвідношення тестикулярні фосфодієфіри/АТФ [185]. Аналогічно, зниження активності АТФ з одночасним пригніченням активності СДГ та сорбітолдегідрогенази, а також зниження вмісту фруктози було виявлено в сім'яниках мурчаків, що вживали алкоголь роками [160]. Ці порушення можуть викликати дисбаланс в енергетичних процесах, необхідних для нормальних процесів сперматогенезу.

Нечисленні клінічні дослідження деяких видів активності ферментів у чоловічих гонадах підтверджують експериментальні дані. У біоптатах сім'яників пацієнтів з порушеннями фертильності, індукованими алкоголем, виявлено майже повну відсутність Ca²⁺-АТФази в клітинах Лейдіга, а також зниження активності 3 β -гідроксистероїд дегідрогенази і 17 β -гідроксистероїддегідрогенази [186].

Введення етанолу порушувало генерацію НАДФН у клітинах Лейдіга, що може бути одним з біохімічних механізмів, опосередковуючих прямі та

непрямі ефекти етанолу, що призводять до гіпоандрогенізації [187]. У сім'яниках мурчаків, що 90 днів отримували етанол спостерігали достовірне підвищення активності 3-гідрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктази та падіння активності тестикулярних глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і малатдегідрогенази, що призводило до зниження рівня тестостерону [188].

Внаслідок дії етанолу порушується здатність клітин Лейдіга окиснювати глюкозу. Його високі дози знижують кількість рецепторів ЛГ на мембранах стероїдогенних клітин. Зниження числа рецепторів до ЛГ, розбалансування окиснення глюкози й активності 3 β -гідроксистероїддегідрогенази (3 β -HSD) і 17-кетостероїд-редуктази можуть бути можливими механізмами, за якими відбувається порушення стероїдогенезу [189]. Враховуючи, що кофермент НАДФН є важливим фактором у регуляції декількох стадій стероїдогенезу, а окиснення глюкози - обмежуючим фактором синтезу тестикулярного тестостерону [190], вплив етилового спирту на продукцію тестостерону клітинами Лейдіга може бути опосередкований, в тому числі, порушенням окиснення глюкози та дефектною генерацією НАДФН.

В експериментах на тваринах, які хронічно споживали етанол, було показано значне збільшення рівнів тестикулярного холестерину, вільних жирних кислот, фосфоліпідів і тригліцеридів [159, 188]. Також у клітинах Лейдіга алкоголь-залежних щурів було продемонстровано порушення складу ліпідів: вміст нейтральних ліпідів (етерифікований холестерин, триацилгліцериoli) знижувався, а рівень вільного холестерину та дیاцилгліцерину зростав. Одночасно знижувався загальний вміст фосфоліпідів (за рахунок фракцій фосфатидилінозиту, фосфатидилсерину, фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну) та зростав - триацилгліцерину [189].

Вважають, що пригнічення репродуктивної здатності внаслідок споживання алкоголю в чоловіків може викликати зниження рівня тестикулярного поліпептиду RASAP [191]. Гібридизація *in situ* продемонструвала, що етанол знижує активність гіпофізарної аденілатциклази, яка активує експресію мРНК поліпептидного рецептора типу I в стероїдогенних

клітинах Лейдіга за одночасного падіння рівня тестостерону в сироватці крові [192].

В експериментах *in vitro* з використанням культури клітин Лейдіга було продемонстровано здатність етанолу активувати специфічні інтрацелюлярні метаболічні шляхи, пов'язані з клітинною смертю, що в свою чергу веде до Вах-залежної активації каспаз-3 й індукції апоптозу [193]. Результати даного дослідження *in vitro* добре узгоджуються з отриманими пізніше *in vivo* даними. Було показано, що повторні введення етанолу мишам вели до зниження експресії StAR, 3β -HSD і 17β -гідроксистероїддегідрогенази (17β -HSD); зростання експресії активної каспази-3, p53, синтази жирних кислот (Fas) і Fas-ліганду (FasL); а також до підвищення співвідношення Вах/Bcl-2 (Bcl-2 є важливим антиапоптотичним білком) і транслокації цитохрому C з мітохондрій у цитозоль. Ці події супроводжувалися зростанням транскриптів каспази-3, p53, Fas, Fas-L; підвищенням активності каспази-3 і каспази-8; зниженням активності 3β -HSD, 17β -HSD і глутатіонпероксидази; падінням потенціалу мітохондріальної мембрани, а також генерацією АФК та зменшення пулу відновленого глутатіону в тестикулярних тканинах [194]. У дослідях з використанням трансгенних мишей були отримані прямі докази того, що FasL опосередковує апоптоз клітин сім'яників, індукований гострим введенням етанолу [195]. У сім'яниках щурів, що споживали алкоголь, також було показане зростання рівнів мРНК Fas і FasL [196]. Крім того, етанол здатен індукувати апоптотичну загибель клітин у сім'яниках шляхом пригнічення активації фосфорильованої протеїнкінази В (pAkt) і фосфорильованої позаклітинної сигнально-регульованої кінази 1/2 (pErk1/2), а також фосфорилування їх мішені – білка Bad (є проапоптотичним членом сімейства Bcl-2) на двох критичних сайтах Ser112 і Ser136 [197].

За умов хронічного споживання етанолу в клітинах Лейдіга мишей було продемонстровано пригнічення активності, пов'язаної з синтазою оксиду азоту (NOS) НАДФН-діафрази [198]. Ген *nNOS* є відповідальним за специфічну тестикулярну ізоформу - TnNOS, яка локалізується в клітинах Лейдіга і бере

участь у контролі стероїдогенезу [199]. Вивчаючи ефекти етанолу за умов внутрішньошлункового та інгаляційного введення, М. Нерман та співавт. продемонстрували його здатність стимулювати експресію TnNOS, але і блокада утворення NO не відновлювала нормальну відповідь тестостерону на хоріонічний гонадотропін людини (hCG) [200].

За умов споживання етанолу в сім'яниках щурів Вістар зростала експресія iNOS, зокрема в клітинах Сертолі, гермінативному епітелії та деяких інтерстиціальних клітинах. Одночасно були виявлені фагоцитовані утримувані подовжені сперматиди з фрагментованою ДНК. Припускають, що підвищення активності iNOS у сім'яниках може викликати апоптоз гермінативних клітин внаслідок генерації надлишкового NO і пригнічення синтезу андрогенів [201].

Н. Y. Lee та співавт. виявили, що після короткого та довгострокового впливу етанолу в сім'яниках дорослих і пубертатних щурів різко знижувалася експресія мРНК гонадоліберину, у той час як у гіпоталамусі не спостерігалось значних змін [202].

Як видно з представлених вище даних літератури, побічні ефекти етанолу на чоловічі гонади численні, серйозні та впливають на всі без винятку метаболічні процеси в цих органах. Ступінь відносного значення цих ефектів для збереження структури та функцій гонад і зворотності негативних змін залежить від часу експозиції, дози та режиму споживання етанолу, а також від статі, віку, фізіологічного стану та супутніх чинників. Повна картина може бути вибудована тільки з використанням сучасних методологічних підходів і широкого використання інструментів біоінформатики. Можна припустити, що за умов сумісної дії етанолу та ПТЗ метаболічні порушення в гонадах будуть поглиблюватись і порушення репродуктивної функції стануть більш очевидними.

Зміни метаболізму ПТЗ можливі не лише за умов екзогенної індукції CYP2E1, а можуть викликатись ендогенними чинниками, як наприклад діабет. Відомо, що розвиток оксидативного стресу та посилення продукції АФК при діабеті часто відбувається паралельно зі значним підвищенням експресії

CYP2E1 [203]. Враховуючи це, та з огляду на задачі нашого дослідження важливими є статистичні дані, які свідчать, що у хворих на діабет часто розвивається туберкульозна інфекція [204]. Клінічні дані підтверджуються і дослідями у яких було показано, що щури з діабетом як I так і II типів є вкрай сприйнятливими до інфікування *Mycobacterium tuberculosis* [205]. Причому результати ретроспективного аналізу даних отриманих на 2141 пацієнтах з діабетом та туберкульозною інфекцією свідчать, що у них період лікування туберкульозу з використанням різних туберкулостатиків подовжується [206].

На репродуктивну здатність чоловіків хворих на діабет, безсумнівно, впливають наявні при цьому захворюванні еректильна дисфункція і ретроградна еякуляція [207, 208], але дані літератури свідчать про ряд суперечливих даних і стосовно параметрів сперми та маркерів її якості. Ще в 70-х роках минулого сторіччя дослідження за участю 25 підлітків з діабетом і 24 контрольних осіб (16-22 років) показало, що у підлітків з діабетом 2 типу були нижчі значення кількості сперматозоїдів, а також значні відмінності в їх рухливості і морфології [209]. Пізніше в іншому дослідженні порівняння еякулятів 65 дорослих діабетиків і 77 контрольних чоловіків також виявило гіршу якість сперми хворих: був зменшений об'єм еякуляту, знижені кількість та рухливість сперматозоїдів, порушена їх морфологія і [210]. В дослідженні 1984 року у молодих чоловіків з діабетом виявили лише незначне і не достовірне зниження кількості сперматозоїдів порівняно з контрольними особами. Але сперма у цих індивідумів мала менший об'єм, у сперматозоїдів була нижча рухливість і змінена морфологія, а також в спермі спостерігались високі рівні фруктози і глюкози [211]. Дослідження біоптатів сім'яників чоловіків з діабетом виявило ультраструктурні зміни в апікальній цитоплазмі клітин Сертолі і морфологічні зміни в інтерстиціальному компартменті, що свідчить про порушення сперматогенезу і пов'язані з цим проблеми виникнення інфертильності або субфертильності [212]. Цікаво, що морфологія сперматозоїдів і якість рухів сперматозоїдів залишались незмінними [213]. М. J. Niven з співавт. оцінювали рухливість сперматозоїдів у пацієнтів з діабетом 1

типу та не виявили кореляції між рухливістю сперматозоїдів і віком, віком початку діабету і тривалістю захворювання [214]. Дискусія про реальний вплив діабету на репродуктивне здоров'я чоловіків продовжувалася, і в 2002 році дослідження з кріоконсервації сперми у пацієнтів з кількома захворюваннями, включаючи діабет, показало, що лише сперма у чоловіків з діабетом виявила значні відмінності, зокрема за кількістю сперматозоїдів [215]. Дослідження, проведене з пацієнтами, що хворіють на діабет 1 та 2 типу, показало, що у чоловіків з діабетом можуть зберігатись нормальні параметри сперми або виявляється тільки значне зменшення кількості сперми. При цьому в їхніх сперматозоїдах показаний більш високий рівень пошкодження ядерної та мітохондріальної ДНК, ніж в контрольній групі [216].

Треба відзначити, що загалом нормальне протікання процесів сперматогенезу *in vivo* залежить від метаболізму глюкози, хоча в каналцях сім'яників її рівень досить низький. Саме тому перенесення глюкози і інших метаболічних інтермедіатів з крові до гермінативних клітин контролюється за допомогою ГТБ. Даний бар'єр не тільки фізично ділить гермінативний епітелій на два компартменти, але також відповідає за підтримання різних рівнів речовин і метаболітів між рідиною тестикулярної сітки і лімфою або плазмою [217]. Для відтворення функцій ГТБ одними з найбільш значущих клітин сім'яників є клітини Сертолі. Ці клітини відіграють таку важливу роль в чоловічій репродуктивній функції, що їх число зазвичай пов'язане з розміром сім'яника, і вони мають широкий спектр функцій пов'язаних з нормальним протіканням процесів сперматогенезу. Крім того, що вони несуть відповідальність за транспорт води з інтерстиціального простору до просвіту каналців, вони також контролюють рН і іонний склад середовища. Крім того, клітини Сертолі забезпечують фізичне і поживне середовище для гермінативних клітин. Вони добре відомі своєю здатністю продукувати з високою швидкістю лактат, який разом з піруватом споживається сперматоцитами в стадії пахітени та округлими сперматидами [217].

Пасивний перенос глюкози через ГТБ, що опосередковується

переносниками глюкози (GLUT), є важливою подією для сперматогенезу. Нещодавні дослідження *in vitro* свідчать, що за умов видалення глюкози [218] або інсуліну [219] з позаклітинного середовища, клітини Сертолі здатні адаптувати свої транспортні системи для перенесення глюкози, щоб забезпечити відповідне виробництво лактату.

Показано, що у сім'яниках діабетиків знижені рівні лактату, аланіну, цитрату і креатину, знижується експресія мРНК GLUT1 і фосфофруктокінази 1, активність ЛДГ та глутаматпіруват-трансамінази. Враховуючи, що лактат і креатин необхідні для нормального розвитку гермінативних клітин, можна припустити їх залучення до молекулярних механізмів розвитку чоловічого безпліддя при цукровому діабеті [220].

Як і очікувалося, існує більше досліджень на моделі діабету у тварин, ніж клінічних даних, що стосуються чоловічого безпліддя, пов'язаного з даним захворюванням. Повідомлення про зниження плодючості самців з діабетом з'являються починаючи з 70-х років минулого сторіччя [221], а на початку 80-х років кілька повідомлень з використанням спонтанно діабетичних щурів BBWistar описують дисфункцію гонад у цих тварин [222, 223]. Через кілька років було проведено перше дослідження на моделі діабету, індукованого стрептозотоцином (СТЗ) з використанням щурів. Повідомлено, що за умов введення СТЗ у щурів знижувалась кількість і рухливість сперматозоїдів, а лікування інсуліном сприяло відновленню цих параметрів [224]. Пізніше було показано, що за умов стрептозотоцинового діабету (СТЗД) у самців щурів змінюється статеве поведінка і знижується маса репродуктивних органів, зменшується кількість сперматозоїдів у сім'яниках та епідидимісах, а також рухливість сперматозоїдів [225]. Дослідження на щурах із СТЗД, також виявили, що діабет може викликати регресію епідидимісів, яка веде до зменшення маси їх тіла, а також головних і каудальних відділів, в кінцевому результаті призводячи до виходу сперматозоїдів з просвіту епідидимісів. Введення інсуліну запобігало лише деяким з цих шкідливих ефектів [226]. Дослідження запліднювальної здатності сперматозоїдів у самців із СТЗД

показано наявність значної репродуктивної дисфункції, хоча за штучної внутрішньоматкової інсемінації запліднювальна здатність сперматозоїдів не була порушена [227]. При порівнянні впливу діабету 1 та 2 типів з використанням щурів, яким вводили СТЗ та щурів Goto-Kakizaki було показано, що гіперглікемія справляє негативний вплив на концентрацію і рухливість сперматозоїдів [228]. S.T. Kim та K.H. Moley дійшли висновку, що діабет викликає субфертильність у мишей-самців, впливаючи на стероїдогенез [229]. Інші дослідники виявили пошкодження сім'яників у потомства, отриманого від діабетичних самиць. А саме, у такого потомства спостерігалось збільшення кількості сім'яних канальців при одночасному стоншенні тестикулярної капсули і зменшенні кількості клітин Лейдіга, Сертолі і сперматогоніїв [230].

Біопсія сім'яників діабетиків показала наявність морфологічних змін в клітинах тестикулярних клітин, а саме в клітинах Сертолі, які виявляли значну вакуолізацію і мали високу ступінь дегенерації. Крім того, гермінативні клітини мали нормальну морфологію, але сім'яні канальці були виснажені, а кількість клітин Лейдіга також дуже варіювала, причому ці клітини мали ліпідні включення та вакуолі [211]. Всі ці зміни, безумовно, можуть мати драматичні наслідки для метаболізму глюкози в тестикулярних клітинах і загальної метаболічної взаємодії між клітинами Сертолі і гермінативними клітинами, що розвиваються. Насправді, порушення метаболізму глюкози часто пов'язані з підвищенням метаболізму жирних кислот. У ранніх роботах повідомляється про зростання рівня холестерину, неестерифікованих жирних кислот, тригліцеридів і фосфоліпідів в тканинах сім'яників щурів з діабетом, а також збільшення поглинання ендогенного кисню і зниження синтезу лактату тестикулярними клітинами [231]. У 80-ті роки С. Hutson вивчив біохімічні відповіді щурячих клітин Сертолі і перитубулярних клітин, культивованих за стимульованих діабетичних умов, і повідомив, що метаболічне функціонування цих тестикулярних клітин *in vitro* є дуже чутливим до концентрацій глюкози [232]. Клітини Сертолі культивовані в середовищі з високою концентрацією глюкози, збільшували секрецію лактату, який, як відомо, посилює швидкість дихання, а

також синтез білків і РНК в ізольованих сперматоцитах пахитени і круглих сперматид [233], взаємодіючи з іншими метаболічними шляхами і продукуючи АТФ [234]. Показано, що зниження рівня глюкози в культуральному середовищі клітин Сертолі збільшує поглинання глюкози для підтримки продукції лактату, рівень якого змінюється несуттєво. Це досягалось модуляцією експресії GLUT1 і GLUT3 за участі допомогою активації AMP-активованих протеїнкіназ, фосфатиділінозитол-3-кінази (PI3K)/PKBтар38 MAPK-залежних метаболічних шляхів [218]. Ця робота вперше довела, що клітини Сертолі можуть адаптувати свій метаболізм глюкози шляхом модуляції експресії GLUT. Цікаво, що, подібні зміни експресії GLUTs було описано для людських клітин Сертолі, культивованих в умовах відсутності інсуліну [219]. У клітинах, позбавлених інсуліну, загальне поглинання глюкози не змінювалось, в основному завдяки описаній вище адаптації, але споживання пірувату зазнавало змін. Клітини, позбавлені інсуліну, не тільки припинили споживати піруват, а й почали продукувати цей субстрат та експортувати його в позаклітинне середовище [219]. Отже, синтез лактату порушувався, як і обидва механізми його метаболічного контролю: ЛДГ і монокарбоксилат-транспортеру 4. Більше того, пізніше було запропоновано гіпотезу за якою клітини Сертолі синтезують і екпортують до гермінативних клітин, що розвиваються, ацетат і цей процес регулюється екзогенним інсуліном. Хоча точні механізми, за якими діабет змінює метаболізм глюкози в тестикулярних клітинах, *in vivo* не просто дослідити, дані, які отримані *in vitro* не можна ігнорувати. Як обговорювалося вище, добре відомо, що діабет є метаболічним захворюванням, яке викликає серйозні зміни в рівнях статевих гормонів. Показано, що клітини при додаванні 5 α -дигідротестостерону, споживали менше глюкози і синтезували менше лактату. Обидва, 17 β -естрадіол і дигідротестостерон виявили здатність порушувати залежний від метаболізму лактату рівень транскрипції генів, таких як монокарбоксилат-транспортер 4, ЛДГ, а також GLUT [235]. Крім того, відомо, що статеві стероїди залучені до регуляції апоптотичних сигнальних шляхів у клітинах Сертолі, тому порушення рівнів цих гормонів може

призводити до стимуляції апоптозу і некрозу [236].

Оксидативний стрес при діабеті може бути результатом підвищеної гліколітичної здатності, викликаной більш високою доступністю глюкози. Тому в тестикулярних клітинах, таких як клітини Сертолі, де активно проходить метаболізм глюкози та синтез лактату, зростання рівня окислювального стресу є досить очікуваним. Це проблема, яка заслуговує на особливу увагу, оскільки гіперпродукція АФК має реальний потенційний токсичний ефект щодо якісно-функціонального стану сперматозоїдів. Більш того, продукція АФК, стимульована гіперглікемією, визнана основною причиною клінічних ускладнень, пов'язаних з діабетом і ожирінням [237].

Результати стосовно рухливості сперматозоїдів та інших репродуктивних параметрів у чоловіків з діабетом є досить суперечливими. В деякій мірі відсутність консенсусу може пояснити той факт, що більшість з проведених досліджень більше зосереджена на клінічних даних, а не на молекулярних механізмах, що лежать в основі розвитку чоловічого безпліддя [238]. Молекулярні дослідження сперми діабетиків все ще недостатні, і більшість механізмів, за якими сперматозоїди здійснюють енергетичний метаболізм у таких пацієнтів, залишаються не розкритими. Тому існує нагальна потреба в додаткових дослідженнях, присвячених молекулярним подіям поза межами тих механізмів, які пов'язані з метаболізмом глюкози в спермі чоловіків. Відчувається відсутність наукових публікацій стосовно впливу діабету на функціонування тестикулярних клітин. З урахуванням того, що експерименти з залученням людської популяції мають значні обмеження, і в більшості випадків ряд гіпотез неможливо оцінити на матеріалі, отриманому від людей для подолання цих проблем є важливим проведення дослідів на моделі діабету у тварин, яке дозволяє забезпечити жорсткий контроль над експериментальними умовами.

З точки зору нашого дослідження, цікавим є визначення індукції CYP2E1, як однієї з причин окисного стресу, у сім'яниках піддослідних тварин з експериментальним діабетом I типу, в тому числі при введенні ПТЗ. З огляду на

те, що індукція CYP2E1 може спостерігатись не тільки в печінці, але майже в усіх органах, слід враховувати можливість того, що активність даної ізоформи за умов діабету може зростати і в сім'яниках. Цікавим є те, що у тестикулярних клітинах також продукується інсулін та СТЗД відбувається зниження його рівня. З одного боку тестикулярна продукція інсуліну може відігравати роль у регуляції сперматогенезу або/та метаболізму глюкози [239]. З іншого боку, зниження продукції інсуліну при діабеті може бути одним з факторів модуляції активності CYP2E1, враховуючи регуляторний вплив інсуліну на експресію даної ізоформи [240].

Враховуючи, що ПТЗ, етанол та діабет можуть змінювати про/антиоксидантний статус організму та модулювати активність залежної від цитохрому P-450 2E1 системи метаболізму, ми припускаємо перспективність застосування для зниження їх шкідливої дії речовин, здатних впливати на дану ізоформу.

1.3. Перспективи застосування інгібіторів цитохрому P-450, як фармакологічних засобів

Проблема фармакокорекції патологічних станів, викликаних модуляцією активності ізоформ цитохрому P-450 не втрачає актуальності протягом тривалого часу. В залежності від ситуації можуть використовуватись, як ферментіндукуючі засоби, так і інгібітори окислення ксенобіотиків. Індуктори активують синтез певних ізоформ цитохрому P-450 та можуть підвищувати швидкість біотрансформації в 2-4 рази. Традиційні індуктори цитохрому P-450 – фенobarбітал та бензонал мають обмежене застосування. Вони абсолютно протипоказані при отруєннях тетрахлорметаном, парацетамолом та іншими ксенобіотиками, які в системі цитохрому P-450 утворюють вільні радикали та електрофільні інтермедіати. У фармакотерапії можуть використовуватись інгібітори окислення ксенобіотиків, такі як наприклад слабкий інгібітор цитохрому P-450 2E1 відомий гепатопротектор - антиоксидант катерген [241].

Інгібіторами загалом називають будь-які речовини, включаючи лікарські засоби і дієтичні компоненти, які зменшують швидкість ферментативних реакцій. Згідно до С.К. Mathews зі співавт. існує два типи інгібування, а саме - оборотне і необоротне. Оборотне інгібування виникає внаслідок слабого зв'язування між інгібітором і ферментом, яке легко дисоціює. Типів такого зв'язування також декілька і вони залежать від молекулярної структури ферменту і інгібітору [242]:

- конкурентні інгібітори конкурують з субстратом за зв'язування з активним центром ферменту. В результаті частка зв'язаного субстрату зменшується та каталітична активність знижується. Гальмування реакції можна уникнути за рахунок збільшення концентрації субстрату;

- неконкурентні інгібітори зв'язуються тільки з комплексом фермент-субстрат. Оскільки інгібітор і субстрат зв'язуються з різними сайтами, вони не мають структурного подібності один одного. При такому зв'язуванні конформаційні зміни ведуть до спотворення каталітичних реакцій, що не може бути подолане за рахунок збільшення концентрації субстрату;

- змішані інгібітори зв'язуються або з вільним ферментом, або з комплексом фермент-субстрат також в ділянці, відмінній від активного сайту. Незначні конформаційні зміни в ферментному комплексі призводять до не оптимального зв'язування субстрату з активною ділянкою і, отже, активність ферменту знижується. Інгібування не можна подолати за рахунок збільшення вмісту субстрату, тому що інгібітор і субстрат не конкурують за один і той же сайт;

- є особливий випадок неконкурентного змішаного інгібування, коли інгібітор має однакову спорідненість і до вільного ферменту, і до комплексу фермент-субстрат.

У деяких випадках інгібітор може проявляти множинні режими інгібування по відношенню до різних ізоформ CYP450. Наприклад, дигідротаншійон, виділений з шалфея червонокореневищного (*Salvia miltiorrhiza*), є конкурентним інгібітором CYP1A2 та CYP2C9, й одночасно

неконкурентним інгібітором CYP3A4 і CYP2E1 [243].

Необоротне інгібування, яке також називають механістичною інактивацією відбувається, за рахунок того, що інгібітор утворює міцні хімічні зв'язки з ферментом, які навряд чи можна порушити [242]. Подібне інгібування може бути скасоване тільки ресинтезом ферментів і тому зазвичай є тривалим. У деяких випадках відбувається повна інактивація ферменту (суїцидальне інгібування) [244].

Існує кілька механізмів необоротного інгібування CYP450. Один з них полягає в тому, що реакційно здатні інтермедіати алкілюють гем, призводячи до його руйнування [245]. Наприклад, за цим механізмом інгібувати CYP450 можуть секобарбітал, гестоден, спіро- і диспіро-1,2,4-тріоксолан і Гемфіброзил [246, 247, 248, 249]. Інший механізм заснований на здатності реакційно активних інтермедіатів ковалентно зв'язуватись з амінокислотними залишками всередині апопротеїну. Речовини, які містять сірчані або азотні групи, можуть окислюватись за допомогою CYP450 і згодом модифікувати його [246, 250]. Як приклад можна навести диетилдитіокарбамат, метаболіт дисульфіраму, який проявляє інгібіторну активність шляхом ковалентного зв'язування з апопротеїном CYP2E1 [251]. Крім того, деякі сполуки здатні одночасно змінювати гем і апопротеїн. Ковалентне зв'язування модифікованого гема з апопротеїном може викликати необоротне інгібування. Наприклад, 17 α -етинілестрадіол, що є загальною складовою частиною оральних контрацептивів, може інактивувати таким чином CYP3A4 [252].

Проблема інгібування активності ізоформи цитохрому P-450 2E1 заслуговує на особливу увагу. По-перше, оскільки за умов індукції CYP2E1 утворюються високо реактивні метаболіти та вільні радикали, здатні реагувати з ліпідами, білками та нуклеїновими кислотами, ушкоджуючи життєво важливі структури клітин, а по-друге, тому що наразі продовжується пошук інгібіторів даної ізоформи, які б були не токсичними та достатньо ефективними. Відомі інгібітори CYP2E1 - дисульфірам та його метаболіт - диетилдитіокарбамат є

токсичними і тому не можуть цілком задовольняти терапевтичним потребам при хронічному застосуванні [253, 254].

Були проведені дослідження стосовно ефективності інгібування мітохондріального CYP2E1 полієнілфосфатидилхоліном та хлорметіазолом за умов алкогольного та неалкогольного ураження тканин печінки. Ефекти цих інгібіторів виявились лише частковими з огляду на ряд можливих факторів: 1) можливо доза була недостатньою; 2) можливо недостатньою була їх біодоступність; 3) мітохондріальний CYP2E1 міг відігравати важливішу роль, ніж мікросомальна ізоформа у використаних модельних умовах, а рівні інгібіторів в мітохондріях виявились недостатніми; 4) CYP2E1 міг бути не єдиним патогенетичним фактором за застосованих експериментальних умов [255].

Цікавими є результати нещодавніх досліджень препарату Бортезоміб (VELCADE, раніше PS-341, LDP-341 і MLN341), який перед усім був розроблений, як інгібітор протеасом і схвалений Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) в якості терапевтичного засобу для лікування множинної мієломи [256]. Окрім інгібування протеасом, Бортезоміб також викликає стрес ендоплазматичного ретикулуму [257], індукуючи деградацію мРНК CYP2E1, опосередковану залежним від інозитулу ензимом 1α (IRE- 1α)(31). Було показано, що зниження транскрипції CYP2E1 та відповідно зменшення експресії його білка і ферментативної активності, викликане застосуванням Бортезомібу, приводило до зменшення пошкодження печінки ацетамінофеном, CCl₄ і тіоацетамідом [258].

Згідно даних літератури ряд речовин природного походження здатні знижувати активність CYP2E1 та можуть бути перспективними для розробки на їхній основі лікарських засобів. Так, в досліджах *in vitro* було визначено здатність катехіну запобігати індукції згаданої ізоформи [259]. Іншими авторами показано супресію CYP2E1 та зниження рівня ушкодження печінки щурів тетрахлорметаном за умов введення водного екстракту кульбаби [260]. Полісахарид джінсен, екстрагований з женьшеню ефективно попереджував

ураження печінки тетрахлорметаном, головним чином, знижуючи активність CYP2E1 та внаслідок цього – оксидативний стрес та запалення [261]. В той же час, щоденне пероральне введення олії з чорнушки посівної (*Nigella sativa*) протягом тижня перед ін'єкцією CCl₄ пом'якшувало індуковану цим токсином супресію CYP2B, CYP3A2, CYP2C11 та CYP1A2, результатом чого було зниження продукції NO та підвищення рівня протизапального інтерлейкіну 10 [262]. Здатність знижувати прояви гепатотоксичності шляхом інгібування активності CYP2E1 у печінці щурів, яким вводили ізоніазид було показано і для екстракту спаржі кистьохвітної (*Asparagus racemosus*) [263]. Виявлені захисні ефекти водного екстракту шалфею червонокореневищного (*Salvia miltiorrhiza*), опосередковані інгібуванням активності CYP2E1, проти ураження печінки парацетамолом [264]. Гліциретинова кислота, отримана з солодки також знижувала ушкодження печінки ацетамінофеном та можливий механізм захисної дії пов'язаний із понижуючою регуляцією експресії CYP2E1 [265]. Визначний терапевтичний ефект при отруєнні парацетамолом також виявлено за умов введення S-алілмеркаптоцистеїна – однієї з водорозчинних органічних сірковмісних складових у спиртовому екстракті часнику (*Allium sativum* L.). Автори вважають, що S-алілмеркаптоцистеїн виявляв протекторну дію саме за рахунок інгібування активності CYP2E1 [266]. Нещодавно в дослідях на тваринах продемонстровано, що сексвітерпенові глікозиди з листя мушмули японської (*Eriobotrya japonica*) пригнічували експресію CYP2E1 і фосфорилування JNK, знижуючи окислювальний стрес і, в кінцевому підсумку, полегшуючи протікання неалкогольного стеатогепатозу [267]. Екстракт з листя японського бамбуку (*Sasa veitchii*) також знижував експресію CYP2E1 при отруєнні мишей парацетамолом та, як наслідок, сприяв підвищенню антиоксидантної ємності печінки [268].

Флавоноїди складають велику групу рослинних пігментів, присутніх в овочах, фруктах, ягодах і травах, які більшість людей споживають щодня. Показано, що флавоноїди можуть взаємодіяти з ферментами CYP450 шляхом модуляції (інгібування або індукції) біосинтезу ферментів або каталітичної

активності. Це може відбуватися на транскрипційному або трансляційному рівні, а також за умов прямої модуляції. Але, варто, відзначити, що дослідження *in vivo* лише частково підтверджують результати, отримані *in vitro*, а отже механізми, що лежать в основі модуляторної дії флавоноїдів, складні і їх важко передбачити *in vivo* [269]. Флавоноїди, що володіють гідроксильною групою, зазвичай інгібують ферменти CYP450, тоді як флавоноїди, позбавлені гідроксильних груп, можуть індукувати активність ізоферментів CYP450 [270].

Основу флавоноїдів становить трьохкільцева молекула з приєднаними гідроксильними (ОН-) групами. Ступінь інгібіторної активності корелює з кількістю гідроксильних груп [271, 272]. Наприклад, мірицетин і кверцетин виявляють більшу здатність інгібувати CYP450, ніж флавоноїди з меншою кількістю гідроксогруп. Мірицетин, що має на одну ОН- групу більше ніж, кверцетин, *in vitro* виявився більш сильним інгібітором активності CYP2E1 і CYP3A4 [271, 273].

Кверцетин, один з найпоширеніших флавоноїдів, що наявний в різних овочах, фруктах, травах і червоному вині, володіє широкою біологічною активністю, яка заснована на його антиоксидантних властивостях [274]. Крім того кверцетин є інгібітором декількох ізоформ CYP, включаючи CYP1A2 і CYP2E1 *in vitro* і CYP3A4, як *in vitro*, так і *in vivo* [275]. Його здатність пригнічувати активність CYP2E1 доведено в ряді експериментів [276, 277, 278, 279]. Експерименти *in vitro* показали, що інгібування CYP2E1 кверцетином супроводжується одночасною індукцією гем-оксигенази-1 і сприяє захисту гепатоцитів від окисного ушкодження, викликаного етанолом [280, 281]. Подальші дослідження тих же авторів продемонстрували, що індукція гем-оксигенази-1 і понижуюча регуляція CYP2E1 відбувається на фоні зниження пулу гема. Виснаження пулу гема і вивільнення СО можуть бути залучені до захисного механізму кверцетину за рахунок обмеження синтезу білка і прямої інактивації гем-вмісного CYP2E1 [277].

Нещодавно було показано, що дідімін (флавоноїд з лимону) здатний значно знижувати активність CYP2E1 та одночасно рівень ПОЛ, генерацію

АФК, продукцію NO і прозапальних цитокінів (TNF α , IL-6 і IL-1 β) в тканинах печінки і клітинах лінії RAW264 [282]. Фармакокінетичні дослідження, проведені на здорових добровольцях, дозволили отримати результати стосовно здатності іншого флавоноїду - ресвеартролу інгібувати CYP2E1 [283].

Речовина, отримана з часнику – диалілсульфід за допомогою CYP2E1 послідовно перетворюється в диалілсульфоксид та диалілсульфон. Показано, що диалілсульфід, диалілсульфоксид та диалілсульфон виявляли властивості конкурентних інгібіторів CYP2E1, а диалілсульфон, крім того, суїцидного інгібітору зазначеної ізоформи. В дослідях на гризунах ці сполуки знижували токсичність чотирьоххлористого вуглецю, N-нітрозодиметиламіну та ацетамінофену [284]. Диалілдисульфід являє собою продукт розкладання аліцину, який міститься в часнику. Отримані переконливі дані стосовно того, що CYP2E1 відіграє ключову роль в індукованому алкоголем утворенні продуктів зв'язування МДА з ДНК (МДА-деоксигуанозин аддукти), а використання диалілдисульфиду в якості дієтичної добавки попереджало їхнє утворення [285]. Крім того, нещодавно показано, що профілактичне введення диалілдисульфиду значно послаблювало індуковані ацетамінофеном нефротоксичні ефекти. При цьому диалілсульфід знижував експресію NF- κ B, циклооксигенази 2 і TNF- α в нирках і експресію мітосомального CYP2E1 в печінці та нирках. Захисні ефекти диалілсульфиду можуть бути пов'язані з його здатністю знижувати метаболічну активацію ацетамінофену шляхом інгібування CYP2E1 разом з його потужною антиоксидантною, антиапоптотичною і протизапальною дією внаслідок інгібування NF- κ B [286]. Диалілсульфід, так само як і дисульфірам, і диетилдитіокарбамат, є необоротним інгібітором CYP2E1 [287].

In vitro дослідження спиртового екстракту з канадського жовтокореня (*Hydrastis canadensis*) виявило що, він є потужним інгібітором CYP2E1, можливо за рахунок присутності алкалоїдів берберіну, гідрастину та канадину [288].

Було проведено скринінг стосовно здатності інгібувати різні ізоформи цитохрому Р-450 людини п'яти сполук, виділених з грейпфрутового соку,

включаючи мономери і димери фуранокумарину та сесквитерпен нооткатон. Додавання етилацетатового екстракту з соку грейпфруту до інкубаційної суміші спричиняло зниження активності ізоформ CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, та CYP2D6. Усі п'ять фуранокумаринів чітко інгібували окислення нифедипіну, що каталізується CYP3A4. Таке інгібування було залежним від дози та концентрації. Спостерігалась очевидна селективність димерів фуранокумарину відносно CYP3A4. З іншого боку, бергамотин мав більш виражений інгібіторний ефект стосовно CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 та CYP2D6, ніж стосовно CYP3A4. Серед усіх досліджених ізоформ цитохрому Р-450 ізоформа CYP2E1 була найменш чутливою до інгібіторного ефекту фуранокумаринових сполук. Сесквитерпен нооткатон не мав визначного ефекту на активність досліджених цитохромів Р-450 за виключенням CYP2A6 та CYP2C19 [289].

Наочно продемонстровано, що, металлотіонеїн, багатий цистеїном антиоксидант здатен послаблювати токсичний вплив ізоніазиду на печінку, знижуючи CYP2E1-залежний оксидативний і нітрозативний стрес [290].

В дослідях на мишах лінії C57BL/6, яким вводили індуктор цитохрому Р-450 2E1 – піразол, довели здатність екзогенного S-аденозил-L-метіоніну (активний метаболіт метіоніну) підвищувати рівень S-аденозил-L-метіоніну у печінці з одночасним збільшенням вмісту відновленого глутатіону та інгібуванням активності CYP2E1 [291]. Наразі не зовсім зрозуміло наскільки визначну роль відіграє інгібування активності CYP2E1 в механізмах протекторної дії S-аденозил-L-метіоніну за умов отруєння речовинами, активуючими цю ізоформу, такими, як ацетамінофен, тетрахлорметан, тіоацетамід [292].

Було досліджено ефективність застосування S-аденозил-L-метіоніну за умов CYP2E1-залежного ураження печінки ob/ob мишей. Дводенне введення піразолу ob/ob мишам спричиняло некроз, стеатоз та підвищення активності трансаміназ і вмісту тригліцеридів сироватки крові. Інтраперітонеальне введення S-аденозил-L-метіоніну (50 мг/кг м.т. кожні 12 годин протягом 3-х днів) попереджувало патологічні зміни, так само як і підвищення кількості

апоптотичних гепатоцитів, активності каспази 3 та рівня TNF-альфа в сироватці. При цьому S-аденозил-L-метіонін інгібував активність CYP2E1 але не знижував його вміст [293].

Таким чином, дані літератури свідчать про здатність інгібіторів цитохрому P-450 2E1 знижувати токсичність речовин, які є індукторами даної ізоформи, в експерименті. Але інгібітори CYP2E1 наразі не отримали широкого терапевтичного застосування, оскільки деякі з них є токсичними, а інші недостатньо ефективними. Отже, проведення досліджень, що обґрунтовують протекторну дію речовин з ефективними інгібіторними властивостями стосовно ізоформи CYP2E1 та є не токсичними не втрачають актуальності. На нашу думку такі речовини можуть виявляти не лише, наприклад, гепатопротекторну дію, а бути і гонадопротекторами.

В цілому проведений аналіз наукової літератури свідчить, що молекулярні та біохімічні механізми, які визначають побічну дію ПТЗ, особливо на тлі коморбідних патологій, все ще далекі від розкриття. Дані ж стосовно їхнього впливу на чоловічу репродуктивну функцію є не чисельними та суперечливими та не пояснюють механізми, залучені до розвитку даних порушень. Важливо, що розвиток побічної дії ПТЗ може залежати від ряду факторів, які включають тип препарату, форму його застосування, дозування та тривалість лікування, поєднання з іншими лікарськими засобами. Зокрема, за комбінованої хіміотерапії туберкульозу спостерігається метаболічна взаємодія між ПТЗ, внаслідок індукції або інгібування різних ізоформ цитохрому P-450. Серед них особливе місце посідає високоіндуцибельний CYP2E1, оскільки зростання його ферментативної активності супроводжується масивним утворенням АФК та токсичних метаболітів. Згідно до наведених в даному огляді результатів наукових досліджень, інтермедіати, що утворюються внаслідок CYP2E1-залежних метаболічних перетворень ксенобіотиків, здатні зв'язуватись з життєво важливими макромолекулами клітин печінки, призводячи до порушення її структури та функції. Ми не виключаємо, що метаболізм деяких ПТЗ в організмі може супроводжуватись індукцією CYP2E1

не тільки у печінці, але і у сім'яниках. На користь цього припущення свідчать дані наукової літератури, де показано індукцію даної ізоформи в гонадах за введення ряду хімічних речовин-репродуктивних токсикантів.

Варто відзначити, що токсичність хімічних речовин (включаючи лікарські засоби), здатних індукувати CYP2E1 зростає за умов їх одночасного надходження до організму та/або на тлі станів, які характеризуються індукцією даної ізоформи, таких як хронічний алкоголізм, ожиріння, діабет. Таким чином, поглиблене вивчення механізмів побічної дії ПТЗ І ряду на чоловічу репродуктивну функцію як за самотійного, так і поєднаного використання, а також на тлі станів, що супроводжуються індукцією CYP2E1 є надзвичайно актуальним. В свою чергу, інгібування CYP2E1 фармакологічними засобами може представляти новий терапевтичний підхід для мінімізації активності даного ізоферменту і зменшення негативного впливу його індукторів на організм. Орієнтація на ізофермент CYP2E1, як мішень для фармакологічного втручання сприятиме, в тому числі, пошуку ефективних методів попередження розвитку чоловічого непліддя в умовах зростаючого навантаження несприятливих факторів довкілля, серед яких не остання роль належить фармацевтичним засобам.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дисертаційній роботі представлені результати експериментального визначення особливостей реалізації побічної дії ПТЗ I ряду на чоловічу репродуктивну функцію, в тому числі за експериментальних алкоголізму та діабету, та обґрунтуванню підходів до її фармакологічної корекції. Досліджено рівень індукції CYP2E1 в сім'яниках та печінці, біохімічні показники, що характеризують стан даних органів, морфо-функціональний стан сім'яників самців щурів та показники антенатального та постнатального розвитку їх потомства. Визначено вплив препаратів, здатних інгібувати експресію CYP2E1, на репродуктивну функцію самців щурів на тлі введення ПТЗ.

2.1. Матеріали досліджень

В дослідженнях використовувалися реактиви та органічні розчинники категорії х.ч. або ч.д.а. виробництва «Хімлаборреактив», Україна: соляна кислота, сірчана кислота, сульфо-саліцилова кислота, диетиловий ефір, хлороформ, хлорне залізо, льодяна оцтова кислота, трихлороцтова кислота (ТХО).

Також були використані реактиви зарубіжного виробництва фірм «Sigma-Aldrich»: фенол; ізоаміловий спирт; ацетат амонію; трис; етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА); TRI-Reagent, 5, 5'-дітиобіс-(2-нітробензойна кислота); нітротетразолій синій; «BioRad»: термостабільна РНКаз; протеїнкіназа, бромовий етидій; «Fermentas»: набір для синтезу комплементарної дезоксирибонуклеїнової кислоти (кДНК) – Revert Aid TMN Minus First Strandc DNA Synthesis Kit; DEPC-вода; Taq буфер; суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів; магнію хлорид; ДНК-полімераза; «Metabion»: прямий та зворотній праймери специфічні для ПЛР ампліфікації гену CYP2E1;

набір для імуноферментного визначення тестостерону у сироватці крові Testosterone ELISA виробництва «DRG Instruments GmbH».

У дослідженнях були використані наступні тест-зразки:

1. Ізоніазид (Isoniazid, гідразидізонікотинової кислоти) – субстанція виробництва ЗАТ НВЦ „Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, серія 07066/12Н.

2. Піразинамід (Pyrazinamide, піразин-2-карбоксамід) – субстанція ЗАТ НВЦ „Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, серія pyz/p-139/09.

3. Рифампіцин (Rifampicinum) – субстанція ЗАТ НВЦ „Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, серія 201009026.

4. Етамбутол (Ethambutolum, (+)-N,N'-етилен-біс-(2-амінобутан-1-ол) – „Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, серія 092501145.

5. Стрептоміцин (Streptomycin) – порошок для ін'єкцій виробництва корпорація „Артеріум”, Україна, серія 770510

6. Метіонін (Methionine) виробництва ВАТ “Київський вітамінний завод”, серія 50511.

7. Композиція Метовітан розроблена в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. До складу композиції входять: метіонін, тіамін, нікотинамід, α -токоферолу ацетат, сіль цинку.

8. Стрептозотоцин виробництва Sigma-Aldrich, США.

Протягом дослідження препарати зберігали у темному, сухому місці при температурі не вище 25 °С.

При проведенні досліджень використовували наступне обладнання: центрифуга з охолодженням Sigma 2-16 K (Великобританія); рефрижераторна центрифуга Joan (Франція); документуюча система для електрофорезу (BioRad, США); блок живлення для електрофорезу (BioRad, США); камера для електрофорезу (BioRad, США); ламінарна шафа BHL 96 LaBox (Чехія); ПЛР-ампліфікатор MyCycle (BioRad, США); ПЛР-бокс UVC/T-M-AR (BioSan, Латвія); водяний термостат з шутелем Julabo SW22 (Франція); спектрофотометр UVVIS BioMate 5 (Франція); фотоелектроколориметр КФК-2-УХЛ 4,2;

амінокислотний аналізатор AAA-881 (Чехія); терези лабораторні електронні CRYSTAL-100 Cal (Gibertini, Італія); pH-метр-301 (Mettler Toledo, США); система для вимірювання глюкози Smartest Optima (BiotestT Medical Corporation, Германія), дозатори піпеткові змінного об'єму (Eppendorf, США) та ін.

Для досліджень використовували самців та самиць щурів лінії Вістар (*Rattus norvegicus*) з початковою масою тіла 150-170 г, віком 10-12 тижнів, наданих експериментально-біологічною клінікою ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Групи тварин формували за методом рандомізації з попереднім карантинном протягом 10 днів.

Ідентифікацію тварин проводили з використанням системи індивідуальних кольорових міток на тілі. Щурів утримували у стандартних умовах віварію за температури 22-24 °С та відносної вологості 30-70 %, з вільним доступом до корму та води.

Використовували корм для лабораторних тварин виробництва АТЗТ “Фенікс”, Україна, Київ. Тварини розміщувались у клітках з полікарбонату розмірами (660 x 370 x 140) мм із кришками з гальванізованої сталі індивідуально або групами в залежності від етапів виконання роботи. Клітки були забезпечені скляними поїлками. Підстилкою слугувала тирса з деревини листових порід.

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), усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Експериментальні моделі

Враховуючи, що завданнями даної роботи було визначення особливостей побічної дії ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію за умов нарізного та сумісного застосування, в тому числі на фоні експериментального алкоголізму та діабету I типу, дослідження було проведене у декілька етапів.

На першому етапі вивчали вплив ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду і етамбутолу за умов їх сумісного та нарізного введення на стан репродуктивної функції щурів-самців. Тварин було розподілено на 6 груп по 12 тварин в кожній.

- 1-а група: введення етамбутолу, 155 мг/кг маси тіла;
- 2-а група: введення рифампіцину, 74,4 мг/кг маси тіла;
- 3-а група: введення ізоніазиду, 62 мг/кг маси тіла;
- 4-а група: введення піразинаміду, 217 мг/кг маси тіла;
- 5-а група: сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу у вище зазначених дозах;
- 6-а група: контроль – введення 1 % крохмального гелю.

Термін уведення препаратів склав 2 місяці.

На другому етапі тварин було розподілено на 5 груп:

- 1-а група: введення етамбутолу, 155 мг/кг маси тіла – 6 тварин;
- 2-а група: введення стрептоміцину – 14 мг/кг – 6 тварин;
- 3-а група: сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу у вище зазначених дозах протягом 60 днів (комбінація 1) – 22 тварини;
- 4-а група: сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду у вище зазначених дозах та стрептоміцину – 14 мг/кг протягом 60 днів (комбінація 2) – 16 тварин;
- 5-а група: контроль – введення 1 % крохмального гелю – 22 тварини.

Термін введення препаратів склав 2 місяці.

На третьому етапі досліджували репродуктивну здатність щурів-самців та метаболічні зміни в їхніх гонадах за умов введення ПТЗ на тлі тривалого споживання етанолу.

Для відтворення моделі експериментального (хронічного) алкоголізму самців-щурів відбирали за прихильністю до алкоголю, пропонуючи їм у вільному виборі воду та 15% розчин етанолу («двопляшковий» тест, що забезпечує добровільний безперервний вибір між алкоголем та водою) [294]. Висновок щодо придатності тварин для подальших експериментів робили після серії щоденних вимірювань спожитих об'ємів води та алкоголю. 28 відібраних таким чином щурів використовували для моделювання хронічного алкоголізму, шляхом заміни води 15% розчином етанолу протягом 150 днів. Споживання 15% етанолу вимірювали у мл і розраховували в г/кг/день чистого етанолу. Щоденне споживання етанолу складало в середньому 10 г/кг/день.

Прихильних до добровільного споживання алкоголю тварин було розподілено на 2 групи - по 14 у кожній.

1-а група: добровільне споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів (хронічний алкоголізм);

2-а група: введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу у зазначених вище дозах на фоні хронічної алкоголізації, починаючи з 91 дня після початку споживання алкоголю;

3-ю групу склали контрольні тварини в тій же кількості, з такою ж початковою масою, того ж віку та які, з початку експерименту утримувались в аналогічних умовах, але замість алкоголю споживали воду *ad libitum*. Цім тваринам в ті ж терміни, що і початок введення комбінації ПТЗ схильним до алкоголю щурам, розпочинали введення 1 % крохмального гелю.

На четвертому етапі вивчали вплив сумісного введення ізоніазиду, піразинаміду, рифампіцину та етамбутолу на печінку та гонади самців-щурів за умов експериментального діабету. Для цього відтворювали модель СТЗД у щурів. Тваринам внутрішньоочеревинно однократно вводили СТЗ у дозі 60

мг/кг, розведений на 10 Мм цитратному буфері (pH4,5) [295]. Після цього щурів витримували протягом 2 тижнів для розвитку діабету, при цьому у них періодично контролювали рівень глюкози у крові за допомогою системи для вимірювання глюкози Smartest Optima виробництва BiotestT Medical Corporation, Германія. Приймали до уваги діапазон нормальних значень глюкози в крові у щурів-самців лінії Вістар, який складає 3,9 - 11,56 ммоль/л [296]. Оцінювали тяжкість індукованого діабетичного стану та наступні досліді проводили на щурах, у яких рівень глюкози в крові сягав більше, ніж $16,5 \pm 0,8$ ммоль/л. Для досліджень були використані наступні групи тварин по 12 у кожній:

1-а група: стрептозотоциновий діабет;

2-а група: введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу у зазначених вище дозах протягом 60 днів на фоні стрептозотоцинового діабету;

3-ю групу склали контрольні тварини (введення 1 % крохмального гелю протягом 60 днів).

На п'ятому етапі проводили дослідження коригуючої дії метаболітичних препаратів - метіоніну та Метовітану стосовно гонадотоксичних ефектів, викликаних сумісним введенням ПТЗ щурам-самцям. Тварин було розподілено на 4 групи по 8 у кожній:

1-а група: введення комбінації 1 протягом 60 днів;

2-а група: введення комбінації 1 за умов лікувально-профілактичного застосування метіоніну (50 мг/кг);

3-а група: введення комбінації 1 за умов лікувально-профілактичного застосування Метовітану (50 мг/кг);

4-а група: контроль – введення 1 % крохмального гелю.

На всіх перерахованих вище етапах дослідження ПТЗ вводили тваринам у дозовому режимі, який застосовується у клініці для короткотермінової терапії туберкульозу [297]. Дози досліджуваних лікарських засобів були розраховані, виходячи з коефіцієнта видової чутливості [298].

Для введення кожного з препаратів, за виключенням стрептоміцину,

готували суспензії на 1 % крохмальному гелі безпосередньо перед введенням тваринам. Розчинник було обрано з огляду на дані фармацевтичних досліджень, де було показано, що приготована у крохмальному гелі суспензія є оптимальною, а властивості суміші ізоніазиду, піразинаміду, рифампіцину та етамбутолу для приготування суспензії є цілком порівнюваними з властивостями доступних комерційних комбінованих таблетованих форм, що містять ці препарати [299]. Суспензії ПТЗ вводили тваринам щоденно внутрішньошлунково за допомогою зонда із медичної сталі скляним ін'єкційним шприцом об'ємом 2 мл.

Стрептоміцин розчиняли у новокаїні виробництва ФФ «Дарниця», серія: 10111 та вводили щурам внутрішньом'язево.

На всіх етапах дослідження ПТЗ вводили щурам-самцям протягом 60 днів, оскільки цей термін охоплює повний період сперматогенезу з урахуванням дозрівання сперматозоїдів в епідидимісі, та є загальноприйнятим при дослідженні впливу хімічних речовин, включаючи лікарські засоби, на чоловічу репродуктивну функцію [300].

Метіонін та Метовітан вводили курсами внутрішньошлунково кожний останній тиждень місяця за одну годину до введення ПТЗ щоденно (всього 2 курси).

Індивідуальні дози всіх препаратів розраховували у мг/кг та мл/кг з урахуванням щотижневих змін маси тіла кожної з тварин.

На термінальній фазі експериментів щурів піддавали евтаназії шляхом декапітації під анестезією діетиловим ефіром. Концентрація ефіру складала 80 мл на літр об'єму контейнера; час експозиції складав приблизно 5 хв.

До евтаназії збирали зразки крові з стегнової вени. Отримували сироватку крові і заморожували при 700С. Вилучали сім'яники та епідидиміси та використовували їх для подальших досліджень. Для морфологічних досліджень брали лівий сім'яник. Правий сім'яник використовували для біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень. Вилучені для біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень сім'яники зберігали до використання у

рідкому азоті.

2.2.2. 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. Одночасно щурам-самцям продовжували вводити досліджувані речовини.

Відповідно до загальноприйнятих методів дослідження фертильності у лабораторних щурів, першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів у вагінальному мазку [300]. Більшість самців запліднювали самиць протягом перших 5 днів сумісного утримання (тобто під час першого ж еструсу у самиць), але частина з них виявилась не здатною до запліднення. Це враховували для оцінки впливу використаних у дослідженні речовин на запліднювальну здатність самців-щурів, яку визначали за формулою:

$$\text{Індекс запліднювальної здатності} = \frac{\text{число вагітних самиць}}{\text{число самиць, парованих з самцями}} \times 100 \quad (2.1)$$

Частину самиць на 20-й день вагітності під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії методом цервікальної дислокації.

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 згідно загальноприйнятим методам [300]. Доімплантаційну загибель розраховували за формулою:

$$\% \text{ відсоток доімплантаційної загибелі} = \frac{(\text{кількість жовтих тіл} - \text{кількість місць імплантації})}{\text{кількість жовтих тіл}} \times 100 \quad (2.2)$$

Післяімплантаційну загибель розраховували за формулою:

$$\% \text{ відсоток післяімплантаційної загибелі} = \frac{\text{кількість загиблих плодів}}{\text{кількість місць імплантації}} \times 100 \quad (2.3)$$

Реєстрували тривалість вагітності, визначали розмір приплоду, його масу, кількість живих та мертвонароджених щурят, розподіл за статтю. Вживаність новонароджених тварин враховували на 4, 7, 14 та 21 день постнатального життя. Спостереження за фізичним розвитком потомства проводили щоденно до завершення підсосного періоду. Оцінку психомоторної активності щурят місячного віку проводили за тестом «відкрите поле», а також перевіряли наявність основних рефлексів (згинання, хапання, перевертання, встановлення лапи на опору, рівноваги, рогівкового, здригання та розчепірювання пальців задніх кінцівок) [301, 302].

2.2.3. Методи дослідження стану гонад щурів-самців

Після евтаназії, як це описано вище, щурів розтинали, виділяли сім'яники з придатками. Сім'яники оглядали, зважували, визначали їхні радіуси та вираховували об'єм.

У всіх випадках для оцінки морфологічних та морфометричних параметрів та показників сперматогенезу використовували правий сім'яник. Тканини фіксували у розчині Буена (РБ) протягом 6-8 годин. Після фіксації у РБ з тканин видаляли пікринову кислоту, промиваючи 70 % етанолом. Потім для нейтралізації пікринової кислоти, що міститься в РБ, зразки переносили до 70 % етанолу з карбонатом літію. Етанол-літій карбонатний розчин замінювали три або більше разів, доки тканини практично втрачали жовтий колір. Надалі за стандартною методикою тканини зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та занурювали у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм фарбували гематоксиліном і еозином; нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК) виявляли

за методом М. Шубича [303]. Гістологічні препарати вивчали і мікрофотографували за допомогою мікроскопу Olimpus BX41 (200 х; 400 х).

За допомогою мікроскопічного дослідження 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 – сперматогоній, сперматоцитів I або II порядку (швидка зміна одним іншим), сперматид та сперматозоїдів. Критерії були такі: 1 бал – наявні тільки сперматогонії; 2 бали – наявні сперматогонії та сперматоцити; 3 бали – наявні сперматогонії, сперматоцити, круглі (ранні) сперматиди та <5 пізніх сперматид; 4 бали – наявні сперматогонії, сперматоцити та круглі сперматиди та до 25 пізніх сперматид. Враховували відносну кількість каналців із 12-ою стадією сперматогенного циклу. Індекс сперматогенезу розраховували за формулою:

$$\text{Індекс сперматогенезу} = \frac{\sum A}{200} ; \quad (2.4)$$

де А – число стадій у кожному каналці;

200 – число підрахованих каналців.

Крім того, звертали увагу на якісні зміни сперматогенного епітелію: відшарування епітелію від базальної мембрани, наявність ділянок у каналцях, позбавлених будь-яких клітин – вакуолі («вікна»), деформацію окремих сім'яних каналців, деструктивні зміни в сперматозоїдах.

Функціональний стан сперматозоїдів вивчали, використовуючи суспензію клітин придатка сім'яника (епідидимісу), яку готували з дотриманням стандартних методичних умов [304].

Визначали характер та час рухливості сперматозоїдів, їхню загальну

кількість та кількість патологічних форм, осмотичну резистентність у розчинах натрію хлориду в градієнті концентрацій, дослідження проводили з використанням мікроскопу MBL 2000 (Германія).

Кількість сперматозоїдів в епідидимальних суспензіях оцінювали, як описано К.С. Chitra з співавт., використовуючи камеру Горяєва та світловий мікроскоп (200 х) [305].

2.2.4. Біохімічні методи дослідження

Для отримання постмітохондріальної та мікросомальної фракцій сім'яники та печінку гомогенізували в гомогенізаторі Даунса з дотриманням холодогового режиму (4 °C). Готували 25 % гомогенат. Середя для гомогенізації містила 0,05M Tris-HCl, pH=7,4; 0,005M MgCl₂ ; 0,025M KCl; 0,008 M CaCl₂. Субфракціонування проводили на рефрижераторній центрифугі, фірми Жоан (Франція), AG 100.80, rad=99, при 10 000 обертів, 15 хв. Після відкритки гомогенату при 10000 g, 15 хв, 4 або 5 мл (еквівалентно 1г маси сирової тканини) постмітохондріального супернатанту змішували з 25 мл 0,01 M розчину сахарози, що містив 0,008 M CaCl₂ та 0,005M MgCl₂. Загальний розчин розмішували протягом декількох хвилин та центрифугували при 15000 g, 10 хвилин. Отриманий осад диспергували та рецентрифугували двічі при 15000 g, 10 хвилин у розчині (0,0125M) сахарози та гомогенізували в 0,05 M Tris-HCl, pH7,5, що містив 0,005M MgCl₂ та 0,008 M CaCl₂ [306].

В гомогенаті сім'яників визначали швидкість аскорбат та НАДФН-залежного утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК). В основі методу лежить реакція між МДА (та деякими іншими продуктами окислення ліпідів) та ТБК, яка за високої температури та кислого значенні рН протікає з утворенням забарвленого триметинового комплексу (рожевий колір), який містить одну молекулу МДА та дві молекули ТБК. Максимум поглинання – 535 нм [307]. У якості прооксидантів додавали аскорбат або НАДФН та іони Fe³⁺. Склад інкубаційної суміші: гомогенат сім'яників 0,5-1 мг/мл, трис-HCl

буфер 40 мМ (рН 7,4), аскорбат або НАДФН 1 мМ, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$. Інкубацію проводили у водяній бані (37°C) протягом 30 хв при постійному струшуванні, після чого зупиняли реакцію 30 % ТХО та видаляли осад центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв. До супернатанту додавали ТБК та інкубували при 95°C протягом 10 хв.

Швидкість утворення ТБК-реактантів визначали за формулою, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції:

$$\frac{\Delta E \times V}{t \times E \times \text{мг білка}}, \quad (2.5)$$

де $\Delta E = E$ холостої проби – E досліджуваної проби,

V – об'єм реакційної суміші,

t – час інкубації,

E – коефіцієнт молярної екстинції $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Вміст відновленого глутатіону в гомогенаті сім'яників оцінювали за рівнем небілкових SH-груп, враховуючи те, що в загальному пулі останніх він складає 9 5%. Небілкові SH-групи, після висаджування білків 50% ТХО визначали в гомогенаті сім'яників з допомогою реактиву Еллмана за кількістю аніону меркаптобензойної кислоти, що дає інтенсивне жовте забарвлення [308]. Використовувались наступні реактиви: 0,01 М 5, 5'-дітіобіс-(2-нітробензойна кислота) – реактив Еллмана; трис буфер 0,4 М, рН 8,9; 0,02 М ЕДТА (для гомогенізації сім'яників); ТХО 50 %. Відміряли у центрифужні пробірки: гомогенат сім'яників 2,5 мл (4-5 мг білка) дистильовану воду - 2 мл, ТХО 50 % - 0,5 мл. Витримували 15 хвилин періодично струшуючи (з дотриманням холодового режиму). 15 хвилин центрифугували, 3000 g, 4°C , відібирали супернатант. До 1 мл супернатанту додавали 2 мл трис буферу 0,4 М, рН 8,9 та 0,05 мл реактиву Еллмана. Через 5 хвилин визначали екстинкцію при 412 нм в 1 см кюветі. Для контролю використовували таку ж реакційну суміш та умови проведення реакції, але замість біологічного матеріалу додавали 2,5 мл 0,02 М ЕДТА.

Вміст SH-груп білків оцінювали за різницею між рівнем загальних та небілкових SH-груп [308]. Небілкові SH-групи, після висаджування білків 50 % ТХО визначали в гомогенаті сім'яників за допомогою реактиву Еллмана, як це описано вище. Загальні SH-групи визначали з реактивом Еллмана, але не висаджуючи білки. Відміряли у центрифужні пробірки: гомогенат сім'яників – 0,75 мл, додавали 1 мл трис буферу 0,4 М, рН 8,2 та 0,05 мл реактиву Еллмана, після цього 3,95 мл 95 % етанолу. Витримували 15 хвилин періодично струшуючи (при кімнатній температурі). 15 хвилин центрифугували, 3000 g, відбирали супернатант. Визначали екстинкцію при 412 нм в 1 см кюветі. Для контролю використовували таку ж реакційну суміш та умови проведення реакції, але замість біологічного матеріалу додавали 2,5 мл 0,02 М ЕДТА.

Глутатіон-S-трансферазну активність постмітохондріальної фракції сім'яників визначали з використанням у якості субстрату 1-хлор-2,4-динітробензолу за моніторингом змін у спектрі поглинальної здатності при 340 нм та температурі 25 °С [309]. Реакційна суміш містила: 0,1 М калій-фосфатний буфер рН 6,5 - 2,8 мл; глутатіон відновлений 1 мМ- 0,1 мл, субстрат - 1 мМ 1-хлор-2,4-динітробензол - 0,1 мл, постмітохондріальна фракція сім'яників 50 мкл. Реакційна суміш без біологічного матеріалу використовувалась, як контроль. Розрахунок активності ферменту проводили за формулою:

$$\frac{\Delta E \times V}{E}; \quad (2.6)$$

де ΔE – зміна екстинції за 1 хв;

V – об'єм реакційної суміші;

E – коефіцієнт молярної екстинції $9,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Глутатіонредуктазну активність визначали згідно до керівництва „Current protocols in Toxicology” [310]. Використаний метод базується на моніторингу окислення НАДФН, пов'язаного з відновленням

глутатіондисульфиду. Максимум поглинання НАДФН 340 нм, і його окислення супроводжується зниженням максимуму поглинання на даній довжині хвиль. Реакцію проводили при температурі 30 °С. У спектрофотометричну кювету, що термостатується, додавали наступні реактиви: 500 мкл буфера (0,2 М фосфат калію, рН=7,0 мМ ЕДТА), 50 мкл 20 мМ розчину окисленого глутатіону, 50 мкл 2 мМ розчину НАДФН. Доводили водою до 1 мл, після додавання біологічного матеріалу, змішували та вимірювали екстинцію на спектрофотометрі при 340 нм. Кількість біологічного матеріалу підбирали експериментально, враховуючи величину Δ - у межах 0,02 – 0,05. У контроль поміщали всі компоненти окрім окисленого глутатіону. І у ще одну пробірку всі компоненти окрім біологічного зразка. Розраховували глутатіонредуктазну активність, що визначається як кількість ферменту, що каталізує відновлення 1 мкмоль окисленого глутатіону за 1хв (еквівалент окислення 1 мкмоль НАДФН за 1 хв). Використовували наступну формулу:

$$\Delta c/t = \frac{\Delta A}{t \times E \times l}; \quad (2.7)$$

де ΔA – зміна екстинції за обраної довжини хвилі;

t – час у хв;

c – концентрація НАДФН;

l – довжина шляху в кюветі;

E – коефіцієнт молярної екстинції НАДФН 9,6 мМ-1см-1.

Для визначення активності каталази готували 2,5%-ний гомогенат сім'яників. Спектрофотометричне вимірювання активності даного ферменту базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [311]. Холоста проба містила: 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 , 0,1 мл трис HCl буфера 0,05М рН 7,8, через 2 хв додавали 1 мл 4 % розчину молібдату амонію $(NH_4)_2MoO_4$ на 1Н H_2SO_4 . Контроль до холостої проби містив: 2 мл дистильованої води, 0,1 мл трис HCl буфера 0,05 М рН7,8, через 2 хв додавали 1 мл 4 % розчину $((NH_4)_2MoO_4)$ на 1Н H_2SO_4 . Досліджувана

проба містила: 2 мл 0,03 % р-ну H_2O_2 , 0,1 мл гомогенату сім'яників (0,2 – 0,3 мг білка), через 2 хв додавали 1 мл 4 % розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ на 1Н H_2SO_4 . Контроль до досліджуваної проби містив: 2 мл дистильованої води, 0,1 мл гомогенату сім'яників (0,2 – 0,3 мг білка), через 2 хв додавали 1 мл 4 % розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ на 1Н H_2SO_4 . Після додавання всіх реактивів проби центрифугували 5 хв при 3000 об/хв. Вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при 410 нм. Центрифугували 5 хв при 3000 об/хв. Вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при 410 нм. Розрахунок активності каталази проводили за формулою:

$$\frac{\Delta E \times V}{t \times E \times \text{мг білка}}; \quad (2.8)$$

де $\Delta E = E$ холостої проби - E досліджуваної проби;

V – об'єм реакційної суміші;

t – час;

E - коефіцієнт молярної екстинції $22,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Активність СОД в сім'яниках визначали за методом Misra та Fridovich у модифікації Т. В. Сироти [312] за здатністю інгібувати реакцію аутоокиснення адреналіну у лужному середовищі. Аутоокиснення адреналіну, який потрапляє у лужне середовище, ініціюється супероксидними радикалами, що виникають у результаті внутрішньомолекулярних перебудов адреналіну у ході його перетворення через адреналінхінон в адренохром. Фермент СОД перехоплює супероксидні радикали та інгібує утворення адренохрому. У відповідності з цим, за кількістю адренохрому – продукту аутоокислення адреналіну, який має максимум поглинання в області 480 нм, оцінюють активність СОД. У модифікації Т. В. Сироти швидке аутоокиснення адреналіну реєструють не за утворенням адренохрому, а за продуктом окиснення адреналіну, який з'являється раніше та поглинає при довжині хвилі 347 нм (температура 30 °С). Утворення цього продукту інгібується СОД.

Активність n -нітрофенолгідроксилази визначали за методом D. R. Коор [313], що базується на оцінці гідроксилювання n -нітрофенолу до 4-

нітрокатехолу (1,2 – ди-гідрокси -4- п-нітробензол) Реакційна суміш містила: 100 мМ фосфатного буфера (KH_2PO_4 , K_2HPO_4), рН 6,8; 1 мМ аскорбату; 10 – 300 мМ *n*-нітрофенолу; 1 мМ НАДФН. Реакцію починали додаванням НАДФН після преінкубації протягом 2 хвилин за 37 С° і закінчували додаванням стоп-реактиву (0,5 мл 0,6Н НСІ) після трьох хвилин інкубації. Після центрифугування до 1мл супернатанту додавали 0,1мл 10Н NaОН. Оцінювали рівень утворення 4-нітрокатехолу на спектрофотометрі при довжині хвилі 546 нм.

Активність синтази оксиду азоту у печінці визначали за методом, який заснований на вимірюванні приросту продуктів аеробного окиснення оксиду азоту [314]. Інкубаційне середовище містило 2,5 мл 0,1 М трис-НСІ буфера, рН 7,4 та 10 мМ CaCl_2 , пізніше додавали 0,3 мл 320 мкМ водного розчину аргініну і 0,1 мл 1 мМ розчину НАДФН⁺. Реакцію запускали внесенням 0,5 мл гомогенату печінки. Пробу ретельно перемішували та відбирали 0,2 мл для визначення вмісту продуктів аеробного окиснення оксиду азоту. Решту проби інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,02 мл 0,02 % розчину азиду натрію. Для оцінки вмісту продуктів аеробного окиснення оксиду азоту аліквоту гомогенату 0,2 мл вносили у 1,8 мл дистильованої води, додавали 0,2 мл 1% розчину сульфанілової кислоти, витримували 7 хв. в темному місці при кімнатній температурі, додавали 0,2 мл 1 % розчину α -нафтилендіаміну та за тих же умов витримували ще 10 хв. Вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при 539 нм. Активність синтази азоту розраховували за формулою:

$$E = \frac{N \times 82}{\text{мг білка} \times t}; \quad (2.9)$$

де N - приріст вмісту NO_2 нмоль/мл;

t – час

Вміст різних фракцій холестеролу в гомогенаті сім'яників визначали згідно методу Н. Станкевічене [315]. Принцип окремого визначення вільного та загального холестеролу заснований на реакції взаємодії кольорового реактиву

(містить хлорне залізо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), льодяну оцтову та сірчану кислоти) з холестерином однієї і тієї ж проби біологічного матеріалу за різних температурних умов. Для приготування кольорового реактиву змішували 3 частини 0,1 % розчину хлорного заліза у льодяній оцтовій кислоті, вільній від окиснювачів та альдегідів, та 2 частини концентрованої сірчаної кислоти (х.ч.). При температурі 55-65 °С хлорне залізо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) вступає в реакцію з вільним і етерифікованим холестерином, в той час як при 20 °С хлорне залізо протягом перших 2-х годин реагує лише з вільним холестерином. Після цього проміжку часу в реакцію вступає і складний ефір холестеролу (після його кислотного гідролізу). Вміст етерифікованого холестеролу розраховували за різницею між вмістом загального та вільного холестеролу.

У сім'яниках визначали вміст вільних амінокислот. До 1 мл гомогенатів сім'яників додавали рівні об'єми 3 % сульфо-саліцилової кислоти і отримані суміші залишали протягом 10 хвилин в холодильнику при температурі 4 °С. Утворені осадки видаляли центрифугуванням (5000 g, 10 хв, 4 °С) [316]. Супернатанти містили вільні амінокислоти з сім'яників. Їхній вміст визначали на амінокислотному аналізаторі ААА-881 (Чехія).

Колаген типу I шкіри екстрагували і очищали, як це було описано раніше [317]. Всі процедури проводили з дотриманням холодого режиму. З подрібненої шкіри (20 г) екстрагували білок у 100 мл 0,1 М Na-цитратного буфера (рН 4,0) і діалізували проти 0,01 М NaHPO_4 при 4 °С. Суспензію білкових фібрил центрифугували (6000 g, 20 хв, 4 °С). Отримані гранули розчиняли (100 мг гранул в 10 мл) в 0,1 М оцтової кислоти (рН 2,5), додавали пепсин (20 мг/г гранул) і суміш витримували протягом 3-х днів у холодильнику при 4 °С. Після цього для інактивації пепсину, рН в кожній суміші нейтралізували додаванням порошкоподібного кристалічного трису (рН 7,4). Далі центрифугували (35000 g, 40 хв, 4 °С). Осад відкидали, а супернатанти використовували для подальшого фракціонування типів колагену. Фракціонування очищеного колагену типу I проводили з NaCl. По-перше в 1,5 М NaCl була сформована фракція, в якій містився колаген типу III. Його

відокремлювали центрифугуванням (40000 g, 40 хв, 4 °C). Білкова фракція з гранул, які були отримані у 2,2 М NaCl, містила колаген типу I. Фракції розділяли центрифугуванням (65000 g, 60 хв, 4 °C). Отриманий осад тричі перекристалізовували шляхом діалізу (проти 15 % KCl в 0,02М NaHPO₄ при 4 °C) і центрифугування (65000 g, 60 хв, 4 °C). Чистоту зразків колагену контролювали за допомогою електрофорезу. Фракції колагену гідролізували протягом 24 год з 6 моль/л HCl при 105 °C. Їхні амінокислотні композиції аналізували методом іонообмінної хроматографії на амінокислотному аналізаторі AAA-881 (Чехія).

Білок у гомогенаті сім'яників визначали за методом О. Н. Lowry та співавт. [318], який базується на вимірюванні оптичної густини при 750 нм кольорової реакції фенольного реактиву Фоліна-Чікольте з амінокислотними залишками тирозину, триптофану, гістидину та цистеїну. Вимірювали інтенсивність синього забарвлення. Концентрацію білка в пробах визначали за допомогою калібрувальної кривої, яку будували на підставі оптичних характеристик ряду точно приготованих білкових розчинів низхідних концентрацій. Для побудови калібрувальної кривої використовували кристалічний препарат чистого бичачого альбуміну.

Вміст білка в мікосомальній та постмітохондріальній фракції сім'яників та печінки визначали за допомогою Total Protein Kit, MicroLowry, Onishian and Barr Modification (Sigma-Aldrich) згідно до інструкції виробника.

2.2.5. Молекулярно-біологічні методи дослідження

Виділення сумарної мРНК з сім'яників проводили з використанням TRI-Reagent виробництва Sigma, США та за відповідною інструкцією до даного реактиву. В 1 мл TRI-Reagent гомогенізували 100 мг тканини сім'яників, додавали 200 мкл хлороформу, ретельно змішували та залишали на 15 хв. Центрифугували при 12000 g, 5 °C впродовж 20 хв. Центрифугат розділявся на 3 фази: органічна фаза червоного кольору - нижня (містить білки), інтерфаза

(містить ДНК), безколірна верхня фаза (містить РНК). Відбирали верхню фазу, додавали 0,5 мл ізопропанолу та ретельно змішували. Центрифугували при 12000 g, 5⁰С впродовж 25 хв. Супернатант зливали та двічі відмивали осад 70 % етанолом, центрифугуючи при 12000 g, 5⁰С впродовж 25 хв. Після цього РНК розчиняли у 100 мкл DEPC води. Відбирали аліквоту 6 мкл для перевірки якості РНК на електрофорезі (агароза 2 %, трис-борат-етилендіамінова кислота (ТБЕ)-буфер). Інше заморожували в рідкому азоті.

Синтез кДНК проводили з використанням стандартного тест-набору фірми Fermentas, Германія за відповідною інструкцією. У мікропробірці готували реакційну суміш: мРНК – 5 мкл, рандомгексамерпраймер – 1 мкл, DEPC-вода 6 мкл. Коротко центрифугували, інкубували при 70⁰С 5 хв, охолоджували у льоді та знову коротко центрифугували. Додавали 4 мкл 5 x 3Т буферу, 1 мкл інгібітору рибонуклеаз, 2 мкл 10 мМ суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів, змішували і коротко центрифугували. Інкубували при 25⁰С 5 хвилин. Додавали 1 мкл рекомбінантної зворотної транскриптази, інкубували 10 хв при 25⁰С та 60 хв при 42⁰С. Зупиняли реакцію нагріванням до 70⁰С 10 хв та охолоджували пробірки у льоді. Готову кДНК зберігали при -20⁰С.

Експресію мРНК CYP2E1, у сім'яниках визначали методом ЗТ-ПЛР. Склад реакційної суміші для ПЛР, праймери специфічні для ПЛР ампліфікації гену CYP2E1 (форвард 5'-CTTCGGGCCAGTGTTAC-3' та реверс 5'-CCCATATCTCAGAGTTGTGC-3'), а також протокол ампліфікації були обрані згідно до S. M. Lankford із співавт. [319]. Для внутрішнього контролю проводили ПЛР з праймерами β-актину, що має постійний рівень експресії: форвард 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'; реверс 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCT-3'. Усі використані праймери виробництва «Metabion», Німеччина. Для ампліфікації використовували термоциклер BioRad, США. Реакційна суміш для ЗТ-ПЛР містила: DEPC-води 15 мкл, 10 x Taq буферу 3 мкл, 2,5 мМ суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів 3 мкл, 2,5 мМ MgCl₂ 3 мкл, по 1 мкл реверс та форвард праймерів, кДНК 3мкл, ДНК-

полімерази 1 мкл. Електрофорез продуктів ампліфікації (744 п.о. – CYP2E1 та 353 п.о. – β -актин) проводили в 2 % агарозному гелі, забарвлювали розчином бромового етидію (5 мкг/мл), 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 визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу, з використанням специфічних поліклональних антитіл миші білка CYP2E1. Антитіла були отримані 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 кількісно за методом Бредфорда [320]. Білки гомогенату сім'яників (50 мг/доріжка) піддавались денатуруючому SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі з наступним перенесенням на нітроцелюлозні мембрани. Після блокування 2 % розчином знежиреного сухого молока, мембрану інкубували з анти-CYP2E1 антитілами, наданими Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (1/400, за об'ємом), далі інкубували з anti-Rabbit IgG-HRP вторинними антитілами виробництва Sigma, 1/5000, за об'ємом) протягом 1 год, відповідно. Білок CYP2E1 візуалізували за допомогою хемілюмінесценції, потім фотографували і виконували денситометричний аналіз за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Дані стосовно білка CYP2E1 представляли у відносних одиницях, як відношення вмісту білка CYP2E1 до вмісту контрольного білка GAPDH в тій же смугі гелю.

Для визначення ступеня фрагментації ДНК заморожені у рідкому азоті проби сім'яників гомогенізували та отримували геномну ДНК [³²¹]. Принцип методу полягає у ферментному виділенні геномної ДНК з використанням протеїнкінази та РНКаз. 25 мг тканини сім'яників гомогенізували у 0,5 мл лізинг-буферу, гомогенат інкубували при 55 °С протягом 16 год за умов постійного перемішування. До кожного гомогенату додавали термостабільну РНКазу А (20 мг/мл) із розрахунку 5 мкл до 0,5 мл гомогенату та інкубували

при перемішуванні протягом 3 год при температурі 37 °С. Після цього до суміші додавали 0,5 мл системи фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт у співвідношенні 25:24:1 та через 10 хв центрифугували у бакет роторі при температурі -4 °С, швидкості 1800 g протягом 10 хв. Видаляли фенольну фазу та двічі промивали хлороформ-ізоамілову фазу 0,5 мл вищезазначеної системи. До водної фази додавали диетиловий ефір у співвідношення 1:1 за об'ємом, 1/2 об'єму 7,5 М ацетату амонію та 2 об'єми 96⁰ етанолу. Залишали суміш на 20 хв при кімнатній температурі, потім центрифугували у кутовому роторі при 1700 g, (-4⁰С) протягом 5 хв. Осад ДНК двічі промивали 70⁰ етанолом. Умови центрифугування ті ж самі. Після останнього центрифугування етанол видаляли, а осад висушували при кімнатній температурі на повітрі. ДНК розчиняли у ТБЕ буфері (10 мМ трис-НCl та 1 мМ EDTA, рН 8) та розділяли у 2 % агарозному гелі (50–60) V; 3,5 год). Після завершення електрофорезу гелі забарвлювали розчином бромового етидію (5 мкг/мл), фотографували в УФ-світлі за допомогою системи GelDoc, виробництва BioRad, США та аналізували, використовуючи програмне забезпечення Quantity One BioRad System (США).

Загальний тестостерон в сироватці крові визначали, використовуючи набір Testosterone ELISA виробництва DRG Instruments GmbH (Німеччина) для визначення вільного тестостерону методом твердофазного імуноферментного аналізу згідно інструкції виробника. Коротко, принцип метода полягає в тому, що на внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла до тестостерону. Вільний тестостерон зразка конкурує з кон'югованим тестостероном за зв'язування з антитілами. В результаті утворюється пов'язаний з пластиком «сендвіч», що містить пероксидазу. Додавання в лунки субстрату тетраметилбензидину призводить до утворення синього забарвлення, яке змінюється на жовте при додаванні стоп-реагенту. Інтенсивність забарвлення вимірюється фотометрично і є обернено пропорційною концентрації тестостерону в пробі. Вимірювання оптичної щільності калібраторів і зразків проводили на мікропланшетному ридері

BioTek. Чисельне значення концентрації визначали за калібрувальною кривою, побудованою по калібраторам з відомим вмістом тестостерону.

2.2.6. Гістохімічні методи дослідження

Для гістохімічного визначення активності дегідрогеназ у кріостаті при температурі -18°C готували нефіксовані зрізи сім'яників товщиною 5 мкм. Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в сім'яниках вивчали методом М.М. Nachlas та співавт. [322], використовуючи нітротетразолій синій (НТС) як акцептор електронів. Зрізи інкубували в середовищі, що містило субстрат та НТС протягом 15 хв при 37°C . Відповідні зрізи сім'яників інкубували без субстрату та використовували як контролю. Скупчення синіх гранул диформагану приймали як показник активності ферменту.

Активність ЛДГ оцінювали за гістохімічною методикою згідно з R. Hess та ін. [³²³], як це було описано А. G. E. Pearse [324]. Зрізи інкубували в середовищі, що містило субстрат, НТС і НАД протягом 15 хвилин при 37°C . Відповідні зрізи сім'яників інкубували без субстрату та використовували як контролю. Скупчення фіолетових гранул диформагану приймали як показник активності ферменту.

Вміст нуклеїнових кислот в сім'яниках визначали за методом М. Г. Шубича [325]. Депарафіновані зрізи інкубували в середовищі, що містило фуксинсірчанисту кислоту (реактив Шифа) протягом 2-х годин при 37°C та після промивання дофарбовували 0,1 % метиленовим синім.

Імуногістохімічне фарбування для виявлення протеїну тестикулярного СYP2E1 виконували з використанням 4 мм зрізів сім'яників, які попередньо були зафіксовані у РБ та залиті в парафін. Зрізи тканин депарафінізували, поміщуючи в ксилол, потім у 100 % етиловий спирт і далі, провівши через спиртові розчини з поступовим зниженням концентрації, поміщали у воду. Демаскування антитіл виконували, помістивши занурені в 10 мМ цитратний буфер (рН 6,2) зрізи у мікрохвильову піч при високій потужності на 30 хв.

Поліклональні антитіла людини проти CYP2E1 (Thermoscientific, Waltham, Массачусетс, США) використовували як первинні антитіла. Для усунення ендогенної пероксидазної активності зрізи інкубували в темряві зі свіжо приготованим 1,0 % перекисом водню протягом 30 хв при температурі 37°C. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували шляхом інкубації з не імунною сироваткою з наступним промиванням трис-буфером. Зрізи інкубували протягом 30 хв при температурі 37°C з первинними антитілами проти CYP2E1 розведеними 1:100 в забуференому фосфатом фізіологічному розчині pH 7,2, надалі тричі промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS). Для виявлення первинних антитіл CYP2E1 використовували anti-Rabbit IgG-HRP вторинні антитіла (розчин 1:40000), потім зрізи сім'яників інкубували протягом 20 хв, при температурі 37 °C. Продукт реакції візуалізували за допомогою 3,3'-діамінобензидинтетрагідрохлориду. Будь яка реакція на CYP2E1 розцінювалась, як позитивна. Зрізи сім'яників, що, забарвились оцінювали напівкількісно, визначаючи реакції, як позитивну, фокальну / слабопозитивну або негативну.

2.2.7 Комп'ютерне моделювання взаємодії протитуберкульозних лікарських засобів та CYP2E1

Використовували оптимізовану комп'ютерну модель просторової структури CYP2E1 людини [326]. Просторова структура цитохрому людини P450 2E1 була створена за допомогою веб-сервера SwissModel (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISSMODEL.html>), як описано раніше [327]. Експериментально визначені просторові структури комплексів 4-метилпіразолу (PDB-код 3E6I) та індазолу (PDB-код 3E4E) 20 з CYP2E1 людини було отримано з бази даних Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Пошук активного центру ферменту проводили за допомогою FredReceptor (версія 2.2.3, Open Eye Scientific Software, Inc., Санта-Фе, Нью-Мексико, США, <http://www.eyesopen.com>, 2005).

Докінг молекули гема в активний центр ферменту був виконаний за допомогою HEX 5.0 Software 21, із застосуванням методу п'ятивимірної (5d) обертальної кореляції за формою та електростатичними взаємодіями з подальшою мінімізацією енергії такої системи. Отримана структура була оптимізована в водному оточенні методом молекулярної динаміки (комп'ютерне моделювання руху атомів і молекул) з використанням програмного забезпечення NAMD [328].

Сольватацію (оточення структури молекулами води) ензиму проводили за допомогою VMD Software [329], простір для сольватації був обмежений розмірами протеїну. Загалом структуру було оточено 6190 молекулами води типу TIP3P [330].

Розрахунок молекулярної динаміки здійснювали за стандартних умов у NVE-ансамблі при 37 °C використанням силових полів Charmm35 [331] протягом 10 пс. Теоретичні розрахунки взаємодії активного центру ензиму з ПТЗ виконували за допомогою програми ArgusLab 4.01 [332]. Пошук активного центру ензиму здійснювали методом ShapeDock. Особливості активного центру передбачено за допомогою програми Fred Receptor.

2.2.8. Статистичні методи дослідження

Отримані дані представляли як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$). Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стюдента або однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p \leq 0,05$ [333].

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 [333].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ НАРІЗНОГО ТА СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ, РИФАМПІЦИНУ, ПІРАЗИНАМІДУ ТА ЕТАМБУТОЛУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-САМЦІВ ТА ЕМБРІО- ФЕТАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ЇХНЬОГО ПОТОМСТВА

Погіршення епідемічної ситуації з туберкульозу у світі наприкінці минулого тисячоліття змусило ВООЗ у 1993 році оголосити туберкульоз глобальною небезпекою. В Україні за критеріями ВООЗ епідемія туберкульозу існує з 1995 року і відтоді продовжує поширюватись [334]. Етамбутол, ізоніазид, піразинамід та рифампіцин використовуються у комбінованій терапії туберкульозу – ДОТС. Проблема їх токсичності є унікальною, оскільки практично всі протитуберкульозні препарати першої лінії мають побічні ефекти, які розрізняються за ступенем тяжкості залежно від лікарського засобу і режиму. Крім того, всі схеми фармакотерапії для лікування активного туберкульозу включають комбінацію ліків, які, як правило, вводять протягом не менше 6 місяців [98]. Механізми взаємодії застосовуваних у ДОТС-терапії препаратів є досить складними. При цьому не останнє місце у структурі захворювання на туберкульоз займають діти та дорослі репродуктивного віку чоловічої статі, але дані щодо побічної дії ПТЗ, зокрема їхніх комбінацій, на чоловічу репродуктивну функцію залишаються неоднозначними та не дослідженими.

3.1. Репродуктивна здатність щурів-самців

Сім'яники виконують дві основних функції - сперматогенез (екзокринна функція) і стероїдогенез (ендокринна функція), які не є повністю незалежними. За нормальних умов гіпоталамус вивільняє гонадотропін рилізінг гормон, який стимулює секрецію гіпофізом ФСГ та ЛГ. ЛГ розпізнається специфічними

рецепторами в клітинах Лейдіга, що веде до стимуляції біосинтезу тестостерону (стероїдогенез). ФСГ розпізнається специфічними рецепторами в клітинах Сертолі, які мають важливе значення для продукції сперматозоїдів (сперматогенез) [335].

Нами було виявлено, що сумісне введення протягом періоду сперматогенезу щурам-самцям чотирьох ПТЗ у терапевтичних дозах, супроводжувалось суттєвим зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові. У тварин даної групи цей показник був у 2,8 рази нижчим, ніж в контролі (рис. 3.1).

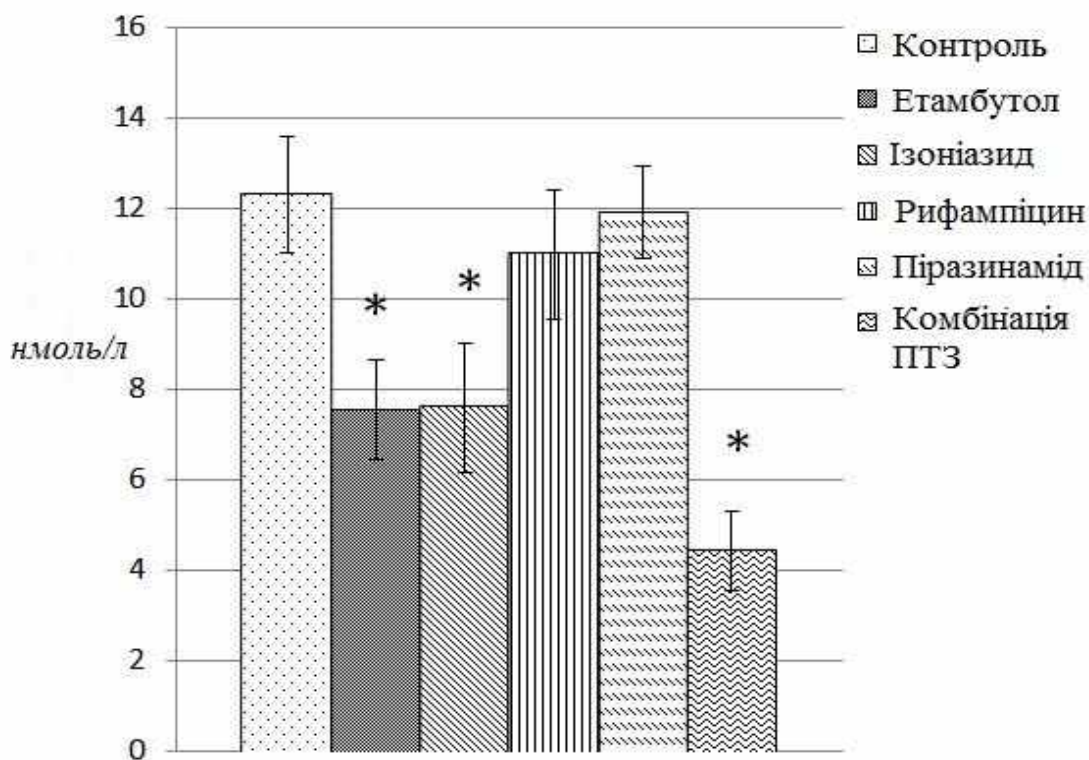


Рис. 3.1. Рівень загального тестостерону в сироватці крові щурів-самців за умов нарізного та сумісного введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

Нарізне застосування етамбутолу та ізоніазиду також суттєво впливало на рівень тестостерону, знижуючи його в середньому в 1,6 рази порівняно з тваринами контрольної групи. У той же час рифампіцин та піразинамід в застосованих дозах не змінювали даний параметр (рис. 3.1).

Таким чином, отримані результати стосовно рівня тестостерону у щурів-самців, яким вводили етамбутол, ізоніазид та комбінацію ПТЗ можуть свідчити про пригнічення тестостерон-продукуючої функції клітин Лейдіга. Це, у свою чергу, призводило до зниження кількості сперматозоїдів у тварин згаданих вище груп.

Даний ефект, очевидно, може бути пов'язаний з етамбутолом та ізоніазидом, оскільки за умов нарізного введення ПТЗ саме після введення цих препаратів спостерігалось зниження кількості сперматозоїдів відповідно у 3 та 1,5 рази порівняно з контролем (рис. 3.2).

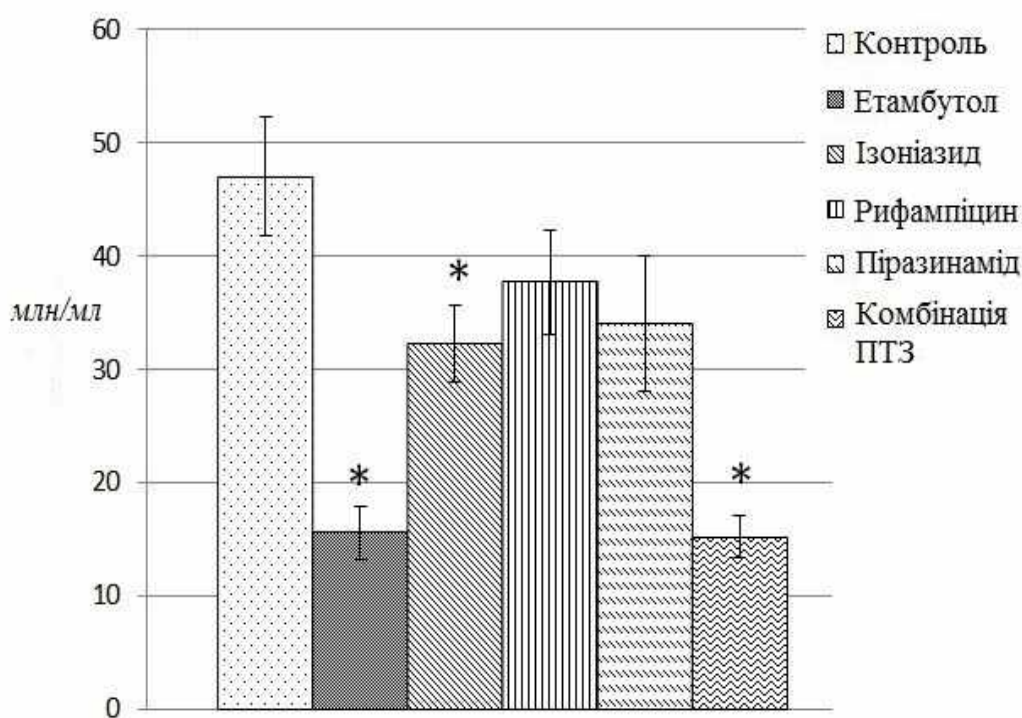


Рис. 3.2. Кількість сперматозоїдів в хвостовій частині епідидимісів за умов нарізного та сумісного введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

Застосування рифампіцину та піразинаміду позначилось лише тенденцією до зниження кількості статевих клітин. Введення комбінації ПТЗ супроводжувалось зменшенням числа сперматозоїдів із хвостової частини епідидимісів втричі (рис. 3.2).

За умов довготривалого, протягом всього періоду сперматогенезу введення самцям щурів ксенобіотиків можливі порушення енергетичних процесів в гонадах, а отже, і пов'язані з цим зміни функціонального стану статевих клітин. Нами були досліджені показники, які опосередковано свідчать про енергетичні можливості сперматозоїдів (характер рухової активності, тривалість руху) та їх стійкість до змін оточуючого середовища (осморезистентність) за вказаних умов експерименту (таблиця 3.1).

Як свідчать отримані дані, введення комбінації ПТЗ щурам-самцям суттєво позначилось на функціональному стані їх статевих клітин. Показано, що був відсутній нормальний поступальний рух сперматозоїдів, практично на початку спостереження відзначали лише слабкі коливальні рухи. Загальний час рухової активності статевих клітин знижувався майже на 80% порівняно з контролем. Цей факт, очевидно, пояснюється наявністю в застосованій схемі введення етамбутолу, але його негативна дія, очевидно, потенціювалась іншими ПТЗ, незважаючи на відсутність їхнього впливу на досліджуваний показник за нарізного введення. Таке припущення можна зробити з огляду на те, що хоча при окремому введенні етамбутолу загальний час рухливості сперматозоїдів і знижувався, але він був на 20 % вищим ніж за умов застосування комбінації ПТЗ. Тим більше, після введення етамбутолу в епідидимальній суспензії визначався певний відсоток статевих клітин, яким був притаманний нормальний поступальний рух.

Як видно з табл. 3.1, життєздатність сперматозоїдів, що визначається за показником осмотичної резистентності по відношенню до розчинів калію хлориду різних концентрацій, за умов сумісного введення чотирьох ПТЗ значно поступалась відповідному показнику у тварин контрольної групи (зниження на 74 %).

Таблиця 3.1

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

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

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;

- $p \leq 0,05$ у порівнянні з групою, що отримувала комбінацію ПТЗ.

В даному випадку можна зробити припущення про сумачію негативних ефектів застосованих препаратів стосовно життєздатності статевих клітин, оскільки було виявлено зниження показника їхньої осморезистентності після введення етамбутолу, рифампіцину та ізоніазиду відповідно на 40 %, 19 % та 16 %.

Підрахунок кількості вагітних самиць, що були спаровані з піддослідними самцями, продемонстрував значне зниження фертильності

самців, які отримували комбінацію ПТЗ (табл. 3.2). З 24 самиць завагітніло лише 4, в той час як в контролі індекс запліднювальної здатності склав 92 %. Оцінка індексу запліднювальної здатності тварин, яким вводили ПТЗ нарізно, виявила, що усі чотири застосованих препарати, певною мірою, знижували даний показник, але найбільш це стосується ізоніазиду, індекс запліднювальної здатності, за умов введення якого склав 66,67 %, та етамбутол (індекс 33,33 %). Це може бути пов'язане як з інкреторним (стероїдогенним), так із сперматотоксичним впливом зазначених препаратів та їх комбінації на організм тварин [336].

Таблиця 3.2

Індекс запліднювальної здатності щурів-самців за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів

Групи самців	Кількість спарованих самиць	Кількість самиць, що завагітніли	Індекс запліднювальної здатності, %
Контроль	24	22	91,7
Етамбутол	12	4	33,33
Рифампіцин	12	10	83,33
Ізоніазид	12	8	66,67
Піразинамід	12	10	83,33
Комбінація ПТЗ	24	4	17

Дані щодо запліднювальної здатності (табл. 3.2) узгоджувались із наведеними вище результатами мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії, які показали, що за умов сумісного введення ПТЗ відбувалось зниження продукції статевих клітин сім'яниками втричі порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 3.2).

3.2. Ембріо-фетальний розвиток потомства щурів-самців

Серед потенційних ризиків для здоров'я, пов'язаних із застосуванням хіміотерапевтичних засобів, особливу увагу слід приділити тому, що вони можуть негативно впливати на репродуктивну систему. Зокрема, для самців небезпечною є потенційна загроза зниження плодючості та вплив на сперматозоїди, який може мати віддалені негативні наслідки для потомства.

Важливий показник для тварин з багатоплідною вагітністю, який характеризує стан як материнського, так і батьківського організму - це плодючість (середня кількість живих плодів на одну самицю). На неї можуть впливати як екзогенні, так і ендогенні фактори, змінюючи гормональний статус організму та значно знижуючи цей показник. Оцінка плодючості і результатів вагітності забезпечує визначення ступеня пошкодження репродуктивної системи. Спостереження щодо потенційної плодючості та інших показників репродуктивної системи забезпечують найбільш багатосторонні та безпосередні уявлення стосовно репродуктивної здатності [336].

За наших умов експерименту ми спостерігали зниження плодючості інтактних самиць, запліднених самцями, які отримували етамбутол (протягом періоду сперматогенезу, включаючи період парування) у 2,4 рази порівняно з контролем, а також фатальне зниження даного показника у самиць, спарованих із самцями, які отримували комбінацію ПТЗ – у 5,2 рази порівняно з контролем (табл. 3.3) [337, 338]. Введення ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду самцям за даних умов суттєво не позначилось на плодючості запліднених ними самиць.

Для отримання даних з репродуктивної токсичності корисним є застосування тесту домінантних леталей, у якому самиць піддають евтаназії в середині третього триместру вагітності. У даному тесті визначають до- та післяімплантаційну загибель. Рівень ембріональної смертності у самиць,

запліднених самцями, які піддавались впливу ксенобіотиків є одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію.

Таблиця 3.3

Плодючість інтактних самиць щурів, спарованих з самцями, яким протягом періоду сперматогенезу нарізно або сумісно вводили протитуберкульозні засоби (абс., $M \pm m$)

Групи самців	Показник	
	Загальна кількість плодів	Кількість живих плодів на одну самицю
Контроль	217	$9,08 \pm 0,52\#$
Етамбутол	15	$3,75 \pm 0,47 *$
Рифампіцин	110	$11,00 \pm 0,57 \#$
Ізоніазид	111	$9,25 \pm 1,30 \#$
Піразинамід	112	$9,33 \pm 1,30 \#$
Комбінація ПТЗ	7	$1,75 \pm 1,43^*$

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;

- $p \leq 0,05$ у порівнянні з групою, що отримувала комбінацію ПТЗ.

Показники ембріональної смертності в різні періоди ембріонального та фетального розвитку потомства самців, яким протягом сперматогенезу вводили нарізно або сумісно протитуберкульозні засоби, наведені в таблиці 3.4. Результати спостереження засвідчують, що за умов нарізного введення рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду не відбувалося суттєвих порушень ембріогенезу та фетогенезу, які визначались за показниками смертності як в доімплантаційний період, так і в період після імплантації. Відсоток загальної смертності в цих групах знаходився або практично на рівні контролю або не виходив за межі фізіологічної норми для щурів [339].

Таблиця 3.3

Показники ембріо- та фетогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким протягом періоду сперматогенезу нарізно або сумісно вводили протитуберкульозні засоби

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

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

Проте, у самиць, яких парували з самцями, що отримували етамбутол, спостерігали значне підвищення рівня доїмплантаційної смертності, яка склала 53% [340,341]. Тваринами, яким вводили комбінацію ПТЗ, було запліднено лише 4 самиці, при цьому до- та післяімплантаційна смертність склали, відповідно, 65,3 % та 76,9 %.

Таким чином, незважаючи на те що за умов нарізного введення лише етамбутол виявив здатність негативно впливати на рівень опосередкованої через самців ембріональної смертності, при сумісному введенні усіх чотирьох туберкулоstaticів виявлено потенціювання віддалених негативних наслідків стосовно потомства [338, 342].

3.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників

Візуальний огляд сім'яників та епідидимісів щурів, підданих евтаназії після закінчення нарізного та сумісного введення ПТЗ, не виявив будь-яких відхилень від норми: органи були звичайного розміру та кровонаповнення, без ознак набряку. Морфометричні дані стану гонад представлені у таблиці 3.5, згідно яких маса та об'єм сім'яників, маса епідидимісів у щурів дослідної групи порівняно з відповідними показниками у тварин контрольної групи практично не відрізнялися.

Майже незалежно від типу клітин, які можуть бути мішенями несприятливого впливу хіміотерапевтичних засобів в межах чоловічої репродуктивної системи, найбільш поширеним морфологічним наслідком є порушення в сперматогенному епітелії сім'яників. Так відбувається тому, що процес сперматогенезу є залежним (та високочутливим) від функціональних порушень у більшості інших частин репродуктивного тракту. З одного боку порушення сперматогенезу можуть відображати прямий вплив на сперматогенний епітелій, зокрема клітини Сертолі, Лейдіга або будь-яку з популяцій статевих клітин, а з іншого боку вони можуть бути вторинною реакцією на зміну рівня гормонів, судинні порушення або зміни балансу рідини,

як в сім'яниках, так і в епідидимісах [343]. Тому виявлення порушень в сперматогенному епітелії є надзвичайно важливим.

Варто відзначити, що введення (нарізне та сумісне) всіх чотирьох ПТЗ викликало деструктивні зміни в сперматогенному епітелії [344, 345, 346, 347, 362, 360]. Згідно даних, наведених у таблиці 3.6, видно, що сперматогенний індекс

Таблиця 3.5

**Морфометричні показники стану гонад самців щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів
($M \pm m$, $n \geq 6$)**

Групи	Показники				
	Маса сім'яників, г	Відносна маса сім'яників, г/100 г маси тіла	Об'єм сім'яника, мм ³	Маса епідидиміса (правий), г	Відносна маса епідидиміса (правий), г/100 г маси тіла
Контроль	2,98 ±0,09	0,89±0,03	1137±72	0,51±0,02	0,152±0,007
Етамбутол	2,93±0,10	0,92±0,06	1167±85	0,43±0,02	0,138±0,008
Рифампіцин	3,11±0,14	0,85±0,04	1192±46	0,53±0,02	0,145±0,005
Ізоніазид	3,09±0,09	0,92±0,02	1127±74	0,53±0,02	0,156±0,005
Піразинамід	2,85±0,14	0,87±0,04	1145±65	0,49±0,03	0,143±0,007
Комбінація ПТЗ	2,86±0,07	0,89±0,05	1040±50	0,45±0,02	0,138±0,007

який віддзеркалює збереження різних типів клітин сперматогенного епітелію, у всіх групах щурів, що отримували нарізно та сумісно ПТЗ, був статистично значимо нижчим, ніж у контролі.

Негативного впливу зазнали сперматогонії – нарізне та сумісне введення ПТЗ призвело до суттєвого зниження мітотичної активності, а отже зменшення їх кількості в поперечних зрізах каналців сім'яників [348, 349].

Очевидно, що зниження мейотичної активності сперматоцитів I порядку узгоджується з отриманими даними щодо зниження продукції сперматозоїдів у піддослідних самців. Крім того, кількість клітин на XII стадії сперматогенного циклу (характеризує процеси мейотичного поділу сперматоцитів I порядку) у сім'яниках щурів, яким вводили етамбутол та комбінацію ПТЗ, знижувалась порівняно з контрольною групою. За умов введення рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду цей показник достовірно не змінювався, проте він продемонстрував тенденцію до зниження.

Таблиця 3.6

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію у щурів за умов нарізного та сумісного 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, %	Злущений епітелій, %
Контроль	$3,615 \pm 0,011$	$69,393 \pm 0,742$	$3,563 \pm 0,365$	$0,313 \pm 0,120$
Етамбутол	$3,484 \pm 0,008^*$	$57,840 \pm 0,465^*$	$2,000 \pm 0,316^*$	$1,000 \pm 0,316$
Рифампіцин	$3,530 \pm 0,012^*$	$59,540 \pm 0,901^*$	$2,200 \pm 0,510$	$0,600 \pm 0,400$
Ізоніазид	$3,494 \pm 0,007^*$	$62,110 \pm 0,936^*$	$2,200 \pm 0,663$	$0,800 \pm 0,374$
Піразинамід	$3,552 \pm 0,007^*$	$61,060 \pm 1,016^*$	$2,400 \pm 0,245$	$1,000 \pm 0,316$
Комбінація ПТЗ	$3,535 \pm 0,014^*$	$59,573 \pm 0,861^*$	$2,412 \pm 0,508$	$1,882 \pm 0,363^*$

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

У сім'яниках щурів, яким сумісно вводили усі чотири ПТЗ, було також зафіксовано зростання відсотку канальців зі злущеним епітелієм (табл. 3.6).

При мікроскопічному дослідженні сім'яників контрольних тварин морфологічних змін не виявлено. Не зустрічалось циркуляторних порушень та запальної реакції. Між сім'яними канальцями в пухкій сполучній тканині не відмічалось збільшення клітинних елементів та сполучнотканинних волокон. На поперечних зрізах сім'яні канальці були округлої чи еліпсоїдної форми, заповнені гермінативним епітелієм на різних стадіях дозрівання (рис. 3.3).

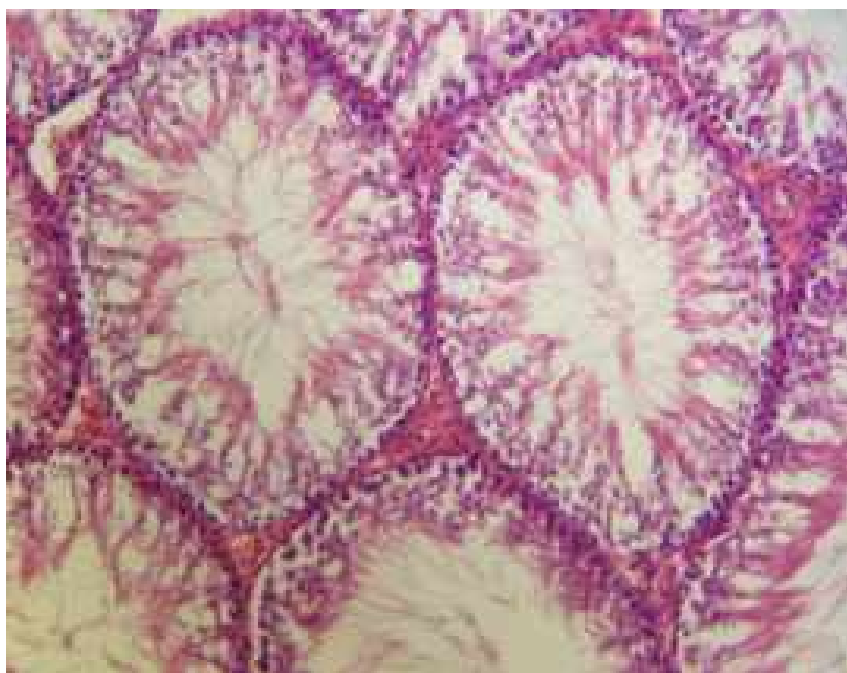


Рис. 3.3. Структура сім'яних канальців не змінена. Контрольна тварина. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 200

При постановці гістохімічної реакції на нуклеїнові кислоти (ДНК, РНК) в сперматогенному епітелії контрольних тварин відмічалась нерівномірність у розміщенні продукту реакції. Так, ядра сперматогоній і сперматоцитів I порядку мали значний вміст зерен ДНК, які фарбувались в темно-фіолетовий колір, тоді як в інших статевих клітинах виявлялись дрібні зерна хроматину і фарбувалися такі ядра в світло-фіолетовий колір. Цитоплазма сперматогоній та сперматоцитів I і II порядку мала значну кількість продукту гістохімічної

реакції на РНК, яка інтенсивно фарбувалася в насичений блакитний колір. Таке нерівномірне розташування реакцій нуклеїнових кислот статевих клітин, вірогідно, пов'язано з деякими особливостями метаболічних процесів, які протікали в гермінативному епітелії сім'яних каналців.

При постановці ензимогістохімічної реакції на СДГ, одного з ключових ферментів циклу Кребса, а також ЛДГ – ензиму анаеробного гліколізу - активність ферментів в сім'яних каналцях контрольних тварин певною мірою відрізнялась як в окремих каналцях, так і в різних статевих клітинах. Так, продукт гістохімічної реакції на СДГ у вигляді темно-синіх гранул виявлявся в багатьох клітинах сперматогенного епітелію, що вказувало на високу його активність і, меншою мірою це стосувалось ЛДГ. Необхідно відмітити, що у статевих клітинах, які розміщувалися на базальній мембрані, активність ферментів була вищою в порівнянні з більш зрілими статевими клітинами. В частині каналців активність ферментів була помірною, що свідчить про різний функціональний стан сперматогенного епітелію в окремих сім'яних каналцях (рис. 3.4).

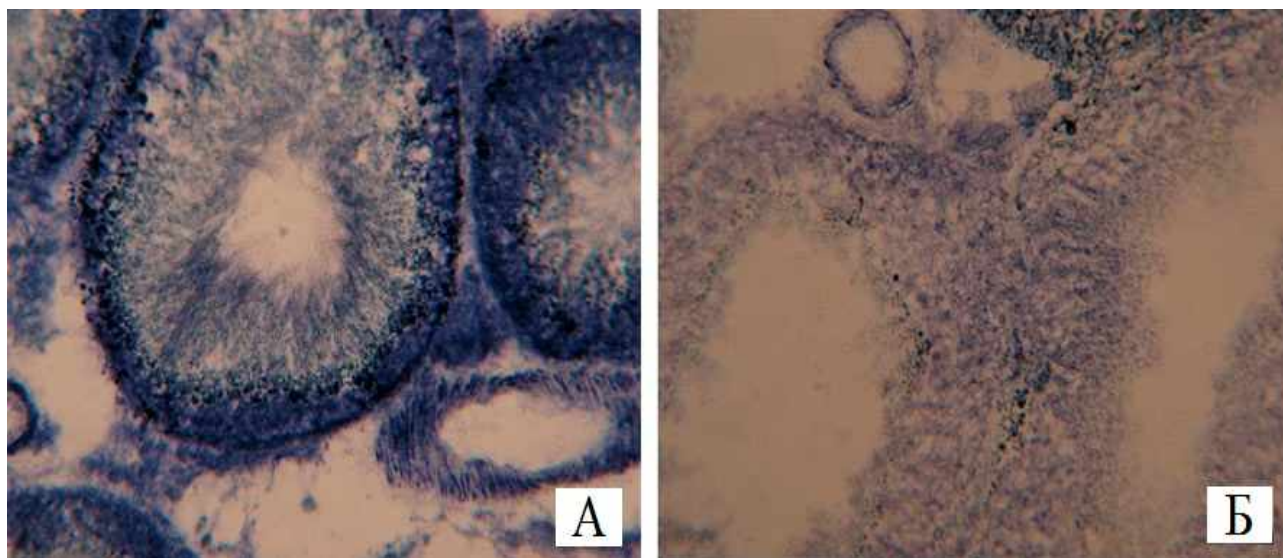


Рис. 3.4. Активність СДГ в сім'яних каналцях щурів: А - активність СДГ не змінена (контроль); Б - послаблення активності СДГ (сумісне введення протитуберкульозних засобів). Метод Nachlas та співавт., збільшення $\times 400$.

При постановці ензимогістохімічної реакції на СДГ в сім'яниках тварин, які отримували нарізно етамбутол та ізоніазид або сумісно усі чотири досліджуваних ПТЗ, активність її відрізнялась від такої у контролі (рис. 3.4). Частіше зустрічалися сім'яні канальці з послабленою або негативною реакцією на фермент. Брилки диформагану були поліморфними, зменшувалась їх кількість, а цитоплазма окремих сперматогоній і сперматоцитів I порядку фарбувалась дифузно в світло-блакитний колір, що свідчить про послаблення окислювально-відновлюваної активності в окремих сім'яних канальцях.

В гонадах щурів, підданих евтаназії через 24 год після останнього введення ПТЗ, як нарізного, так і сумісного, поруч з патологічно не зміненими сім'яними канальцями виявлялися дистрофічні прояви в окремих канальцях [³⁵⁰, ³⁵¹, ³⁵², ³⁵³]. Вони характеризувалися десквамацією сперматогенного епітелію, іноді виявлялись спустошені сім'яні канальці (рис. 3.5).

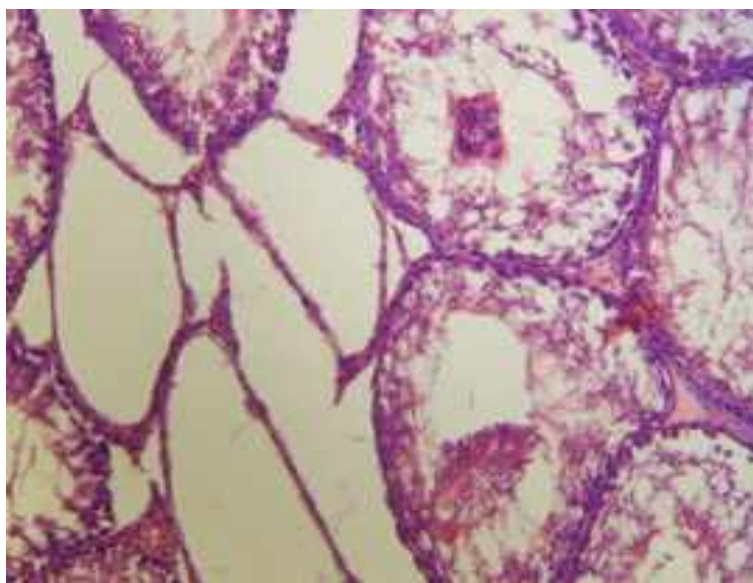


Рис. 3.5. Осередковано розташовані спустошені і деформовані канальці та канальці з десквамованим епітелієм. Введення ізоніазиду. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 200.

Зустрічалися невеликі ділянки з відсутністю статевих клітин, так звані вакуолі або „вікна”, а також сперматозоїди в стані деструкції. Також у сім'яниках піддослідних тварин нерідко спостерігали пусті та деформовані

канальці, а також канальці з дисконкомплексованим сперматогенним епітелієм та поодинокі заповнені загиблими сім'яродними клітинами (рис. 3.6).

Крім цього, у 2-х тварин із 6-и після сумісного введення ПТЗ в поодинокі звивисті канальці в зоні сперматоцитів I порядку зрідка виявлялися гігантські і багатоядерні клітини, що є свідченням дегенеративних змін (рис. 3.7).

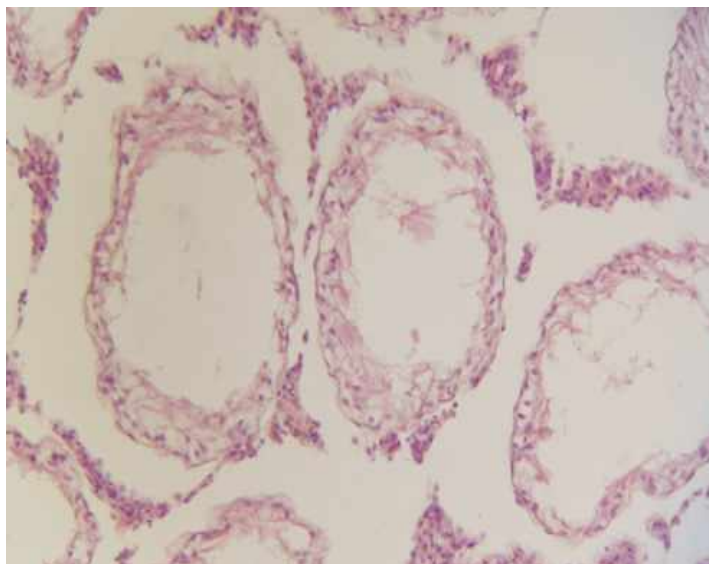


Рис. 3.6. Спущення гермінативного епітелію та ушкодження оболонки сім'яних канальців. Сумісне введення протитуберкульозних засобів. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 200.



Рис. 3.7. Гігантська багатоядерна клітина в зоні сперматоцитів I порядку. Сумісне введення протитуберкульозних засобів. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

Також у щурів, яким протягом періоду сперматогенезу вводили нарідно етамбутол та ізоніазид або сумісно усі чотири ПТЗ, спостерігались окремі канальці з деструктивно зміненими сперматозоїдами, що проявлялося їх адгезією і фрагментацією (рис. 3.8).

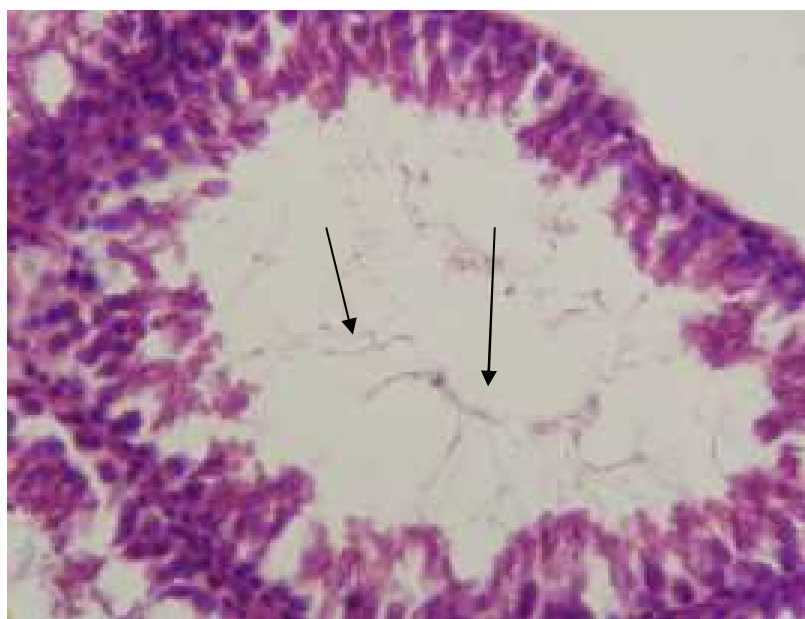


Рис. 3.8. Фрагментація сперматозоїдів в сім'яному канальці. Введення ізоніазиду. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

За умов уведення ізоніазиду в значній кількості були виявлені дегенеративні зміни в сім'яниках такі, як злушення епітелію в просвіт канальців (рис. 3.9) і наявність ділянок, позбавлених гермінативних клітин - "вікон" або вакуолей (рис. 3.10).

Як свідчать результати статистичної обробки кількісних даних, наведені в табл. 3.6, ступінь вакуолізації в сім'яних канальцях не сягала рівня статистичної значущості через високі міжіндивідуальні відмінності.

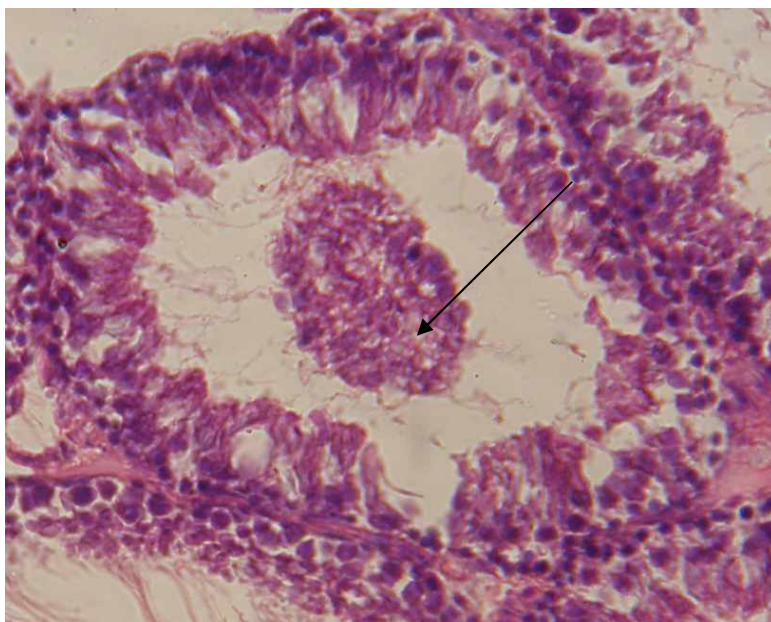


Рис. 3.9. Злушення сперматогенного епітелію в просвіт сім'яного канальця. Введення ізоніазиду. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

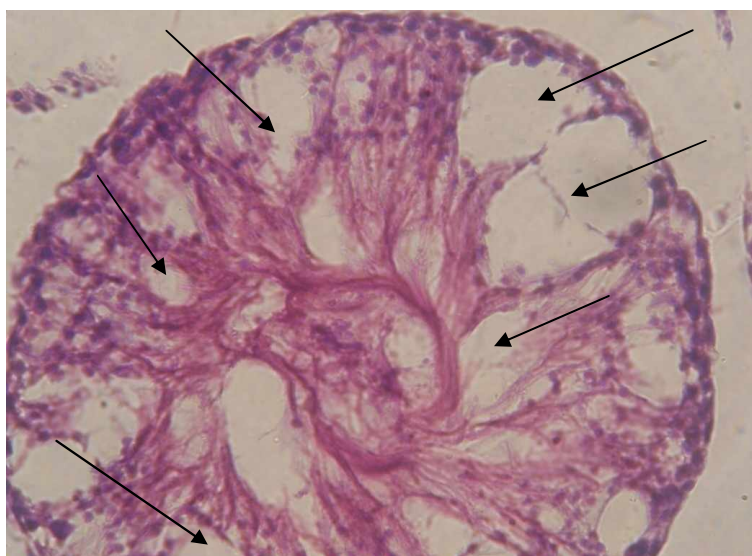


Рис. 3.10. Канальці з втратою сперматогенного епітелію - "вікна". Введення ізоніазиду. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

Крім того, як і за введення усіх чотирьох ПТЗ в зоні сперматоцитів I порядку були наявні гігантські багатоядерні клітини (рис 3.11).

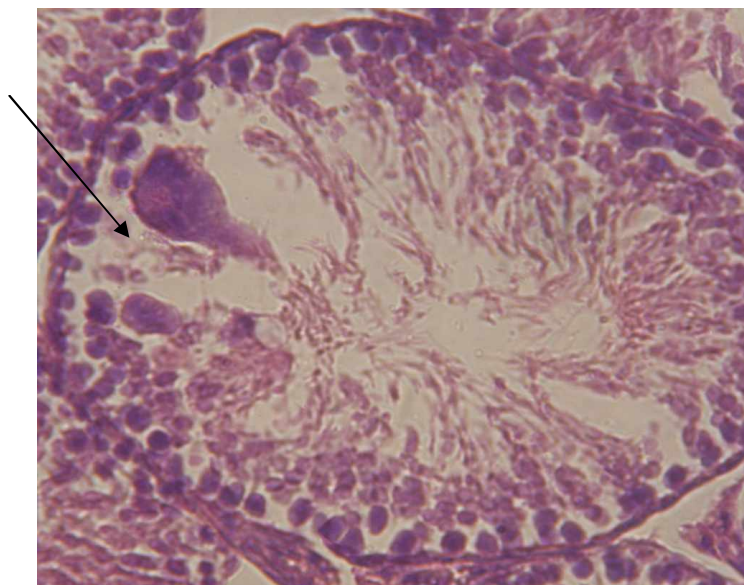


Рис. 3.11. Гігантська багатоядерна клітина в зоні сперматоцитів I порядку. Введення ізоніазиду. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

Дані, наведені на рис. 3.12 та 3.13, свідчать, що так само, як і за умов застосування ізоніазиду, при введенні етамбутолу були зафіксовані значні дегенеративні зміни в сім'яниках щурів (злушення клітин сперматогенного епітелію в просвіт канальця, «вікна»).

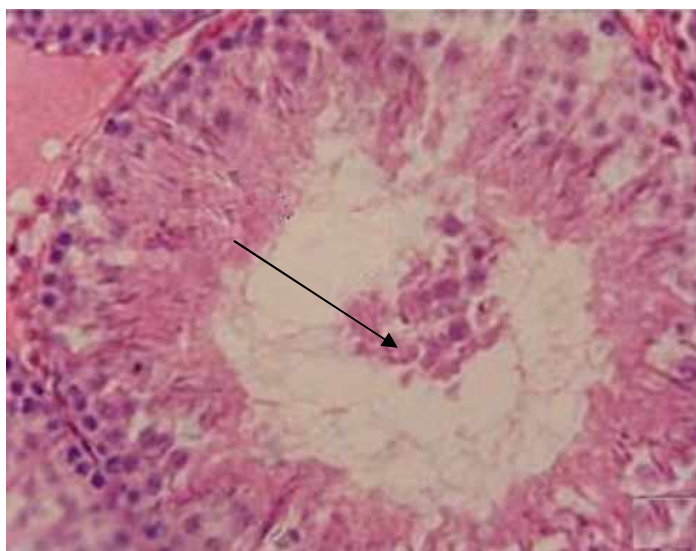


Рис. 3.12. Злушення сперматогенного епітелію в просвіт сім'яного канальця. Введення етамбутолу. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

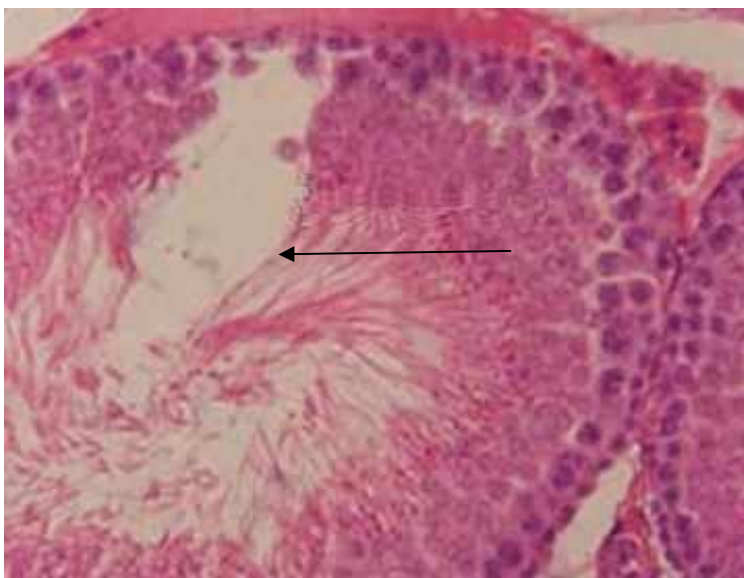


Рис. 3.13. Канальці з втратою сперматогенного епітелію - "вікна". Введення етамбутолу. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

І в цьому випадку також спостерігались досить сильні міжіндивідуальні відмінності, які не дозволили за кількісним показником сягнути порогу статистичної значущості. Варто відзначити, що у сім'яниках щурів, яким тривало вводили етамбутол спостерігалось також потоншення сперматогенного епітелію (рис. 3.14),

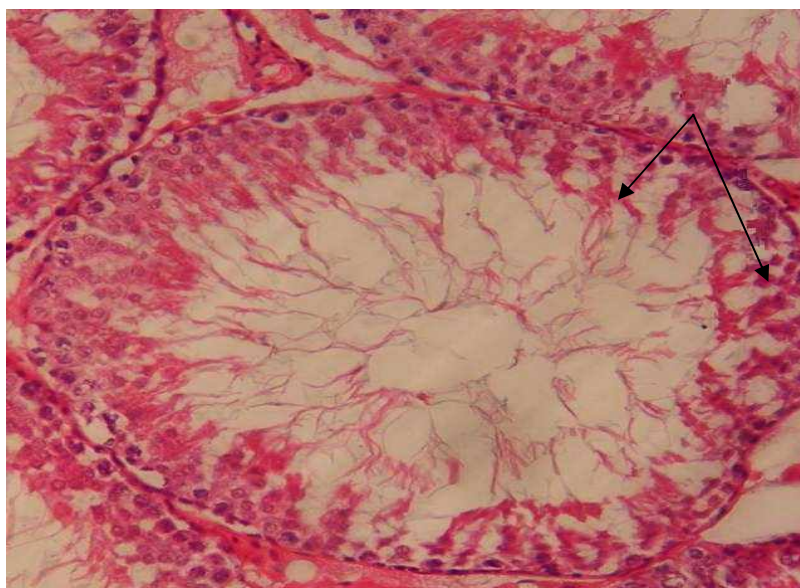


Рис. 3.14. Потоншення сперматогенного епітелію та "вікна". Введення етамбутолу. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

його осередковане відшарування від базальної мембрани каналців (рис. 3.15) та міжканальцеві набряки (рис. 3.16).

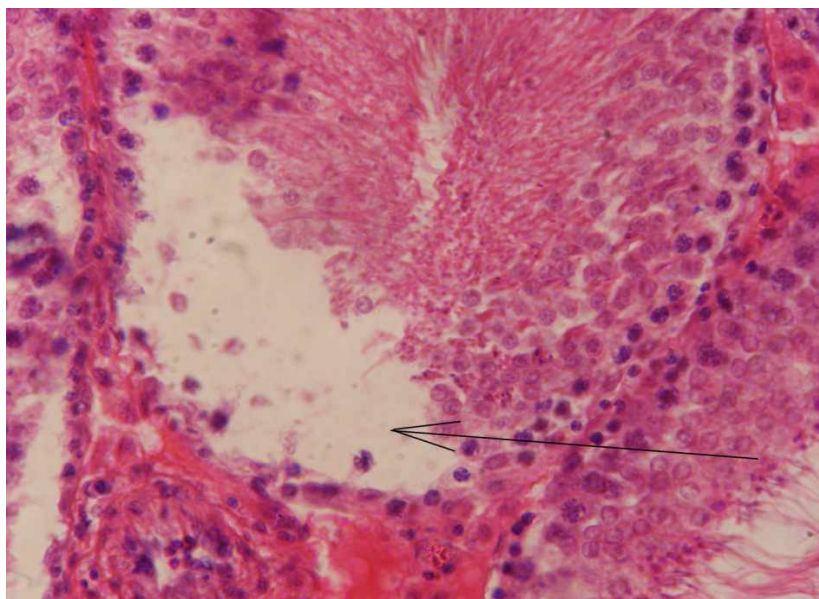


Рис. 3.15. Відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани. Введення етамбутолу. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.



Рис. 3.16. Міжканальцеві набряки. Введення етамбутолу. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 200.

У сім'яниках деяких щурів, які отримували нарізно піразинамід також

спостерігались певні дегенеративні процеси. В основному вони проявлялись відшаруванням епітеліального пласта клітин від базальної мембрани каналців та злуцнення окремих клітин епітелію у просвіт сім'яних каналців (рис. 3.17 та 3.18).



Рис. 3.17. Відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани каналця. Введення піразинамідю. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

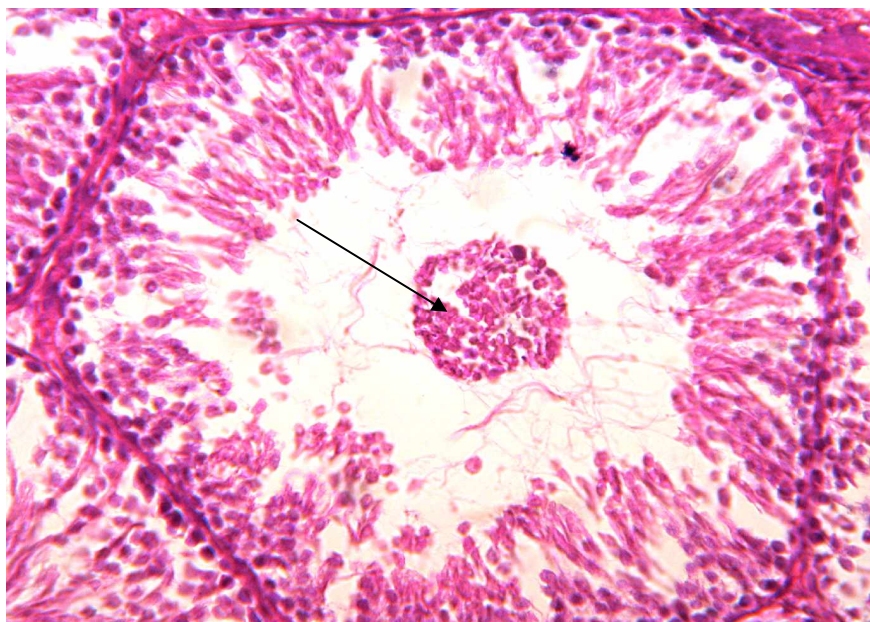


Рис. 3.18. Злуцнення клітин сперматогенного епітелію у просвіт каналця. Введення піразинамідю. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 400.

Однак, такі зміни виявлялись в значно меншій кількості випадків, ніж за умов нарізного введення ізоніазиду або етамбутолу.

На підставі даних літератури [354] і отриманих нами даних [477] можна зробити висновок про тяжку ступінь пошкодження стадій сперматогенезу у щурів при застосуванні етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинамиду, особливо при їх сумісному введенні.

Результати морфологічних досліджень свідчать, що дистрофічні та деструктивні зміни у статевих залозах щурів-самців за сумісного введення протитуберкульозних препаратів, очевидно, найбільшою мірою були обумовлені етамбутолом та ізоніазидом.

3.4. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз впливу нарізного та сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинамиду на морфо-функціональний стан гонад щурів-самців, їх фертильність та ембріо-фетальний розвиток потомства.

Аналіз результатів досліджень, описаних у цьому розділі дозволяє зробити наступні висновки:

1. Введення щурам-самцям етамбутолу, ізоніазиду та комбінації ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід) в терапевтичних дозах протягом усього періоду сперматогенезу супроводжується зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові в 1,6-2,8 рази ($p \leq 0,05$).

2. Сумісне застосування ПТЗ порівняно з нарізним їх введенням викликає більш виражене порушення нормоспермії у щурів-самців (зниження продукції сперматозоїдів - втричі, зменшення їх життєздатності - на 74 % ($p \leq 0,05$), зниження часу рухливості – на 80 % ($p \leq 0,05$), що веде до згубного

зниження фертильності щурів-самців (індекс запліднювальної здатності знижується до 17 %).

3. Сумісне застосування ПТЗ порівняно з нарізним їх введенням викликає більш важкі морфологічні порушення у сперматогенному епітелії, які виявляються зниженням сперматогенного індексу та числа сперматогоній, підвищенням відсотку випадків злушення сперматогенного епітелію в посвіт каналця, спустошенням і деформацією сім'яних каналців, появою багатоядерних синтиціїв в зоні сперматоцитів I порядку.

4. Результати морфологічних досліджень свідчать, що дистрофічні та деструктивні зміни у статевих залозах щурів-самців за сумісного введення ПТЗ, очевидно, найбільшою мірою обумовлені етамбутолом та ізоніазидом.

5. За умов сумісного введення ПТЗ щурам самцям спостерігається зменшення плодючості, запліднених ними самиць на 81 % ($p \leq 0,05$) та значне зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності ембріонів на 55 % ($p \leq 0,05$) та 73 % ($p \leq 0,05$) відповідно. Ключова роль в реалізації негативних ефектів на потомство належить етамбутолу.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СІМ'ЯНИКІВ ЗА УМОВ НАРІЗНОГО І СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ, РИФАМПІЦИНУ, ПІРАЗИНАМІДУ, ЕТАМБУТОЛУ ЩУРАМ

Чоловіче безпліддя є багатофакторною патологією, основні причини якої часто залишаються невідомими. Враховуючи, що сперматогенез - це складний процес проліферації та диференціації чоловічих статевих клітин, що включає мітоз, мейоз, сперміогенез та дозрівання сперматозоїдів у придатках сім'яників, то вплив досліджуваних хіміотерапевтичних засобів на будь яку з цих ланок може призводити до зниження репродуктивного потенціалу. З огляду на отримані нами експериментальні дані стосовно негативної дії ПТЗ І ряду на чоловічу репродуктивну функцію, з'ясування механізмів залучених до розвитку виявлених порушень необхідні для своєчасної діагностики і адекватного використання коригуючих засобів.

4.1. Дослідження індукції CYP2E1 в у сім'яниках

Відомо, що більшість лікарських засобів є субстратами цитохрому Р-450, і це – важливий момент для розуміння механізму взаємодії ліків. Терапевтичні засоби можуть індукувати або інгібувати метаболізм інших препаратів, а також конкурувати за метаболізм з субстратами відповідних ізоформ. Найчастіше зустрічаються: індукція ферментів цитохрому Р-450 одним лікарським засобом з наступним впливом на метаболізм іншого, що застосовується одночасно або пізніше; інгібування метаболізму лікарського засобу, яке може бути пов'язане з конкуренцією з іншим препаратом за одну й ту ж ізоформу цитохрому Р-450 [355]. Найкраще дослідженим є індуктивний та інгібіторний вплив ксенобіотиків на різні ізоформи цитохрому Р-450 у печінці, але останнім часом

достатньо уваги приділяється і екстрапечінковому метаболізму речовин, зокрема у репродуктивних тканинах.

Механізм пошкодження печінки, індукований сумісним введенням ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду був раніше частково охарактеризований. Показано, що до розвитку побічної дії на печінку залучені токсичні інтермедіати (ацетилгідразин та гідразин) та АФК, які утворюються за біотрансформації ізоніазиду. Поміж іншого, гепатотоксичність, індуковану гідразином, відносять на рахунок окислювального стресу, опосередкованого CYP2E1 [356]. Більше того вважають, що рифампіцин, як сильнодіючий індуктор CYP2E1, може посилювати гепатотоксичність ізоніазиду, збільшуючи продукцію токсичного метаболіту – гідразину та викликаючи синергічний ефект стосовно ушкодження печінки [357].

Враховуючи зазначене вище та те, що присутність CYP2E1 було показано у сім'явиносних каналцях сім'яників, клітинах Лейдіга та в епідидимісі щурів [126, 128, 129], нами було досліджено можливість модуляції експресії та активності даної ізоформи у сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду [340, 341, 358, 359, 360, 361, 362, 350, 352, 352, 353].

Після нарізного введення рифампіцину та піразинаміду не було виявлено значного зростання експресії гену CYP2E1 у гонадах піддослідних тварин (рис. 4.1).

Одночасно спостерігалось значне підвищення експресії мРНК CYP2E1 після введення ізоніазиду (у 28 разів), етамбутолу (у 8,5 разів) та комбінації всіх чотирьох ПТЗ (у 19 разів). Відсутність адитивного ефекту стосовно рівня експресії CYP2E1 за сумісного введення ПТЗ можливо пояснюється конкурентною взаємодією застосованих препаратів [363].

Таким чином, з високою долею впевненості можна стверджувати, що ПТЗ І ряду справляли модулюючий вплив на експресію гену CYP2E1 у сім'яниках щурів [364].

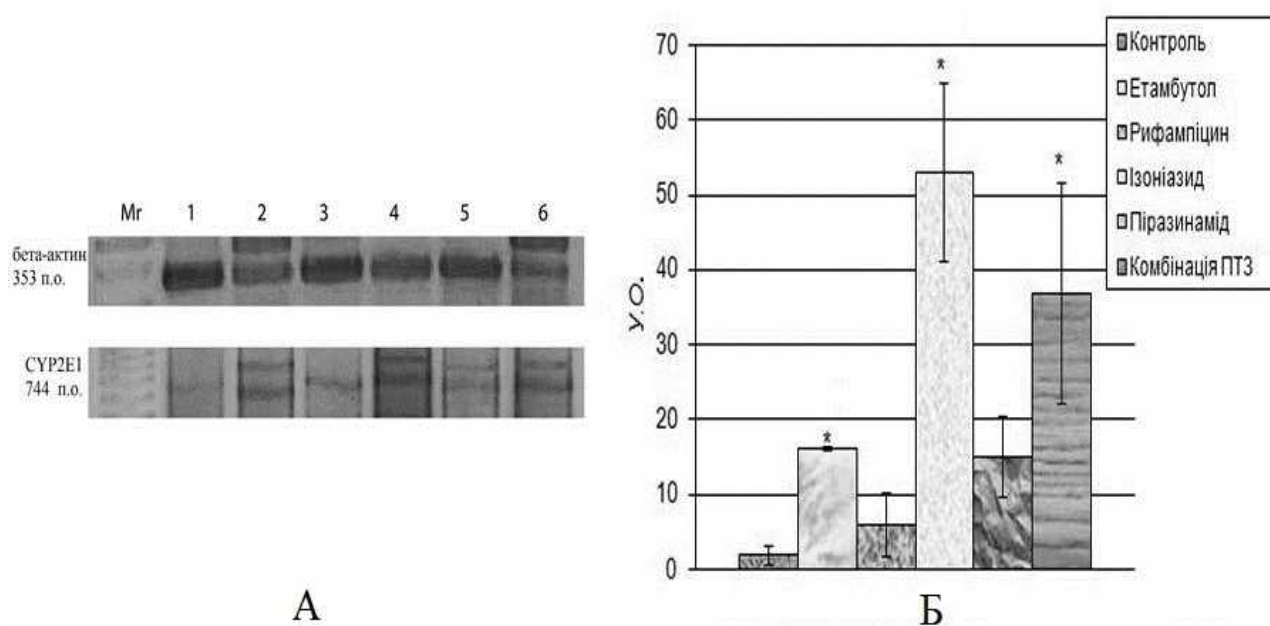


Рис. 4.1. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (Mr – ДНК маркер, 1- контроль; 2 – етамбутол; 3 - рифампіцин; 4 – ізоніазид; 5 – піразинамід; 6 – ПТЗ); Б) відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 - інтенсивність піку β -актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Оцінку експресії білка CYP2E1 в сім'яниках щурів, яким нарізно та сумісно вводили ПТЗ, було проведено з використанням імуногістохімічного аналізу [351, 352, 353]. Тестикулярна імуноекспресія CYP2E1 в сім'яниках візуалізувалась за допомогою реакції з 3,3'-діамінобензидинтетрагідрохлоридом та підтверджувалась наявністю коричневого забарвлення різної інтенсивності на зрізах сім'яників. Реакцію на CYP2E1 визначали як позитивну, фокальну/слабко позитивну або негативну.

Дані, наведені на рис. 4.2, свідчать про значну експресію протеїну

CYP2E1 в сім'яниках щурів, яким вводили етамбутол, ізоніазид та комбінацію ПТЗ. Вона була значно вищою, ніж за умов введення піразинамід, рифампіцину та в контролі.

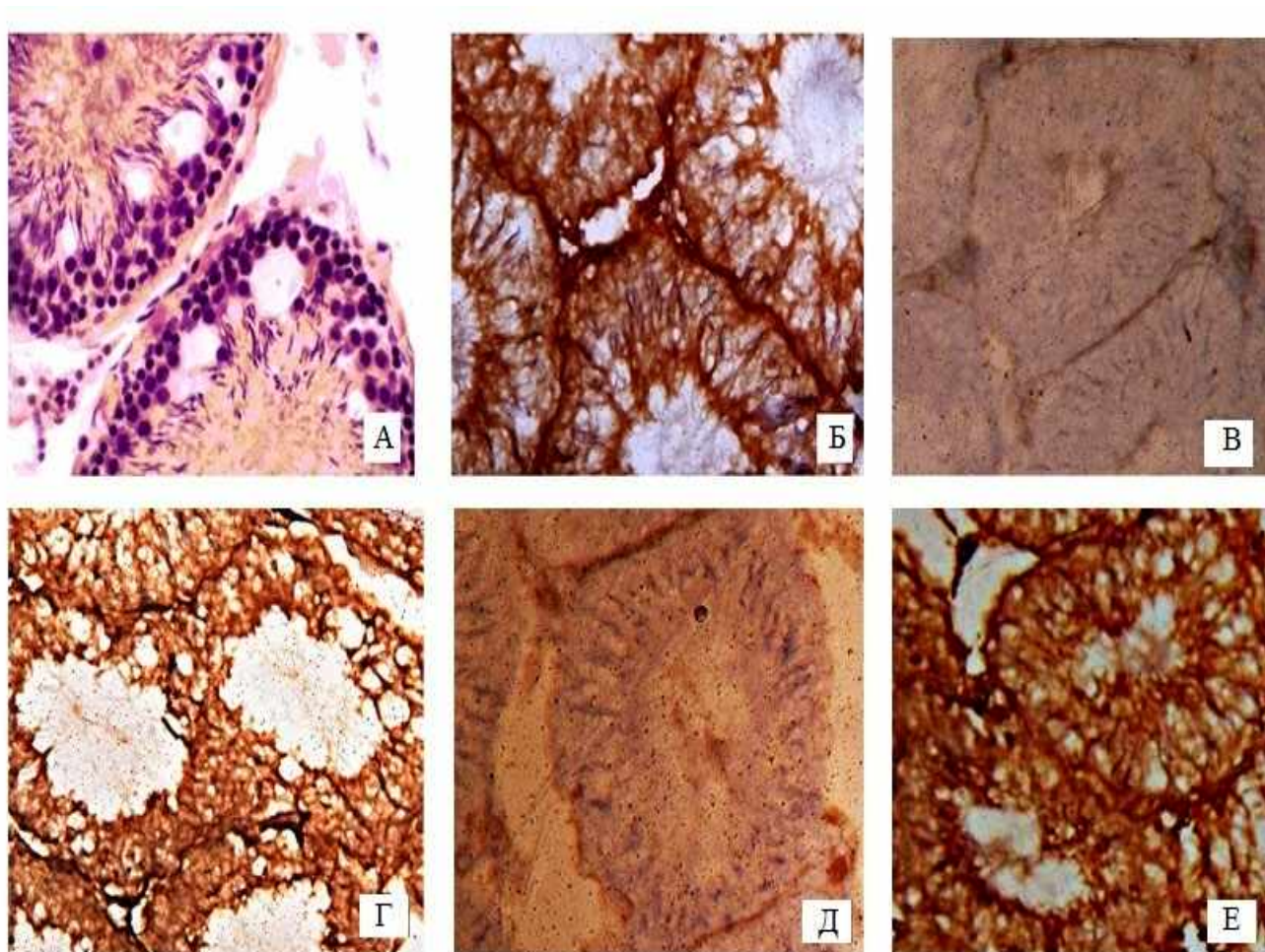


Рис. 4.2. Імуногістохімічний аналіз експресії протеїну CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів: А – негативна реакція в сім'янику щура контрольної групи; Б, Г, та Е – сильно позитивна реакція в сім'яниках щурів, яким відповідно вводили етамбутол, ізоніазид та комбінацію ПТЗ; В та Д – слабо позитивна реакція в сім'яниках щурів, яким відповідно вводили рифампіцин та піразинамід. Збільшення x 200.

Результати дослідження активності маркерного ферменту CYP2E1

– *n*-нітрофенолгідроксилази в мікросомальній фракції сім'яників наведені на рис. 4.3. Вони цілком узгоджуються з отриманими нами даними стосовно тестикулярної експресії гену та білка даної ізоформи.

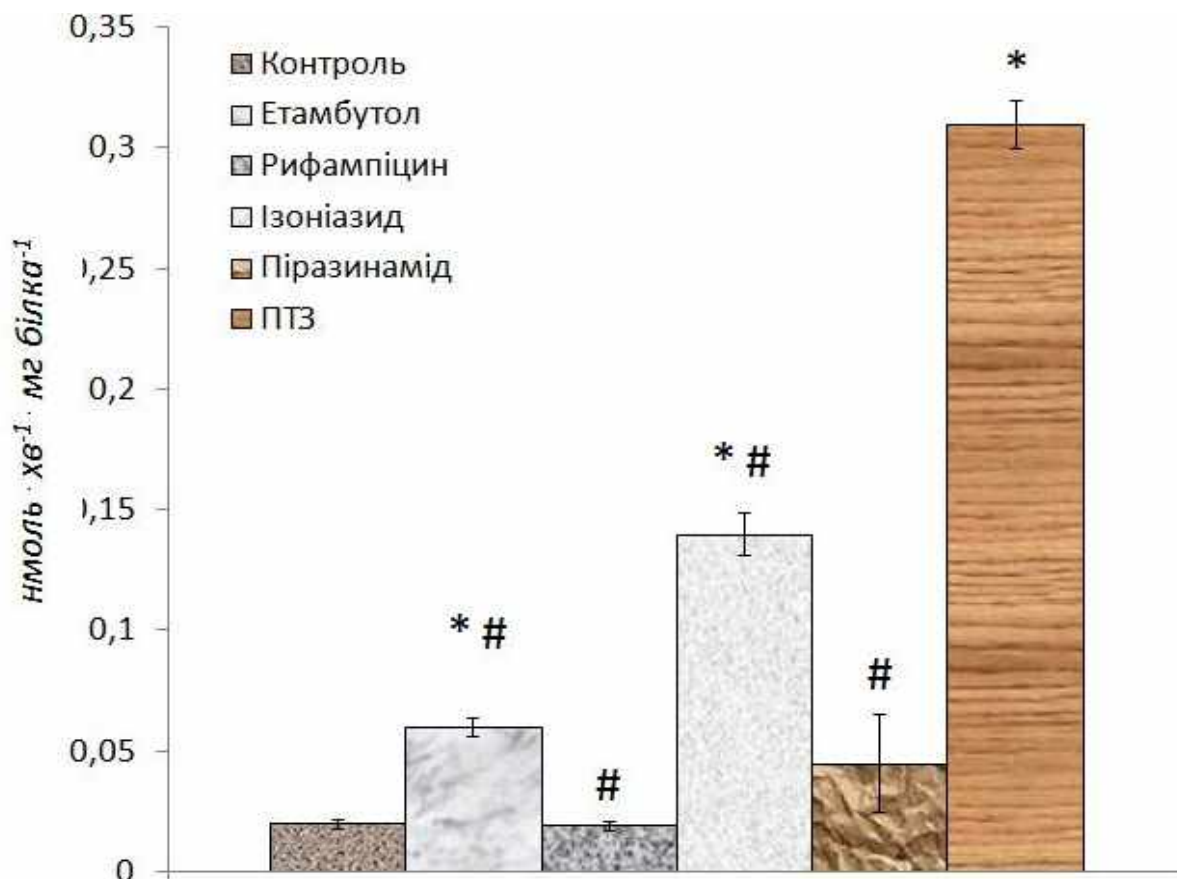


Рис. 4.3. Активність *n*-нітрофенолгідроксилази в мікросомах сім'яників щурів за умов нарізного та сумісного введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили комбінацію ПТЗ.

Рифампіцин та піразинамід в застосованих дозах практично не впливали на даний показник. При цьому за умов введення етамбутолу та ізоніазиду *n*-нітрофенолгідроксилазна активність зростала відповідно в 3 та 7 раз порівняно з контролем. Найбільшу ж ензиматичну активність CYP2E1 в

виявлено в сім'яниках групи тварин, яким вводили одночасно всі чотири ПТЗ. Вона майже в 16 раз перевищувала контрольний рівень.

Щодо ізоніазиду, то отримані нами дані не суперечать результатам інших дослідників, які показали активацію трансляції гену CYP2E1 з відповідним збільшенням мРНК цитохрому Р-450 2E1 у гепатоцитах під впливом даного препарату, а саме гідразидної групи у складі його молекули [47].

Стосовно ж властивостей етамбутолу виступати індуктором CYP2E1, дане питання є не дослідженим і враховуючи це нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії етамбутолу з CYP2E1. У роботі було використано створену та оптимізовану раніше комп'ютерну модель просторової структури CYP2E1 людини. Як описано у розділі 2, для моделювання взаємодії етамбутолу з CYP2E1 було проведено докінг ліганду в активний центр ферменту. Просторову структуру етамбутолу 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). В ході докінгу було відібрано найбільш енергетично-вигідні комплекси CYP2E1-ліганд (табл. 4.1, рис. 4.4).

Розташування ліганду в активному центрі наводить на думку, що він може бути інгібітором CYP2E1.

Таблиця 4.1

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

печінці та її первинна алкогольна група окислюється із залученням тих самих ензимів, що і етилового спирту [65]. Подальше окислення альдегідів до карбоксилової кислоти часто відбувається не тільки за допомогою альдегіддегідрогенази, а в деяких випадках, і монооксигеназної системи [123]. Можна припустити, що виявлена нами здатність етамбутолу індукувати CYP2E1 реалізується за механізмом, подібним для етилового спирту, а саме – пост-транскрипційної стабілізації молекули зазначеного ізоензиму [123].

На нашу думку залежний від CYP2E1 метаболізм ПТЗ в чоловічих репродуктивних органах, як і у печінці, може супроводжуватись утворенням токсичних інтермедіатів, здатних взаємодіяти з життєво важливими структурами клітин, та гіперпродукцією АФК з наступним розвитком оксидативного стресу та субфертильності. Подібний каскад може призводити до оксидативного ураження клітин Лейдіга, яке в свою чергу, викликати зниження секреції тестостерону, спричиняючи порушення функції клітин Сертолі та негативно позначаючись на протіканні сперматогенезу. Наприклад, відомо, що CYP2E1 є ефективним генератором перекису водню [367]. H_2O_2 діє безпосередньо на клітини Лейдіга щурів, знижуючи синтез тестостерону шляхом пригнічення ферменту розщеплення бічного ланцюга цитохрому Р-450 (P450_{scs}) та експресії стероїдогенного гострого регуляторного білку (StAR), який переносить холестерин у мітохондрії в клітинах, де синтезуються стероїдні гормони [368, 369].

Результати попарного кореляційного аналізу показали наявність сильної негативної кореляції між кількістю сперматозоїдів та рівнем експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів, які отримували усі чотири ПТЗ ($r = -0,87$; $p=0,001$) або етамбутол ($r = -0,92$; $p=0,001$) та ізоніазид ($r = -0,98$; $p=0,001$).

Проведений кореляційний аналіз [370, 371] дозволяє припустити, що в основі тестикулярної токсичності, як досліджуваних нами ПТЗ, так і інших ксенобіотиків, які метаболізують в системі цитохрому Р-450, можуть лежати процеси, пов'язані зі змінами експресії генів певних ізоформ безпосередньо в сім'яниках. Незважаючи на те, що дія подібних речовин може бути

спрямованою на різні структури чоловічих репродуктивних органів, остаточна відповідь, як правило, є неспецифічною, оскільки ушкодження одного з типів клітин тягне за собою каскад подій, які призводять до структурних змін та дисфункції інших частин системи.

4.2. Біохімічні показники стану сім'яників

Слід зазначити, що в сім'яниках генерація АФК може бути корисною або навіть необхідною в комплексному процесі проліферації та дозрівання чоловічих статевих клітин шляхом мейозу з диплоїдних сперматогоніїв до зрілих гаплоїдних сперматозоїдів. Навпаки, високі дози та / або недостатнє видалення АФК, що спричинене низкою механізмів може бути дуже небезпечним, модифікуючи чутливі молекули сім'яників, у тому числі ДНК, ліпіди та білки [372]. Незважаючи на низьку напругу кисню, що характеризує тестикулярне мікросередовище, ця тканина залишається вразливою до окислювального стресу завдяки великій кількості високоненасичених жирних кислот, зокрема, (20:4) і (22:6), а також наявності систем, що потенційно можуть генерувати АФК: окисно-відновні ферменти, в тому числі ксантин, НАДФН-оксидази, цитохром Р-450 [373, 374, 375].

З метою вивчення впливу нарізного та сумісного введення ПТЗ на стан про- та антиоксидантної системи сім'яників щурів нами було оцінено параметри ПОЛ, активності СОД та деяких показників глутатіонової системи. Сумісне застосування ПТЗ призводило до активації процесів ПОЛ у сім'яниках, про що свідчить зростання рівня індукованого аскорбатом та НАДФН утворення продуктів реакції з ТБК відповідно у 1,2 та 1,9 рази порівняно з контролем [376].

Також зафіксовано зниження на 22% і 12% активності тестикулярної СОД та вмісту відновленого глутатіону відповідно (табл. 4.2 та 4.3).

В постмітохондріальній фракції сім'яників тварин даної групи на 18% підвищувалась активність глутатіонтрансферази - ферменту, який відповідає за

детоксифікацію електрофільних ксенобіотиків усіх класів, знешкодження деяких продуктів першої фази детоксикації, а також залучений до метаболізму ендогенних речовин, зокрема біосинтезу тестостерону [377].

Зміни в окисно-відновному циклі глутатіону можуть відігравати негативну роль у ході реалізації токсичних ефектів комбінації ПТЗ

Таблиця 4.2

Деякі показники стану про- та антиоксидантної системи сім'яників щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Експериментальні групи	Показники		
	швидкість аскорбатзалежного утворення ТБК-реактантів, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$	швидкість НАДФН-залежного утворення ТБК-реактантів, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$	активність СОД, $\text{У.О.} \cdot \text{мг тканини}^{-1}$
Контроль	$0,259 \pm 0,002$	$0,120 \pm 0,018$	$120,65 \pm 5,30$
Етамбутол	$0,345 \pm 0,010^*$	$0,286 \pm 0,009^*$	$179,76 \pm 18,64^* \#$
Рифампіцин	$0,322 \pm 0,024^*$	$0,150 \pm 0,025$	$123,86 \pm 5,62 \#$
Ізоніазид	$0,347 \pm 0,014^*$	$0,260 \pm 0,011^*$	$81,78 \pm 8,05^*$
Піразинамід	$0,344 \pm 0,003^*$	$0,147 \pm 0,019$	$131,99 \pm 8,43 \#$
Комбінація ПТЗ	$0,302 \pm 0,031^*$	$0,223 \pm 0,016^*$	$93,35 \pm 5,30^*$

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;

- $p \leq 0,05$ у порівнянні з групою, що отримувала комбінацію ПТЗ.

і функціонуванні механізмів детоксикації у гонадах самців. У контексті захисту сім'яників від АФК, відновлений глутатіон відіграє ключову роль, і зниження його вмісту може мати вирішальне значення для збереження про- / антиоксидантної рівноваги в гонадах [378].

Таблиця 4.3

Деякі показники, що характеризують обмін тіолів у сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів (M $\pm$ m, n $\geq$ 6)

Експериментальні групи	Показники		
	вміст білкових SH-груп в гомогенаті сім'яників, мкмоль $\cdot$ г тканини ⁻¹	вміст глутатіону в гомогенаті сім'яників, мкмоль $\cdot$ г тканини ⁻¹	активність глутатіонтрансфери в пост-мітохондріальній фракції сім'яників, нмоль $\cdot$ хв ⁻¹ $\cdot$ мг білка ⁻¹
Контроль	4,37 $\pm$ 0,51	3,21 $\pm$ 0,05	1,615 $\pm$ 0,063
Етамбутол	6,18 $\pm$ 0,88	2,79 $\pm$ 0,11*	1,521 $\pm$ 0,063#
Рифампіцин	5,79 $\pm$ 0,41	3,10 $\pm$ 0,12	1,478 $\pm$ 0,044#
Ізоніазид	6,36 $\pm$ 0,83	2,76 $\pm$ 0,07*	2,136 $\pm$ 0,125*
Піразинамід	5,86 $\pm$ 0,48	3,12 $\pm$ 0,14	1,510 $\pm$ 0,072 #
Комбінація ПТЗ	6,12 $\pm$ 0,70	2,83 $\pm$ 0,11*	1,900 $\pm$ 0,070*

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;

- $p \leq 0,05$ у порівнянні з групою, що отримувала комбінацію ПТЗ.

Глутатіон має плейотропні властивості, відіграючи роль донора

електронів для деяких антиоксидантних ферментів та утворюючи кон'югати з рядом шкідливих ендогенних речовин та ксенобіотиків за допомогою глутатіон-S-трансферази. Підтримка рівня відновленої форми глутатіону відбувається двома шляхами. Одним з них є синтез *de novo* з глутамату, цистеїну і гліцину у два АТФ-залежних етапи із залученням с-глутамілцистеїн-синтетази та глутатіон-синтетази. Другий являє собою систему рециркуляції за участі глутатіонредуктази, яка відновлює окислений глутатіон завдяки НАДФН. Крім прямої взаємодії відновленого глутатіону з АФК, він служить в якості донора електронів для деяких пероксидаз, в тому числі глутатіонпероксидази і пероксиредоксинів. Надходження відновленого глутатіону з клітин Сертолі може бути необхідним як для захисту від АФК та виступати в якості джерела амінокислот для процесів сперматогенезу [379].

Що стосується нарізного введення ПТЗ, то найбільш помітні порушення біохімічних показників сім'яників щурів спостерігались за умов введення етамбутолу та ізоніазиду. Зокрема, виявлено значне збільшення рівня ендогенного ПОЛ в сім'яниках щурів, яким вводили етамбутол. Швидкість індукованого аскорбатом та НАДФН утворення продуктів реакції з ТБК була істотно підвищена у 1,3 та 2,4 рази відповідно порівняно з контролем (табл. 3.4). Поряд з цим, у 1,5 рази зростала активність СОД, а вміст відновленого глутатіону був на 13% менше, ніж у контрольній групі (табл. 4.4 та 4.5). Активність глутатіонтрансферази та вміст SH-груп білків лишались незмінними (табл. 4.3).

При введенні ізоніазиду також було зафіксоване підвищення швидкості індукованого ПОЛ в сім'яниках, більшою мірою НАДФН-залежного (вдвічі порівняно з контролем), що може бути свідченням переважного залучення до цих процесів системи цитохрому Р-450. Крім того, у гонадах тварин, що отримували ізоніазид ми виявили збільшення глутатіонтрансферазної активності на 32% та зниження активності СОД на 35% (табл. 4.2 та 4.3). Вірогідних відмінностей в кількості тіольних груп білків не спостерігалось (табл. 4.3).

Піразинамід та рифампіцин за умов нарізного введення щурам в терапевтичних дозах викликали підвищення рівня аскорбатзалежного ПОЛ в сім'яниках на 24% та 34% порівняно з контролем, практично не впливаючи на рівень НАДФН-залежного (табл. 4.4). В тому числі не було виявлено достовірних змін активності СОД та глутатіонтрансферази, вмісту відновленого глутатіону та білкових SH-груп (табл. 4.2 та 4.3).

Беручи до уваги, що тестикулярні мембрани багаті ненасиченими жирними кислотами, які є чутливими мішенями для окисного пошкодження, можна припустити, що ПОЛ бере участь у розвитку гонадальної дисфункції за введення ПТЗ [380].

Підсумовуючи отримані дані, особливу увагу слід приділити тому, що виявлені нами біохімічні зміни у сім'яниках щурів, які протягом періоду сперматогенезу отримували комбінацію ПТЗ перш за все опосередковувались ефектами етамбутолу та ізоніазиду.

4.2. Фрагментація ДНК в гонадах

Індукція цитохрому Р-450 2Е1, як окремими ПТЗ так і їх комбінацією може призводити до надлишкового утворення АФК, активації ПОЛ та розвитку оксидативного стресу. Слід зазначити, що наслідком оксидативного стресу є ушкодження всіх внутрішньоклітинних макромолекул (ДНК, РНК, протеїнів та АТФ). Будь-які зміни вмісту даних сполук мають принципове значення для життєдіяльності клітини, а значні відхилення від нормального рівня ведуть до ураження клітини та її загибелі.

Наявність індукцибельних ізоформ цитохрому Р450 у чоловічих гонадах, на наш погляд, може мати вплив на продукцію генотоксичних метаболітів при біотрансформації хімічних сполук безпосередньо в органах мішенях. Особливо важливим є те, що в основі механізмів репродуктивної токсичності ксенобіотиків, їх мутагенних впливів на організм та виникнення онкологічних

захворювань, лежать спільні процеси із залученням високореактивних метаболітів, в тому числі утворених із залученням системи цитохрому Р-450. Дестабілізація клітинних структур життєво важливих органів відтворення (гонади, плацента) може спостерігатись вже тоді, коли ще не відбувається “видимих” структурно-функціональних змін в організмі [381].

Нами було показано, що застосування етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду, піразинаміду та комбінації ПТЗ призводило до зростання фрагментації ДНК у клітинах сім'яників (рис. 4.5) [382].

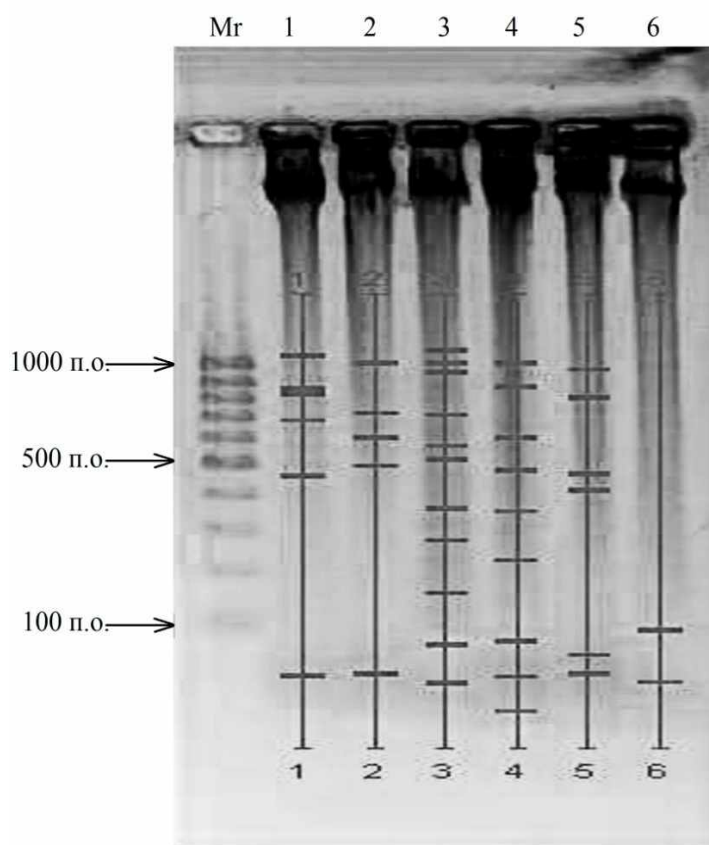


Рис. 4.5. Рівень фрагментації ДНК у сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів (1 – етамбутол; 2 – рифампіцин; 3 – ізоніазид; 4 – піразинамід; 5 – сумісне введення ПТЗ; 6 – контроль). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

З представлених даних 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, що 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. (рис. 4.5).

Результати стосовно відносного сумарного вмісту фрагментів ДНК різної молекулярної маси у сім'яниках щурів за умов нарізного та сумісного введення ПТЗ у порівнянні з контролем наведені у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси у сім'яниках щурів за умов сумісного та нарізного введення ПТЗ

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,83
Етамбутол	14,74
Рифампіцин	14,91
Ізоніазид	26,99
Піразинамід	35,00
Комбінація ПТЗ	20,51

Дещо інша картина спостерігалась при дослідженні процесів фрагментації ДНК у епідидимісах (рис. 4.6). 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.

Звертає на себе увагу, що за умов нарізного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинамід у була відсутня низькомолекулярна фракція фрагментів ДНК в діапазоні 20-30 п.о., що може бути наслідком 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 [361, 383, 384].

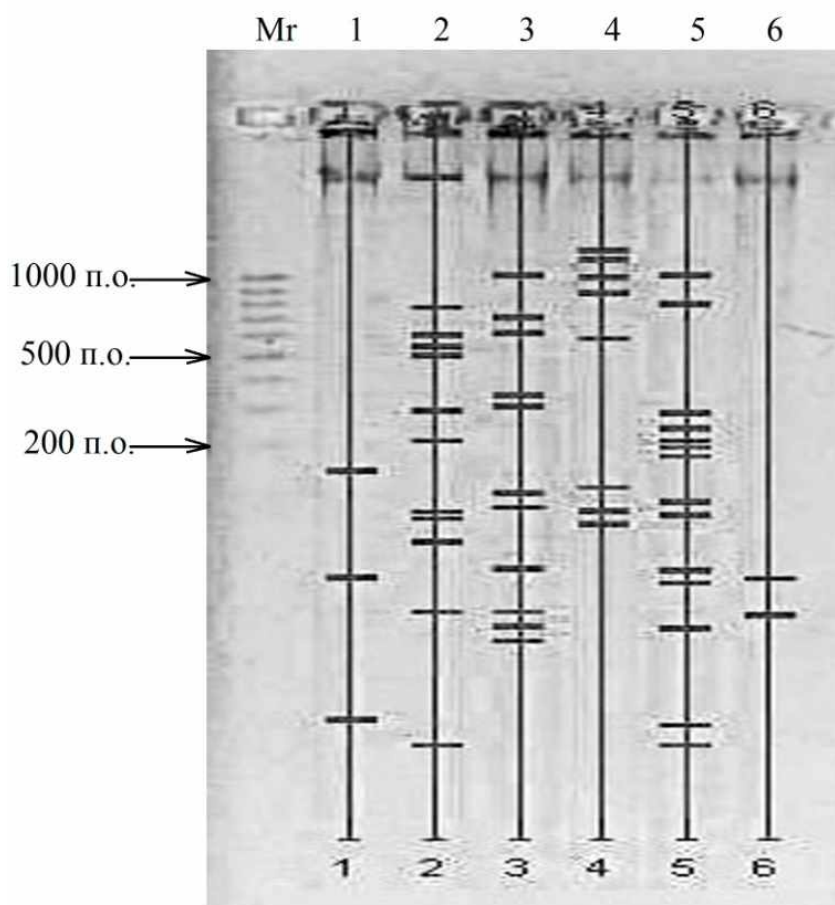


Рис. 4.6. Рівень фрагментації ДНК у епідидимісах щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів (1 – етамбутол; 2 – рифампіцин; 3 – ізоніазид; 4 – піразинамід; сумісне введення ПТЗ; 6 – контроль). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

Дані стосовно відносного сумарного вмісту фрагментів ДНК різної молекулярної маси у епідидимісах щурів за умов нарізного та сумісного введення ПТЗ у порівнянні з контролем наведені у табл. 4.5. Вони свідчать, що загалом відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси в епідидимісах щурів зростає порівняно з контролем.

Таблиця 4.5

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси у епідидимісах щурів за умов сумісного та нарізного введення протитуберкульозних засобів

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,84
Етамбутол	14,76
Рифампіцин	44,11
Ізоніазид	41,40
Піразинамід	30,98
Комбінація ПТЗ	47,24

Найбільшою мірою це відбувалось внаслідок введення рифампіцину (у 6,4 рази), ізоніазиду (у 6 разів), піразинаміду (у 4,5 рази) та усіх 4-х ПТЗ одночасно (у 6,9 рази).

4.6. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз впливу нарізного та сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду на експресію в сім'яниках

щурів-самців мРНК та протеїну CYP2E1, а також на його ферментативну активність. Проведено оцінку біохімічних показників сім'яників, що характеризують стан про/антиоксидантної системи та рівень фрагментації нуклеарної ДНК в сім'яниках та епідидимісах.

Аналіз результатів досліджень, описаних у цьому розділі дозволяє зробити наступні висновки:

1. Отримані дані дозволяють з високою долею впевненості стверджувати, що ПТЗ I ряду за умов сумісного введення щурам індукують CYP2E1 в сім'яниках, про що свідчить значне зростання експресії його мРНК та протеїну, а також підвищення ензиматичної активності в тестикулярних клітинах.

2. Серед ПТЗ I ряду при нарізному застосуванні найвищу здатність індукувати CYP2E1 та тестикулярну токсичність виявляють ізоніазид та етамбутол.

3. Зростання експресії мРНК та білка CYP2E1 з наступним підвищенням його ензиматичної активності за умов введення етамбутолу, ізоніазиду та комбінації 4-х ПТЗ в числі інших механізмів можуть бути залучені до механізмів розвитку порушень сперматогенезу. На користь цього свідчать дані стосовно високої негативної кореляції між рівнем експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів та кількістю сперматозоїдів.

4. Індукція тестикулярного CYP2E1 за нарізного введення етамбутолу й ізоніазиду, а також сумісного введення всіх чотирьох ПТЗ супроводжується порушеннями про- та антиоксидантного статусу в сім'яниках (зниження активності СОД та вмісту відновленого глутатіону, зростання активності глутатіонтрансферази, активація ПОЛ).

5. Нарізне та сумісне введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду призводить до зростання фрагментації ДНК у клітинах сім'яників та епідидимісів, що свідчить про активацію процесів апоптозу.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-САМЦІВ ТА ЕМБРІО-ФЕТАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ЇХНЬОГО ПОТОМСТВА КОМБІНАЦІЙ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА УМОВ ЗАМІНИ ЕТАМБУТОЛУ НА СТРЕПТОМІЦИН

Загалом, 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) [385].

Враховуючи отримані нами на попередньому етапі досліджень дані стосовно найбільш вираженого негативного ефекту етамбутолу на репродуктивну здатність щурів-самців при нарізному введенні ПТЗ, доцільним стало порівняння ефектів стосовно чоловічих гонад двох використовуваних в клініці комбінацій ПТЗ, до складу яких входять рифампіцин, ізоніазид та піразинамід, а четвертою складовою є етамбутол (комбінація 1) або стрептоміцин (комбінація 2) [386, 387].

5.1. Репродуктивна здатність щурів-самців

Результати мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії показали, що комбінація 1, як і в першій серії експериментів, негативно впливала на нормоспермію у щурів. Показане зниження продукції статевих клітин сім'яниками відповідно на 68 % порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 5.1).

За умов введення ПТЗ в комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, середня кількість сперматозоїдів не виходила за межі норми (рис. 5.1).

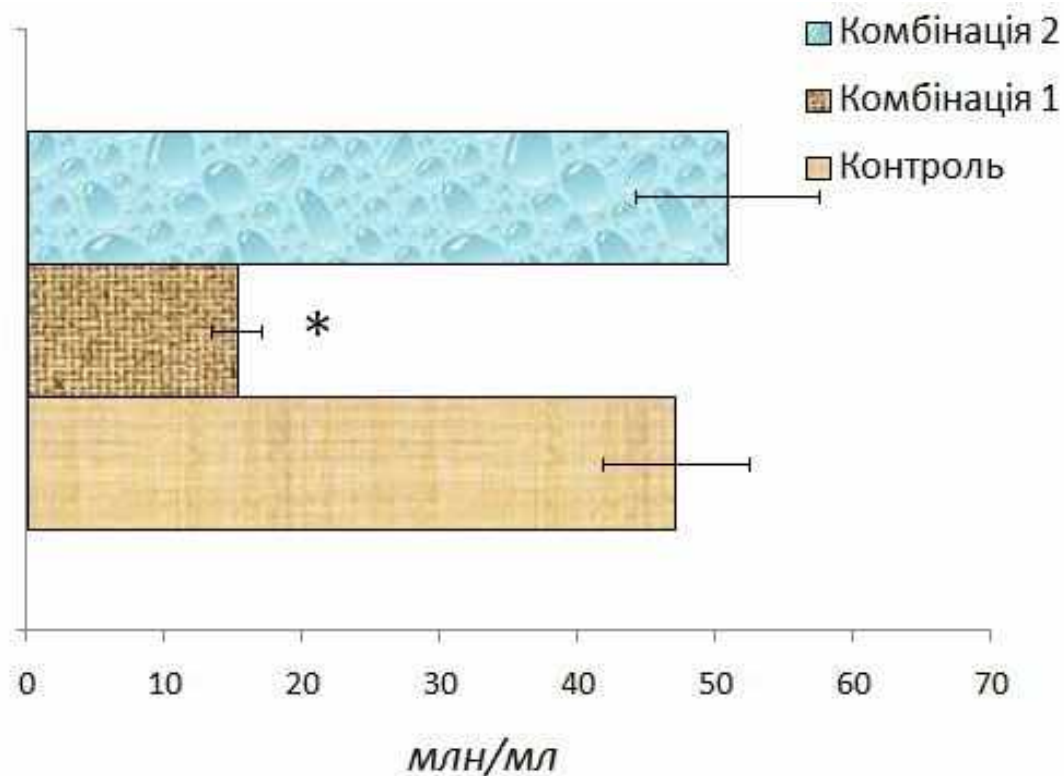


Рис. 5.1. Кількість сперматозоїдів в хвостовій частині епідидиміса щурів за умов введення протитуберкульозних засобів в двох комбінаціях ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

Параметри, що відображають енергетичний потенціал сперматозоїдів (час рухливості) та їхню стійкість до змін оточуючого середовища (осмотична резистентність), наведені на рисунку 5.2. Вони свідчать, що загальний час рухливості сперматозоїдів після введення комбінацій 1 та 2 скорочувався порівняно з контролем відповідно на 77 і 34 %. Життєздатність сперматозоїдів у розчинах КСІ зростаючих концентрацій за умов введення комбінації 1 знижувалась на 65 %, тоді застосування комбінації 2 позначилося лише тенденцією до зниження даного показника.

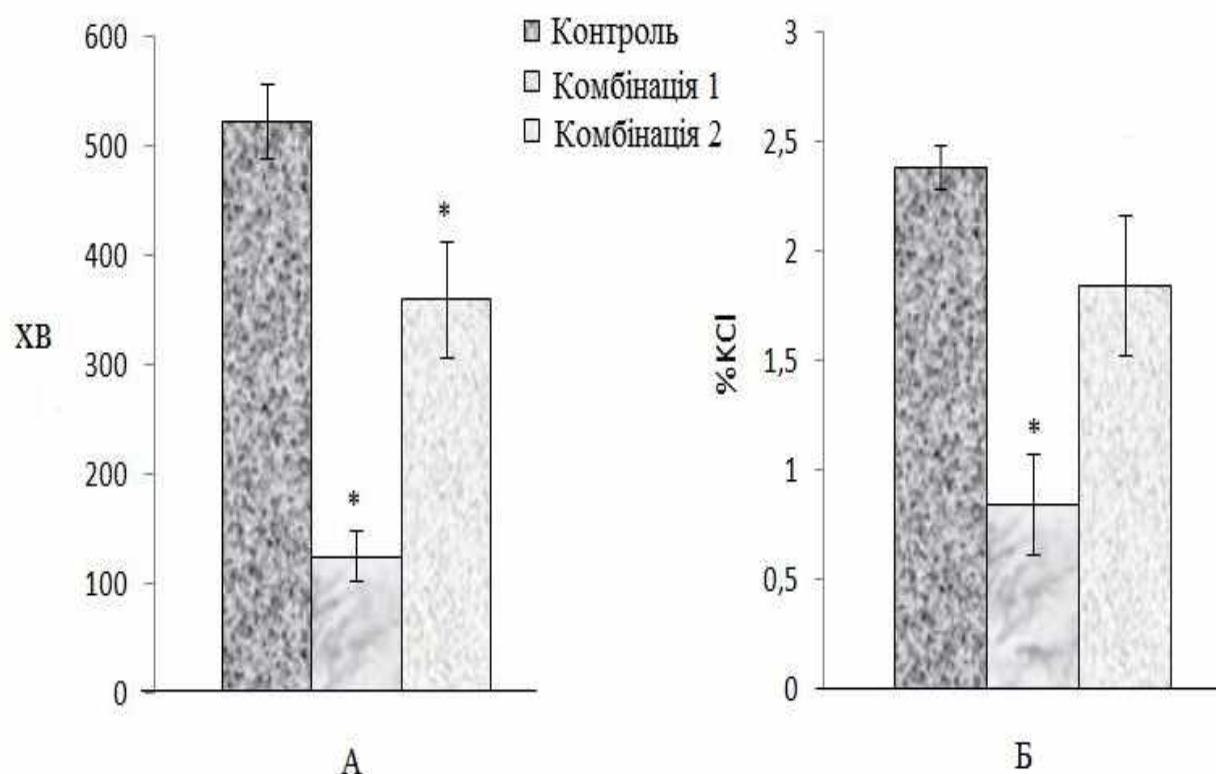


Рис. 5.2. Якісні показники сперматозоїдів щурів за умов введення ПТЗ в двох комбінаціях: А- час рухливості; Б – осмотична резистентність ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

Наші дані стосовно порушення процесів сперматогенезу та якості сперматозоїдів добре узгоджуються з результатами вивчення запліднювальної здатності експериментальних тварин (табл. 5.1). Менша кількість вагітних самоць в піддослідних групах є доказом нижчої фертильності самців внаслідок тривалого введення ПТЗ. Але, очевидно, що за умов застосування комбінації 2 індекс запліднювальної здатності знижувався незначною мірою (на 8,3 % порівняно з контролем), в той час як комбінація 1 викликала фатальне зниження даного показника (на 77,3 % порівняно з контролем).

Таблиця 5.1

**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	86,4
Комбінація 1	44	4	9,1
Комбінація 2	32	25	78,1

5.2. Ембріо-фетальний розвиток потомства щурів-самців

Для отримання даних з стосовно впливу досліджуваних препаратів на потомство ми застосували тест домінантних леталей, у якому самиць піддають евтаназії в середині третього триместру вагітності. У даному тесті визначають до- та післяімплантаційну загибель, рівень яких є одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію.

Показники смертності ембріонів та плодів в різні періоди розвитку потомства самців, яким протягом сперматогенезу вводили різні комбінації ПТЗ, представлені в таблиці 5.2.

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. 5.2). Кількість живих плодів в цій групі знижувалась, тоді як комбінація 2 практично не виявила ушкоджуючої дії (табл. 5.2).

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. 5.2).

Таблиця 5.2

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

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

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

Комбінація 2 виявила менший ефект: до- та післяімплантаційна смертність зростала лише в 2 та 4 рази (табл. 5.2).

Таким чином, застосування стрептоміцину в комбінації з іншими ПТЗ, замість етамбутолу, сприяло певному покращенню показників репродуктивної здатності піддослідних тварин та ембріо-фетального розвитку їх потомства. Даний феномен, можливо, пояснюється складними метаболічними взаємодіями застосованих ПТЗ.

5.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників

Ефект будь-якого шкідливого впливу повинен визначатись лише за умов комплексного дослідження функціональних, морфологічних та морфометричних показників, оскільки порушення, виявлені морфологічними методами, можуть спостерігатись і за відсутності змін функціонального стану та навпаки. Оскільки дотепер не існує адекватних біохімічних маркерів тестикулярного пошкодження, дослідження токсичного впливу на репродуктивну систему повинно включати як функціональну, так і морфологічну та морфометричну оцінку її органів.

Було проведено детальне порівняльне морфологічне дослідження сім'яників щурів, які отримували нарізно етамбутол та стрептоміцин, а також ПТЗ у 2-х комбінаціях. Візуальний огляд сім'яників тварин, підданих евтаназії після закінчення введення досліджуваних препаратів не виявив будь-яких відхилень від норми: органи були звичайного розміру та кровонаповнення, без ознак набряку. Морфологічні дані стану гонад представлені у таблиці 5.3. Згідно до них маса та об'єм сім'яників, маса епідидимісів у щурів дослідних груп практично не відрізнялися порівняно з відповідними показниками у тварин контрольної групи.

При цьому введення обох комбінацій ПТЗ супроводжувалось розвитком деструктивних змін в сперматогенному епітелії. Згідно даних таблиці 5.4 в

обох піддослідних групах спостерігали зниження сперматогенного індексу порівняно з контролем.

Таблиця 5.3

Морфометричні показники стану гонад самців щурів за умов введення протитуберкульозних засобів в різних комбінаціях ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи				
	Контроль	Етамбутол	Стрептоміцин	Комбінація 1	Комбінація 2
Маса сім'яників, г	3,12±0,24	2,93±0,10	3,08±0,25	3,10±0,12	3,07±0,33
Відносна маса сім'яників, г · 100 г м. т. ⁻¹	0,96±0,04	0,92±0,06	0,91±0,09	0,93±0,03	0,87±0,09
Об'єм сім'яника, мм ³	1282±76	1167±85	1413±35	1268±91	1384±181
Маса епідидиміса (правий), г	0,5±0,02	0,43±0,02	0,48±0,04	0,46±0,02	0,46±0,03
Відносна маса епідидиміса (правий), г · 100 г м. т. ⁻¹	0,15±0,01	0,138±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01

Це відбувалось на фоні зниження мітотичної активності гермінативних клітин і скорочення кількості сперматогоніїв. За цих умов кількість клітин в XII стадії сперматогенного циклу виявляла лише тенденцію до зниження за введення комбінації 1 та достовірно знижувалась за умов застосування комбінації 2.

Окрім перелічених вище кількісних показників, змін зазнали і певні якісні характеристики сперматогенного епітелію щурів, яким вводили ПТЗ в обох комбінаціях. Внаслідок введення комбінації 1 спостерігали зростання кількості випадків відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани в 2,7 рази порівняно з контролем (табл. 5.4). Значні дегенеративні зміни, такі як злушення епітеліальних клітин в просвіт сім'яних каналців (за введення обох комбінацій) та наявність «вікон» (за введення комбінації 1) також

спостерігались у значній кількості (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію у щурів за умов введення протитуберкульозних засобів в різних комбінаціях (M ±m, n ≥ 6)

Показники	Експериментальні групи				
	контроль	етамбу-тол	стрептоми-цин	комбіна-ція 1	комбіна-ція 2
Індекс сперматогенезу, загальна кількість стадій сперматогенезу / кількість досліджених каналців	3,615 ± 0,011	3,48 ± 0,008*	3,41 ± 0,13	3,535 ± 0,014*	3,533 ± 0,011*
Число сперматогоній, на поперечний зріз через каналець	69,393 ± 0,742	57,84 ± 0,46*	43,62 ± 5,53*	59,573 ± 0,861*	54,56 ± 2,398*
Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	3,563 ± 0,365	2,0 ± 0,32	3,6 ± 1,08	2,412 ± 0,508	2,455 ± 0,366*
Відшарування епітелію, %	1,063 ± 0,249	0,32 ± 0,05	1,3 ± 0,81	2,882 ± 0,283*	1,818 ± 0,444
Злущений епітелій, %	0,313 ± 0,120	0,31 ± 0,17	2,2 ± 0,97	1,882 ± 0,363*	1,545 ± 0,390*
“Вікна”, %	0,500 ± 0,158	1,4 ± 0,51	3,6 ± 1,83	1,765 ± 0,265*	2,27 ± 0,070

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

При мікроскопічному дослідженні препаратів сім'яників щурів, яким вводили стрептоміцин у деяких тварин виявляли різні патологічні зміни в сім'яродному епітелії. Зокрема, у трьох тварин цієї групи осередковано зустрічалися запустілі та деформовані каналці, а також каналці з дисконфлексованим і дистрофічно зміненим сперматогенним епітелієм (рис.

5.5).

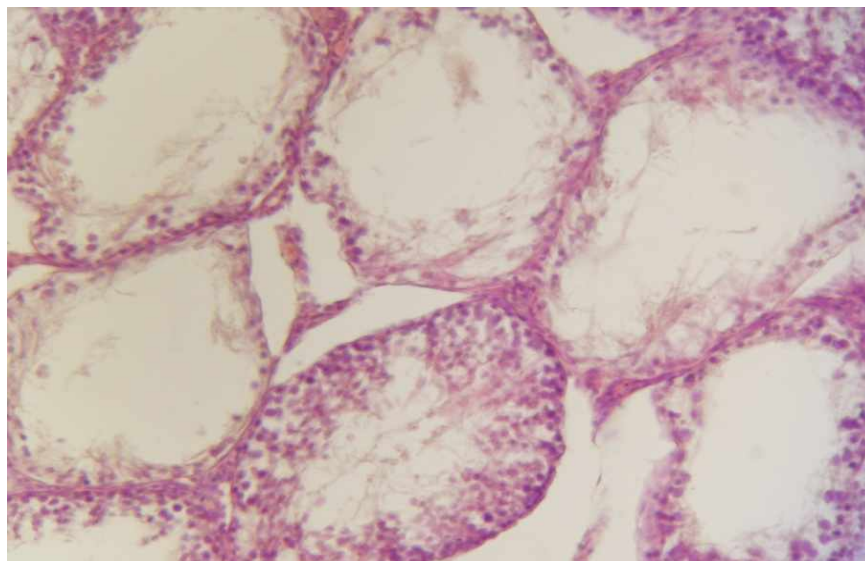


Рис. 5.5. Патологічно змінені спустошені сім'яні канальці. Введення стрептоміцину. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення x 200.

Крім того, в однієї тварини в сім'янику спостерігалось тотальне спустошення сперматогенного епітелію в канальцях і тільки в деяких із них зустрічалися дегенеративні, багатоядерні та гігантські сперматиди (рис. 5.6).

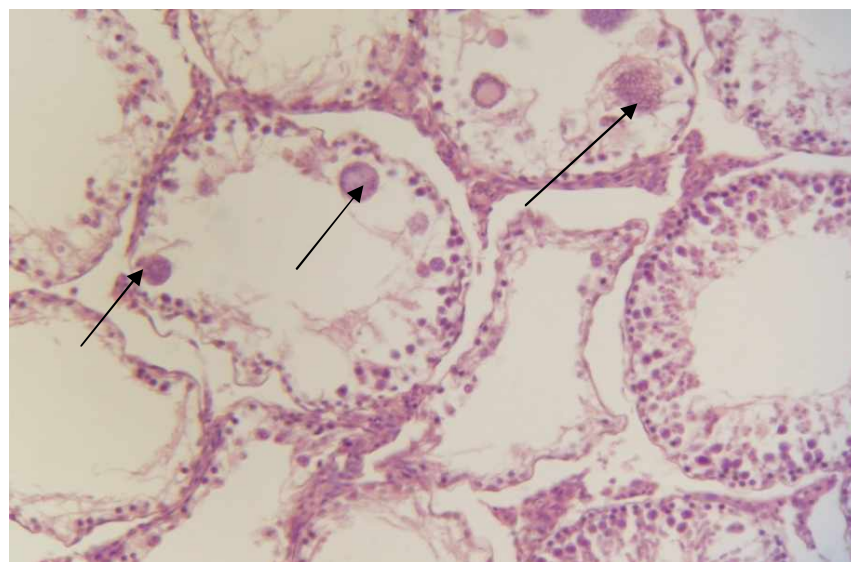


Рис. 5.6. Дегенеративні, багатоядерні та гігантські клітини. Введення стрептоміцину. Фарбування гематоксилін-еозином. Збільшення x 200.

На розтині у сім'яниках 50 % щурів, яким вводили комбінацію 1, не спостерігалось патології, і морфологічна картина в сім'яродному епітелії нагадувала таку в контролі. В інших тварин патологічні зміни були виражені по-різному. Зокрема у однієї тварини зустрічалися поодинокі деструктивно змінені сім'яні каналці і виявлялися вони серед каналців з нормальним сперматогенезом (рис. 5.7), а у іншого щура поруч з патологічно незміненими сім'яними каналцями знаходився великий пласт деформованих, здавлених та спустошених каналців. В просвіті деяких із них виявлялися гігантські чи багатоядерні статеві клітини (рис. 5.8).



Рис. 5.7. Осередкована деструкція сім'яного каналця щура. Введення комбінації 1. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення x 200.

Слід відмітити, що деструктивно змінені каналці розміщувалися по периферії сім'яника у вигляді напівмісяця. В одній з тварин гермінативний епітелій в сім'янику був повністю некротизований. Зберігалася тільки власна оболонка сім'яних каналців, яка була розпушена і слабо фарбувалася еозином в блідо-рожевий колір (рис. 5.9).

Гістохімічна реакція на нуклеїнові кислоти в патологічно незмінених сім'яних каналцях не відрізнялась від такої в контролі. Що стосується

деструктивно змінених каналців, то реакція на ДНК і РНК була слабкою чи негативною.

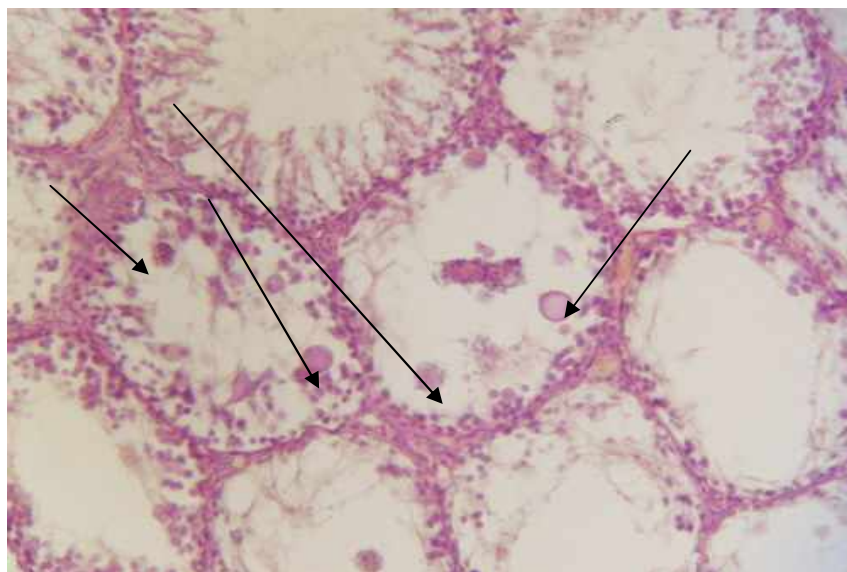


Рис. 5.8. Значна кількість дегенеративних, гігантських і багатоядерних клітин. Введення комбінації 1. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення x 200.

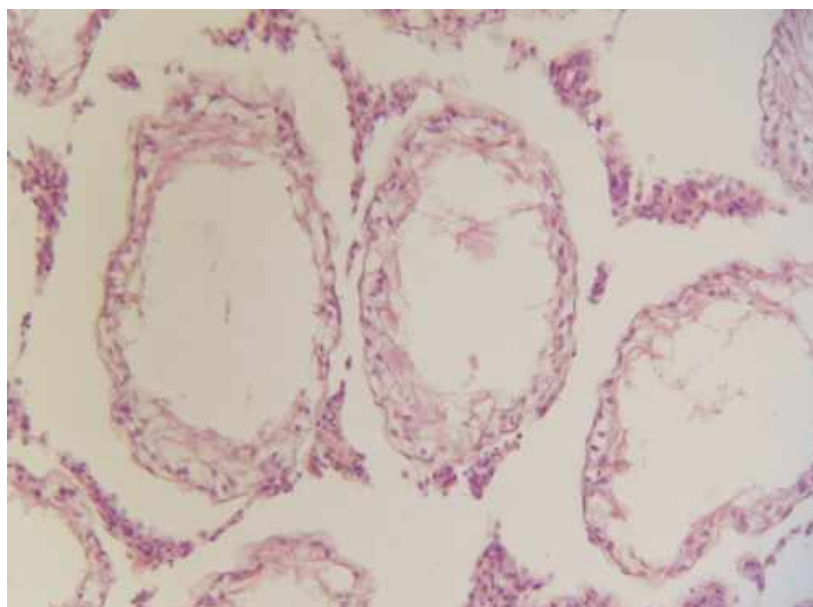


Рис. 5.9. Спустощення гермінативного епітелію та розпушення власної оболонки сім'яних каналців. Введення комбінації 1. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення x 200.

У сім'яниках щурів, яким вводили комбінацію 2 в основному не виявлялося деструктивних змін у статевих клітинах. Сім'яні каналці мали характерну будову і не відрізнялися від таких у контролі. В інтерстиціальній тканині не спостерігалось збільшення кількості сполучнотканинних волокон та клітинних елементів. Не виявлялося також гемоциркуляторних порушень та запальної реакції. Але слід відмітити, що в одній тварини були виявлені поодинокі деформовані сім'яні каналці (рис. 5.10).



Рис. 5.10. Деформація, дисконкомплексція і потоншення гермінативного епітелію. Введення комбінації 2. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 200$.

В таких каналцях спостерігалась дисконкомплексція сперматогенного епітелію і зменшення кількості статевих клітин.

В цілому, підсумовуючи дані гістологічних досліджень сім'яників варто відзначити що за умов введення щурам комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, ступінь деструктивних змін у сперматогенному епітелії була нижчою.

5.4. Експресія мРНК CYP2E1 та фрагментація ДНК у сім'яниках

В рамках даного дослідження було показано, що етамбутол та ізоніазид за умов їх нарізного, або сумісного з піразинамідом та рифампіцином введення здатні індукувати ізоформу CYP2E1 в сім'яниках. В подальшому ми проаналізували в порівняльному аспекті вплив сумісного введення ПТЗ у двох зазначених вище комбінаціях на стан експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів. Відповідні дані наведені на рисунку 5.11.

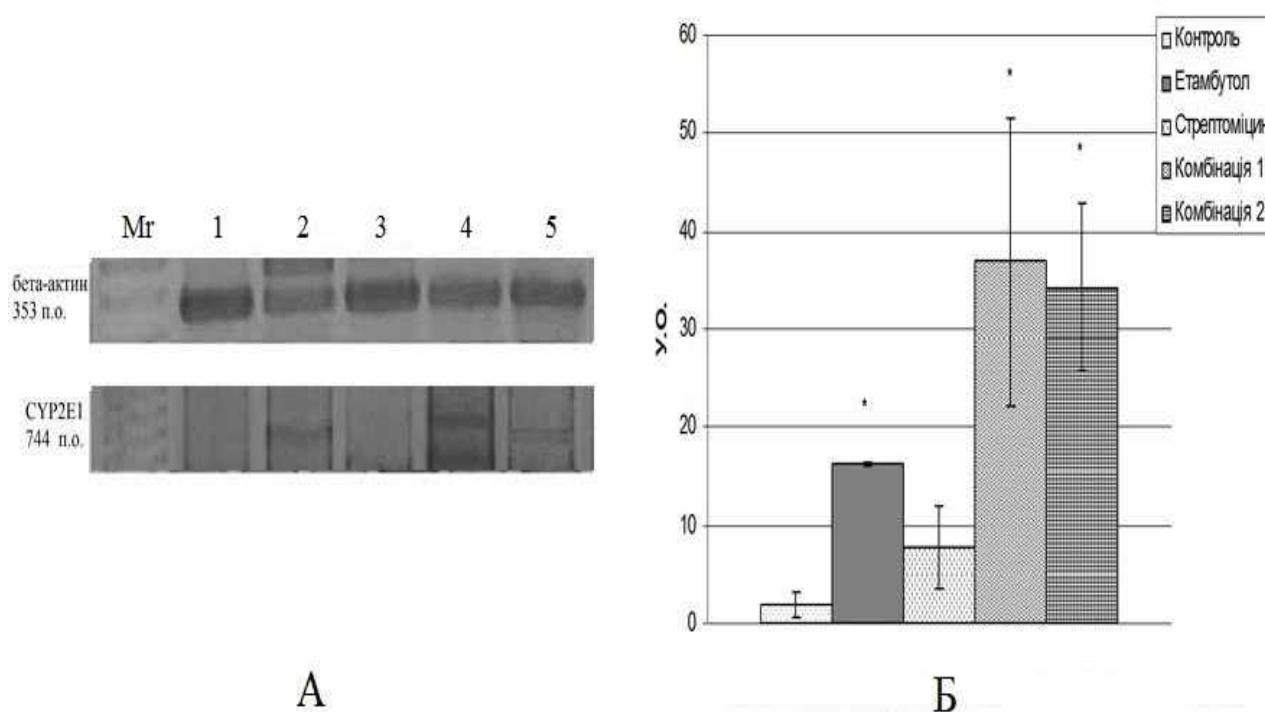


Рис. 5.11. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (Mr –ДНК маркер, 1- контроль; 2 – етамбутол; 3 - стрептоміцин; 4 – комбінація 1; 5 – комбінація 2); 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.

Показано значне посилення експресії мРНК CYP2E1 (у 18-19 разів) у тварин, яким вводили комбінації 1 та 2. При цьому етамбутол введений нарізно викликав підвищення вмісту мРНК згаданої ізоформи у 8 разів порівняно з контролем, тоді як стрептоміцин не впливав на даний показник. Отримані дані свідчать, що в даному випадку заміна етамбутолу на стрептоміцин значною мірою не позначилась на ступені експресії мРНК CYP2E1. Можливо, що індуюча дія комбінацій ПТЗ стосовно вказаної ізоформи реалізується переважно за рахунок наявності в них ізоніазиду.

Таким чином, нами було виявлено індукцію експресії гену ізоформи CYP2E1 у сім'яниках щурів, як за умов застосування комбінації 1, що містила етамбутол, так і за умов введення комбінації 2. В той же час стрептоміцин за умов його нарізного введення не впливав на CYP2E1 у тестикулах щурів.

Було досліджено вплив двох комбінацій ПТЗ на стан процесів фрагментації ДНК в сім'яниках та епідидимісах щурів [388].

З рисунку 5.12 видно, що у сім'яниках щурів контрольної групи відзначалась незначна фрагментація ДНК до 2 основних фракцій в діапазоні 100 п.о. та 20 п.о.

Введення комбінації 1 посилювало фрагментацію ДНК у сім'яниках та призводило до утворення її 6-и основних фракцій. Перша фракція була представлена відносно високомолекулярними фрагментами 1200 п.о., друга — 850 п.о., третя - 650 п.о. та четверта – 550 п.о. П'яту фракцію склали низькомолекулярні фрагменти ДНК 40-30 п.о. За інтенсивністю піка найбільшими були перша та п'ята фракції ДНК (рис. 5.12).

При застосуванні комбінації 2 також було виявлено 6 основних фракцій фрагментів ДНК: перша- із довжинами понад 1000 п.о., друга — 850 п.о., третя – 500 п.о., четверта - 400 п.о., п'ята – 200 п.о. та шоста 40-30 п.о. Найбільшою з них була фракція, що містила ланцюжки ДНК у діапазоні 40-30 п.о. За інтенсивністю піка вона була у 1,5 рази більшою, ніж інші.

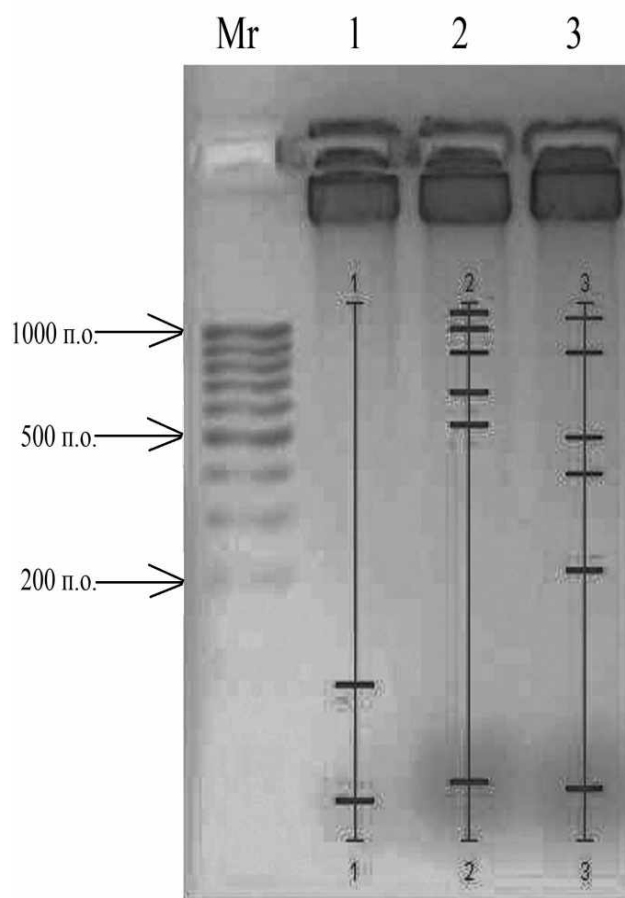


Рис. 5.12. Фрагментація ДНК у сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях (Mr –ДНК маркер, 1- контроль; 2 – комбінація 1; 3 – комбінація 2). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

Встановлено, що відносний вміст фрагментів ДНК в сім'яниках щурів, які отримували дві різні комбінації ПТЗ зростав у 3-4 рази порівняно з контролем (табл. 5.5).

Очевидно, токсичні ефекти складових комбінації ПТЗ реалізувались незалежно від наявності стрептоміцину або етамбутолу.

Дещо інша картина спостерігалась при дослідженні процесів фрагментації ДНК у епідидимісах щурів (рис. 5.13).

За умов введення лише крохмального гелю (контроль) спостерігалась

Таблиця 5.5

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси у сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,51
Комбінація 1	22,22
Комбінація 2	28,29

Незначна фрагментація ДНК до 3-х основних фракцій (перша - 250 п.о., друга - 150 п.о. та третя – 20 п.о.). За інтенсивністю піка найбільшими були друга та третя фракції ДНК.

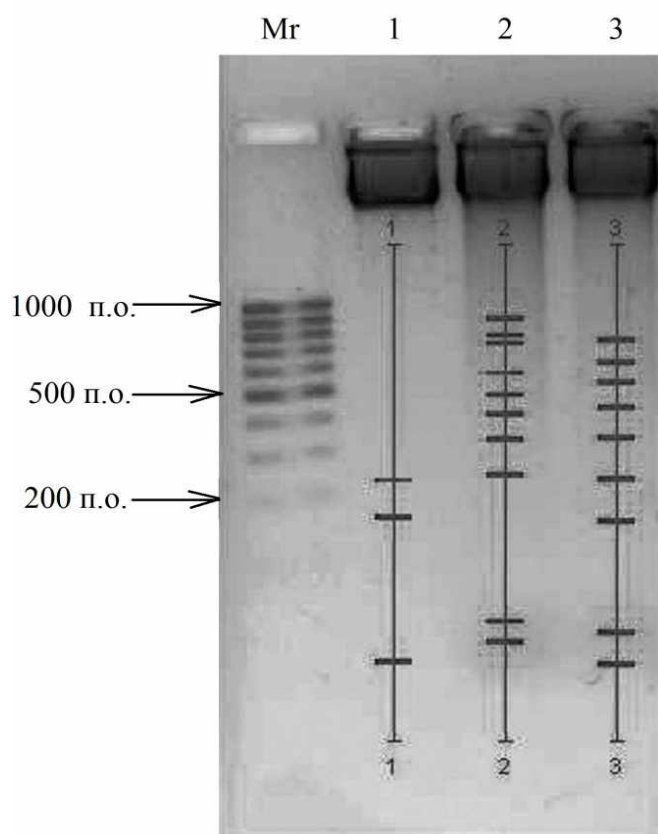


Рис. 5.13. Фрагментація ДНК в епідидимісах щурів протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях (Mr –ДНК маркер, 1- контроль; 2 – комбінація 1; 3 – комбінація 2). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

Введення комбінації 1 посилювало фрагментацію у епідидимісах та призводило до утворення 10 основних фракцій ДНК. Перша фракція була представлена відносно високомолекулярними фрагментами 900 п.о., друга — 800 п.о., третя - 750 п.о., четверта - 550 п.о., п'ята — 500 п.о., шоста - 400 п.о., сьома - 350 п.о., восьма — 250 п.о. Дев'яту та десятую фракції склали низькомолекулярні фрагменти ДНК – 30 та 40 п.о. За інтенсивністю піка найбільшими були перша, шоста та восьма фракції ДНК (рис. 5.13).

При введенні комбінації 2 в епідидимісах, як і у сім'яниках, не було зафіксоване пригнічення фрагментації (за інтенсивністю піків) та зменшення числа фракцій ДНК-фрагментів. При застосуванні комбінації 2 було виявлено 9 основних фракцій фрагментів ДНК в діапазоні довжин ланцюжків від 800 п.о. до 20 п.о. рівномірних щодо інтенсивності піків.

Відносний вміст фрагментів ДНК в епідидимісах щурів за введення комбінацій 1 та 2 був більший, ніж в контролі у 7 та 5,6 разів відповідно (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси в епідидимісах щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,53
Комбінація 1	46,81
Комбінація 2	36,54

Певні відмінності у фрагментації ДНК між епідидимісами, клітинами сім'яників та печінки можуть бути пов'язані із різними за активністю наборами нуклеаз у клітинах різних тканин.

5.5. Біохімічні показники стану сім'яників

Було проведене порівняльне вивчення впливу введення двох комбінацій ПТЗ на рівень ПОЛ в статевих органах щурів-самців (табл. 5.7). Виявлено, що комбінація 1 викликала зростання швидкості утворення продуктів реакції з ТБК у сім'яниках щурів (на 27 %) та у суспензії сперматозоїдів з епідидимісів (на 38 %) порівняно із контрольною групою, а комбінація 2 - підвищення ліпопероксидації лише у сім'яниках на 20 %.

Таблиця 5.7

Швидкість індукованого аскорбатом утворення продуктів реакції з ТБК в сім'яниках та епідидимальній суспензії сперматозоїдів щурів за умов введення протитуберкульозних засобів в двох комбінаціях, нмоль · хв⁻¹ · мг білка⁻¹ (M ± m, n ≥ 6)

Експериментальні групи	Тканини	
	сім'яники	епідидимальна суспензія сперматозоїдів
Контроль	0,250 ± 0,020	0,100 ± 0,006
Комбінація 1	0,317 ± 0,010*	0,162 ± 0,006*
Комбінація 2	0,302 ± 0,031*	0,104 ± 0,006

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

Крім того, можливо внаслідок активації процесів ПОЛ, введення комбінації 1 самцям-щурам призводило до зниження вмісту відновленого глутатіону у сім'яниках на 23 % (рис. 5.14).

Зростання рівня ПОЛ у сім'яниках та епідидимісах за умов введення комбінації 1 може бути, в тому числі, наслідком СYP2E1-залежної генерації АФК. Менш виражена інтенсивність процесів ПОЛ в сім'яниках щурів, що

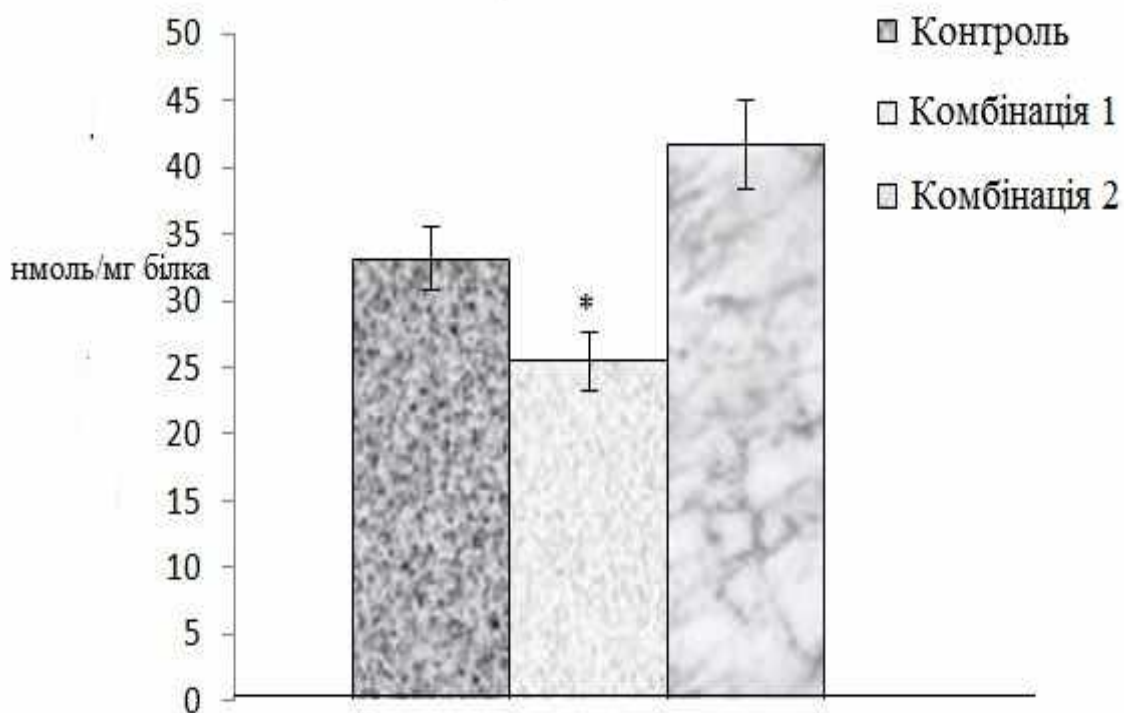


Рис. 5.4. Вміст відновленого глутатіону в сім'яниках щурів за умов введення ПТЗ в двох комбінаціях ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

отримували комбінацію 2 можливо, як мінімум частково, пов'язана з інгібуванням синтезу білка CYP2E1 стрептоміцином. Зокрема, дослідження *in vitro* багатьох аміноглікозидних антибіотиків з використанням еукаріотичних модельних систем, отриманих з дріжджів та клітин ссавців, виявило їхню здатність інгібувати синтез білків шляхом пригнічення фази подовження поліпептидних ланцюгів [389].

5.6. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльне дослідження впливу двох комбінацій ПТЗ, що містять ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол або стрептоміцин на

рівень експресії гену CYP2E1 та фрагментації ДНК у гонадах самців щурів, а також показників, що характеризують їх репродуктивну здатність.

Аналіз результатів досліджень, описаних у цьому розділі дозволяє зробити наступні висновки:

1. За умов заміни етамбутолу на стрептоміцин відбувається покращення показників репродуктивної здатності піддослідних щурів-самців, ембріо-фетального розвитку їх потомства.

2. Нарізне введення стрептоміцину викликає менш виражені морфологічні порушення в сім'яниках, ніж нарізне введення етамбутолу. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ сприяє зниженню покращенню стану сперматогенного епітелію.

3. Стрептоміцин за умов нарізного введення на відміну від етамбутолу не впливає на експресію мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів.

4. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ не запобігає зростанню тестикулярної експресії гену CYP2E1, ймовірно внаслідок наявності ізоніазиду.

5. Відносний вміст фрагментів ДНК в сім'яниках та епідидимісах щурів зростає порівняно з контролем за введення ПТЗ в обох комбінаціях, що свідчить про індукцію апоптозу незалежно від наявності стрептоміцину або етамбутолу.

6. Зміни біохімічних показників гонад є більш глибокими за умов введення комбінації 1. Комбінація 1, що містить етамбутол, порівняно із контрольною групою викликала зростання швидкості утворення продуктів реакції з ТБК у сім'яниках щурів (на 15 %, $p \leq 0,05$) та у суспензії сперматозоїдів з епідидимісів (на 38 %, $p \leq 0,05$), а також зниження вмісту відновленого глутатіону у сім'яниках (на 23 %, $p \leq 0,05$). Комбінація 2, що містить стрептоміцин, призводила до підвищення ліпопероксидації лише у сім'яниках.

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ (ІЗОНІАЗИД, РИФАМПІЦИН, ПІРАЗИНАМІД, ЕТАМБУТОЛ) НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-САМЦІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО СПОЖИВАННЯ ЕТАНОЛУ

Зловживання алкоголем пов'язане з порушеннями обмінних процесів у різних тканинах; співвідношення між рівнем споживанням алкоголю та його впливом на стан здоров'я є складним і багатовимірним [390]. Вважають, що індукований етанолом окиснювальний стрес, відіграє важливу роль у механізмах, за якими дана речовина викликає пошкодження клітин. Натепер загально прийнято, що одним із центральних шляхів промоції окисного стресу етанолом є індукція CYP2E1. Дана ізоформа представляє інтерес через її здатність брати участь у метаболізмі та активувати значну кількість токсикологічних субстратів, у тому числі етанол, до більш реактивних токсичних продуктів. CYP2E1 також є ефективним генератором АФК, таких як супероксидний аніонний радикал і перекис водню, і в присутності залізовмісних каталізаторів продукує потужні окиснювачі, такі як гідроксильний радикал. Рівень експресії CYP2E1 може підвищуватись за різних фізіологічних і патофізіологічних станів, а також після гострого та хронічного вживання алкоголю [391].

Враховуючи отримані нами на попередніх етапах дослідження 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 та тлі споживання алкоголю. Вивчення комбінованої дії етанолу та ПТЗ є тим більш актуальним з огляду на результати останніх клініко-епідеміологічних досліджень, які свідчать про підвищення ймовірності туберкульозної інфекції у людей не тільки з високим, але й з будь-яким споживанням алкоголю [152]. Для дорослих чоловіків

ймовірність комбінованого вживання етанолу та фармацевтичних препаратів є досить високою [392], призводячи до їх фармакокінетичної та фармакодинамічної взаємодії і небажаних побічних ефектів [393].

6.1. Репродуктивна здатність щурів-самців

Експериментальні дослідження свідчать про надзвичайну чутливість чоловічої репродуктивної системи до комбінованого впливу пошкоджуючих факторів зовнішнього середовища різної природи, в тому числі і фармакологічних засобів. Деякі з них відзначаються багаторівневим характером впливу на сперматогенез, що призводить до порушень гермінативної функції. [10, 11]. Щодо ПТЗ, то на прояв їхньої побічної дії можуть суттєво впливати генетичні та не генетичні фактори ризику [394]. Останні включають різноманітні навколишні чинники, одним з яких може бути ексцесивне споживання алкоголю.

За умов сумісного введення ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід) щурам самцям з хронічним алкоголізмом, виявлено значне скорочення кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісу та часу їх рухливості, як це показано у таблиці 6.1. В той час як у групі, де тварини протягом 150 днів споживали 15 % розчин етанолу кількість сперматозоїдів порівняно з контрольною групою знижувалась у 1,8 рази, то за умов введення на цьому тлі ПТЗ кількість сперматозоїдів була нижчою, ніж у контролі та у алкогользалежних тварин (відповідно у 3,2 та 1,7 разів).

Одночасно у щурів з хронічним алкоголізмом, яким вводили ПТЗ, зафіксовано зниження абсолютної та відносної маси епідидимісів ~ 15 % у порівнянні з контролем, а також з тваринами, що отримували лише етанол (табл. 6.1).

З огляду на наведені дані, можна вважати, що епідидиміси – органи статеві системи самців, де відбувається формування дозрілих сперматозоїдів, виявились досить чутливими до сумісного впливу алкоголю та ПТЗ.

Таблиця 6.1

Показники кількості сперматозоїдів та маси епідидимісів у щурів із експериментальним хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм + ПТЗ
Кількість сперматозоїдів, $10^6 \cdot \text{мл}^{-1}$	$82,17 \pm 7,07$	$44,40 \pm 4,64^*$	$25,9 \pm 4,88^* **$
Епідидиміс (правий) абсолютна маса , г	$0,538 \pm 0,020$	$0,531 \pm 0,040$	$0,463 \pm 0,020^* **$
Епідидиміс (правий) відносна маса , г	$0,140 \pm 0,007$	$0,125 \pm 0,011$	$0,107 \pm 0,007^* **$

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем;

** - $p \leq 0,05$ у порівнянні з тваринами з хронічним алкоголізмом.

Як засвідчують дані, наведені в табл. 6.2, введення тваринам ПТЗ на тлі тривалого споживання алкоголю також призводило до змін функціонального стану статевих клітин. Показники, які опосередковано свідчать про енергетичні можливості сперматозоїдів щурів (характер рухової активності, тривалість руху), та їх стійкість до змін оточуючого середовища (осморезистентність) були нижчими у тварин даної групи в порівнянні з контролем в середньому на 25 %.

Порушення процесів сперматогенезу та зниження кількості та якості сперматозоїдів у піддослідних тварин призводило до зниження їхньої фертильності. Нами було зафіксовано значно меншу кількість самиць, які завагітніли від самців, що піддавались тривалому впливу алкоголю, та згубне зниження числа вагітних самиць за умов парування з самцями, яким на тлі хронічного алкоголізму вводили ПТЗ (табл. 6.3).

Таблиця 6.2

**Функціональний стан сперматозоїдів щурів з експериментальним
хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі
протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)**

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм + ПТЗ
Час рухливості, хв.	423,16 $\pm$ 17,70	363,50 $\pm$ 16,00*	314,16 $\pm$ 26,8*
Осморезистентність, % KCL	2,85 $\pm$ 0,16	2,80 $\pm$ 0,25	2,40 $\pm$ 0,23*

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

В останньому випадку з 14 спарованих самиць завагітніло лише 4, в той час як індекс запліднювальної здатності в контролі та групі тварин з експериментальним хронічним алкоголізмом, але без введення ПТЗ склав 93 % та 71 % відповідно.

Таблиця 6.3

**Індекс запліднювальної здатності щурів-самців з експериментальним
хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі
протитуберкульозних засобів**

Групи самців	Кількість спарованих самиць	Кількість самиць, що завагітніли	Індекс запліднювальної здатності, %
Контроль	14	13	93
Хронічний алкоголізм	14	10	71
Хронічний алкоголізм + ПТЗ	14	4	29

6.2. Ембріо-фетальний та постнатальний розвиток потомства щурів-самців

Оцінюючи можливі ризики сумісної дії ПТЗ та етилового спирту звертає на себе увагу, що дані стосовно ефектів предкоїтального вживання алкоголю чоловіками на потомство обмежені, а щодо ефектів туберкулоstaticів взагалі відсутні. Результати, отримані на гризунах, є недостатніми та суперечливими з огляду на велику різноманітність видів/ліній тварин та експериментальних моделей алкоголізму [395]. Внаслідок цього дані досліджень, в яких самці хронічно споживають етиловий спирт, часто важко інтерпретувати. Більше того, було запропоновано кілька механізмів, за якими вживання етанолу батьком може впливати на потомство (включаючи мутагенність та епігенетичні зміни), але жоден з них до кінця не пояснює всіх ефектів [395]. З огляду на це, нами були оцінені наслідки довготривалого споживання 15 % алкоголю щурами-самцями лінії Вістар, в тому числі за введення комбінації ПТЗ, на розвиток їх потомства. З урахуванням виявленої нами на попередньому етапі досліджень індукції тестикулярної етанол залежної ізоформи CYP2E1 за умов сумісного введення ПТЗ можна припустити залучення даної ізоформи до утворення токсичних метаболітів безпосередньо в сім'яниках та, як результат, появи мутацій у статевих клітинах та негативного впливу на потомство.

Одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію сім'яників експериментальних тварин, є рівень ембріональної смертності у самиць, запліднених такими самцями. Відомо, що у гризунів формування ембріональних втрат пов'язане із запліднювальною здатністю сперматозоїдів, в основі якої лежать порушення як генетичного, так і негенетичного характеру [396].

Порівняння показників ембріогенезу в групах самиць, запліднених контрольними самцями та самцями з експериментальним алкоголізмом показало суттєвий негативний вплив алкоголю на рівень доімплантаційної

летальності [397], який склав 32%, в той час як в контролі доімплантаційна смертність була на рівні 9,6% (табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Показники ембріо- та фетогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць щурів, запліднених самцями із експериментальним хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі протитуберкульозних засобів

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм +ПТЗ
Кількість вагітних самиць, абс.	13	10	4
Загальна кількість жовтих тіл, абс.	146	128	75
Кількість жовтих тіл на одну самицю,	$11,23 \pm 0,73$	$12,80 \pm 0,90$	$18,75 \pm 1,0^* **$
Загальна кількість місць імплантації, абс.	132	87	46
Кількість місць імплантації на одну самицю, $M \pm m$	$10,15 \pm 0,55$	$8,70 \pm 0,87$	$11,5 \pm 2,15$
Доімплантаційна загибель, абс. / %	17 / 9,58	41 / 32,03	28 / 38,67
Доімплантаційна загибель на одну самицю, $M \pm m$	$1,31 \pm 0,41$	$4,10 \pm 0,88^*$	$2,57 \pm 0,24$
Післяімплантаційна загибель, абс. / %	10 / 7,58	8 / 9,19	46 / 100
Післяімплантаційна загибель на одну самицю, $M \pm m$	$0,76 \pm 0,32$	$0,80 \pm 0,36$	$11,50 \pm 2,15^* **$
Загальна кількість живих плодів, абс. / %	125 / 94,69	81 / 93,10	0 / 0
Кількість живих плодів на одну самицю, $M \pm m$	$9,62 \pm 0,40$	$8,10 \pm 0,82$	0
Загальна ембріональна/фетальна смертність, %	14	37	100

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

Стосовно післяімплантаційної загибелі ембріонів та смертності плодів, то відмінності в зазначених групах тварин не виявлені. Що стосується самиць, спарованих із самцями, яким на тлі алкоголізму вводили ПТЗ, то відсоток доімплантаційної смертності у тварин даної групи не набагато перевищував такий у групі з алкоголізмом, але постімплантаційна смертність сягнула 100 %.

Загальна ембріональна/фетальна смертність потомства в групі тварин з експериментальним алкоголізмом збільшувалась на 22 % порівняно з контролем, тоді як за умов введення на цьому тлі ПТЗ вона була на рівні 100 % (табл. 6.4). Враховуючи 100 %-ну загибель ембріонів та плодів в даній групі дослідження постнатального розвитку в на цьому етапі експерименту не вдалось провести.

Тим не менш по 6 самиць з груп «Контроль» та «Хронічний алкоголізм» були залишені до природних пологів з метою дослідження постнатального розвитку потомства.

Споживання алкоголю щурами-самцями не вплинуло на розмір приплоду спарованих з ними самиць (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Вплив 150-денного споживання 15 % розчину етанолу самцями на деякі показники стану їх потомства у перший день постнатального розвитку

Показники	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
Кількість вагітних самиць, абс.	6	6
Загальна кількість плодів, абс.	56	78
Живі плоди, абс.	56	76
Мертворождені плоди, абс.	0	2
Самиці/самці, %	59 / 41	56 / 44
Співвідношення статей	0,69	0,78

В піддослідній групі було зареєстровано 2 випадки мертвонародження, тоді як у контрольній групі мертвонароджених плодів не виявлено. Відсоток самців у приплодах, отриманих від алкоголізованих самців, дещо перевищував цей показник у приплодах, отриманих від самців контрольної групи (табл. 6.5).

Важливим показником стану потомства є виживання новонароджених щурят протягом перших трьох тижнів постнатального життя, а ключовими термінами для таких спостережень є 4, 7, 14 та 21 дні після народження. Дані таблиці 6.6 свідчать, що в групі тварин, де самці тривало вживали алкоголь, на 4-й та 14-й дні спостережень зростала смертність новонароджених.

Таблиця 6.6

Вплив 150-денного споживання 15 % розчину етанолу самцями на смертність їх потомства у різні періоди постнатального розвитку (абс./ %)

Експериментальні групи	Кількість новонароджених	Смертність у різні терміни спостереження, дні після народження				Загальна смертність, абс. (%)
		4	7	14	21	
		абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	
Контроль	56	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)
Хронічний алкоголізм	76	2 (2,6 %)	- (0 %)	6 (8,0 %)	- (0 %)	7 (10 %)

Загальна смертність в цій групі протягом 21 дня після народження склала 10%, в той час як в контролі загибелі щурят не виявлено (табл. 6.6). У перший день постнатального життя маса одного приплоду в групі, де самці піддавались тривалій алкоголізації, достовірно зростала у порівнянні з контролем. В подальші терміни спостережень ця різниця не сягала порогу статистичної значимості, але тенденція зберігалась (табл. 6.7).

Нормальний фізичний розвиток потомства характеризується вчасною появою тих чи інших зовнішніх ознак, притаманних кожній особині в певний в період постнатального життя. Ці ознаки, рівень та терміни їх прояву також знаходяться під впливом як зовнішніх, так і внутрішніх чинників.

Таблиця 6.7

Вплив 150-денного споживання 15 % розчину етанолу самцями на масу тіла їх потомства у різні періоди постнатального розвитку

Експериментальні групи	Кількість новонароджених	Маса одного приплоду, г				
		1-й день	4-й день	7-й день	14-й день	21-й день
Контроль	56	5,98 ± 0,15	9,38 ± 0,67	11,61 ± 0,99	21,89 ± 2,20	35,05 ± 4,93
Хронічний алкоголізм	76	6,56 ± 0,16*	9,71 ± 0,45	14,67 ± 0,96	24,56 ± 0,89	42,50 ± 4,23

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Спостереження за фізичним розвитком щурят – потомством інтактних самиць та алкогользалежних самців не вплинули на терміни прояву всіх досліджених зовнішніх ознак у потомства (дані не наводяться).

У клінічних неврологічних дослідженнях використовують тести на високу регулярність та відтворюваність мимовільних, уроджених реакцій, наявність або відсутність яких дає важливу інформацію щодо широкого спектру функцій головного мозку. У потомства, що було отримане від інтактних самиць та самців з алкогольною залежністю, було перевірено наявність основних рефлексів (згинання, хапання, перевертання, встановлення лапи на опору, рівноваги, рогівкового, здригання та розчепірювання пальців задніх кінцівок). Показано, що тривале споживання алкоголю щурами самцями не відобразилось

на формуванні рефлексів їхнього потомства. Всі зазначені рефлекси, як у самців, так і у самиць-щурят з обох дослідних груп були в межах норми.

Визначення можливого впливу довготривалого (протягом періоду сперматогенезу) введення 15 % етанолу щурам-самцям на поведінкові реакції їхнього потомства від інтактних самиць досліджували методом «відкритого поля». Результати спостережень наведені в таблиці 6.8.

Таблиця 6.8

Показники поведінкових реакцій потомства, отриманого від інтактних самиць та самців щурів, які протягом 150 днів споживали 15 % розчин етанолу ($M \pm m$; $n=24$)

Показники		Експериментальні групи	
		контроль	хронічний алкоголізм
Латентний період, с		$1,29 \pm 0,20$	$1,03 \pm 0,30$
Горизонтальна активність, кількість квадратів, перетнутих за 3 хв	периферичні	$92,83 \pm 4,60$	$62,09 \pm 6,90^*$
	центральні	$20,50 \pm 2,60$	$12,00 \pm 1,40^*$
Вертикальна активність, кількість стійок за 3 хв		$11,41 \pm 0,94$	$8,40 \pm 1,01^*$
Дослідницька активність, кількість зазирань в нірки за 3 хв		$9,95 \pm 0,78$	$6,37 \pm 0,82^*$
Грумінг, кількість реакцій за 3 хв		$1,25 \pm 0,17$	$1,68 \pm 0,37$
Уринації, кількість за 3 хв		$1,0 \pm 0,18$	$0,90 \pm 0,13$
Дефекації, кількість за 3 хв		$1,25 \pm 0,25$	$1,12 \pm 0,19$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Вони свідчать про істотну зміну локомоторної та емоційної реактивності у потомства щурів-самців, що хронічно піддавались впливу алкоголю, порівняно з контролем. Зокрема, в піддослідній групі було зареєстровано зниження горизонтальної (кількість перетнутих периферичних та центральних квадратів була меншою, ніж у контролі на 32 % та 44 % відповідно), вертикальної (-26 %) та дослідницької (-46 %) активності [398, 399].

Враховуючи, що рухова та дослідницька активність тварин є природним індикатором аналізаторної діяльності мозку та його функціонального стану, можна стверджувати, що введення самцям щурів 15 % етанолу мало віддалені негативні наслідки щодо розвитку центральної нервової системи їхнього потомства. Загалом, отримані нами дані підтверджують залежність психо-емоційного стану потомства від споживання батьком алкоголю та дозволяють припустити можливість посилення негативного впливу за умов введення ПТЗ у разі успішної вагітності.

6.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників

Результати візуального обстеження стану сім'яників щурів показали, що вони були звичайних розмірів та кровонаповнення, без ознак набряку. Необхідно зазначити, що у одного самця із групи тварин, які отримували на тлі хронічного алкоголізму протитуберкульозні препарати, один сім'яник був нетипової (прямокутної) форми та мав меншу масу. Його було виключено при математичному аналізі об'єму та маси сім'яників у цієї групи тварин.

Морфометричні показники стану сім'яників представлені у таблиці 6.9 Згідно наведених даних маса та об'єм тестикул у щурів обох дослідних груп порівняно з відповідними показниками у тварин контрольної групи суттєво не відрізнялися.

Мікроскопічні дослідження сім'яників щурів з контрольної групи не виявили будь-яких структурних змін в сім'яних каналцях. Гемодинамічних порушень та ознак запальної реакції не зареєстровано.

Таблиця 6.9

**Морфометричні показники стану гонад самців щурів з експериментальним
хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі
протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)**

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	хронічний алкоголізм	хронічний алкоголізм +ПТЗ
Маса сім'яників, г	$3,12 \pm 0,24$	$2,93 \pm 0,10$	$3,08 \pm 0,25$
Відносна маса сім'яників, $г \cdot 100 \text{ г маси тіла}^{-1}$	$0,96 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,06$	$0,91 \pm 0,09$
Об'єм сім'яника, $мм^3$	1282 ± 76	1167 ± 85	1413 ± 35

Між сім'яними каналцями в пухкій сполучній тканині не відмічалось збільшення кількості клітинних елементів та сполучнотканинних волокон. Сім'яні каналні на зрізах, як правило, мали округлу або еліпсоподібну форму та були заповнені сперматогенним епітелієм на різних стадіях дозрівання (рис. 6.1).

За умов експериментального алкоголізму нами було виявлено значні деструктивні зміни сперматогенного епітелію. Зокрема в цій групі у порівнянні з контролем спостерігалось збільшення в 1,4 рази відсотку випадків злушення сім'яродного епітелію в просвіт каналцях (рис. 6.2, табл. 6.10).

Крім того, в сім'яниках тварин, що тривало споживали розчин етанолу спостерігались досить численні випадки відшарування епітелію від базальної мембрани та ділянки, позбавлені гермінативних клітин, так звані "вікна" (рис. 6.3, табл. 6.10). Виявлялись деякі клітини з ядрами в стані пікнозу та лізису.

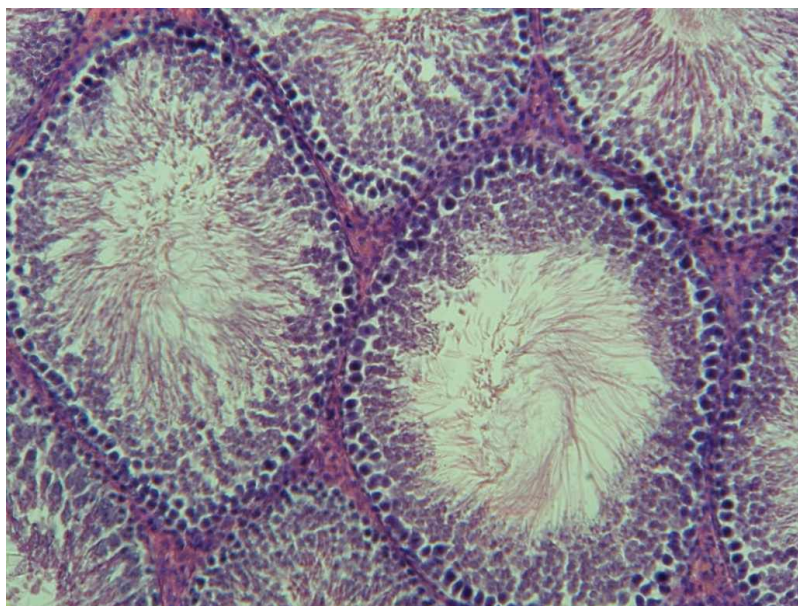


Рис. 6.1. Структура сім'яних канальців не змінена. Контрольна тварина. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 200.



Рис. 6.2 Злуцення сперматогенного епітелію в просвіт канальця в сім'янику щура за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 100.

Нами показано більш значний ступінь ушкодження клітин сім'яників у тварин, яким на тлі споживання алкоголю вводили ПТЗ, порівняно з групою, о піддавалась експозиції лише етанолу. Про це свідчать дані, приведені на

рисунку 6.4 та таблиці 6.10, які демонструють зростання кількості сім'яних канальців із злущеним сперматогенним епітелієм у просвітах за умов введення ПТЗ на тлі алкоголізації.



Рис. 6.3 Канальці з ділянками, позбавленими сперматогенного епітелію («вікна»), в сім'янику щура за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 100.



Рис. 6.4. Зростання числа канальців із злущеним сперматогенним епітелієм у просвітах. Сім'яник щура, якому на тлі експериментального хронічного алкоголізму вводили протитуберкульозні засоби. Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільшення x 100.

За даними морфометричного дослідження стану сперматогенного епітелію, наведеними у табл. 6.10, кількість епітеліальних клітин у просвітах сім'яних каналців, а також ділянок, позбавлених сперматогенного епітелію («вікон»), зростала в обох експериментальних групах. У щурів, які одночасно отримували 15 % розчин етанолу та ПТЗ, ці зміни були більш очевидними. Зокрема, відсоток випадків злушення епітелію в просвіт каналців в групі тварин з хронічним алкоголізмом порівняно з контролем зростав у 4 рази, а у групі з введенням ПТЗ - у 5 разів. Відсоток появи «вікон» збільшувався відповідно у 7 та 9 разів.

Таблиця 6.10

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію у щурів із експериментальним хронічним алкоголізмом та за умов уведення на його тлі протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

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.

Результати, наведені у табл. 6.10, також засвідчують, що у порівнянні з контролем в обох експериментальних групах достовірно знижувався індекс сперматогенезу. У сім'яниках щурів, що вживали алкоголь та тих, яким на цьому тлі вводили ПТЗ, знижувалась кількість сперматогоній на 14% та 20% відповідно. Це можна пояснити негативним впливом як алкоголю, так і ПТЗ на мітотичну активність первинних клітин, які дають популяцію сперматогоній. Одночасно не спостерігалось будь-якої реакції клітин, що підлягають мейотичному поділу та визначаються за показником клітин у XII стадії циклу сперматогенного епітелію: у дослідних та контрольній групах тварин відсоток звивистих каналців, де було чітко видно діакінез (завершальний етап профазі I мейотичного ділення) суттєво не відрізнявся від відповідних значень у тварин інтактної групи.

Таким чином, проведені дослідження за більшістю проаналізованих показників свідчать про поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів, яким на тлі хронічного експериментального алкоголізму вводили ПТЗ.

6.4. Експресія мРНК та протеїну CYP2E1 у печінці та сім'яниках щурів

Окрім АДГ, важливу роль в окисненні етанолу в ацетальдегід відіграє система CYP, у тому числі ізоферменти CYP2E1, 1A2 і 3A4, а також каталаза [154, 155]. Причому за умов хронічного споживання етанолу в його метаболізмі переважно беруть участь ізоферменти цитохрому Р-450. Досить добре дослідженим є вплив етанолу на CYP2E1 у печінці [400]. Але дані стосовно індукції цієї ізоформи в екстрапечінкових тканинах при вживанні етанолу практично відсутні.

Нами було оцінено вплив 150-денного споживання 15 % етанолу та комбінований ефект експериментального хронічного алкоголізму та одночасного введення ПТЗ на транскрипційну активацію CYP2E1 в печінці та сім'яниках щурів [401, 402, 403]. Було проведено ЗТ-ПЛР та відповідні результати наведені на рис. 6.5 та 6.6. Вони виявили наявність тканинспецифічної експресії, яка різнилась в залежності від дослідної групи тварин. Згідно даних, наведених на рис. 6.5 за умов повторних введенень алкоголю та при застосуванні на цьому тлі ПТЗ експресія мРНК CYP2E1 у печінці щурів зростала майже в 5 разів порівняно з контрольною групою.

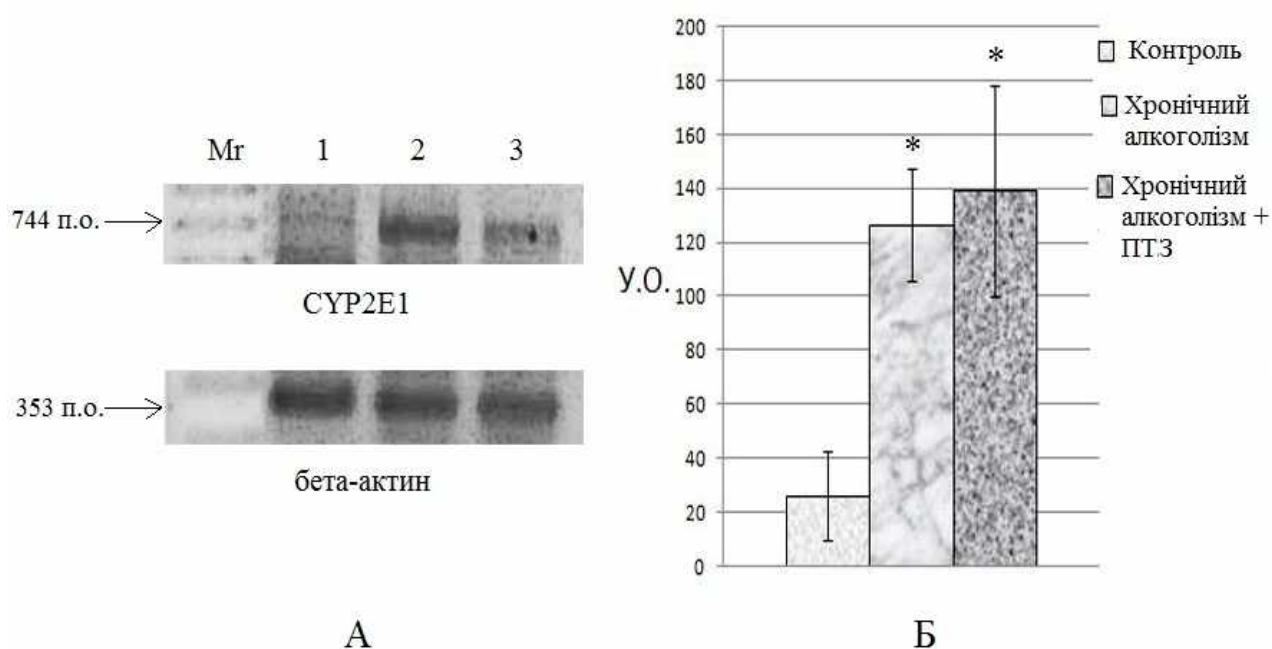


Рис. 6.5. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в печінці щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (1 – контроль; 2–хронічний алкоголізм; 3 – введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму); Б) - відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 - інтенсивність піку β - актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

В той же час ми виявили, що експресія тестикулярної мРНК CYP2E1 у щурів, які тривалий час вживали алкоголь, зростала в 3,6 рази порівняно з контрольною групою (рис. 6.6). Одночасне застосування ПТЗ на тлі довготривалого прийому етанолу викликало більш суттєві зміни експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках, ніж у печінці, даний показник підвищувався в 5,9 разів порівняно з контролем (рис. 6.6).

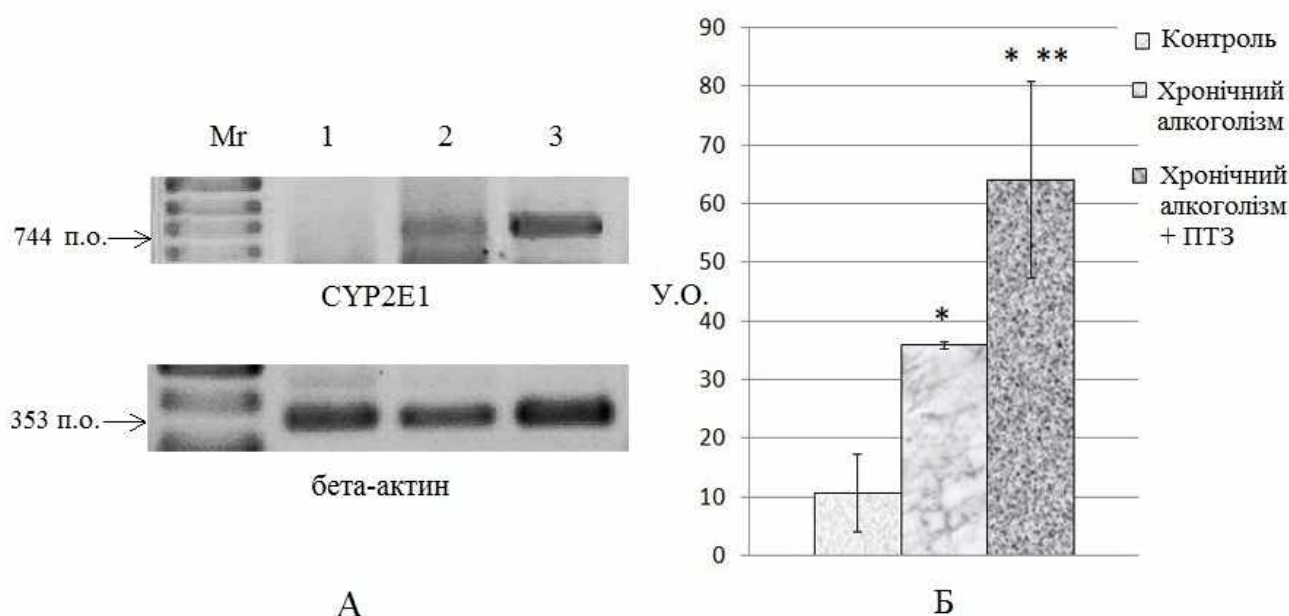


Рис. 6.2. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (1 – контроль; 2–хронічний алкоголізм; 3 – введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму); Б) - відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 - інтенсивність піку β - актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

** - $p \leq 0,05$ порівняно з тваринами з хронічним алкоголізмом

Відомо, що внаслідок тривалої дії етанолу індукція ізоформи CYP2E1

може відбуватись не тільки на трансляційному рівні, а й за рахунок стабілізації білка [123]. Ми оцінили його рівень у печінці та гонадах щурів-самців методом Вестерн-блот. Дані, наведені на рис. 6.7 та 6.8, засвідчують, що паралельно із зростанням експресії гену CYP2E1 у печінці та сім'яниках щурів з хронічним алкоголізмом в 2,2 та 1,4 рази збільшувалась експресія його білка порівняно з тваринами контрольної групи.

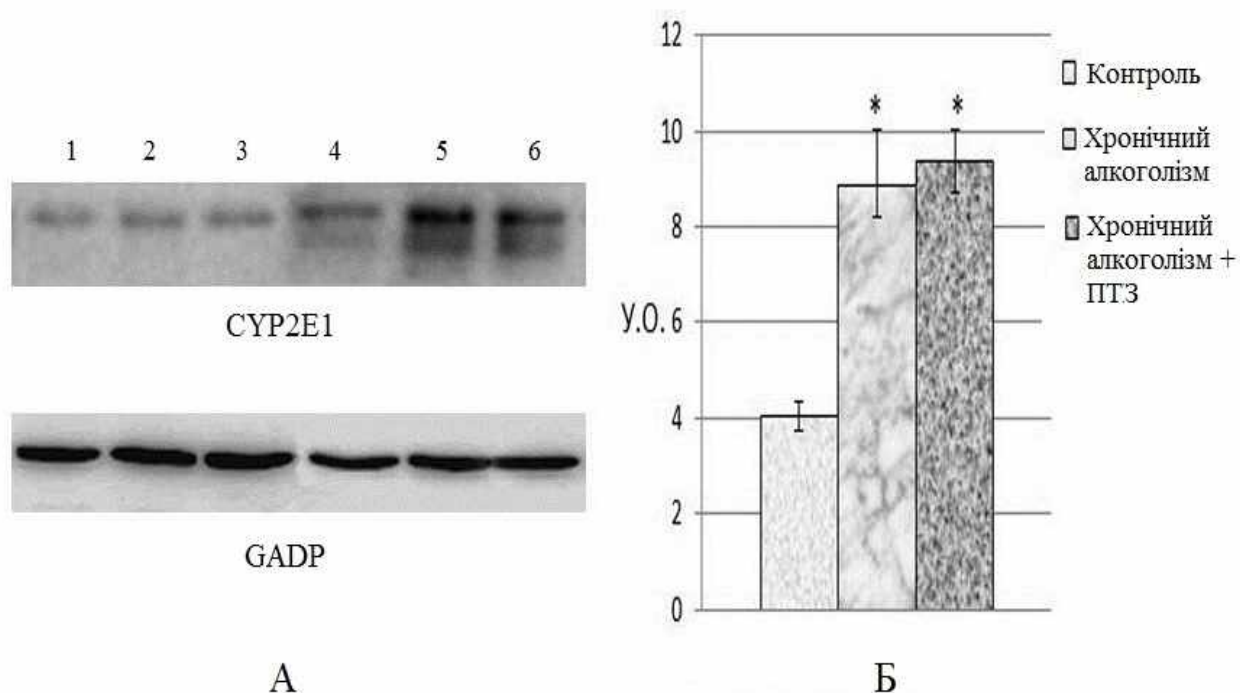


Рис. 6.4. Вміст білка CYP2E1 у печінці щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) вміст білка CYP2E1 згідно Вестерн-блот аналізу зі специфічними поліклональними антитілами до рекомбінантного CYP2E1 (1 та 2 контроль; 3 та 4 хронічний алкоголізм; 5 та 6 введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму). Кожна смужка представляє вміст білка в печінці різних тварин; Б) відносний рівень білка CYP2E1 в лізаті печінки ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

При цьому, за умов застосування ПТЗ на тлі споживання алкоголю на

відміну від експресії мРНК CYP2E1 подальшого росту експресії його білка не виявлено (рис. 6.4).

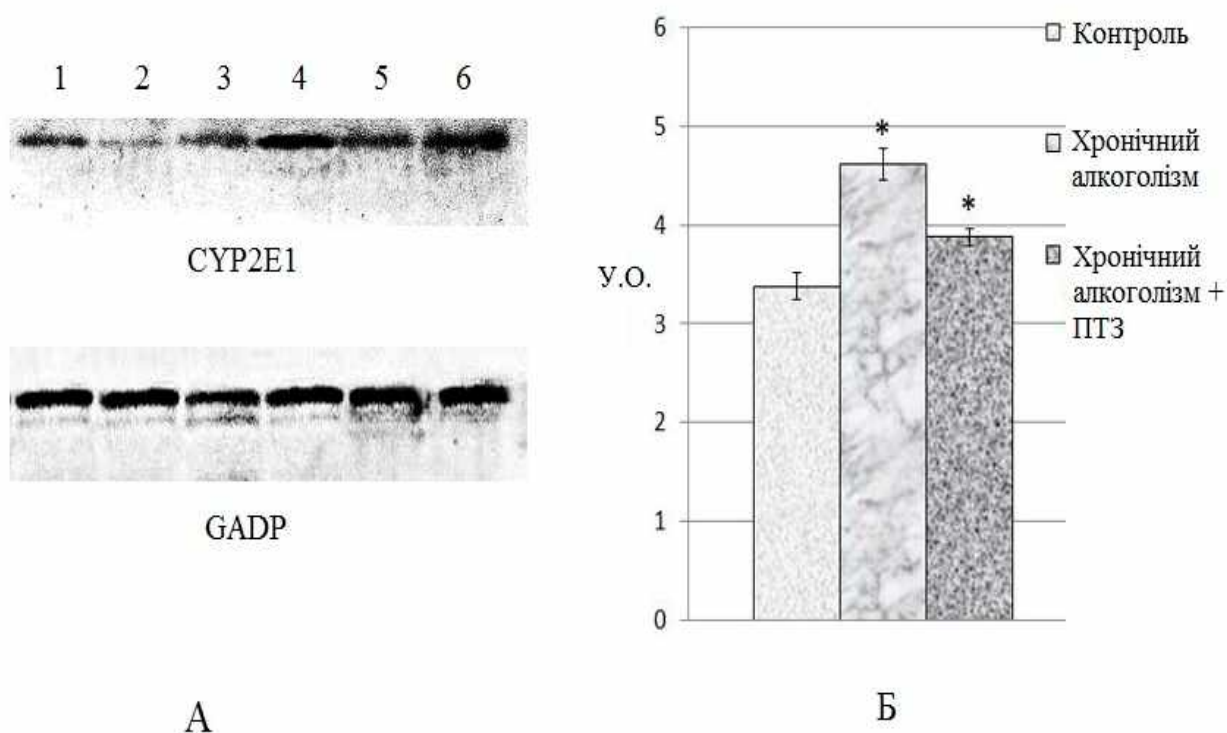


Рис. 6.4. Вміст білка CYP2E1 у сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму: А) вміст білка CYP2E1 згідно Вестерн-блот аналізу зі специфічними поліклональними антитілами до рекомбінантного CYP2E1 (1 та 2 контроль; 3 та 4 хронічний алкоголізм; 5 та 6 введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму). Кожна смужка представляє вміст білка в сім'яниках різних тварин; Б) відносний рівень білка CYP2E1 в лізаті сім'яників ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Загалом, рівень печінкового та тестикулярного протеїну CYP2E1 у щурів даної групи залишався практично на тому ж рівні, що і у тварин, які вживали лише розчин етанолу (у 2,3 та 1,2 рази вище, ніж у контролі). Подібний

феномен можливо пояснюється складними ефектами ПТЗ та етанолу на пост-трансляційну регуляцію CYP2E1.

Таким чином, нами було показано, що за умов хронічного споживання щурами самцями 15 % розчину етанолу та ПТЗ відбувалось зростання експресії гену та протеїну CYP2E1 не тільки у печінці, але і у сім'яниках.

Молекулярна регуляція індукції CYP2E1 досить складна, вона реалізується за транскрипційними, пост-транскрипційними та пост-трансляційними механізмами і залежить від дози, тривалості та способу введення, а також специфічної структури індукуючого агенту. Відомо, що індукція CYP2E1 етиловим спиртом відбувається за пост-транскрипційним механізмом при введенні низьких доз і транскрипційним - високих [404].

Зростання вмісту мРНК CYP2E1 у наших експериментах дозволяє припустити можливість транскрипційної регуляції його експресії або стабілізації мРНК. Проте, значне збільшення вмісту білка CYP2E1, як у печінці, так і у сім'яниках, зокрема може свідчити про стабілізацію даного ізоензиму етанолом і подовження періоду його напіврозпаду [123]. Виявлений нами феномен може вказувати на індукцію CYP2E1 у гонадах щурів-самців та мати велике значення у продукції гонадо- та генотоксичних метаболітів при біотрансформації досліджуваних речовин.

Враховуючи, що етанол є класичним індуктором CYP2E1 на даному етапі досліджень нами було оцінено зв'язок між рівнем мРНК експресії CYP2E1 та кількісними морфометричними показниками, що характеризують стан сперматогенного епітелію у щурів, які тривало споживали алкоголь. Було з'ясовано, що в сім'яниках цих тварин вміст мРНК CYP2E1 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 ($r = 0,99$; $p = 0,001$) [370, 371].

Рівень кореляції між експресією мРНК CYP2E1 в гонадах та порушеннями сперматогенезу дозволяє припустити можливість залучення даного ізоферменту до неспецифічних патогенетичних механізмів чоловічої

субфертильності та інфертильності.

6.5. Стан фрагментації ДНК у печінці та сім'яниках щурів

Оцінка рівня фрагментації ДНК печінки у щурів-самців за умов експериментального хронічного алкоголізму показала її суттєву інтенсифікацію порівняно з контролем (рис. 6.9) [405].

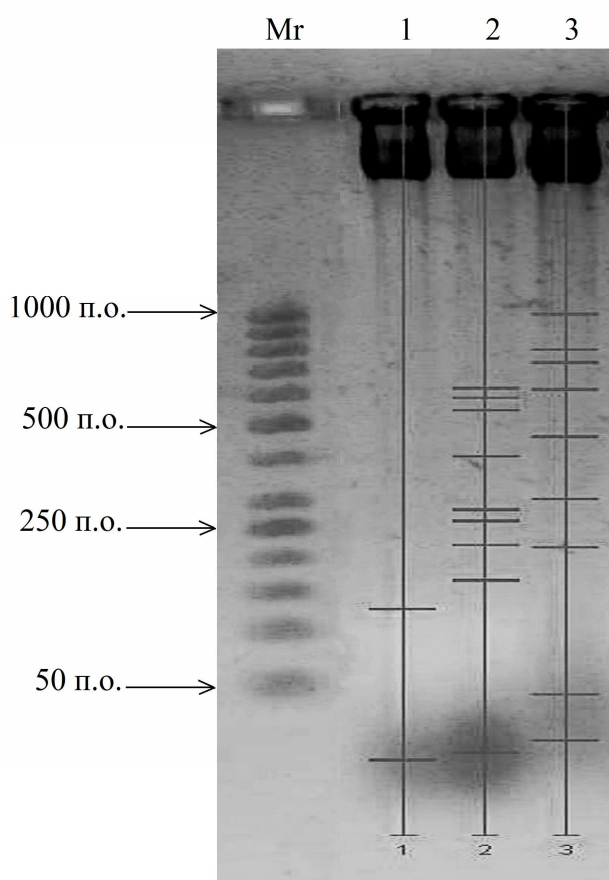


Рис. 3.8. Рівень фрагментації ДНК у печінці щурів-самців за умов споживання 15 % розчину етанолу протягом 150 днів (1 — контроль; 2 — хронічний алкоголізм). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

У печінці тварин контрольної групи були присутні 2 фракції фрагментів ДНК масою 170 і 20 п.о. Основна фракція високомолекулярних фрагментів ДНК

була довжиною 170 п.о., основна фракція низькомолекулярних фрагментів припадала на 20 п.о. (рис. 6.9). У печінці щурів, які тривало споживали алкоголь, були присутні 9 фракцій фрагментів ДНК від 600 до 30 п.о. (рис. 6.9). Основну частину високомолекулярних фрагментів ДНК складали фракції ланцюжків довжиною 600, 550, 500, 400, 280, 250, 200, 150 п.о., тоді як низькомолекулярна фракція ДНК була одна – 30 п.о. За умов введення на тлі алкоголізму ПТЗ також були наявні дев'ять фракцій фрагментів ДНК, але характер фрагментації змінювався – вісім високомолекулярних фракцій складали ланцюжки довжиною 950, 800, 750, 600, 550, 300 і 200 п.о. Низькомолекулярних фракцій було дві і складались вони з олігонуклеотидів довжиною 50 та 40 п.о.

Дослідження фрагментації ДНК в сім'яниках щурів з хронічним експериментальним алкоголізмом та за умов введення на цьому тлі ПТЗ продемонструвало її істотну інтенсифікацію порівняно з контрольною групою (рис. 6.10) [406]. У сім'яниках тварин контрольної групи були присутні лише дві низькомолекулярні фракції фрагментів ДНК довжиною 50 та 20 п.о. При цьому у тканинах сім'яників щурів з експериментальним алкоголізмом виявили чотири різні високомолекулярні фракції олігонуклеотидів у діапазоні від 400 до 150 п.о. та дві низькомолекулярні фракції – 50 та 20 п.о. За умов введення на тлі алкоголізму ПТЗ також були наявні шість фракцій фрагментів ДНК, але характер фрагментації змінювався порівняно з групою без уведення фармакологічних засобів. А саме, п'ять високомолекулярних фракцій складали ланцюжки довжиною 900, 700, 500, 300 і 100 п.о. Низькомолекулярна фракція була одна і складалась з олігонуклеотидів довжиною 20 п.о.

Виявлений нами високий рівень фрагментації ДНК в сім'яниках тварин з алкоголізмом та за умов введення ПТЗ свідчить про запуск процесів апоптозу, який може бути, в тому числі, кінцевим результатом дерегуляції систем контролю сперматогенезу [407].

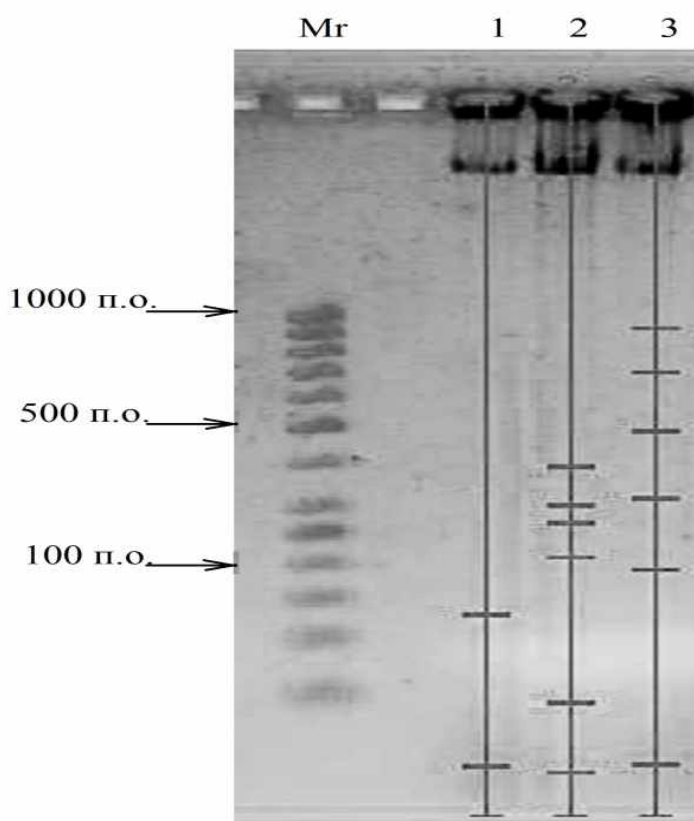


Рис. 6.10. Рівень фрагментації ДНК у сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму (Mr – маркер; 1 – контроль; 2 – хронічний алкоголізм; 3 - введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму). Аналіз проведено з використанням програмного забезпечення Quantity One.

Підрахунок відносного вмісту фрагментів ДНК різної молекулярної маси у печінці та сім'яниках показав, що в обох піддослідних групах їх відсоток перевищував такий у контролі більше ніж у 4 рази (табл. 6.11). Значного зростання даного показника за умов комбінованої дії алкоголю та ПТЗ не виявлено. Але, певним чином, змінювався характер пошкодження структури ДНК та її деградації до рівня олігонуклеотидів.

Таблиця 6.11

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси в сім'яниках щурів із експериментальним хронічним алкоголізмом за умов введення протитуберкульозних засобів або без нього

Експериментальні групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК	
	печінка	сім'яники
Контроль	6,1	6,7
Хронічний алкоголізм	26,7	29,4
Хронічний алкоголізм + ПТЗ	33,4	32,6

На сьогодні відомо, що етанол індукує апоптоз за двома різними шляхами: модуляцією проникності мітохондрій та підвищуючою регуляцією експресії CD95-Fas ліганду [408, 409]. Припускаємо, що гіперпродукція АФК мітохондріями, обумовлена метаболізмом ацетальдегіду, та індукцією CYP2E1 (як етанолом, так і ПТЗ) можуть бути загальним тригером обох механізмів. Загалом одержані результати узгоджуються із даними інших авторів, що відзначали можливість синергізму впливу індукції CYP2E1 етанолом та інших токсичних речовин на процеси апоптозу [410].

6.6. Метаболічні зміни в організмі щурів-самців

На сьогодні накопичено значну кількість важливих даних стосовно токсичних ефектів етилового спирту, пов'язаних з його метаболізмом в організмі та їх глибокий аналіз чітко демонструє, скільки ще лишилось невирішених питань [411]. Незважаючи на високий рівень зловживання алкоголем, його тяжкі наслідки та інтенсивні дослідження, увесь комплекс метаболічних порушень за алкоголізму залишається недостатньо вивченим. Це стосується і повного спектру факторів, що лімітують та регулюють метаболізм

алкоголю *in vivo* [411]. Стосовно ж метаболічних змін в організмі за умов комбінованої дії ПТЗ та алкоголю дані практично відсутні.

Результати вивчення активності NO-синтази печінки самців-щурів після 150-денного споживання алкоголю наведені на рисунку 6.11.

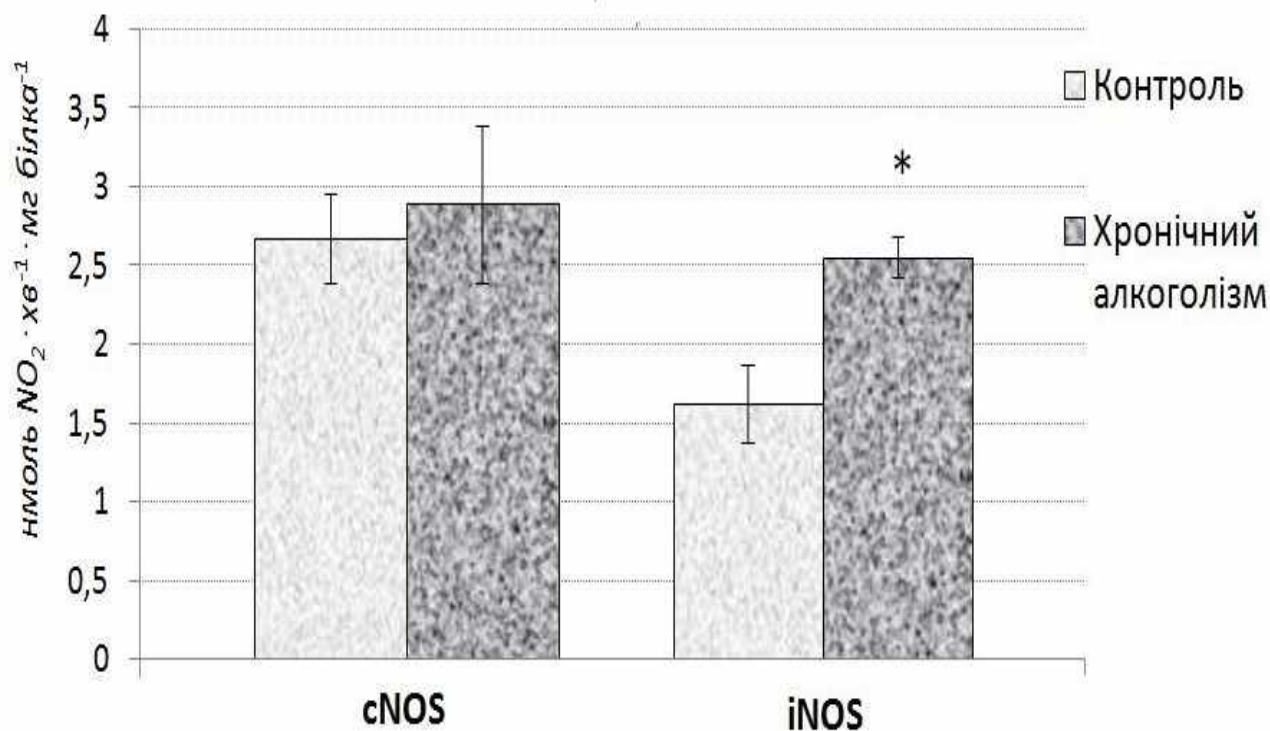


Рис. 6.11. Активність cNOS та iNOS у печінці щурів-самців за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Вони засвідчують, що за даних умов експерименту активність cNOS знаходилась в межах норми. У той же час активність iNOS зростала в 1,6 рази порівняно з контролем [405].

Згідно даних, наведених у таблиці 6.12, у печінці алкоголізованих тварин спостерігалось порушення про- та антиоксидантної рівноваги.

Порівняно з контрольною групою хронічне введення 15 %-ного етанолу призводило до зростання швидкості утворення ТБК-реактивів більше, ніж вдвічі за одночасного зниження активності антиоксидантних ферментів – СОД

та каталази на 30 % та 49 % відповідно. Таким чином, внаслідок тривалого споживання алкоголю в організмі щурів відбувався розвиток оксидативного та стресу та зростання активності iNOS.

Таблиця 6.12

Стан про- та антиоксидантної системи печінки щурів-самців за умов споживання 15%-ного розчину етанолу протягом 150 днів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
Швидкість аскорбатзалежного утворення ТБК-реактивних, нмоль $\cdot$ хв ⁻¹ $\cdot$ мг білка ⁻¹	177,07 $\pm$ 3,08	374,91 $\pm$ 10,57*
Активність СОД, УО. $\cdot$ хв ⁻¹ $\cdot$ мг білка ⁻¹	4,60 $\pm$ 0,06	2,34 $\pm$ 0,15*
Активність каталази, нмоль H ₂ O ₂ $\cdot$ хв ⁻¹ $\cdot$ мг білка ⁻¹	13,65 $\pm$ 0,29	9,41 $\pm$ 0,17*

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Беручи до уваги, що характер змін в амінокислотному складі при алкоголізмі може бути свідченням значних загальних порушень обміну білків [412] нами було досліджено вміст вільних амінокислот сироватки крові щурів-самців, що протягом 150 днів замість питної води споживали 15 % розчин етанолу [405].

За даних умов експерименту нами було зафіксовано статистично значимі зміни для 8 амінокислот (табл. 6.13). Вміст аспарагінової кислоти (-19 %), серину (-30,5 %), гліцину (-11 %), аланіну (-8 %), валіну (-16 %) знижувався, а вміст гістидину (+ 56 %), метіоніну (+ 42 %) та фенілаланіну зростав (+ 19 %). Як видно з табл. 3.2 найбільш глибокі зміни порівняно з контролем були зареєстровані щодо гістидину та метіоніну.

Виявлені нами на рівні цілісного організму патологічні зміни метаболізму

амінокислот можуть впливати на метаболізм колагену [413].

Ми також проаналізували вплив експериментального хронічного алкоголізму на амінокислотний склад колагену [414].

Таблиця 6.13

Вміст вільних амінокислот (залишків/1000 залишків) у сироватці крові щурів-самців за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів (M ± m, n ≥ 6)

Амінокислота	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
1	2	3
Лізин	4,37 ± 0,35	4,31 ± 0,31
Гістидин	0,50 ± 0,05	0,78 ± 0,01*
Аргінін	3,29 ± 0,33	3,74 ± 0,11
Орнітин	1,42 ± 0,53	1,39 ± 0,40
Аспарагінова кислота	1,15 ± 0,05	0,93 ± 0,03*
Треонін	2,05 ± 0,35	1,58 ± 0,08
Серин	2,61 ± 0,20	2,00 ± 0,10*
Глутамін	4,62 ± 0,45	4,75 ± 0,50
Загальна сума амінокислот	40,21 ± 2,40	39,14 ± 2,59
Глутамінова кислота	4,49 ± 0,45	4,68 ± 0,30
Пролін	1,86 ± 0,15	1,88 ± 0,10
Гліцин	2,67 ± 0,05	2,40 ± 0,01*
Аланін	4,77 ± 0,09	4,40 ± 0,10*
Цистеїн	0,50 ± 0,10	0,32 ± 0,10
Валін	1,62 ± 0,03	1,40 ± 0,08*

Продовження таблиці 6.13

1	2	3
Метіонін	$0,33 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,03^*$
Ізолейцин	$0,60 \pm 0,10$	$0,62 \pm 0,07$
Лейцин	$1,35 \pm 0,12$	$1,41 \pm 0,10$
Тирозин	$1,18 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,06$
Фенілаланін	$0,83 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,03^*$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Результати стосовно змін вмісту амінокислот колагену I типу шкіри щурів, індукованих довготривалим споживанням 15 % етанолу, наведені у таблиці 6.14.

Колаген I типу шкіри алкоголізованих щурів-самців у порівнянні з контрольною групою містив значно менше залишків лізину (-12,4 %), глутамінової кислоти (-9,04 %), серину (-11,9 %), проліну (-3,7 %), аланіну (-9,8 %), валіну (-22,3 %), залишків фенілаланіну (-16,7 %), одночасно з більш високим вмістом гідроксипроліну (+25,1 %), гліцину (+2,7 %) та треоніну (+10,1 %) [415].

Виявлені нами, індуковані етанолом зміни у амінокислотному складі колагену можуть спричиняти порушення його фізико-хімічних властивостей. Залишки лізину разом з гідроксилізином та гістидином [416] беруть участь у зшиванні колагену. Порушення співвідношення між залишками гідроксилізину : лізину : гістидину серйозно впливає на кількість та тип перехресних зв'язків у колагенових фібрилах. Це, в свою чергу, викликає зміни механічної міцності, еластичності/жорсткості позаклітинного матриксу. Наші результати стосовно змін кількості залишків лізину узгоджуються з даними інших авторів, що фіксували зміни числа міжмолекулярних зшивок в молекулах колагену тканин алкоголізованих тварин [417].

Таблиця 6.14

Вміст амінокислот (залишків/1000 залишків) у колагені І типу шкіри щурів-самців за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів (M ± m, n = 6)

Амінокислота	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
1	2	3
Гідроксилізін	4,30 ± 0,28	4,60 ± 0,90
Лізін	29,80 ± 0,70	26,10 ± 0,62*
Гістидин	4,69 ± 0,40	4,70 ± 0,20
Аргінін	49,80 ± 3,60	48,80 ± 1,24
Гідроксипролін	90,90 ± 1,30	113,0 ± 2,60*
Аспарагінова кислота	46,70 ± 4,10	48,90 ± 3,96
Треонін	17,80 ± 0,20	19,60 ± 0,40*
Серин	38,80 ± 0,20	34,20 ± 0,20*
Глутамінова кислота	75,20 ± 0,50	68,40 ± 2,40*
Пролін	127,10 ± 0,70	122,40 ± 0,80*
Гліцин	323,70 ± 2,70	332,56 ± 1,22*
Аланін	104,40 ± 3,10	94,20 ± 1,36*
Валін	27,10 ± 0,60	21,05 ± 0,95*
Метіонін	6,20 ± 0,10	6,80 ± 1,90
Ізолейцин	10,80 ± 0,80	11,80 ± 1,87
Лейцин	29,20 ± 1,70	29,10 ± 5,25
Тирозин	3,70 ± 0,20	3,80 ± 0,32
Фенілаланін	12,00 ± 0,50	10,00 ± 0,30*

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Також не ідуть в розріз із попередніми результатами і виявлені нами зміни кількості амінокислотних залишків проліну та гідроксипроліну в колагені щурів з експериментальним хронічним алкоголізмом [418, 419]. Показані за наших умов експерименту зміни в кількості амінокислотних залишків глутамінової кислоти, серину та треоніну можуть призводити до значної модуляції поверхневого заряду молекули колагену [412, 420], тоді як зміни кількості залишків валіну, аланіну та фенілаланіну можуть справляти вплив на рівень жорсткості та пружності колагенової спіралі [412]. Крім того, відзначені нами зміни кількості залишків гліцину впливають на кількість доменів Arg-Gly-Asp, які відповідають за процеси адгезії клітин до колагенових структур [421, 422, 423]. Залишки гліцину в молекулі колагену також є частиною спеціальних локусів, відповідальних за взаємодію з шаперонами та перетворення проколагену в колаген [424]. Таким чином, отримані нами дані засвідчують наявність якісних змін колагену I типу у щурів, що хронічно вживали алкоголь. Вони можуть бути причиною порушень структури спіралі колагену, її поверхневого заряду, жорсткості та пружності, кількості та типів перехресних зв'язків і специфічних локусів, які відповідають за адгезію клітин, взаємодію з шаперонами та перетворення проколагену на колаген. Можна припустити, що такі пертурбації викликані прямим впливом етанолу та продуктів його обміну на синтез колагену [425]. Крім того, на метаболізм колагену також можуть впливати патологічні зміни обміну амінокислот на рівні цілісного організму [409]. Для більшості амінокислот *in vitro* була встановлена здатність регулювати біосинтез білка на рівні трансляції шляхом стимуляції 70kD-рибосомальної протеїн-S6-кінази [426]. З іншого боку, беручи до уваги наявність поліморфізму генів колагену [427,428], такі події можуть бути також результатом порушення показників транскрипції різних генів з того ж суперсімейства колагену типу I, як це було раніше показано для *osteogenesis imperfecta* [429]. На нашу думку, порушення в структурі молекул колагену за умов тривалої алкогольної інтоксикації можуть впливати на властивості та нормальне функціонування сперматогенного епітелію та інших тканин репродуктивних органів. Також

можна припустити, що опосередковані хронічним споживанням етанолу структурні зміни колагену частково можуть бути спричинені АФК, продукція яких зростає внаслідок індукції CYP2E1 [123]. АФК опосередковують паракринну стимуляцію синтезу колагену І типу на різних стадіях цього процесу [430]. Вони можуть бути причиною порушень структури спіралі колагену, її поверхневого заряду, жорсткості та пружності, кількості та типів міжмолекулярних зшивок і специфічних локусів, які відповідають за адгезію клітин, взаємодію з шаперонами та перетворення проколагену на колаген [431]. Можливо, що подібні зміни викликані, в тому числі, прямим впливом етанолу та продуктів його обміну на синтез колагену [432].

І нарешті, дослідження впливу хронічного алкоголізму на пул вільних амінокислот у сім'яниках щурів показало статистично значущі зміни для 5 амінокислот та їх загальної суми (табл. 6.15). А саме, знижувались вміст лізину (-54 %), аргініну (-52 %), серину (-31 %) та гліцину (-46 %) за одночасного підвищення вмісту метіоніну (+133 %). Таким чином, найбільш визначні зміни були зареєстровані стосовно вмісту лізину та метіоніну [402].

Таблиця 6.15

Вміст амінокислот (мг/100 г тканини) у сім'яниках щурів за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів ($M \pm m$, $n = 6$)

Амінокислота	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
1	2	3
Лізін	$2,60 \pm 0,30$	$1,20 \pm 0,10^*$
Гістидин	$0,40 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,12$
Аргінін	$1,30 \pm 0,20$	$0,63 \pm 0,07^*$
Орнітин	$0,60 \pm 0,20$	$0,52 \pm 0,10$
Аспарагінова кислота	$9,70 \pm 3,10$	$8,80 \pm 2,50$

Продовження таблиці 3.4

1	2	3
Треонін	$2,20 \pm 0,10$	$2,40 \pm 0,10$
Серин	$2,60 \pm 0,10$	$1,80 \pm 0,09^*$
Глутамінова кислота	$34,60 \pm 3,50$	$33,20 \pm 4,10$
Пролін	$3,00 \pm 0,80$	$3,90 \pm 0,40$
Гліцин	$11,80 \pm 2,30$	$6,40 \pm 0,70^*$
Аланін	$8,00 \pm 1,30$	$9,10 \pm 1,00$
Цистеїн	$0,70 \pm 0,20$	$0,50 \pm 0,10$
Валін	$0,80 \pm 0,20$	$0,36 \pm 0,08$
Метіонін	$0,30 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,10^*$
Ізолейцин	$0,60 \pm 0,20$	$0,34 \pm 0,05$
Лейцин	$0,70 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,09$
Тирозин	$1,10 \pm 0,30$	$0,62 \pm 0,04$
Фенілаланін	$1,40 \pm 0,40$	$1,98 \pm 0,06$
Глутамін	$16,10 \pm 3,50$	$12,70 \pm 2,80$
Загальна сума амінокислот	$108,10 \pm 4,70$	$85,95 \pm 2,80^*$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Це може свідчити про порушення метаболізму аденозинтрифосфату (АТФ) та НАДФН як на стадії гліколізу (зміни вмісту гліцину та серину), так і в циклі лимонної кислоти (зміни вмісту метіоніну) [433]. Наявність змін у циклі лимонної кислоти підтверджують і наші дані стосовно активності СДГ в клітинах сім'яників, а припущення про можливість порушень метаболізму АТФ та НАДФН добре узгоджується з результатами щодо змін активності тестикулярної ЛДГ [395].

Серин і аргінін можуть виступати як депо NO, який не тільки відповідає за розслаблення судин, але також взаємодіє з атомами заліза (гемового і вільного), з супероксидними аніонами, молекулами кисню, гідропероксидом, органічними пероксидами та перекисними радикалами [434]. Крім того, аргінін володіє антиоксидантною і потужною імуномодулюючою дією та може виступати попередником біосинтезу поліамінів, що регулюють в організмі процеси проліферації клітин [435]. Таким чином, зміни вмісту серину та аргініну в сім'яниках за умов нашого експерименту можуть негативно впливати на рівень NO, показники ПОЛ та функціонування судинної системи, як сім'яників, так цілісного організму.

Виявлені нами зміни вмісту метіоніну в пулі сім'яників заслуговують на особливу увагу. Дана амінокислота може діяти як антиоксидант та імуномодулятор [436, 437]. Крім того, вона є попередником таурину, глутатіону - антиоксидантів та стабілізаторів мембран, впливаючи на склад мембранних ліпідів [438]. Метіонін є попередником поліамінів - стимуляторів та регуляторів процесів проліферації [439]. Зміни в циклі метіоніну тісно пов'язані з порушеннями обміну холестерину (також були виявлені нами у сім'яниках щурів з алкогольною залежністю) та порушеннями, що передують молекулярним ознакам запалення [440]. Зростання вмісту метіоніну в сім'яниках щурів за умов нашого експерименту, можливо, пояснюється захисними компенсаторними механізмами. Можна припустити також, що мало місце порушення біосинтезу S-аденозилгомоцистеїну і гомоцистеїну. На це вказують зміни вмісту амінокислот, що беруть участь у синтезі цих сполук (метіоніну, гліцину та серину) [439]. Таке припущення добре узгоджується з даними інших авторів, які показали, що викликане алкоголем пошкодження органів, пов'язане зі зниженням співвідношення S-аденозил-1-метіонін/S-аденозил-1-гомоцистеїн та виснаженням пулу мітохондріального глутатіону, який підвищує чутливість клітин до фактора некрозу пухлини (TNF) [441]. Результатом модуляції обміну гомоцистеїну може бути накопичення гідропероксидів та порушення процесів репарації ДНК [69, 439].

Зміни в пулі сім'яників вмісту такої амінокислоти як гліцин, мають особливе значення завдяки її залученню (разом з іншими амінокислотами) до біосинтезу глутатіону [442]. Оскільки глутатіон реалізує транс-мембранний перенос амінокислот, коливання його концентрації можуть призводити до модуляції вмісту вільних амінокислот, особливо есенціальних [443]. У сім'яниках алкоголізованих щурів ми також відзначали статистично значущі зміни вмісту амінокислот, залучених до біосинтезу пуринів і піримідинів (гліцин та серин) [444], що може впливати на процеси метаболізму нуклеотидів і нуклеїнових кислот та стан хромосом.

При цьому загальна сума амінокислот в сім'яниках тварин, що споживали алкоголь знижувалась порівняно з контрольною групою на 20,5 % (табл. 6.15). Зниження вмісту вільних амінокислот у сім'яниках піддослідних тварин може, зокрема, призводити до порушення функції клітин Сертолі та, як наслідок, процесів сперматогенезу в цілому.

Одночасно в тканинах сім'яників тварин з хронічним алкоголізмом зростав вміст загального та етерифікованого холестерину на 25 % та 45 % відповідно (табл. 6.16) [401].

Таблиця 6.16

Вміст холестерину та SH-груп білків у сім'яниках щурів за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи	
	контроль	хронічний алкоголізм
Загальний холестерин, мкмоль · мг білка ⁻¹	3,98 ± 0,63	4,98 ± 0,39*
Вільний холестерин, мкмоль · мг білка ⁻¹	1,34 ± 0,07	1,51 ± 0,17
Етерифікований холестерин, мкмоль · мг білка ⁻¹	2,64 ± 0,68	3,84 ± 0,36*

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Наші результати щодо вмісту холестерину в сім'яниках алкоголізованих щурів добре узгоджуються з даними інших авторів, які продемонстрували, що хронічний вплив етанолу викликає значне підвищення рівня тестикулярного холестерину, вільних жирних кислот, фосфоліпідів та тригліцеридів [445]. Але в наших експериментах ми вперше продемонстрували різний ступінь змін у різних фракціях холестерину. Високий рівень холестерину в сім'яниках на тлі етанол-опосередкованого пригнічення синтезу тестостерону [446, 447, 448] може спостерігатись за безпосередньої взаємодії етанолу з шляхами біосинтезу та/або метаболічної активації тестостерону. Зміни в пулі холестерину сім'яників здатні модулювати процеси біосинтезу тестостерону в клітинах Лейдіга. Тестостерон та його метаболічно активований продукт – дигідротестостерон - мають вирішальне значення для розвитку чоловічої репродуктивної системи та сперматогенезу [449].

Результати нашого дослідження свідчать, що застосування ПТЗ у терапевтичних дозах на тлі хронічного алкоголізму призводило до зростання активності *p*-нітрофенолгідроксилази (маркера CYP2E1) у мікросомній фракції клітин печінки в 1,5 рази порівняно з групою «хронічний алкоголізм» та втричі порівняно з контрольною групою (рис. 6.12).

Тобто, за результатами вивчення ферментативної активності CYP2E1 його індукція за умов уведення ПТЗ щурам з хронічним алкоголізмом була у 1,5 рази вищою, ніж та, яку викликали повторні введення 15 %-ного розчину етанолу.

Збільшення ферментативної активності ізоформи CYP2E1 є одним із потужних промоторів розвитку оксидативного стресу [123]. Крім того, добре відомо, що усі три шляхи метаболізму етанолу, до яких залучені алкогольдегідрогеназа, мікросомальна етанол-окиснююча система та каталаза також пов'язані з розвитком оксидативного стресу. В усіх трьох варіантах продукуються вільні радикали, що справляють вплив на анти- та прооксидантну рівновагу в організмі [157].

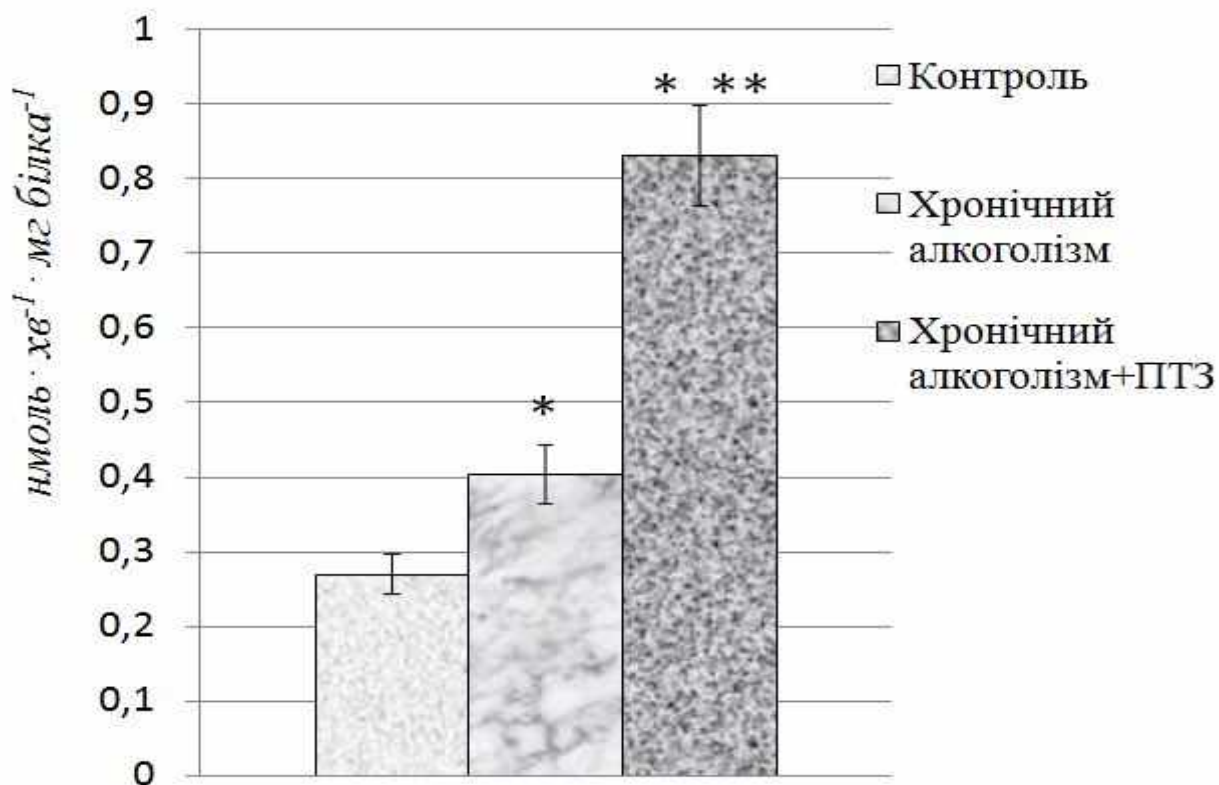


Рис. 6.5. Активність *p*-нітрофенолгідроксилази в печінці щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

** - $p \leq 0,05$ порівняно з тваринами з хронічним алкоголізмом

Зокрема для гідроксиетилу, супероксиданіону та гідроксильних радикалів них характерне недовге існування, нестабільність і активна взаємодія з молекулами клітин [155].

Це цілком узгоджується з отриманими нами результатами, які свідчать про виразну тенденцію до зростання активності НАДФН-залежного ПОЛ у мікосомах печінки щурів з хронічним алкоголізмом та статистично значимого збільшення цього показника (на 82 %) за умов введення на цьому тлі ПТЗ (рис. 6.13).

Наведені результати щодо пріоритетного підвищення рівня саме

ферментативного ліпопереокислення є ще одним свідченням залучення до процесів CYP2E1 [123].

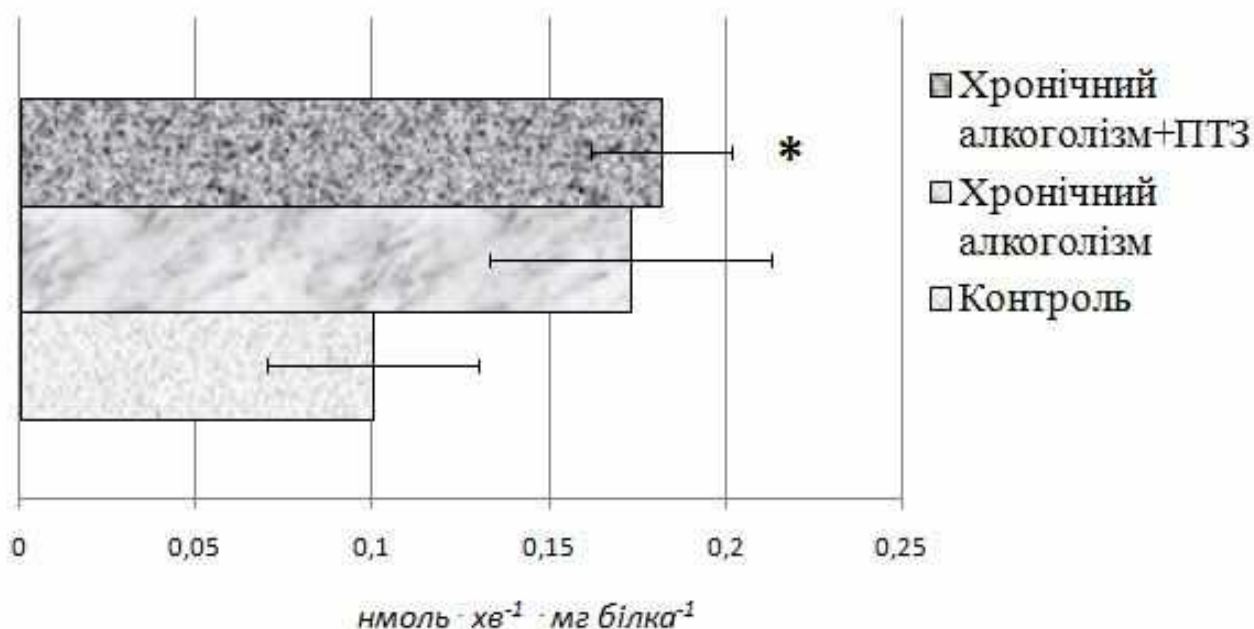


Рис. 6.13. Швидкість утворення ТБК-реактивів у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

У постмітохондріальній фракції печінки щурів, що тривало вживали алкоголь, в тому числі одночасно з ПТЗ нами було виявлено підвищення активності глутатіон-S-трансферази відповідно на 40 % та 44 % порівняно з контролем (рис. 6.14). Це може бути свідченням активної детоксикації електрофільних метаболітів за участю даного ферменту.

Відомо, що ізоформи глутатіон-S-трансферази присутні не тільки у печінці, а і в тканинах інших органів, включаючи сім'яники, де також відбувається кон'югація токсичних метаболітів з глутатіоном. Ці ферменти можуть відігравати значну захисну роль під час протікання критичних стадій сперматогенезу. Зокрема, глутатіон-S-трансферази діють як антиоксиданти і

захищають сперматозоїди від окисного стресу [450].

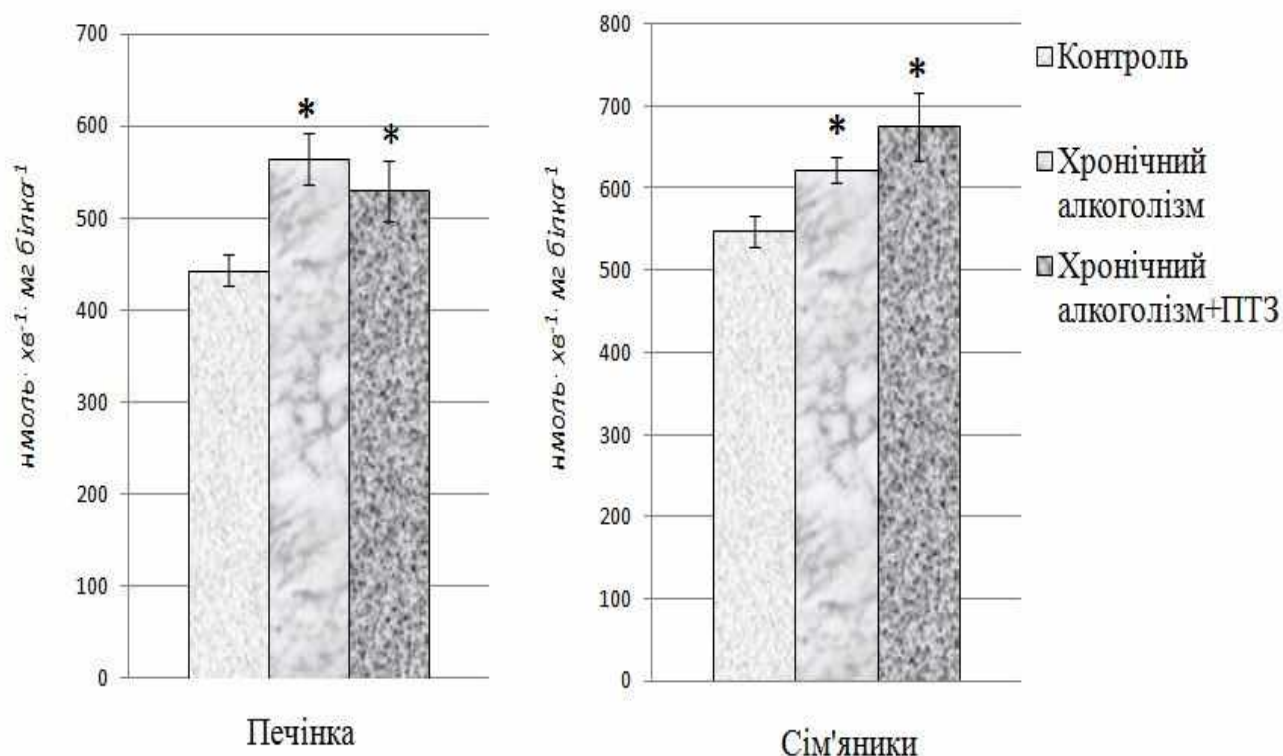


Рис. 6.14. Активність глутатіон-S-трансфери у постмітохондріальній фракції печінки та сім'яників щурів за умов уведення протитуберкульозних засобів на тлі хронічного алкоголізму ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Разом з тим нами було виявлено зміни вмісту відновленого глутатіону та SH-груп білків у тварин з хронічним алкоголізмом та тих, що на цьому тлі отримували комбінацію ПТЗ (таблиця 6.17). Характерно, що за умов тривалого споживання 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 в контрольній групі.

Зміни ж вмісту SH-груп білків мали однакову спрямованість, як в групі

щурів, що на тлі споживання отримували ПТЗ, так і без них. Даний показник в обох групах знижувався в середньому на 36 % порівняно з контролем.

Таблиця 6.17

Вміст відновленого глутатіону та SH-груп білків у сім'яниках щурів за умов уведення 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 ⁻¹	5,75 ± 0,29	9,64 ± 0,81*	3,94 ± 0,39* **
SH-групи білків, мкмоль · мг тканини ⁻¹	9,65 ± 0,49	5,94 ± 0,70*	6,27 ± 1,22*

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

В сім'яниках щурів, що на тлі хронічного експериментального алкоголізму отримували ПТЗ з використанням гістохімічних методів було проведено дослідження активності важливих ферментів енергетичного обміну СДГ (цикл Кребса) та ЛДГ (гліколіз). Вивчення гістотопографії СДГ в тканині сім'яників цих тварин показало, що активність даного ензиму суттєво знижувалась в порівнянні з такою у контрольних тварин та тих, що тривало споживали етанол (рис. 6.15). На рис. 6.15 Б та В видно прогресуюче фокальне зменшення числа скупчень диформазау у всіх шарах сперматогенного епітелію.

В протилежність цьому активність ЛДГ зростала у всіх шарах сперматогенного епітелію дослідних тварин, причому у щурів, яким на тлі хронічного алкоголізму вводили ПТЗ, набагато перевищувала таку у інтактних тварин (рис. 6.16)

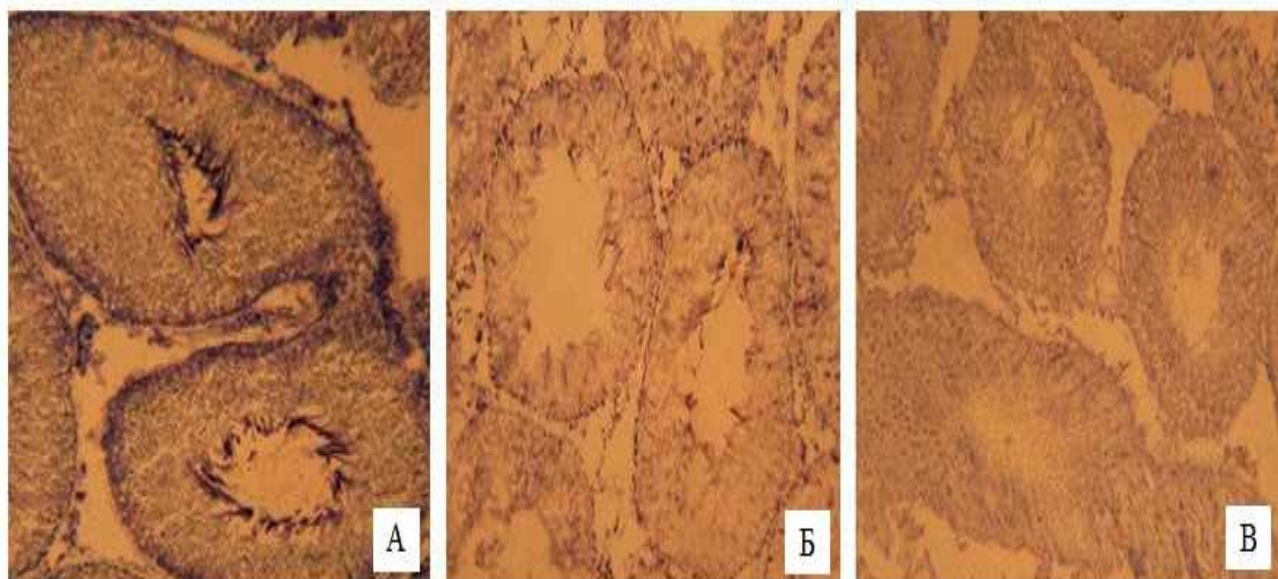


Рис. 6.15. Активність СДГ в сім'яниках щурів: А - контроль; Б – осередковане зниження ферментативної активності за умов споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів; В - значне послаблення ензиму у сім'янику щура, якому на тлі алкоголізації вводили протитуберкульозні засоби. Метод Nachlas та співавт., Збільшення x 200.

Зниження активності СДГ в окремих сім'яних канальцях може призвести до послаблення аеробних окислювальних процесів в гермінативному епітелії та порушення енергетичного забезпечення клітин, що диференціюються.

З іншого боку виявлене нами зростання активності ЛДГ – ферменту гліколізу може розглядатись, як прояв компенсаторних можливостей гонад.

Таким чином, хронічне споживання щурами-самцями 15 % етанолу призводило до складних метаболічних змін на різних рівнях організму, які одночасно характеризують структуру макромолекул клітин, метаболізм та розвиток оксидативного/нітрозативного стресу. Введення щурам-самцям на тлі хронічного експериментального алкоголізму ПТЗ призводило до поглиблення метаболічних порушень в сім'яниках.

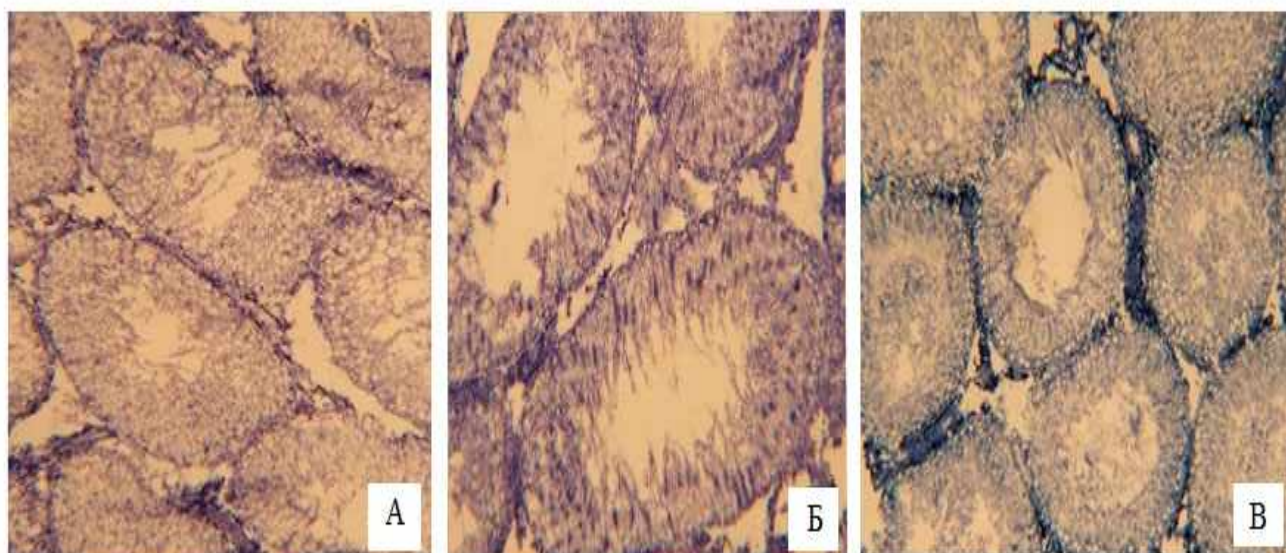


Рис. 6.16. Активність ЛДГ в сім'яниках щурів: А - контроль; Б – підвищення ферментативної активності за умов споживання 15 % розчину етанолу протягом 150 днів; В - значне посилення активності ензиму на тлі хронічної алкоголізації та введення протитуберкульозних засобів. Метод Hess та співавт., Збільшення x 200.

Показані в наших експериментах порушення метаболізму у гонадах щурів-самців, як за умов тривалого споживання етанолу, так і за умов одночасного введення ПТЗ можуть мати негативні наслідки для клітинної регуляції процесів сперматогенезу.

6.7. Резюме

Даний розділ містить результати власних досліджень дії ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу за умов сумісного введення на тлі експериментального алкоголізму на рівень експресії гену та протеїну CYP2E1 у печінці та сім'яниках, морфо-функціональний стан сім'яників самців щурів, а також показники антенатального розвитку їх потомства. Крім того, визначено вплив хронічної експозиції етанолу на стан геному та метаболізму печінки та гонад щурів-самців, охарактеризовано морфо-функціональні зміни в сім'яниках,

визначено ступінь негативного впливу на ембріо-фетальний та постнатальний розвиток потомства.

Аналіз результатів, описаних в цьому розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Проведені дослідження виявили значний негативний вплив тривалої експозиції алкоголю на гонади щурів-самців: зменшення числа сперматозоїдів та часу їх рухливості, дегенеративні зміни сперматогенного епітелію (зниження індексу сперматогенезу та кількості сперматогоній, зростання відсотку випадків злушення епітелію в просвіт каналця та «вікон»).

2. Отримані дані засвідчують поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів, які на тлі хронічного експериментального алкоголізму отримували ПТЗ. Відсоток випадків злушення епітелію в просвіт каналця в групі тварин з хронічним алкоголізмом порівняно з контролем зростав у 4 рази ($p \leq 0,05$), а у групі з введенням ПТЗ у 5 разів ($p \leq 0,05$); відсоток появи «вікон» збільшувався відповідно у 7 та 9 разів ($p \leq 0,05$); кількість сперматогоній знижувалась на 14 % та 20 % відповідно ($p \leq 0,05$). Крім того, за умов введення ПТЗ порівняно з контролем та алкоголь-залежними тваринами знижувались абсолютна і відносна маса епідидимісів ~ 15 % ($p \leq 0,05$) та кількість сперматозоїдів відповідно у 2,4 та 1,6 разів ($p \leq 0,05$).

3. Порушення процесів сперматогенезу та зниження кількості та якості сперматозоїдів за умов введення ПТЗ призводили до очевидного зниження плодючості щурів-самців. Індекс їх запліднювальної здатності знижувався порівняно з контролем та тваринами з хронічним алкоголізмом відповідно у 3,2 та 2,4 разів ($p \leq 0,05$).

4. Тривале споживання самцями щурів 15 % етанолу мало віддалені негативні наслідки щодо антенатального та постнатального розвитку їх потомства. Порівняно з контрольною групою показано 22 % збільшення рівня доімплантаційної та загальної смертності ($p \leq 0,05$); зростання смертності новонароджених у різні терміни постнатального розвитку; істотну зміну

локомоторної та емоційної реактивності в тесті «відкрите поле» на 21-й день постнатального розвитку, а саме зниження горизонтальної (-32-44 %; $p \leq 0,05$), вертикальної (-26 %; $p \leq 0,05$) та дослідницької (-46 %; $p \leq 0,05$) активності.

5. За умов парування інтактних самиць із самцями, яким на тлі алкоголізму вводили ПТЗ відсоток доімплантаційної ембріональної загибелі перевищував контрольний рівень більше, ніж втричі та дорівнював такому у групі із споживанням самого алкоголю, але післяімплантаційна смерть сягнула 100 %.

6. Тривале вживання протягом 150 днів 15 % розчину етанолу щурами викликає у печінці та сім'яниках значне зростання експресії мРНК (у 4,9 та 3 рази, $p \leq 0,05$) і протеїну CYP2E1 (в 2,4 та в 1,4 рази, $p \leq 0,05$). Введення комбінації ПТЗ щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до прогресуючого збільшення експресії CYP2E1 в печінці та сім'яниках щурів у 5 та 5,9 разів ($p \leq 0,05$). В той самий час не виявлено подальшого росту експресії печінкового та тестикулярного протеїну CYP2E1, її рівень у цих щурів був майже таким же, як у тварин, які споживали лише алкоголь.

7. Введення комбінації ПТЗ щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до зростання активності *p*-нітрофенолгідроксилази (маркера CYP2E1) у мікросомній фракції клітин печінки в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з групою «хронічний алкоголізм».

8. Рівень експресії гену CYP2E1 в сім'яниках виявив 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 ($r = 0,99$; $p = 0,001$). Отримані результати дозволяють припустити можливість залучення даного ізоферменту до неспецифічних патогенетичних механізмів чоловічої субфертильності та інфертильності.

9. У печінці та сім'яниках щурів з експериментальним хронічним алкоголізмом суттєво інтенсифікуються процеси фрагментації ДНК порівняно з контролем. Як у печінці, так і у сім'яниках основну частину

високомолекулярних фрагментів ДНК складають фракції ланцюжків довжиною 1000 п.о. За введення щурам ПТЗ на цьому тлі не виявлено суттєвої інтенсифікації фрагментації ДНК, але показано зміну характеру ураження структури ДНК та її деградації до рівня олігонуклеотидів. Високий рівень фрагментації ДНК в сім'яниках свідчить про запуск процесів апоптозу.

10. Хронічна експозиція етилового спирту та одночасне введення ПТЗ викликають складні метаболічні зміни на різних рівнях організму щурів-самців: розвиток оксидативного стресу у печінці та сім'яниках; зміни в амінокислотному складі сироватки крові, колагену І типу та сім'яників; зростання в сім'яниках вмісту загального (+25 %; $p \leq 0,05$) та етерифікованого холестерину (+45 %; $p \leq 0,05$), зниження вмісту SH-груп (-36 %; $p \leq 0,05$); модуляцію вмісту відновленого глутатіону, пригнічення ензиматичної активності тестикулярної СДГ за одночасного зростання ЛДГ. Виявлені порушення метаболізму у сім'яниках можуть мати негативні наслідки для клітинної регуляції процесів сперматогенезу.

РОЗДІЛ 7

ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ (ІЗОНІАЗИД, РИФАМПІЦИН, ПІРАЗИНАМІД, ЕТАМБУТОЛ) НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЩУРІВ-САМЦІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДІАБЕТУ І ТИПУ

За даними ВООЗ, цукровий діабет посідає третє місце за рівнем захворюваності та смертності [451]. Результати численних досліджень ясно показують, що сучасне фармакологічне лікування діабету не здатне повністю запобігти всім ускладненням [452]. Цукровий діабет негативно впливає на репродуктивну функцію чоловіків [453] на декількох рівнях: ендокринна регуляція сперматогенезу, погіршення ерекції або еякуляції [454], але конкретні патогенетичні механізми наразі далекі від розкриття.

Відомо, що цукровий діабет, як 1 так і 2 типу, є патологією, що супроводжується індукцією CYP2E1 [455, 456, 457]. Відбувається це внаслідок одночасного підвищення рівня кетонових тіл в організмі та зниження рівня інсуліну, здатного пригнічувати транскрипцію гена CYP2E1 [458]. До патогенезу хронічних ускладнень діабету можуть бути залучені механізми, пов'язані з розвитком окислювального стресу та змінами в пулі внутрішньоклітинних антиоксидантів [459]. Гіперглікемія, автоматичне окислення глікозильованих білків, зростання продукції АФК, зниження рівня антиоксидантів, активація ПОЛ та пов'язана з ними дегенерація мембран можуть бути визначені як основні причини клітинної смерті (апоптоз або некроз) та загальні процеси, що супроводжують розвиток ускладнень при діабеті [460, 461]. Ефекти діабету на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів, що застосовуються на його тлі, ще не достатньо досліджені і не повністю зрозумілі [452]. Таким чином, актуальність досліджень, які дозволять зрозуміти механізми побічної дії ПТЗ, здатних індукувати CYP2E1 та в тому числі, застосовуваних на тлі ендогенної індукції даної ізоформи, на

чоловічу репродуктивну функцію є об'єктивною реальністю.

7.1. Репродуктивна здатність щурів-самців

Відомо, що як діабет типу 1, так і діабет типу 2 мають несприятливий вплив на показники чоловічої фертильності, особливо на рухливість сперматозоїдів, цілісність ДНК сперми та склад сім'яної рідини [462]. При цукровому діабеті відзначають значне погіршення якості сперми і більш високу ступінь пошкодження ДНК в сперматозоїдах. Ці ефекти пов'язані з дефектними метаболічними і сигнальними шляхами у сім'яниках. Внаслідок зміненого гліколітичного статусу цукровий діабет здатен модулювати споживання та/або продукцію субстратів сперматозоїдами [463].

Проведене нами мікроскопічне дослідження епідидимальної суспензії сперматозоїдів показало, що при СТЗД та за умов введення на цьому тлі ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід) у щурів-самців відбувалось значне порушення сперматогенної функції. Згідно отриманих результатів кількість сперматозоїдів у групі тварин з СТЗД знижувалась в 1,6 рази порівняно з контролем (рис.7.1).

В той же час за умов введення на фоні даної патології ПТЗ загальна кількість сперматозоїдів була в 2,7 рази нижчою ніж в контролі (рис.7.1).

Таким чином, сумісне введення ПТЗ тваринам з діабетом протягом всього періоду сперматогенезу негативно впливало на показники нормоспермії, прогресивно знижуючи кількість сперматозоїдів в епідидимісі.

Одночасно спостереження за самцями щурів зі СТЗД, в тому числі і тими, які на тлі патології отримували ПТЗ, виявило зниження мотиваційного та копуляторного компонентів статевої поведінки, що цілком узгоджується з результатами інших дослідників [464]. Парування самців цих груп з інтактними самицями показало значно нижчий результат порівняно з контролем. Відповідні дані наведені в таблиці 7.1 і свідчать, що індекс запліднювальної здатності тварин з діабетом та введенням на його тлі ПТЗ знижувався в порівнянні з

контролем відповідно на 10 та 30 %.

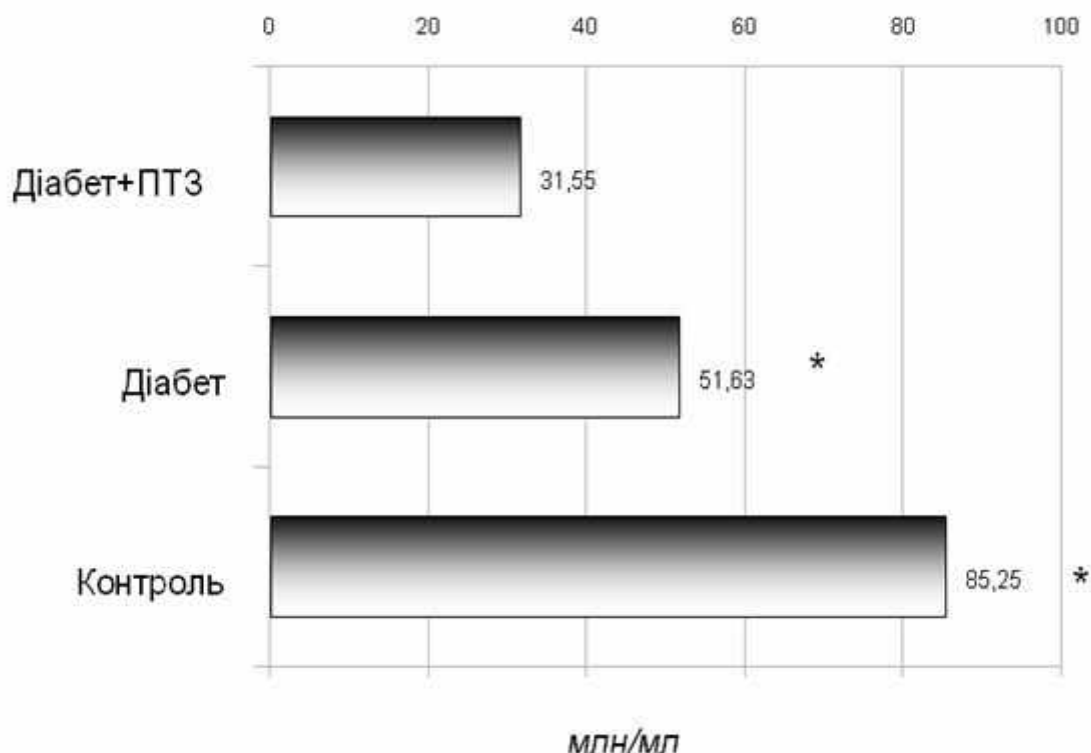


Рис. 7.1. Кількість сперматозоїдів в хвостовій частині епідидимісів щурів із стрептозотоциновим діабетом за умов введення протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n = 10$).

Примітка: *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Такі результати дозволяють дійти висновку, що сам діабетичний стан та тривале сумісне введення вищезазначених ПТЗ за умов діабету у щурів негативно впливали на їх фертильність [465,466].

Крім того, спостерігалось зниження на 20 % показника плодючості інтактних самиць, що були спаровані з самцями з діабетом. Плодючість же самиць, запліднених самцями, яким на тлі діабету вводили ПТЗ, порівняно з тваринами з діабетом та контролем знижувалась відповідно на 33 % та 47 % (табл. 7.2). Тобто, введення ПТЗ протягом періоду сперматогенезу щурам-самцям з експериментальним діабетом спричиняло негативний вплив на плодючість інтактних самиць, що були з ними спаровані.

Таблиця 7.1

Індекс запліднювальної здатності щурів-самців із стрептозотоциновим діабетом за умов введення на його тлі протитуберкульозних лікарських засобів

Групи самців	Кількість парованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності, %
Контроль	20	20	100,0
Діабет	20	18	90,0
Діабет + ПТЗ	20	14	70,0

Таблиця 7.2

Плодовитість інтактних самиць щурів, спарованих з самцями, що протягом періоду сперматогенезу на тлі стрептозотоцинового діабету отримували протитуберкульозні лікарські засоби (абс., $M \pm m$)

Показник	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Загальна кількість живих плодів	222	159	82
Кількість живих плодів на одну самицю	$11,1 \pm 0,61$	$8,8 \pm 0,7^*$	$5,9 \pm 1,3^* \#$

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

#- $p \leq 0,05$ порівняно з групою «діабет».

Варто відзначити, що зниження кількості зигот, що вижили може бути свідченням функціональної (в т. ч. генетичної) неповноцінності сперматозоїдів піддослідних самців [396].

7.2. Ембріо-фетальний та постнатальний розвиток потомства щурів-самців

Генеративна функція чоловічих гонад залежить від багатьох чинників, і одним із інтегральних показників її стану є рівень ембріональної та фетальної смертності у самиць, запліднених самцями, що піддавалися негативним впливам. Показники смертності в різні періоди антенатального розвитку потомства самців з експериментальним діабетом, яким протягом періоду сперматогенезу вводили ПТЗ, представлені в таблиці 7.3.

Слід відмітити, що як діабетичний стан, так і введення на його тлі ПТЗ супроводжувалось підвищенням рівня ембріональних втрат [465]. Отримані результати можуть бути доказом того, що за даних експериментальних умов відбувались порушення ембріофетального розвитку потомства. Особливо чутливим був етап розвитку після імплантації. У той час, як доімплантаційні втрати у самиць, запліднених самцями з діабетом, включаючи тих, що отримували ПТЗ, були лише на кілька відсотків вищими порівняно з контролем (5 % та 20 % відповідно), післяімплантаційна загибель у цих групах була відповідно в 6 і 13 разів вище, ніж у нормі. Особливо висока летальність після імплантації зафіксована у групі тварин зі СТЗД, що отримували ПТЗ. Тут рівень післяімплантаційних втрат в перерахунку на одну самицю був майже в 10 разів вищим, ніж в контролі. Звичайно, це вплинуло на рівень загальної ембріофетальної смертності. Особливе значення має той факт, що цей показник у порівнянні з контролем був вищим у тварин з діабетом та уведенням на його тлі ПТЗ відповідно у 2 та 4 рази.

По 3-4 самиці, запліднені самцями з кожної групи було залишено до природних пологів для спостереження за постнатальним розвитком потомства. У інтактних самиць щурів, спарованих з самцями усіх груп, термін вагітності склав 21-22 доби, що відповідає середньостатистичним даним для цього виду тварин. Результати спостережень за станом новонароджених першого дня постнатального розвитку представлені в табл. 7.4.

Таблиця 7.3

Показники ембріо- та фетогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
1	2	3	4
Кількість вагітних самиць, абс.	20	18	14
Загальна кількість жовтих тіл, абс.	255	214	161
Кількість жовтих тіл на одну самицю, $M \pm m$	$12,75 \pm 0,48$	$11,89 \pm 0,42$	$11,50 \pm 0,54$
Загальна кількість місць імплантації, абс.	226	179	110
Кількість місць імплантації на одну самицю, $M \pm m$	$11,3 \pm 0,60$	$9,94 \pm 0,48$	$7,86 \pm 1,05^*$
Доімплантаційна загибель, абс. / %	26 / 11,4	35 / 16,4	52 / 31,7
Доімплантаційна загибель на одну самицю, $M \pm m$	$1,30 \pm 0,53$	$1,94 \pm 0,35$	$3,71 \pm 0,83^*$
Післяімплантаційна загибель, абс. / %	4 / 1,8	20 / 11,2	27 / 24,5
Післяімплантаційна загибель на одну самицю, $M \pm m$	$0,20 \pm 0,09$	$1,11 \pm 0,62$	$1,93 \pm 0,74^*$
Загальна кількість живих плодів, абс. / %	222 / 28,2	159 / 88,8	82 / 74,6
Кількість живих плодів на одну самицю, $M \pm m$	$11,1 \pm 0,61$	$8,8 \pm 0,7^*$	$5,9 \pm 1,3^* \#$
Загальна ембріональна/фетальна смертність, %	12,9	25,7	49,1

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

#- $p \leq 0,05$ порівняно з групою «діабет».

Згідно отриманих даних в жодній з груп тварин не спостерігалось випадків мертвонароджень. Відсоткове співвідношення самців та самиць у приплоді відповідало середньостатистичним показникам для цього виду тварин [339].

Таблиця 7.4

Показники стану плодів в перший день постнатального розвитку потомства інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби (абс. значення, %)

Експериментальні групи	Кількість вагітних	Загальна кількість плодів	Живих	Мертво народжених	Кількість плодів на 1 самицю	Самиці/самці, %
Контроль	4	47	47	0	11,75	55 / 45
Діабет	4	44	44	0	11	48 / 52
Діабет + ПТЗ	3	30	30	0	10	50 / 50

Важливим показником стану новонароджених є їх виживання протягом перших трьох тижнів постнатального життя, оскільки саме в цей період відбуваються важливі процеси, спрямовані на адаптацію новонародженого до умов існування за межами материнського організму. Ключовими термінами для таких спостережень є 4-й, 7-й, 14-й та 21-й дні після народження.

З наведених у табл. 7.5 даних можна зробити висновок, що як діабет, так і спільне уведення на цьому тлі ізоніазиду, піразинаміду, рифампіцину та

етамбутолу не впливали на життєздатність потомства від інтактних самиць, оскільки зафіксовані випадки смертності новонароджених у відсотковому еквіваленті відповідали таким у групі контролю.

Таблиця 7.5

Смертність новонароджених щурят потомства інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби (абс. значення, %)

Експериментальна група	Кількість щурят у групі	Терміни спостереження після народження, день				Загальна смертність, абс (%)
		4-й	7-й	14-й	21-й	
Контроль	47	2 (4,25%)	0	0	0	2 (4,25%)
Діабет	44	2 (4,55%)	0	0	0	2 (4,55%)
Діабет + ПТЗ	30	0	0	0	0	0

Один з інтегральних показників – масу приплоду в різних експериментальних групах протягом 21-го дня спостережень представлено в таблиці 7.6. Згідно наведених даних на 1-й, 4-й та 21-й дні постнатального періоду розвитку маса приплоду інтактних самиць, спарованих з самцями зі СТЗД, була статистично значимо вищою у порівнянні з групою контролю. У самиць, яких парували з самцями, які отримували на тлі СТЗД комбінацію протитуберкульозних засобів маса приплоду несуттєво, але статистично значимо підвищувалась лише на 21-й день спостереження.

Таблиця 7.6

Маса одного приплоду – потомства інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби, $M \pm m$

Експериментальна група	Кількість щурят у групі	Маса одного приплоду, г				
		1-й день	4-й день	7-й день	14-й день	21-й день
Контроль	47	$6,3 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,6$	$22,28 \pm 0,6$	$36,85 \pm 1,4$
Діабет	44	$8,1 \pm 0,08^*$	$11,2 \pm 0,3^*$	$14,7 \pm 1,2$	$26,1 \pm 1,32$	$50,6 \pm 1,2^*$
Діабет + ПТЗ	30	$7,0 \pm 0,4$	$10,6 \pm 0,2$	$15,4 \pm 1,0$	$27,23 \pm 2,1$	$41,27 \pm 1,1^*$

Примітка: *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Результати спостережень за фізичним розвитком щурят – потомством інтактних самиць та самців зі стрептозотоциновим діабетом, яким протягом сперматогенезу вводили комбінацію ПТЗ, наведені в табл. 7.7. Згідно них терміни прояву всіх досліджених зовнішніх ознак у потомства експериментальних груп не відрізнялись від контролю.

У потомства, що було отримане від інтактних самиць та самців з діабетом, яким вводили ПТЗ, було перевірено наявність основних рефлексів (згинання, хапання, перевертання, встановлення лапи на опору, рівноваги, рогівкового, здригання та розчепірювання пальців задніх кінцівок). Показано, що всі зазначені рефлекси, як у самців, так і у самиць-щурят груп були в межах норми.

Таблиця 7.7

Показники фізичного розвитку щурят – потомства інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби ($M \pm m, n \geq 37$)

Показники, день	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Відлипання вушних раковин	$1,75 \pm 0,22$	$2,0 \pm 0$	$1,33 \pm 0,27$
Поява первинного волосяного покриву	$3,0 \pm 0$	$3,0 \pm 0$	$3,0 \pm 0$
Прорізання різців	$5,0 \pm 0$	$5,25 \pm 0,22$	$5,0 \pm 0$
Відкриття очей	$15,0 \pm 0,35$	$14,25 \pm 0,22$	$14,67 \pm 1,19$
Опускання сім'яників	$22,25 \pm 0,22$	$22,50 \pm 0,25$	$22,67 \pm 0,27$
Відкриття піхви	$36,75 \pm 0,74$	$35,25 \pm 0,41$	$34,0 \pm 0,47$

Визначення можливого впливу спільного введення ПТЗ щурам самців з СТЗД на поведінкові реакції їхнього потомства від інтактних самиць досліджували методом „відкритого поля”. Результати спостережень наведені в таблиці 7.8. Вони засвідчують, що запліднення інтактних самиць самцями з груп «Діабет» та «Діабет + ПТЗ» позначилось на емоційно-руховій активності потомства, визначеній у тесті „відкрите поле”. Так, за цих умов кількість перетнутих периферичних квадратів знижувалась на 24 % та 7 %, центральних - підвищувалась на 86 % та 75 %, а кількість уринацій зростала на 85 % та 56% відповідно.

Таблиця 7.8

Показники поведінкових реакцій потомства інтактних самиць щурів, запліднених самцями, яким на тлі стрептозотоцинового діабету протягом періоду сперматогенезу вводили протитуберкульозні засоби

($M \pm m$, $n \geq 11$)

Показники		Експериментальні групи		
		контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Латентний період, с		$2,09 \pm 0,49$	$2,5 \pm 0,23$	$2,08 \pm 0,30$
Горизонтальна активність, кількість квадратів, перетнутих за 3 хв	периферичні	$62,09 \pm 3,86$	$47,28 \pm 2,83^*$	$51,77 \pm 2,66^*$
	центральні	$6,0 \pm 1,22$	$11,18 \pm 1,02^*$	$10,52 \pm 0,93^*$
Вертикальна активність, кількість стійок за 3 хв		$4,36 \pm 0,34$	$3,21 \pm 0,34^*$	$4,23 \pm 0,39$
Дослідницька активність, кількість зазирань в нірки за 3 хв		$3,91 \pm 0,55$	$2,34 \pm 0,23^*$	$3,74 \pm 0,34$
Грумінг, кількість реакцій за 3 хв		$1,50 \pm 0,30$	$1,12 \pm 0,09$	$1,60 \pm 0,11$
Уринації, кількість за 3 хв		$1,17 \pm 0,20$	$2,09 \pm 0,24^*$	$2,41 \pm 0,23^*$
Дефекації, кількість за 3 хв		$1,43 \pm 0,28$	$2,65 \pm 0,27^*$	$2,24 \pm 0,21$

Примітка: *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Слід зазначити, що у потомства самців із СТЗД крім того відзначали зниження вертикальної та дослідницької активності на 26 % та 40 % відповідно і підвищення кількості актів дефекації на 85 %. Такі результати вивчення поведінкової активності потомства самців експериментальних груп можуть свідчити про стан підвищеної тривожності. Можна стверджувати, що сумісне введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу щурам-самцям зі СТЗД мало певні віддалені негативні наслідки щодо розвитку центральної нервової системи їхнього потомства.

7.3. Морфологічні дослідження стану сім'яників

Зовнішнє обстеження зразків сім'яників щурів з діабетом не виявило видимої патології: органи були без набряків та з нормальним кровонаповненням. Проте, як показано в таблиці 7.9, порівняно з контролем відзначались відхилення деяких морфометричних показників гонад.

Таблиця 7.9

Показники, що характеризують стан сім'яників контрольних щурів та щурів з індукованим стрептозотоцином діабетом ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Маса сім'яників, г	$3,5 \pm 0,14$	$3,24 \pm 0,26$	$3,30 \pm 0,12$
Відносна маса сім'яників, $г \cdot 100 г м.т.^{-1}$	$0,90 \pm 0,022$	$1,04 \pm 0,048^*$	$1,14 \pm 0,08^*$
Об'єм сім'яників, $мм^3$	$1915 \pm 0,61$	$1816 \pm 0,79$	$1770 \pm 0,09$
Маса епідидимиса (правий), г	$0,55 \pm 0,014$	$0,43 \pm 0,042$	$0,43 \pm 0,024^*$
Відносна маса епідидимиса (правий), $г \cdot 100 г м.т.^{-1}$	$0,136 \pm 0,003$	$0,130 \pm 0,006$	$0,140 \pm 0,005$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Відповідно цих даних абсолютна маса та об'єм сім'яників щурів з експериментальних груп не відрізнялись від контролю, в той час як відносна маса сім'яників тварин зростала більш ніж на 15 %. У групі, де на тлі СТЗД вводили ПТЗ також відзначено зниження абсолютної маси епідидимісів.

Результати мікроскопічного дослідження сперматогенного епітелію щурів при СТЗД, наведені в таблиці 7.10, свідчать про негативні зміни викликані діабетом [467].

Таблиця 7.10

**Морфометричні показники сперматогенного епітелію щурів із
стрептозотоциновим діабетом за умов введення протитуберкульозних
засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$)**

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Індекс сперматогенезу, загальна кількість стадій сперматогенезу / кількість досліджених каналців	$3,61 \pm 0,01$	$3,49 \pm 0,01^*$	$3,56 \pm 0,42 \#$
Число сперматогоній, на поперечний зріз через каналець	$80,03 \pm 0,68$	$65,99 \pm 0,71^*$	$70,68 \pm 1,37 \#$
Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	$5,21 \pm 0,44$	$2,02 \pm 0,39^*$	$5,67 \pm 1,86 \#$
Злущений епітелій, %	$0,99 \pm 0,55$	$3,01 \pm 1,06$	$6,0 \pm 3,79 \#$
Відшарування епітелію, %	0	$1,4 \pm 0,58^*$	$6,67 \pm 2,91^* \#$
«Вікна», %	0	$5,25 \pm 1,29^*$	$4,67 \pm 1,45^* \#$

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

- $p < 6$ внаслідок значних морфологічних порушень в деяких сім'яниках

Відповідно до даних, наведених у таблиці 7.10, у щурів зі СТЗД спостерігалось вірогідне зниження сперматогенного індексу порівняно з контролем, але у групі тварин, де на тлі діабету вводили комбінацію ПТЗ статистично значущих змін даного показника не виявлено [465]. Це однозначно пояснюється невеликою кількістю тварин (менше 6), у яких можливо було провести підрахунок шарів сперматогенного епітелію. Адекватному кількісному аналізу показників сперматогенного епітелію інших тварин заважали значні

морфологічні порушення (канальці з областями, вільними від гермінативних клітин, наявність деформованих і порожніх канальців, сім'яродний епітелій без ознак сперматогенезу, дистрофія та некроз канальців (рис. 7.2 та 7.3).

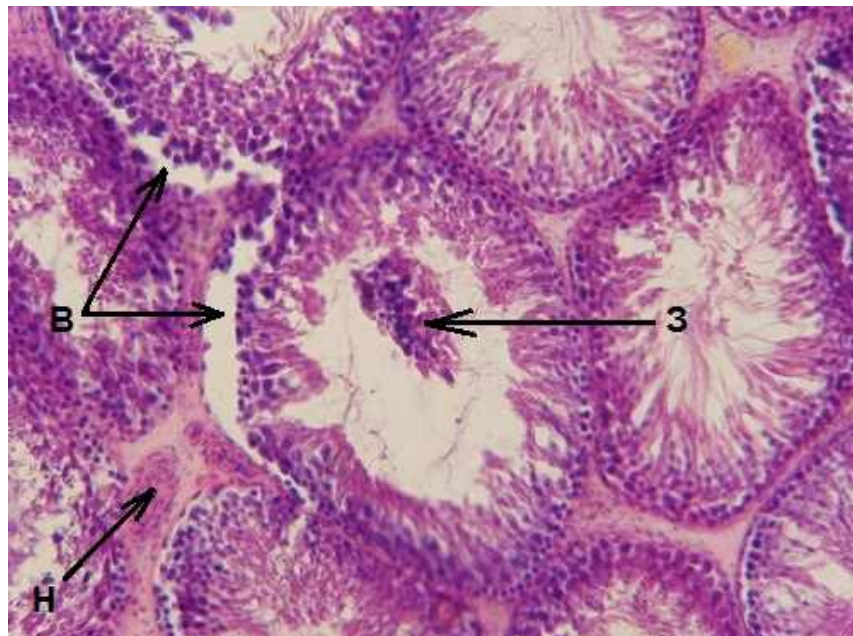


Рис. 7.2. Осередки відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани (В), злуцнення сперматогенного епітелію в просвіт канальця (З) та інтерстиціальні набряки (Н) в сім'яниках щура з діабетом, якому вводили протитуберкульозні засоби. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення x 400.

Первинна популяція клітин сперматогенного епітелію також зазнала впливу діабету. За даних умов була пригнічена мітотична активність і знижувалась кількість сперматогоній на зрізах тестикулярних канальців. Одночасно, в групі щурів з діабетом порівняно з контролем знижувалася вдвічі кількість клітин у XII стадії циклу сперматогенного епітелію, що характеризує мейотичний поділ сперматоцитів першого порядку (табл. 7.10).

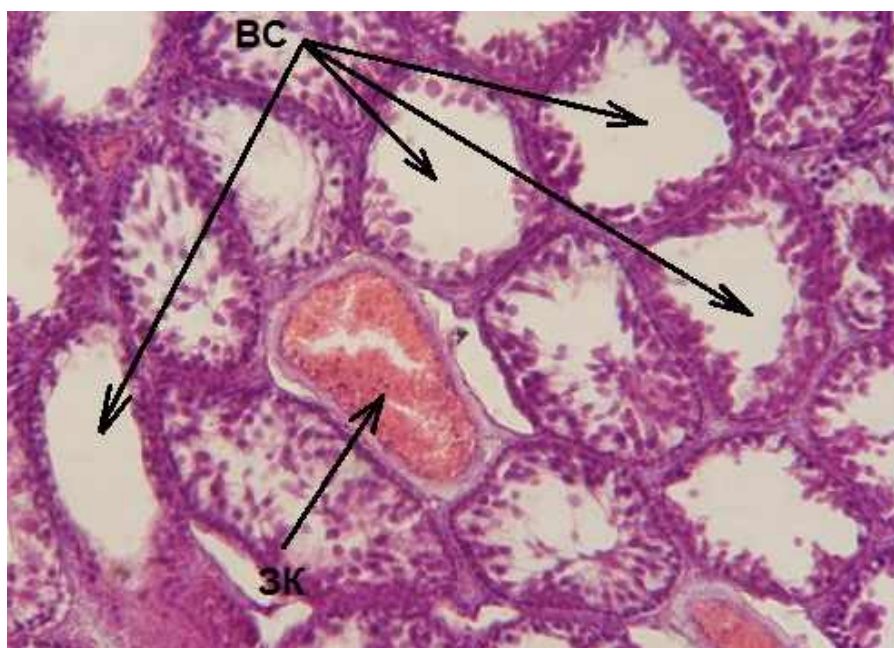


Рис. 7.3. Осередки каналців з втратою шарів сперматогенного епітелію (BC) та згустки крові (ЗК) в судинах сім'яника щура з діабетом, якому вводили протитуберкульозні засоби. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення x 200.

Стосовно групи тварин, які на тлі діабету отримували комбінацію ПТЗ, то зміни вищевказаних параметрів мали подібну спрямованість (табл. 7.7), проте їх кількісна оцінка була ускладнена значними морфологічними порушеннями в сім'яниках деяких експериментальних тварин, про що йдеться вище.

Загалом нами було виявлено широкий спектр дегенеративних змін у тестикулярних каналцях, і ці результати можуть бути доказом негативного впливу як самого діабету, так і введених на його тлі ПТЗ [465]. Відповідно до даних таблиці 7.10, та рис. 7.4, 7.5 в обох дослідних групах виявляли втрату шарів сперматогенного епітелію, ознаки запалення, підвищення відсотка випадків злушення епітелію (вихід епітеліальних елементів в просвіт каналця), відшаровування епітелію (відрив від базальної мембрани каналців) і "вікна"

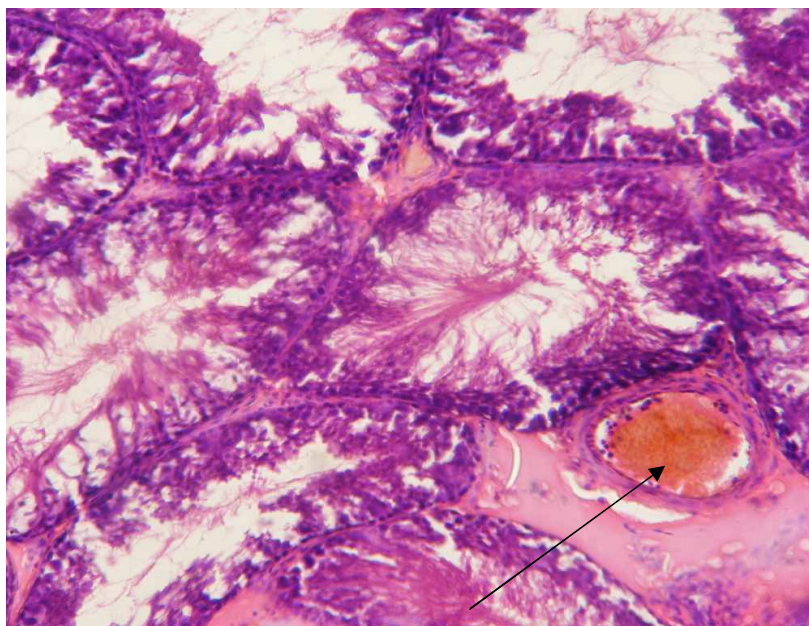


Рис. 7.4. Дистрофічні зміни і втрата сперматогенного епітелію, тромбоз судин та інтерстиційна едема в сім'янику щура з діабетом. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшеннях 400.

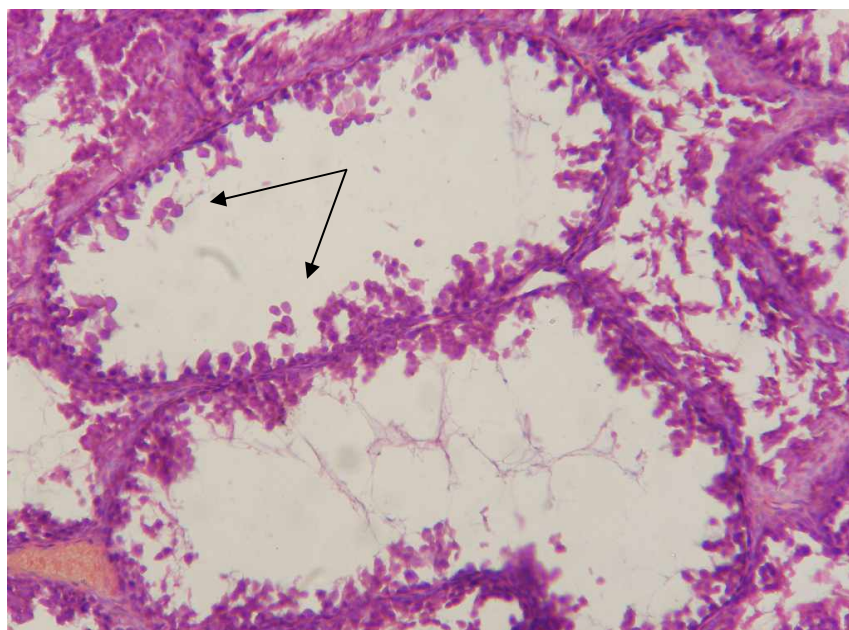


Рис. 7.5. Потоншення сперматогенного епітелію та злуцування епітеліальних клітин в просвіт каналця в сім'янику щура з діабетом. Фарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення х 400.

(ділянки позбавлені гермінативних клітин), тоді як у контролі кількість каналців зі злуцненням епітелію була незначна, а випадки відшарування

епітелію від базальної мембрани і "вікна" не спостерігались.

Гістохімічними методами в сім'яних канальцях тварин всіх груп виявлено нерівномірність розподілу нуклеопротейдів. Так, ядра сперматогоній і сперматозоїдів мали значний вміст ДНК, в той час як в інших статевих клітинах було менше гранул хроматину і, відповідно, дезоксирибонуклеопротейдів. Поряд з цим, у цитоплазмі сперматогоній і сперматоцитів I і II порядку виявлялась значна кількість продукту реакції на РНК (рис. 7.6 - А).

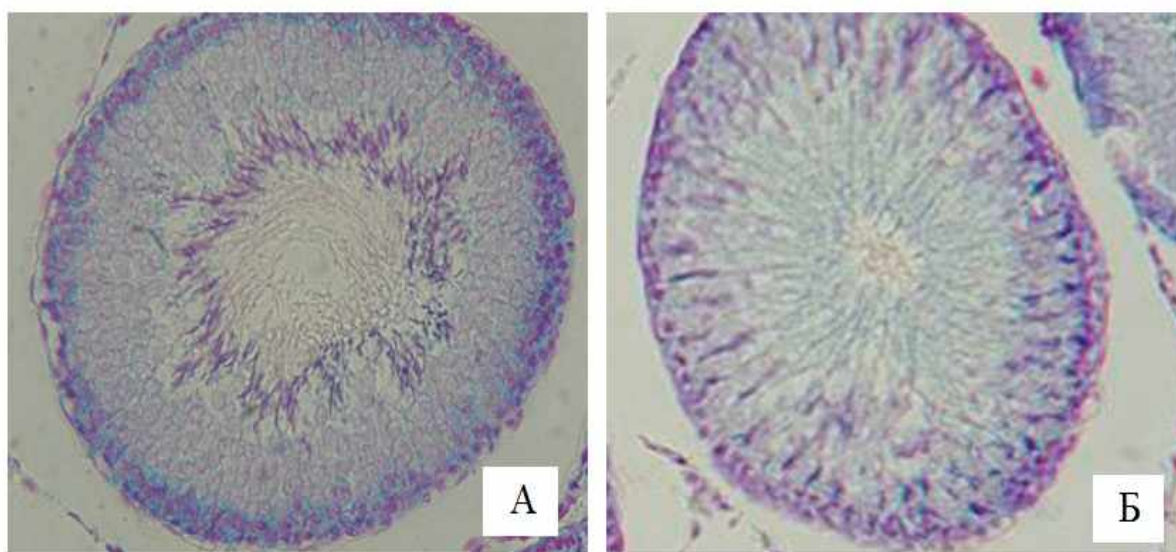


Рис. 7.6. Вміст нуклеїнових кислот в сім'яниках щурів. А - нерівномірність розподілу нуклеопротейдів в клітинах сперматогенного епітелію щура контрольної групи. Б - зниження вмісту нуклеїнових кислот у сперматогенному епітелії щура з діабетом Фарбування за методом Шубича. Збільшення x 400.

Таке нерівномірне розташування нуклеїнових кислот в статевих клітинах більшості канальців тварин пов'язане з деякими особливостями метаболічних процесів, що перебігають у сім'яродному епітелії звивистих канальців.

Слід відзначити, що за умов СТЗД в значній кількості сім'яних канальців тестикул піддослідних тварин ми виявили суттєве зниження вмісту нуклеїнових кислот (рис. 7.6 - Б).

Таким чином, діабет викликав кількісні та якісні зміни в

сперматогенному епітелії, що поглиблювались за умов введення ПТЗ.

7.4. Експресія мРНК CYP2E1, стан фрагментації ДНК у сім'яниках та метаболічні зміни в організмі щурів

Методом ЗТ-ПЛР нами було оцінено рівень тестикулярної експресії CYP2E1 за умов введення щурам зі СТЗД комбінації ПТЗ. Відповідні дані наведені на рис. 7.7.

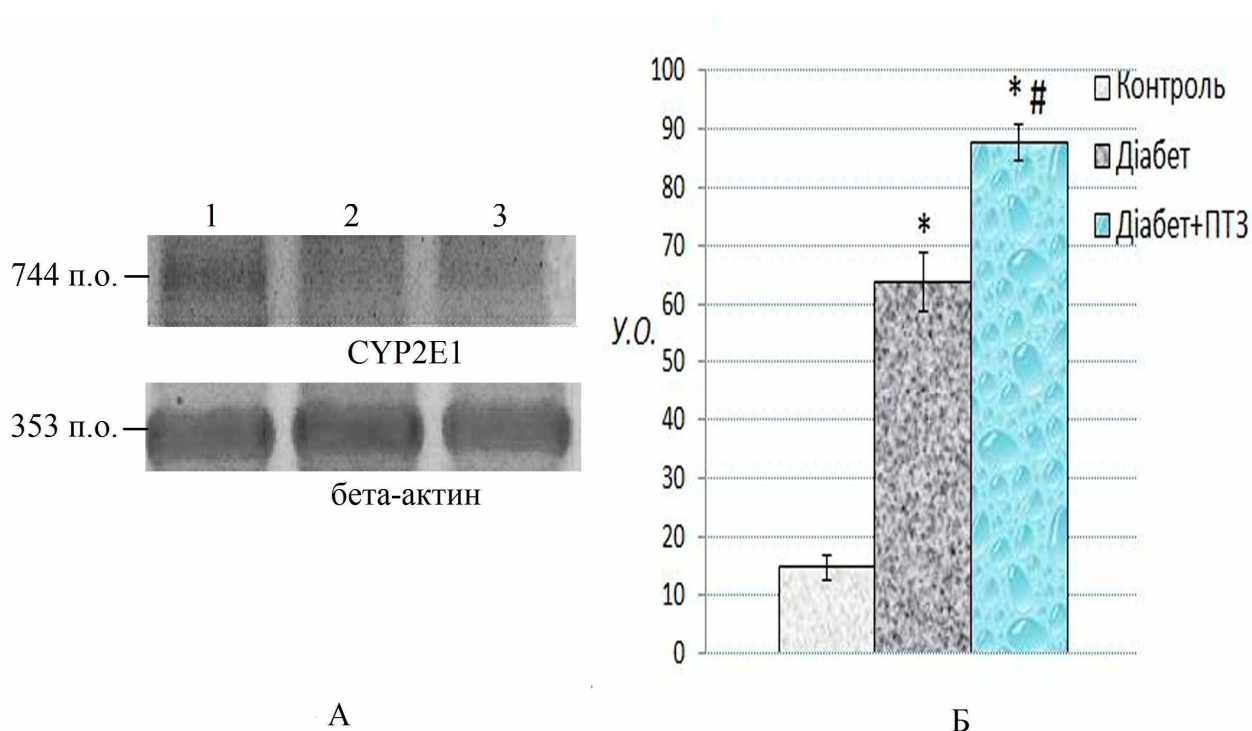


Рис. 7.7. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів на фоні стрептозотоцинового діабету: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину (1 – контроль; 2–діабет; 3 – діабет + ПТЗ); Б) відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 - інтенсивність піку β - актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Вони 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.

Слід відзначити, що 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» ($r = 0,96$; $p = 0,001$). Крім того, між ступенем експресії гену CYP2E1 та кількістю випадків злучення сперматогенного епітелію в просвіт каналців і десквамації епітелію від базальної мембрани відзначено середню ($r = 0,65$; $p = 0,01$) та слабку ($r = 0,27$; $p = 0,05$) кореляцію відповідно [371].

Враховуючи здатність CYP2E1 генерувати активні форми кисню, такі як супероксидні радикали, що швидко взаємодіють із органічними молекулами з утворенням вторинних вільних радикалів [155], можна припустити зростання вільнорадикального ушкодження клітин Лейдіга та/або їх мікрооточення, що, в свою чергу, викликати зниження секреції тестостерону та спричинитиме порушення функції клітин Сертолі в кінцевому результаті порушуючи процес сперматогенезу. Крім того, оксидативний стрес у сім'яниках та епідидимальній спермі можуть бути асоційовані зі значним підвищенням ушкодження ДНК.

Дослідження рівня фрагментації тестикулярної ДНК показало його зростання у порівнянні з контролем як за умов СТЗД, так і при введенні на його тлі комбінації ПТЗ (рис. 7.8).

У сім'яниках щурів контрольної групи були присутні 7 фракцій фрагментів ДНК молекулярною масою понад 1000 п.о. (одна фракція), а також 650, 600, 500, 480, 50 і 30 п.о.

У щурів з діабетом було визначено 19 фракцій фрагментів ДНК із молекулярною масою понад 1000 (6 різних фракцій), а також 1000, 950, 900, 800, 750, 650, 600, 550, 500, 480, 100, 50 і 40 п.о. За умов введення на тлі діабету ПТЗ виявлено 15 фракцій фрагментів ДНК, молекулярна маса яких

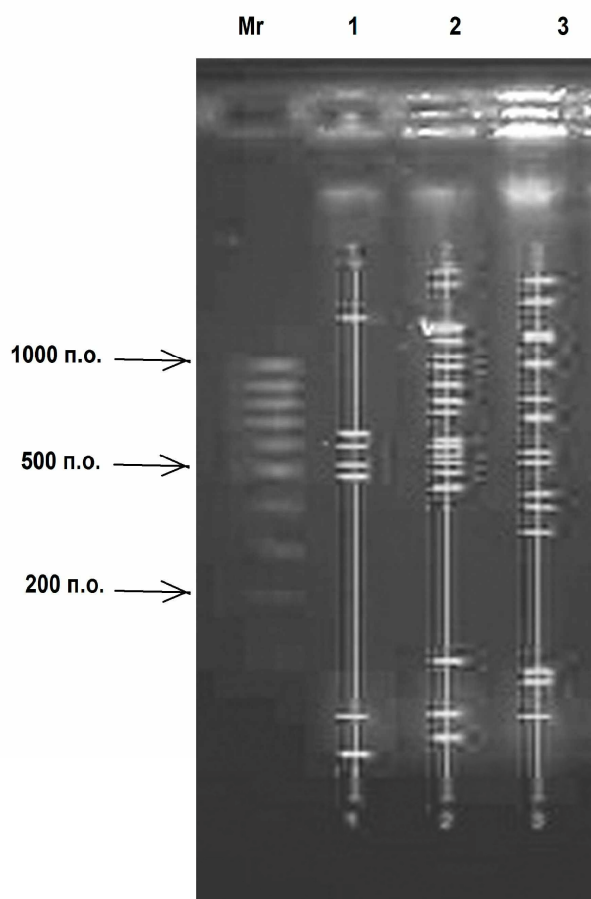


Рис. 7.8. Фрагментація ДНК в сім'яниках щурів із стрептозотоциновим діабетом за умов введення протитуберкульозних засобів або без нього (1 - контроль; 2 - діабет, 3 - діабет + ПТЗ). Аналіз проведений з використанням програмного забезпечення Quantity One.

перевищувала 1000 (4 різних фракції), а також 1000, 800, 700, 550, 500, 420, 400, 340, 80, 70 і 50 п.о.

Дані таблиці 7.11 підсумовують результати визначення вмісту фрагментів ДНК різної молекулярної маси в сім'яниках щурів із СТЗД та за умов введення на тлі СТЗД ПТЗ. Вони демонструють зростання даного показника порівняно з контролем у 3,3 та 3,8 рази відповідно.

Таблиця 7.11

**Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси в сім'яниках
щурів із стрептозотоциновим діабетом за умов введення
протитуберкульозних засобів або без нього**

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,61
Діабет	21,76
Діабет + ПТЗ	25,36

Високий рівень фрагментації ДНК в сім'яниках тварин з СТЗД та при введенні на цьому тлі ПТЗ свідчить про запуск процесів апоптозу.

7.5 Біохімічні зміни в організмі щурів-самців

Діабет індукує зміни структури та функції позаклітинного матриксу білків у багатьох тканинах [468]. Є дані, що дана патологія супроводжується порушеннями сполучної тканини та, особливо, якісними змінами у синтезі колагену [430]. Цукровий діабет супроводжується неферментативним глікозилюванням колагену, зниженням його обміну під час дозрівання, повільним накопиченням складних вуглеводів, та постійністю кінцевих продуктів цих реакцій. Це може призвести до: 1) утворення зшивок (міжмолекулярні зшивки можуть утворюватись між двома суміжними молекулами і приєднувати лізин до лізину або лізин до залишків аргініну) [469]; 2) модифікації аргініну в ділянках RGD і GFOGER, що роз пізнаються двома специфічними для колагену інтегрінами (альфа1бета2 і альфа2бета1). Обидва типи модифікацій шкідливо впливають на оптимальні властивості колагену, як опорної структури та як контролюючого фактора в взаємодіях клітинного матриксу [469].

Показано, що утворення та секреція колагену контролюється інсуліном на посттранскрипційному сайті [470]. Ген колагену $\alpha 2$ (I) містить два функціональні промотори, і його експресія в клітинах регулюється як на транскрипційному, так і на посттранскрипційному рівнях [471]. Неферментативне глікозилювання колагену, зниження його обміну під час дозрівання, повільне накопичення складних вуглеводів, та постійність кінцевих продуктів цих реакцій, викликане цукровим діабетом є важливим фактором змін оптимальних властивостей колагену. Утворення міжмолекулярних зшивок між двома суміжними молекулами і приєднання лізину до лізину або лізину до залишків аргініну) [469], а також модифікація аргініну в ділянках RGD і GFOGER призводять до модифікацій колагену, який є не лише опорною структурою, але і контролюючим фактором в взаємодіях клітинного матриксу [469]. На нашу думку зміни в структурі колагену можуть мати велике значення, в тому числі, для нормального протікання процесів сперматогенезу. Враховуючи, що кількісні зміни структури колагену співвідносяться з параметрами чоловічої репродуктивної системи, такими як відсоток нормальних сперматозоїдів та чутливість до дегенеративних процесів в сім'яниках [472], стає очевидним, наскільки важливим є аналіз одночасного впливу діабету на колаген та репродуктивну функцію, зокрема з'ясування того, як саме змінюється амінокислотний склад колагену за умов наших експериментів.

Було проаналізовано вплив СТЗД на вміст амінокислот колагену в організмі щурів. Ці дані наведені в таблицях 7.12 та 7.13. Статистично значимі зміни були зареєстровані в колагені кісток для 16 амінокислот та у колагені шкіри для 15 амінокислот.

Колаген I типу в кістковій тканині тварин з цукровим діабетом містив значно менший вміст гідроксилізину (-75,0 %), гідроксипроліну (-87,5 %), проліну (-31,3 %), гліцину (-51,2 %) та аланіну (-25,5 %), тобто амінокислот, що

Таблиця 7.12

Амінокислотний склад (залишків/1000 залишків) колагену I типу кісток щурів із стрептозотоциновим діабетом ($M \pm m$, $n=6$)

Амінокислота	Експериментальні групи	
	контроль	діабет
Гідроксилізін	$6,70 \pm 0,10$	$1,70 \pm 0,11^*$
Лізін	$39,1 \pm 0,40$	$56,5 \pm 1,26^*$
Гістидин	$4,70 \pm 0,20$	$10,65 \pm 1,76^*$
Аргінін	$48,30 \pm 0,60$	$79,90 \pm 7,13^*$
Гідроксипролін	$99,00 \pm 1,40$	$12,40 \pm 3,64^*$
Аспарагінова кислота	$38,80 \pm 0,80$	$116,30 \pm 3,03^*$
Треонін	$24,00 \pm 0,60$	$40,20 \pm 1,52^*$
Серин	$38,20 \pm 1,40$	$60,00 \pm 2,35^*$
Глутамінова кислота	$97,50 \pm 1,30$	$195,00 \pm 0,67^*$
Пролін	$101,90 \pm 1,80$	$70,10 \pm 2,10^*$
Гліцин	$305,00 \pm 2,50$	$149,10 \pm 6,32^*$
Аланін	$109,00 \pm 1,10$	$81,20 \pm 1,27^*$
Валін	$23,00 \pm 0,50$	$27,90 \pm 4,31$
Метіонін	$6,20 \pm 0,10$	$13,50 \pm 1,34^*$
Ізолейцин	$13,70 \pm 0,30$	$23,40 \pm 3,05^*$
Лейцин	$27,90 \pm 0,20$	$62,50 \pm 2,52^*$
Тирозин	$4,80 \pm 0,20$	$9,70 \pm 2,00$
Фенілаланін	$12,00 \pm 0,20$	$37,10 \pm 3,99^*$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

мають принциповий вплив на структуру колагенової спіралі (скоріш за все, складається з триплетів Gly-X-Pro або Gly-X-Hyp), її жорсткість і пружність, поверхневий заряд і ступінь зшитості [416].

Таблиця 7.13

Амінокислотний склад (залишків/1000 залишків) колагену I типу шкіри щурів із стрептозотоциновим діабетом ($M \pm m$, $n=6$)

Амінокислота	Експериментальні групи	
	контроль	діабет
Гідроксилізін	$4,30 \pm 0,10$	$4,60 \pm 1,03$
Лізін	$29,80 \pm 1,30$	$53,10 \pm 3,62^*$
Гістидин	$4,80 \pm 0,20$	$7,70 \pm 0,62^*$
Аргінін	$50,20 \pm 0,60$	$75,80 \pm 3,24^*$
Гідроксипролін	$92,70 \pm 2,30$	$23,70 \pm 2,64^*$
Аспарагінова кислота	$44,70 \pm 1,10$	$88,90 \pm 2,96^*$
Треонін	$17,80 \pm 0,70$	$31,10 \pm 1,53^*$
Серин	$35,80 \pm 1,00$	$48,20 \pm 0,80^*$
Глутамінова кислота	$75,20 \pm 1,50$	$140,40 \pm 3,63^*$
Пролін	$130,60 \pm 3,00$	$109,50 \pm 8,68$
Гліцин	$324,40 \pm 3,70$	$165,20 \pm 9,02^*$
Аланін	$105,20 \pm 2,10$	$92,40 \pm 2,36^*$
Валін	$26,40 \pm 0,60$	$21,20 \pm 1,03^*$
Метіонін	$6,80 \pm 0,10$	$14,80 \pm 2,07^*$
Ізолейцин	$12,80 \pm 0,80$	$18,80 \pm 1,87$
Лейцин	$29,20 \pm 1,70$	$49,10 \pm 4,25^*$
Тирозин	$3,70 \pm 0,20$	$11,80 \pm 2,32^*$
Фенілаланін	$12,20 \pm 0,50$	$32,00 \pm 4,60^*$

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

При цьому порівняно з контрольною групою зростав вміст аргініну (+ 65,4 %), аспарагінової кислоти (+ 200,0 %), треоніну (+ 67,5 %), серину (+ 57,1 %), глутамінової кислоти (+100,0 %), метіоніну (+117,7 %), ізолейцину (+ 70,8 %), лейцину (+124,0 %) та фенілаланіну (+ 209,0 %). Наші результати

узгоджуються з даними інших авторів, які продемонстрували порушення ультраструктури колагену при СТЗД [473, 474].

У колагені шкіри щурів з діабетом також значно нижчими виявились вміст гідроксипроліну (-74,4 %), проліну (-16,5 %), гліцину (-49,0 %), аланіну (-12,0 %) і валіну (+ 19,7 %). При цьому збільшувався вміст лізину (+78,2 %), гістидину (+60,4 %), аргініну (+51,0 %), аспарагінової кислоти (+ 99,0 %), треоніну (+75,0 %), серину (+34,6 %), глютамінової кислоти (+86,7 %), метіоніну (+117,6 %), лейцину (+68,0 %), тирозину (+218,0 %) та фенілаланіну (+162,3 %). Таким чином, у цій тканині діабет викликав аналогічні кількісні зміни молекул колагену, як і у кістках (табл. 7.13).

Порушення обміну речовин, які виникають при СТЗД, поширюються і на систему біотрансформації ксенобіотиків. Результати досліджень, які характеризують стан монооксигеназної системи мікросомної фракції печінки самців щурів із стрептозотоциновим діабетом за умов уведення протягом періоду сперматогенезу комбінації протитуберкульозних препаратів, представлені на рис. 7.9. Визначення *n*-нітрофенолгідроксилазної активності показало її збільшення в 2 рази в мікросомальній фракції печінки щурів, яким моделювали діабет порівняно з контролем, що підтверджує індукцію CYP2E1.

При введенні щурам ПТЗ I ряду (ізоніазиду, піразинаміду, рифампіцину та етамбутолу) у терапевтичних дозах на тлі СТЗД активність *n*-нітрофенолгідроксилази зростала ще більшою мірою, в 5,7 разів, порівняно з контролем. Представлені результати свідчать, що застосування комбінації ПТЗ на тлі СТЗД призводило до потенціювання ефекту індукції цитохрому CYP2E1.

Наразі зростає кількість даних стосовно того, що за умов діабету внаслідок гіперпродукції АФК і зниження ефективності систем антиоксидантного захисту, відбувається розвиток окислювального стресу [475]. У печінці тварин із СТЗД спостерігали зростання глутатіон-S-трансферазної активності ПМХ фракції печінки майже в 2 рази на тлі зниження вмісту відновленого глутатіону (табл. 7.14).

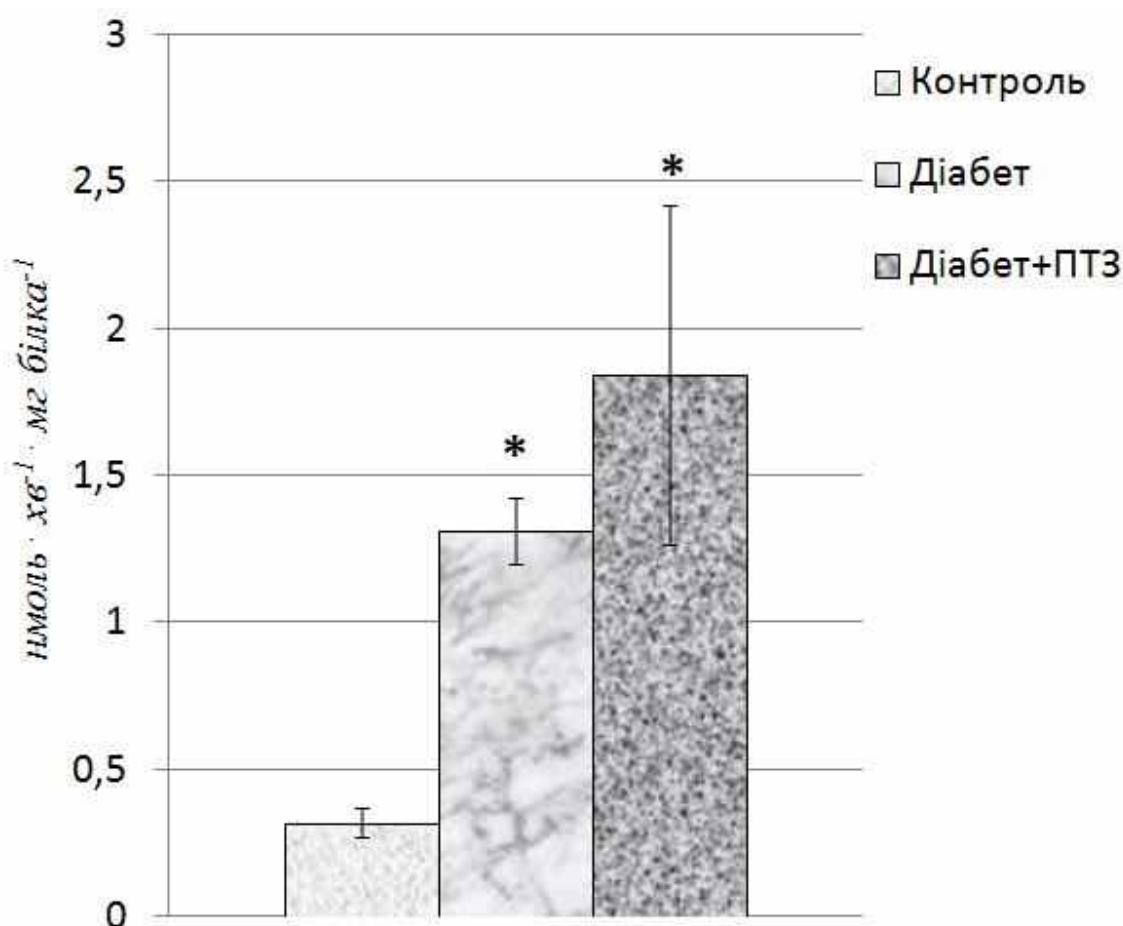


Рис. 7.9. Активність *p*-нітрофенолгідроксилази у печінці щурів із стрептозотоциновим діабетом за умов введення протитуберкульозних засобів або без нього ($M \pm m$, $n \geq 6$).

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Підвищення активності даного ензиму може бути компенсаторним та сприяти підтримці гомеостазу за станів, що супроводжуються оксидативним стресом [476]. У тварин, яким на тлі діабету вводили ПТЗ активність глутатіон-S-трансферази зростала ще більшою мірою – у 3 рази порівняно з контролем, але на відміну від попередньої групи спостерігалось не зниження, а компенсаторне зростання вмісту відновленого глутатіону в печінці (табл. 7.14). Виявлені нами порушення обмінних процесів при діабеті можуть мати негативний вплив на клітинну регуляцію сперматогенезу, частково

Таблиця 7.14

Вміст глутатіону та активність глутатіонтрансферази у печінці щурів з стрептозотоциновим діабетом за умов введення протитуберкульозних засобів або без нього ($M \pm m$, $n \geq 6$)

Показники	Експериментальні групи		
	контроль	діабет	діабет + ПТЗ
Вміст відновленого глутатіону, нмоль · мг білка ⁻¹	17,99 ± 1,01	14,80 ± 0,64*	24,70 ± 2,12*
Активність глутатіонтрансферази, нмоль · хв ⁻¹ · мг білка ⁻¹	176,50 ± 29,20	319,40 ± 30,40*	532,40 ± 52,50*

Примітка. *- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

опосередковуватись індукцією CYP2E1 у чоловічих гонадах, бути залученими до патогенезу дисфункції сім'яників, а також створювати передумови ризику побічної дії на чоловічу репродуктивну функцію ПТЗ та інших лікарських засобів за умов застосування на тлі даної патології.

7.6. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень стосовно впливу комбінації ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу за умов стрептозотоцинового діабету на плодючість щурів-самців, морфо-функціональний стан їх сім'яників, показники антенатального та постнатального розвитку потомства, отриманого від піддослідних самців та інтактних самиць, молекулярно-біологічні та біохімічні показники печінки та сім'яників.

Аналіз результатів досліджень, описаних у цьому розділі дозволяє зробити наступні висновки:

1. Отримані дані свідчать про посилення порушень морфо-функціонального стану сім'яників та репродуктивної здатності щурів-самців із діабетом за умов сумісного введення ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід).

2. Діабетичний стан та особливо введення на цьому тлі ПТЗ негативно позначалось на ембріо-фетальному та постнатальному розвитку потомства щурів-самців, що проявлялось зростанням рівня післяімплантаційної смертності (у 6 і 13 разів відповідно; $p \leq 0,05$), загальної смертності (у 2 і 4 рази відповідно; $p \leq 0,05$), а також впливом на ЦНС - підвищенням рівня тривожності за показниками активності в тесті «відкрите поле» порівняно з контролем.

3. Сумісне введення ПТЗ на тлі СТЗД призводило до подальшої стимуляції тестикулярної експресії гену *CYP2E1*, зростання його ензиматичної активності та змін рівня і характеру фрагментації нуклеарної ДНК у сім'яниках щурів.

4. У щурів з діабетом виявлено сильні кореляційні зв'язки між рівнем експресії мРНК *CYP2E1* і кількістю сперматогоній ($r = -0,99$; $p = 0,001$) і появою «вікон» ($r = 0,96$; $p = 0,001$), а також кореляцію середнього ступеня між інтенсивністю тестикулярної експресії гену *CYP2E1* та кількістю випадків злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналців ($r = 0,65$; $p = 0,01$). Ймовірно, *CYP2E1* є важливою початковою ланкою у генерації АФК та інших токсичних метаболітів в сім'яниках, які згодом пошкоджують ДНК та негативно впливають на чоловічу репродуктивну функцію.

5. Виявлені нами за умов СТЗД зміни в амінокислотному складі колагену І типу та порушення толового статусу організму можуть впливати на властивості та правильне функціонування сперматогенного епітелію та інших тканин репродуктивних органів.

РОЗДІЛ 8

КОРИГУЮЧА ДІЯ МЕТІОНІНУ ТА МЕТОВІТАНУ НА ГОНАДОТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ І РЯДУ ТА ВИКЛИКАНІ НИМИ ПОРУШЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ ЩУРІВ-САМЦІВ

В результаті проведених експериментів нами було показано значний антифертильний ефект комбінації ПТЗ - етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та ізоніазиду при тривалому введенні самцям щурів протягом періоду сперматогенезу. Виявлено, що за цих умов у сім'яниках тварин відбувається індукція ізоформи CYP2E1, а також дисбаланс тестикулярної про- та антиоксидантної системи [477]. Подібні зміни супроводжуються значною активацією процесів апоптозу в тканинах сім'яників.

З огляду на отримані дані, ми вважаємо, що для зниження ризику побічної дії ПТЗ на чоловічі гонади можуть бути застосовані речовини, які здатні виступати інгібіторами CYP2E1 та/або мають антиоксидантні властивості. Важливою характеристикою таких речовин є їх низька токсичність, а отже перспективним є використання природних речовин, амінокислот, вітамінів, мікроелементів.

Варто відзначити, що питання стосовно використання антиоксидантів для корекції станів, що супроводжуються зниженням чоловічої фертильності наразі є відкритим, оскільки, отримані різними авторами дані досить суперечливі. Незважаючи на очевидні корисні ефекти, дослідження ефективності різних композицій амінокислот, мікроелементів та вітамінів при лікуванні чоловічого безпліддя все ще дуже обмежені. З одного боку ряд *in vitro* та *in vivo* досліджень демонструють позитивний ефект значної кількості біологічно активних речовин на стан сперматозоїдів, успішність запліднення та плодовитість [478, 479]. Однак, інші роботи не підтверджують їхньої ефективності [480,481]. Таким чином, вивчення захисної дії біологічно

активних низькомолекулярних сполук (в тому числі за комбінованого застосування) є актуальним.

Нами було оцінено в порівняльному аспекті гонадопротекторні властивості метіоніну та оригінальної композиції Метовітан, основу якої складає метіонін, за умов введення щурам-самцям комбінації ПТЗ. Подібний вибір був, зокрема, обумовлений антиоксидантними властивостями метіоніну, а також інгібіторними по відношенню до CYP2E1 властивостями його метаболіту - S-аденозилметионіну [482, 483]. Метіонін також є необхідним для синтезу глутатіону, який є важливим компонентом II фази біотрансформації ксенобіотиків та важливим внутрішньоклітинним антиоксидантом [484]. До складу композиції Метовітан окрім метіоніну входять інші компоненти здатні регулювати рівень оксидативних процесів в клітинах, такі як тіамін, нікотинамід, α -токоферолацетат та цинк [485, 486, 487, 488]. Причому останній володіє не тільки антиокиснювальними, але і антиапоптотичними функціями [489].

8.1. Репродуктивна здатність щурів-самців

Було проведене порівняльне дослідження ефективності метіоніну та композиції Метовітан, як засобів для профілактики порушень нормоспермії за умов сумісного введення ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід).

Виявлено, що курсове введення метіоніну та Метовітану щурам, які отримували сумісно ПТЗ сприяло підвищенню кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісів вдвічі, порівняно з групою без відповідної корекції (табл. 8.1).

Крім того, за умов введення Метовітану спостерігалось зростання відносної маси епідидимісів у порівнянні з тваринами, яким вводили ПТЗ, що свідчить про зниження рівня дегенеративних змін у даних органах (табл. 8.1).

Таблиця 8.1

**Зміни параметрів епідидимісів щурів за умов введення
протитуберкульозних засобів та метіоніну або Метовітану, ($M \pm m$, $n \geq 6$)**

Показники	Експериментальні групи			
	контроль	ПТЗ	ПТЗ+ метіонін	ПТЗ+ Метовітан
Відносна маса епідидимісів, $г \cdot 100 м.т.^{-1}$	$0,342 \pm 0,017$	$0,243 \pm 0,012^*$	$0,276 \pm 0,028^*$	$0,278 \pm 0,08^* **$
Кількість сперматозоїдів в епідидимальній суспензії, $мільйон \cdot мл^{-1}$	$57,77 \pm 8,89$	$10,02 \pm 2,02^*$	$22,57 \pm 3,71^* **$	$21,15 \pm 3,52^* **$

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

** - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ.

Зростання кількості сперматозоїдів за умов введення метіоніну та Метовітану позитивно позначилось на фертильності щурів-самців цієї групи, яких парували з інтактними самицями (табл. 8.2).

Таблиця 8.2

**Індекс фертильності щурів-самців за умов введення протитуберкульозних
засобів та метіоніну або Метовітану**

Групи самців	Кількість парованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності, %
1	2	3	4
Контроль	16	15	94 ± 6
ПТЗ	16	0	0*

Продовження табл. 8.5

1	2	3	4
ПТЗ+ метіонін	16	4	$25 \pm 11^* **$
ПТЗ+ Метовітан	16	3	$19 \pm 10^* **$

Примітки:

*- $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

** - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували ПТЗ.

Даний показник зростав відповідно на 25 та 19 % порівняно з самцями, які отримували лише ПТЗ. Таким чином, застосування метіоніну та Метовітану на фоні введення ПТЗ певною мірою покращувало репродуктивні показники піддослідних тварин [490].

8.2. Морфологічні дослідження стану сім'яників

Порушення нормоспермії в щурів-самців за умов введення ПТЗ супроводжувалось дегенеративними змінами їх сперматогенного епітелію. На рисунках 8.1-8.3 наведені мікрофотографії зрізів через сім'яні каналці. Структура сім'яних каналців щурів контрольної групи була представлена регулярним чергуванням шарів сперматогенного епітелію (рис. 8.1).

В той же час на зрізах через сім'яні каналці тварин, яким вводили ПТЗ можна помітити злущений епітелій у просвітах (рис. 8.2), порушення структури сперматогенного епітелію та значні спустошені ділянки (рис. 8.3). Дегенеративні зміни в сім'яниках (включаючи дегенерацію сперматоцитів і округлих сперматид) пов'язані зі зниженням внутрішньотестикулярного рівня тестостерону, який, як правило, приблизно в 50 разів перевищує рівень тестостерону в сироватці крові [491].

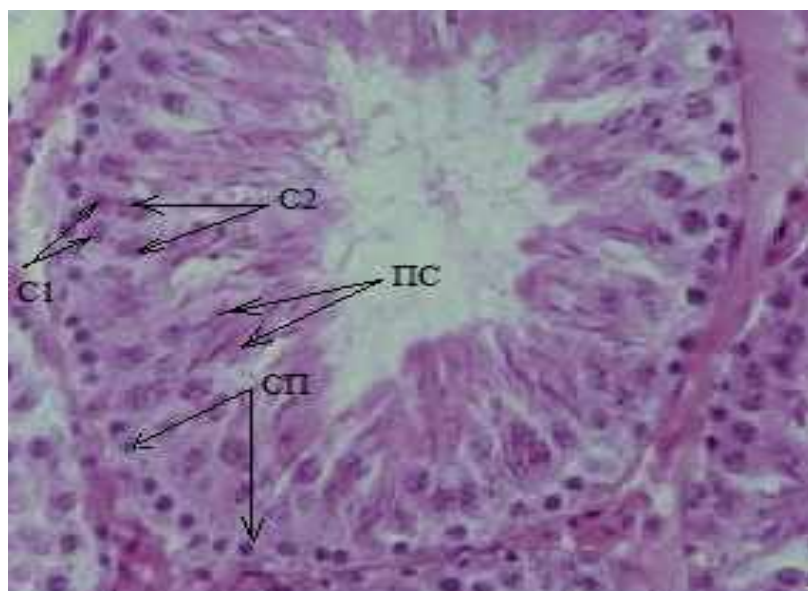


Рис. 8.1. Незмінена структура канальця щура контрольної групи (СП - сперматогонії; С1 – сперматоцити 1 порядку; С2 – сперматоцити 2 порядку; ПС – подовжені сперматиди). Гематоксилін та еозин, х 400.

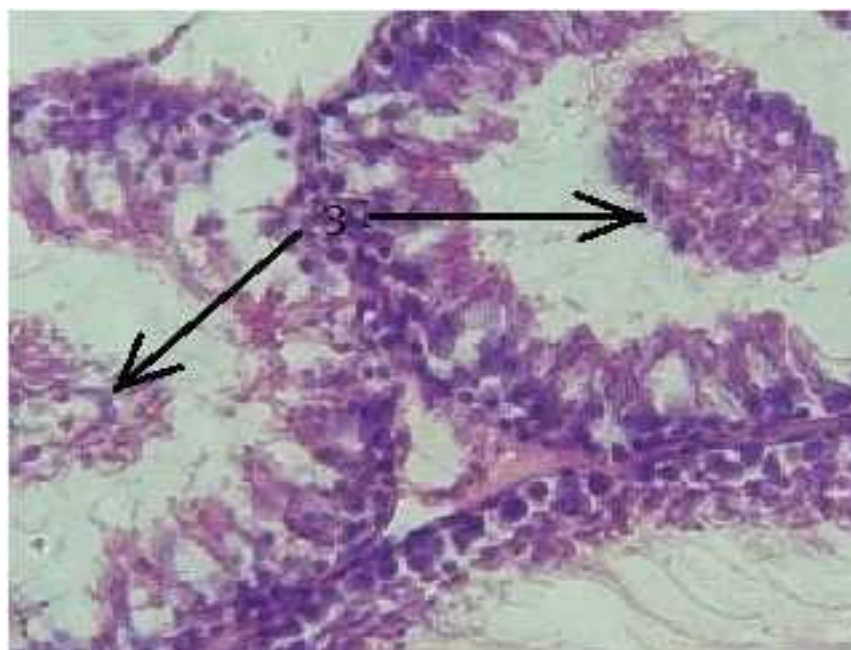


Рис. 8.2. Злушення епітелію в просвіт канальця щура, якому вводили протитуберкульозні засоби. Гематоксилін та еозин, х 400.

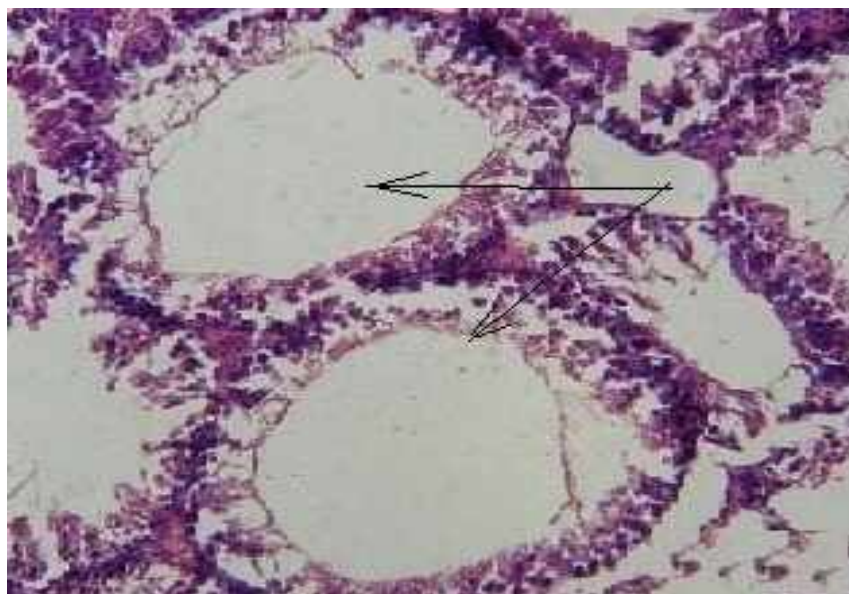


Рис. 8.3. Спустощення сім'яних каналців щура, якому вводили протитуберкульозні засоби. Гематоксилін та еозин, х 200.

Введення, як метіоніну так і Метовітану певною мірою сприяло збереженню цілісності сперматогенного епітелію щурів, які отримували ПТЗ (рис. 8.4).

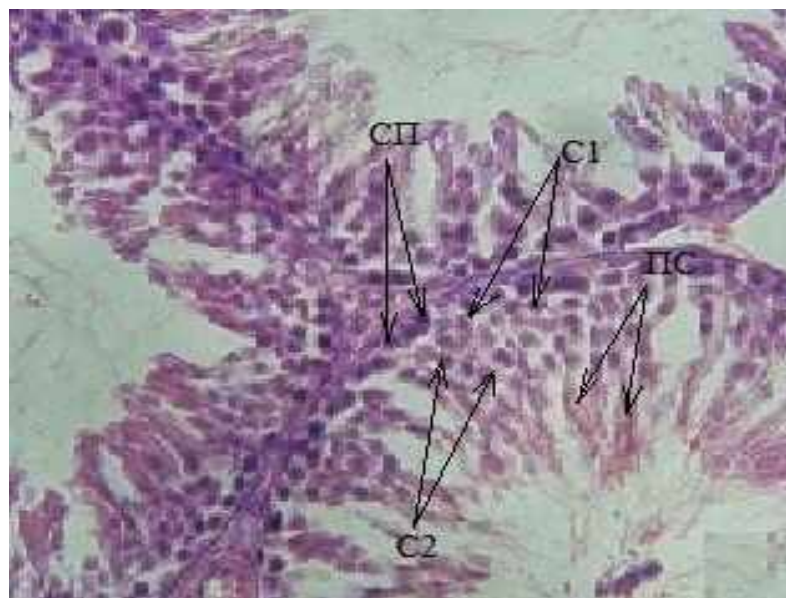


Рис. 8.4. Структура сім'яних каналців щура, якому на тлі протитуберкульозних засобів вводили Метовітан подібна до контрольної групи (СП - сперматогонії; С1 – сперматоцити 1 порядку; С2 – сперматоцити 2 порядку; ПС – подовжені сперматиди). Гематоксилін та еозин, х 200.

З даних, наведених у таблиці 8.3, видно, як змінювались кількісні показники сперматогенного епітелію. Сперматогенний індекс у групі, що отримувала ПТЗ, був значно менший у порівнянні з контролем. Також було завдано шкоди первинній популяції клітин сперматогенного епітелію, а саме, відбувалось інгібування мітотичної активності і зниження кількості сперматогоній у сім'яних канальцях. Крім того, кількість клітин у XII стадії сперматогенезу (характеризує процеси мейотичного поділу сперматоцитів першого порядку) виявляла тенденцію до зменшення. Спостерігались випадки злущування епітелію в просвіт сім'яних канальців, відшарування епітелію та наявність значної кількості ділянок, позбавлених клітин - вакуолей (табл. 8.3).

Таблиця 8.3

Кількісні зміни у сперматогенному епітелії сім'яників щурів за умов введення протитуберкульозних засобів та метіоніну або Метовітану,

($M \pm m$, $n = 8$)

Показники	Експериментальні групи			
	контроль	ПТЗ	ПТЗ+ метіонін	ПТЗ+ Метовітан
1	2	3	4	5
Індекс сперматогенезу (загальна кількість стадій сперматогенезу / кількість досліджених канальців)	$3,64 \pm 0,01$	$3,53 \pm 0,01^*$	$3,55 \pm 0,01^*$	$3,62 \pm 0,01^{**}$ ***
Число сперматогоній (на поперечний зріз через каналець)	$69,39 \pm 0,75$	$59,57 \pm 0,86^*$	$60,16 \pm 0,37^*$	$65,93 \pm 1,16^{**}$ ***

Продовження табл. 8.3

1	2	3	4	5
Клітини в XII стадії циклу сперматогенного епітелію, %	$3,56 \pm 0,36$	$2,41 \pm 0,28$	$5,00 \pm 0,41^*$ **	$2,33 \pm 0,37^*$ ***
Злущений епітелій, %	$1,06 \pm 0,25$	$2,88 \pm 0,28^*$	$1,00 \pm 0,71$	$1,66 \pm 0,54$
Відшарування епітелію, %	$0,31 \pm 0,12$	$1,88 \pm 0,36^*$	$2,00 \pm 0,71$	$0,83 \pm 0,48^{**}$
«Вікна», %	$0,50 \pm 0,16$	$1,76 \pm 0,26^*$	$1,24 \pm 0,49$	$0,50 \pm 0,25^{**}$

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.

За умов застосування на фоні ПТЗ Метовітану вдалося досягти корекції більшості згаданих вище показників, в той час як при введенні метіоніну було відзначено лише значне збільшення кількості клітин у XII стадії сперматогенезу (табл. 8.3). Зокрема в сім'яниках тварин, яким вводили Метовітан порівняно з групою тварин, які отримували лише ПТЗ зростала кількість сперматогоній та сперматоцитів першого порядку, а отже, відновлювалась трансформація сперматогоній у первинні сперматоцити [492, 493]. Подібні позитивні зміни у перетвореннях гермінативних клітин та/або їх активності були причиною збільшення продукції сперматозоїдів в даній групі.

8.3. Експресія мРНК CYP2E1 та стан фрагментації ДНК у сім'яниках

Нами було показано на попередніх етапах роботи, що CYP2E1 відіграє

ключову роль в реалізації побічної дії комбінації ПТЗ на чоловічу репродуктивну здатність.

З метою оцінки ефектів метіоніну та Метовітану на транскрипційну активацію даної CYP2E1 в сім'яниках щурів, яким протягом періоду сперматогенезу сумісно вводили ПТЗ, нами було проведено ЗТ-ПЛР.

Показано, що за умов застосування ПТЗ, в сім'яниках щурів у майже 23 рази порівняно з контролем зростала експресія мРНК CYP2E1 (рис. 8.5). Введення на цьому фоні метіоніну та Метовітану сприяло зниженню рівня експресії гену CYP2E1 відповідно у 8,7 та 20 разів (рис. 8.5) [494].

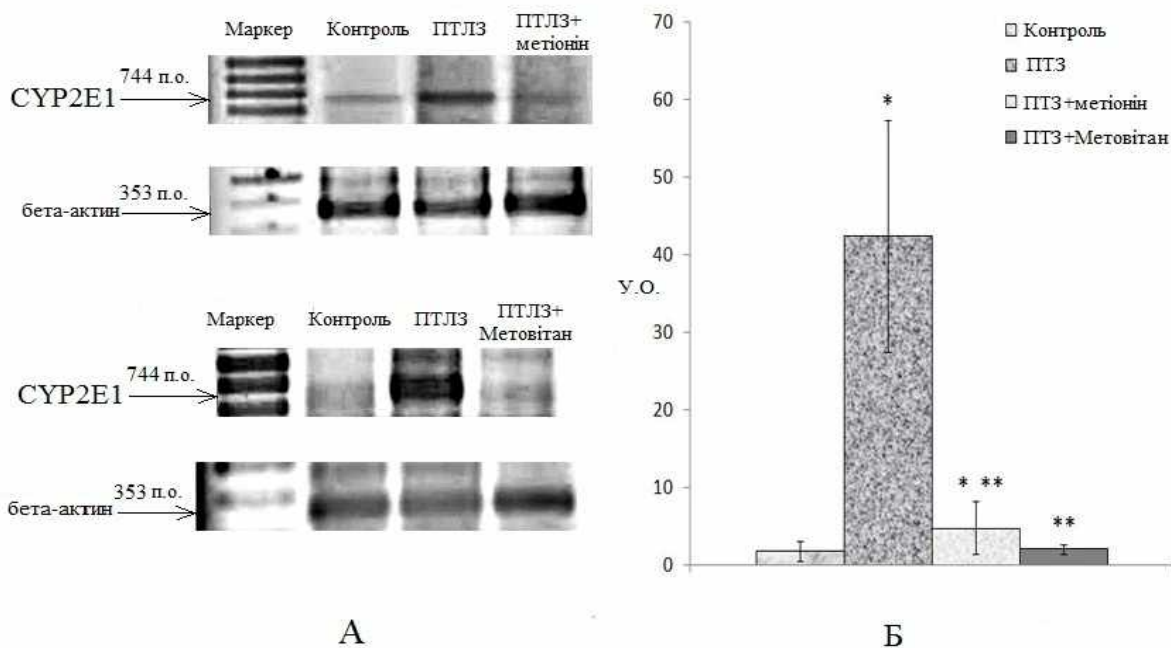


Рис. 8.5. Рівень експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов введення метіоніну та Метовітану на фоні застосування протитуберкульозних засобів: А) електрофореграми продуктів ПЛР гену CYP2E1 та референсного гену β -актину; Б) відносний рівень експресії мРНК CYP2E1 - інтенсивність піку β -актину взято за 100 % ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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

Виявлений нами регуляторний ефект метіоніну та Метовітану на ферментативну активність тестикулярного CYP2E1 на нашу думку може реалізуватись завдяки метаболіту метіоніну - S-аденозилметионіну, що здатний інгібувати дану ізоформу [483]. Це припущення узгоджується з даними досліджень де було показано, що S-аденозил-L-метіонін генерував спектр II типу зв'язку з мікросомальним цитохромом P-450 печінки щурів, яким для індукції CYP2E1 вводили ацетон або ізоніазид. S-аденозил-L-метіонін не змінював спектр зв'язування монооксиду вуглецю з цитохромом P-450, а також не денатурував цитохром P-450 до P-420 та не інгібував активність НАДФН-P-450 редуктази. Проте, він інгібував каталітичну активність CYP2E1 за умов використання типових субстратів, таких як *n*-нітрофенол, етанол та диметилнітрозамін в IC₅₀ близько 1,5-5 ммоль/л та в даному випадку виявився не конкурентним інгібітором. На модельних мікросомах, що експресували індивідуальні ізоформи цитохрому P-450 людини S-аденозил-L-метіонін утворював спектр II типу зв'язку за умов експресії CYP2E1 та інгібував каталітичну активність CYP2E1 в інтактних клітинах HepG2, що експресували дану ізоформу. А отже S-аденозил-L-метіонін взаємодіє з цитохромами P-450, особливо з CYP2E1 та інгібує каталітичну активність останнього в зворотній та неконкурентній манері [292].

Крім того, понижуючий ефект Метовітану на експресію гена CYP2E1 частково може опосередковуватись дією нікотинамід у його складі [495].

Було оцінено вплив метіоніну та Метовітану на стан фрагментації нуклеарної ДНК в сім'яниках щурів, яким вводили комбінацію ПТЗ [494].

У тестикулярних тканинах щурів контрольної групи нами було відзначено лише незначну фрагментацію ДНК. Як свідчать наведені на рис. 8.6 результати, визначались три майже однакові фракції низькомолекулярних фрагментів (20-40, 100-150 та 250 п.о.). Порушення структури тестикулярних клітин, спричинене ПТЗ, супроводжувалось інтенсифікацією фрагментації ядерної ДНК. Загальна кількість фракцій збільшилася з 3 до 5. Окрім фракцій з низькою

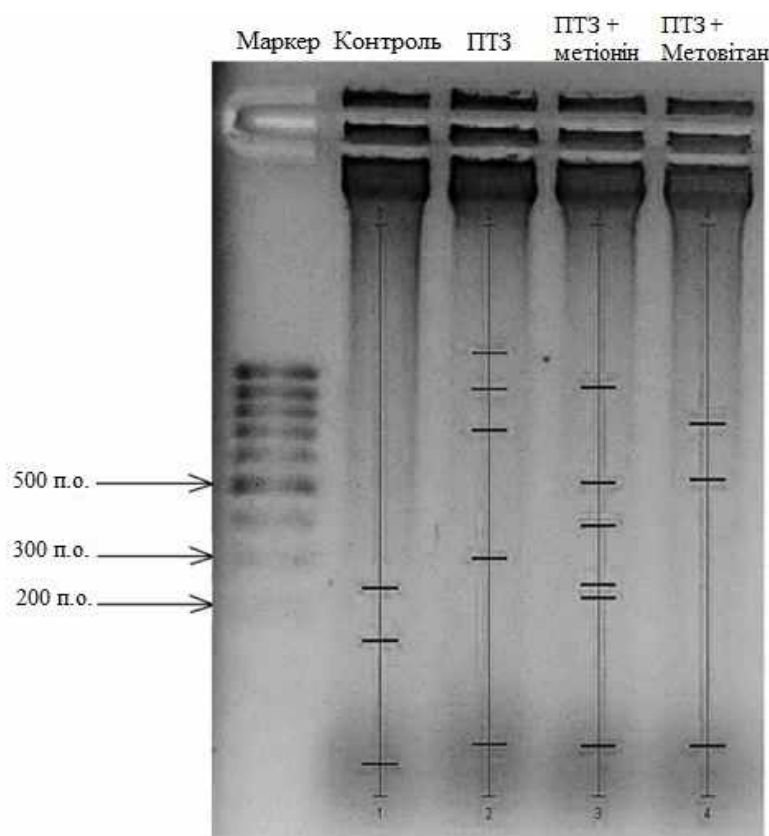


Рис. 8.6. Стан фрагментації нуклеарної ДНК в сім'яниках щурів за умов введення метіоніну та Метовітану на тлі застосування протитуберкульозних засобів

молекулярною масою (у діапазоні від 200 п.о. та 50 п.о.), ми відзначали появу нових фракцій фрагментів ДНК. Їхня молекулярна маса становила від 300-450 до 700-850 п.о., але основну частку (за інтенсивністю піків) складали фрагменти 700 п.о

Введення на фоні ПТЗ метіоніну також змінювало характер фрагментації ядерної ДНК. У сім'яниках щурів даної групи загальна кількість фрагментів ДНК також зросла до 6: перша фракція -800-700 п.о., друга -600-500 п.о., третя - 400-300 п.о., четверта - 200 п.о., п'ята - 150 п.о., шоста - 40-30 п.о. У тварин цієї групи найбільші фракції за інтенсивністю піків складали перша та шоста.

На відміну від ефекту метіоніну, за умов застосування на фоні ПТЗ Метовітану спостерігалось утворення лише трьох фракцій фрагментів ДНК - перша - 600 п.о., друга - 450 п.о., третя - 40-50 п.о.

В таблиці 8.4 підсумовано результати аналізу вмісту фрагментів нуклеарної ДНК різної молекулярної маси в сім'яниках щурів за даних умов експерименту.

Таблиця 8.4

Відносний вміст фрагментів ДНК різної молекулярної маси в сім'яниках щурів за умов введення протитуберкульозних засобів та метіоніну або Метовітану

Групи	% фрагментації ДНК від загального вмісту ДНК
Контроль	6,24
ПТЗ	18,41
ПТЗ + метіонін	20,56
ПТЗ + Метовітан	8,32

Вони свідчать про очевидний позитивний ефект Метовітану. Відсоток фрагментації ДНК у тестикулах щурів даної групи наближався до контрольних значень і був майже вдвічі нижчим у порівнянні з тваринами, які не отримували лікування. Уведення метіоніну не справляло суттєвого впливу на даний показник. Більша ефективність Метовітану в даному разі може пояснюватись наявністю у його складі цинку, який в тому числі має антиапоптотичну дію [489].

8.4. Біохімічні показники сім'яників щурів

Враховуючи зміни експресії гена CYP2E1, нами було оцінено активність його маркерного ферменту – *n*-нітрофенолгідроксилази в мікросомальній фракції сім'яників (рис. 8.7).

Нами показано підвищення даного показника у 15,5 разів у тварин, що

отримували ПТЗ порівняно з контролем. При цьому як метіонін, так і Метовітан

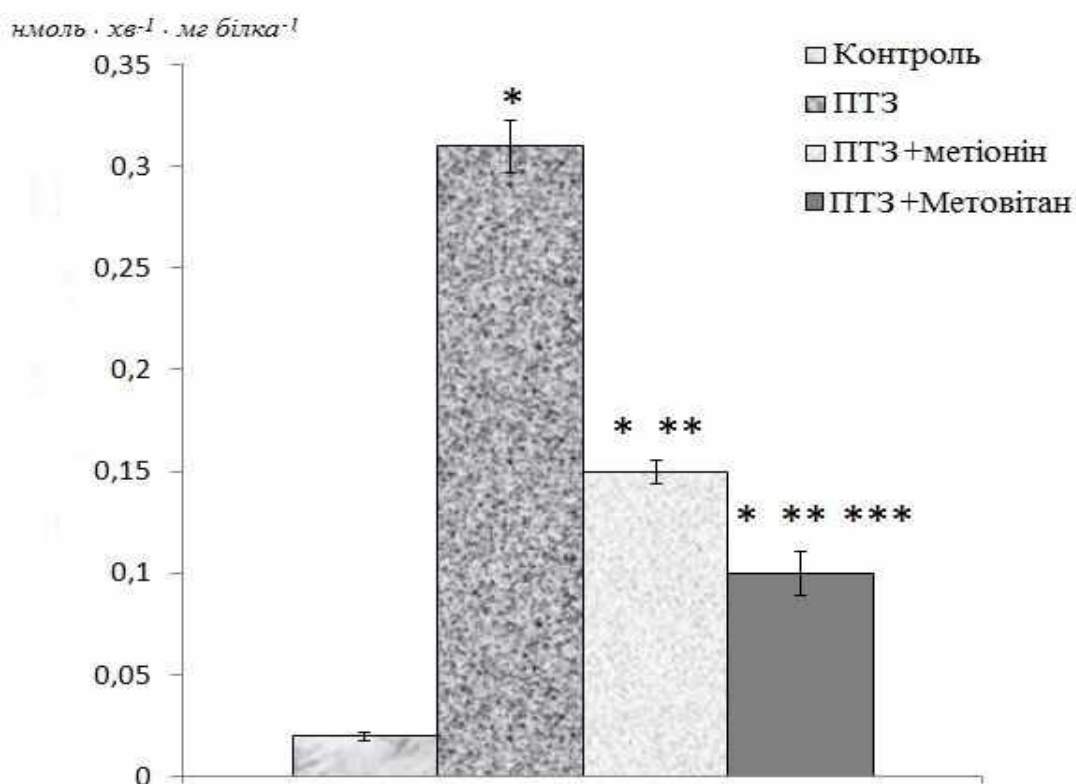


Рис. 8.7. Активність п-нітрофенолгідроксилази в мікросомальній фракції сім'яників щурів за умов введення метіоніну та Метовітану на тлі застосування протитуберкульозних засобів ($M \pm m$, $n \geq 6$).

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.

різною мірою сприяли зниженню ферментативної активності CYP2E1, але показник не сягав значень контролю. Метовітан в даному випадку виявився більш ефективним, ніж метіонін, що як вже зазначалось вище може бути обумовлене синергічною дією його компонентів [494].

Індукція CYP2E1 в сім'яниках супроводжувалась порушенням їхньої

про/антиоксидантної системи (табл. 8.5). Зокрема, тривале введення ПТЗ призводило до зниження активності СОД (25 %) та вмісту відновленого глутатіону (12 %) за одночасного підвищення швидкості НАДФН-залежного утворення продуктів реакції з ТБК (1,9 разів).

Таблиця 8.5

**Зміни показників про/антиоксидантної системи сім'яників щурів 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**
Вміст відновленого глутатіону, 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.

Введення метіоніну та Метовітану ефективно попереджало зміни всіх зазначених параметрів. Як свідчать наведені у табл. 8.5 результати, активність СОД, вміст відновленого глутатіону та швидкість формування ТБК-реактантів залишались в межах нормальних значень [494, 496].

Ми вважаємо, що відновлення про- та антиоксидантного балансу в сім'яниках за умов введення метіоніну та Метовітану може опосередковуватись регуляцією експресії та ензиматичної активності CYP2E1, що веде до обмеження генерації АФК та токсичних метаболітів, а також прямою антиоксидантною дією. Зокрема відомо, що метаболіт метіоніну - S-аденозил-L-метіонін є основним біологічним донором метильних груп, прекурсором амінопропільних груп, що використовуються в біосинтезі поліамінів та прекурсором глутатіону [497]. S-аденозил-L-метіонін відіграє значну роль у метаболізмі та регуляції нуклеїнових кислот, а також збереженні структури та функції мембран та багатьох клітинних складових. Він задіяний у трьох принципових метаболічних шляхах: трансметилування, транссульфування та амінопропілювання, в яких він слугує або донором груп або модулює активність ферментів [498].

Особливо важливою є здатність S-аденозил-L-метіоніну в захисті клітин від вільних радикалів [499]. S-аденозил-L-метіонін синтезується в цитозолі кожної клітини, але печінка відіграє центральну роль в його гомеостазі, як основне місце синтезу та деградації [500].

8.5. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень стосовно впливу препаратів, здатних інгібувати експресію цитохрому P-450 2E1, на репродуктивну функцію самців щурів на тлі введення протитуберкульозних лікарських засобів.

Аналіз результатів досліджень, описаних у даному розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Метовітан більш ефективно, ніж метіонін, сприяв збереженню цілісності сперматогенного епітелію щурів, яким вводили ПТЗ. Покращуючи стан сперматогенного епітелію, метіонін та Метовітан сприяли підвищенню кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісів та фертильності

щурів.

2. За умов сумісного введення щурам ПТЗ протягом періоду сперматогенезу метіонін та оригінальна композиція Метовітан показали здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену CYP2E1, а також інгібувати його ензиматичну активність в сім'яниках. При цьому, Метовітан виявився більш ефективним у порівнянні з метіоніном.

3. Встановлено 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.

4. Введення метіоніну та Метовітану на фоні застосування ПТЗ ефективно попереджало зміни параметрів про/антиоксидантної системи сім'яників щурів.

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Представлені у роботі результати поєднують дві важливі медичні та соціальні проблеми, що не втрачають актуальності: побічної дії лікарських засобів та чоловічої інфертильності. З усіх випадків безпліддя, приблизно 40-50 % обумовлено "чоловічим фактором" і не менше, ніж у 2 % чоловіків в популяції показники якості сперми є субоптимальними внаслідок низької концентрації сперматозоїдів, їх поганої рухливості, морфологічних аномалій або всіх трьох факторів разом. При чому відсоток безплідних пар у менш розвинутих країнах значно вищий [501]. Проблема чоловічого безпліддя, на відміну від жіночого, широко не обговорюється та мало досліджується, більше того існує тенденція приховувати діагноз. Іноді партнер-жінка прагне взяти на себе відповідальність за безплідний шлюб, навіть, якщо очевидним є чоловічий чинник. Розуміння причин даної патології є наразі обмеженим, оскільки лікарі переважно зосереджуються на діагностиці та лікуванні жіночого безпліддя [502]. Невисока ефективність в лікуванні безпліддя у чоловіків є наслідком того, що причини чоловічої інфертильності та субфертильності є недостатньо вивченими. Для підвищення успіху в лікуванні чоловічого безпліддя, вироблення правильної тактики і розробки оптимальних схем лікування необхідна верифікація різних факторів чоловічого безпліддя. Від точності встановлення причини чоловічого безпліддя залежить подальше вивчення патогенезу порушень репродуктивної функції, що буде сприяти розробці ефективних методів терапії [503].

Серед етіологічних факторів, що призводять до чоловічого безпліддя, на детальне дослідження заслуговують порушення репродуктивної функції, обумовлені вживанням певних категорій ліків. Якщо пацієнт приймає хіміотерапевтичний засіб, варто звертати увагу на час початку лікування, його тривалість і період, протягом якого препарат застосовувався (чи був це

критичний період розвитку сім'яників?) та дозу. Подібна інформація може бути дуже корисною у разі зміни показників спермограми, еректильної або еякуляційної функції. Проте, до сих пір даних стосовно потенційної побічної дії лікарських засобів на чоловічу репродуктивну функцію (за винятком тих, що застосовуються для лікування онкологічних захворювань) недостатньо [10]. В зв'язку з цим експериментальні дослідження побічної дії лікарських засобів на чоловічі гонади є вкрай важливими для визначення реального впливу їх застосування серед інших факторів ризику.

Значне число захворювань потребує застосування довготривалих фармакотерапевтичних схем та одним з них є туберкульоз, який дотепер не втрачає позицій важливої медичної та соціальної проблеми [4]. Останнім часом з'явилися поодинокі клінічні дані, які дозволяють припустити, що комбіноване тривале застосування ПТЗ може мати негативні наслідки для чоловічого репродуктивного здоров'я [25, 26, 28]. Затверджена ВООЗ стандартна схема терапії туберкульозу включає комбінацію препаратів I ряду – ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу або стрептоміцину [504]. Наразі накопичено значний масив даних щодо різних токсикологічних наслідків застосування зазначених засобів як за умов нарізного, так і сумісного їх прийому. Незважаючи на це, дотепер не було проведено комплексної експериментальної оцінки їхнього впливу на чоловічу репродуктивну функцію, хоча в науковій літературі минулого сторіччя зустрічаються фрагментарні експериментальні свідчення їхніх гонадотоксичних ефектів [21, 22, 23]. Нечисленні клінічні дані, що з'явилися останнім часом є вкрай суперечливими та також не дають чіткої картини порушень чоловічої репродуктивної функції внаслідок застосування ПТЗ [25, 26, 27].

З урахуванням викладеного вище, метою нашої роботи було визначення шляхів реалізації побічної дії ПТЗ I ряду на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції.

Нами встановлено, що ПТЗ I ряду - етамбутол, піразинамід, ізоніазид та рифампіцин, введені сумісно протягом періоду сперматогенезу в терапевтичних

дозах шурам-самцям, викликали значні морфологічні та морфометричні змін у сперматогенному епітелії, які в кінцевому результаті призводили до зниження продукції сперматозоїдів та зменшення їх життєздатності.

Підрахунок кількості інтактних самиць, які завагітніли після парування з самцями дослідних груп виявив значне зниження фертильності самців, які отримували комбінацію ПТЗ. Оцінка ж індексу запліднювальної здатності тварин, яким вводили ПТЗ нарізно, виявила, що усі чотири застосованих препарати певною мірою знижували даний показник, але найбільше - ізоніазид (індекс запліднювальної здатності – 66,67 %) та етамбутол (індекс запліднювальної здатності - 33,33 %). Дані щодо запліднювальної здатності дослідних щурів узгоджувались із результатами мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії, які показали, що за умов сумісного введення ПТЗ відбувалось зниження продукції статевих клітин сім'яниками більше, ніж вдвічі порівняно з тваринами контрольної групи. Очевидно, що цей ефект був пов'язаний з дією етамбутолу та ізоніазиду, оскільки за умов нарізного введення ПТЗ саме після введення цих препаратів спостерігалось зниження кількості сперматозоїдів, в той час як рифампіцин та піразинамід практично не впливали на даний показник. Результати морфологічних досліджень також показали, що наявність дистрофічних та деструктивних змін у статевих залозах щурів-самців за введення ПТЗ, очевидно, більшою мірою обумовлені дією етамбутолу та ізоніазиду.

Одночасно сумісне введення ПТЗ і нарізне - етамбутолу та ізоніазиду за умов наших експериментів призводило до суттєвого зниження рівня тестостерону в сироватці крові щурів дослідних груп порівняно з контролем. Рифампіцин та піразинамід в застосованих дозах не впливали на даний показник. Таким чином, ми припускаємо, що ключова роль в реалізації порушень репродуктивної здатності за умов сумісного введення ПТЗ I ряду належить етамбутолу та ізоніазиду.

Відомо, що індукція або інгібування цитохромів Р-450 при застосуванні лікарських засобів може обумовлювати ряд побічних ефектів, в основі

механізмів яких є, зокрема, безпосереднє ушкодження токсичними метаболітами та АФК найважливіших складових клітин - ліпідів, протеїнів, вуглеводів та ДНК [505]. Серед ізоформ цитохрому Р-450, що мають здатність до експресії в чоловічих гонадах, однією з найважливіших з точки зору фармакології та токсикології є СYP2E1 [506]. Його індукція супроводжується активацією утворення АФК, очевидно, внаслідок високої оксидазної активності [507, 367] внаслідок взаємодії з НАДФН-цитохром Р-450 редуктазою, а також здатності до швидкого відновлення навіть за відсутності субстрату [508]. Особлива роль СYP2E1 у стимуляції окислювального стресу підтверджується даними про зростання рівня окиснення ліпідів в мікросомальних системах, збагачених даним ізоензимом [30]. Крім того, є повідомлення, що за умов індукції СYP2E1 може ушкоджуватись не лише печінка [509, 510], але й розвиватись окисний стрес в інших органах, де відбувається експресія даної ізоформи [511]. Присутність СYP2E1 у чоловічих гонадах та його індукцибельність можуть мати велике значення у продукції гонадо- та генотоксичних метаболітів при біотрансформації лікарських засобів.

Ми припустили, що модуляція експресії та активності СYP2E1 у сім'яниках за умов дії ПТЗ може відігравати суттєву роль в механізмах порушень репродуктивної функції [512]. Для з'ясування цього було порівняно вплив етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду за умов їх окремого та сумісного введення на індукцію СYP2E1 у сім'яниках білих щурів та визначено кореляційні зв'язки між станом експресії гену даного ізоензиму та рівнем продукції сперматозоїдів. Було показано, що етамбутол, піразинамід, ізоніазид та рифампіцин, введені сумісно, викликали значне підвищення експресії мРНК та протеїну СYP2E1 з одночасним зростанням його ферментативної активності у сім'яниках білих щурів, що свідчить про індукцію даної ізоформи [358, 359, 360, 361, 362, 513, 514,]. Разом з цим у щурів-самців, які отримували ПТЗ в зазначеній комбінації виявлено дисбаланс про- та антиоксидантної системи сім'яників, а також зростання апоптотичних процесів у тестикулярних тканинах, що підтверджувалось, як зростанням рівня

фрагментації нуклеарної ДНК, так і наявністю гігантських багатоядерних клітин у зоні сперматоцитів I порядку.

Після нарізного введення рифампіцину та піразинаміду нами не виявлено статистично значимого зростання експресії мРНК CYP2E1 у гонадах тварин. Але, спостерігалось значне підвищення експресії мРНК CYP2E1 як після введення ізоніазиду, етамбутолу, так і при застосуванні комбінації ПТЗ. Оцінка експресії білка CYP2E1 також виявила значне підвищення його синтезу в сім'яниках щурів, яким вводили етамбутол та ізоніазид, що супроводжувалось підвищенням його ферментативної активності в гонадах тварин зазначених груп. Результати попарного кореляційного аналізу показали наявність високої негативної кореляції між кількістю сперматозоїдів та рівнем експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів, які отримували усі чотири ПТЗ ($r = -0,87$; $p = 0,001$) або етамбутол ($r = -0,92$; $p = 0,001$) та ізоніазид ($r = -0,98$; $p = 0,001$).

Так само і біохімічні зміни (стан про- та антиоксидантної системи, тіоловий статус) у сім'яниках щурів, які протягом періоду сперматогенезу отримували ПТЗ, перш за все виявлялись у групах тварин, що отримували етамбутол та ізоніазид.

Згідно отриманих даних за здатністю викликати порушення чоловічої репродуктивної функції досліджені препарати можна розташувати в наступному порядку: рифампіцин < піразинамід < ізоніазид < етамбутол < комбінація ПТЗ. Враховуючи, що небажані ефекти ПТЗ на репродуктивну функцію щурів-самців згідно отриманих нами даних перш за все опосередковувались етамбутолом та ізоніазидом, можна припустити існування таких механізмів, які можуть визначати вплив саме цих препаратів.

Загалом ізоніазид відомий як селективний індуктор CYP2E1. Вважають, що його гепатотоксичність обумовлена метаболітами, що утворюються за допомогою даної ізоформи [515]. Гідразин, моноацетилгідразин та інші метаболіти гідразину здатні генерувати вільні радикали, які, в свою чергу, спричиняють активацію ПОЛ та розриви ланцюгів ДНК, порушуючи функціонування клітин [516]. Враховуючи, що нами встановлено можливість

індукції CYP2E1 в сім'яниках [358, 359, 360, 361, 362, 513, 514], ми можемо припустити, що метаболізм ізоніазиду за участі CYP2E1 відбувається також і безпосередньо в цих органах. На наш погляд це є цілком можливим, оскільки ізоніазид є низькомолекулярною речовиною, яка в організмі не зв'язується з білками плазми і легко перетинає клітинні мембрани, розподіляючись по тканинах [517]. Примітно, що дані стосовно здатності ізоніазиду підвищувати експресію гена CYP2E1 є суперечливими. За даними K. S. Parck та співавт. індукція CYP2E1 ізоніазидом не супроводжувалася підвищенням рівня мРНК CYP2E1. Зважаючи на це автори дійшли висновку, що в даному випадку індукція CYP2E1 була обумовлена активацією трансляції мРНК CYP2E1 [518]. Наші ж результати, які свідчать про значне збільшення вмісту мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за введення ізоніазиду узгоджуються з даними тих авторів, що як і ми, виявили зростання експресії гена CYP2E1 внаслідок дії ізоніазиду, але не в сім'яниках, а у печінці [519].

Важливо відзначити, що тканини сім'яників є вразливими до окисного стресу внаслідок значної кількості високоненасичених жирних кислот (особливо 20:4 та 22:6) та наявності потенційних систем, що генерують АФК [520]. З огляду на отримані нами результати, можна зробити припущення, що активація CYP2E1, опосередкована дією ізоніазиду, швидше за все, відіграє значну роль у генерації АФК, призводячи до дисбалансу окисних процесів та антиоксидантного захисту в тканинах сім'яників. Це припущення підтверджують наші дані стосовно зростання швидкості НАДФН-індукованого утворення ТБК-реактивних та модуляції активності глутатіон-S-трансферази і СОД в сім'яниках тварин, які піддавались впливу ізоніазиду.

Одержані нами дані щодо посилення фрагментації ДНК в сім'яниках щурів за умов введення ізоніазиду узгоджуються з результатами інших авторів, які встановили, що даний препарат негативно впливає на процеси метилювання ДНК печінки [521] та пригнічує нормальний синтез ДНК у сперматогоніях кролів-самців [522]. Крім того, було показано, що ізоніазид здатний стимулювати апоптоз в клітинах HepG2, знижуючи співвідношення Bcl-2 / Bax,

що призводить до активації каспази-3 та каспази-9 [523]. Можна припустити, що виявлена нами інтенсифікація апоптозу відбувалась внаслідок зумовленої ізоніазидом індукції CYP2E1 та порушення балансу АФК та антиоксидантів, що впливає на відповідні сигнальні шляхи. Наприклад, відомо, що CYP2E1 є ефективним генератором пероксиду водню [524], який інгібує сигналізацію мішені рапаміцину ссавців (mTOR), протеїнкінази серин-треонінової специфічності, шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази α [525]. Одночасно індукція АФК може пригнічувати негативні регулятори – фосфатазу з подвійною субстратною специфічністю (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 - PTEN) та АМФ-активовану протеїнкіназу α , призводячи до активації шляху протеїнкінази В (Akt)/mTOR [526]. Обидва варіанти подій призводять до клітинного апоптозу [525, 526]. Виявлений нами порівняно високий рівень фрагментації ДНК в сім'яниках щурів, що отримували ізоніазид, може слугувати свідченням інтенсивності апоптотичної загибелі статевих клітин [527]. Це припущення узгоджується з нашими результатами гістоморфологічних досліджень сім'яників тварин дослідних груп, якими виявлено появу гігантських багатоядерних клітин у зоні сперматоцитів першого порядку, що може бути пов'язане з "повільними" дегенеративними процесами в тестикулах. У разі інтенсивного відмирання гермінативного епітелію апоптотичні клітини дуже швидко фагоцитуються оточуючими клітинами Сертолі, що призводить до видалення "доказів" клітинної смерті [343]. Більше шансів спостерігати їх існує у випадку повільних, неспецифічних дегенеративних процесів суміжних гермінативних клітин з тієї самої когорти, що утворюють багатоядерний синтицій, який більш повільно фагоцитується клітинами Сертолі. Утворення таких синтиціїв відбувається внаслідок розриву цитоскелетних волокон, що підтримують взаємозв'язані цитоплазматичні містки [343].

Таким чином, нами вперше було надано докази того [351, 352, 353], що несприятливі ефекти застосування ізоніазиду можуть бути більш серйозними та глибокими, ніж це вважалось раніше.

Що стосується етамбутолу, то важливою його властивістю є здатність за умов перорального введення швидко всмоктуватись і легко розподілятися по організму [528]. Близько 8-15 % дози метаболізується в печінці [529] до двох сполук: проміжного метаболіту альдегідної природи та дикарбонової кислоти - 2,2'-(етилендіаміно)-дибутирової кислоти [530]. 45-62 % уведеної дози виводиться з сечею в незмінному вигляді [531]. Фармакокінетичні властивості етамбутолу добре описані [532]. Показано, що у найвищих концентраціях препарат виявляється в еритроцитах, нирках, легенях та слині, а у найнижчих - в асцитній та плевральній рідині, головному мозку та цереброспінальній рідині [533]. При цьому етамбутол має високу біодоступність (~ 80 %) та низький рівень зв'язування з білками плазми (20-30 %) [534]. Отже, ми можемо припустити його здатність проникати через ГТБ внаслідок низької молекулярної маси та гідрофільності [535]. Таке припущення добре узгоджується з нашими фактичними результатами, а також з ранніми повідомленнями 70-х років минулого сторіччя, які свідчать про втрату фертильності та очевидні регресивні ураження сім'яників щурів [23] та порушення стану сперматогенного епітелію з подальшим блокуванням сперматогенезу у щурів та півнів за введення етамбутолу [21]. Варто відзначити, що незважаючи на деякі експериментальні докази гонадотоксичності етамбутолу [21, 24], досі не проведено глибокого аналізу ефектів і механізмів, залучених до формування його токсичної дії на чоловічі гонади. Результати нашого дослідження вперше надають факти стосовно біохімічних та молекулярних змін, що відбуваються на рівні тканин сім'яників за умов введення етамбутолу.

Як зазначено вище, нами було отримано чіткі докази тестикулярної індукції CYP2E1 внаслідок тривалого введення етамбутолу щурам в терапевтичній дозі. Зокрема, відзначено значне зростання вмісту мРНК та протеїну CYP2E1, а також збільшення його ферментативної (*n*-нітрофенолгідроксилазної) активності в сім'яниках [362]. Здатність етамбутолу до індукції CYP2E1 в сім'яниках, на наш погляд може реалізуватись за різними механізмами. Наразі виявлено дуже мало речовин, які індукують

CYP2E1 на рівні транскрипції, більшість з них збільшують експресію цього ферменту шляхом стабілізації його протеїну [536], але значне зростання рівня мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов наших експериментів дозволяє припустити наявність регуляції CYP2E1 як на транскрипційному рівні внаслідок транскрипційної активації, так і за рахунок гальмування деградації мРНК. Наше припущення підтверджується нечисленними даними інших авторів, які показали можливість індукції CYP2E1 на транскрипційному рівні з використанням первинних культур гепатоцитів людини за умов експозиції етанолу та пальмітинової олії [537] та результатами стосовно зростання експресії мРНК даного ізоферменту в периферичних лімфоцитах при експозиції толуолу [538].

Стосовно підвищення ферментативної активності CYP2E1 за введення етамбутолу, можна припустити, що даний препарат діє за механізмом, подібним до такого в етанолу (стабілізація білка CYP2E1) [539, 540]. Відомо, що етанол може структурно стабілізувати молекулу CYP2E1 і пригнічувати протеоліз шляхом етанол-залежного інгібування протеолітичної системи [540].

Дані, отримані нами за допомогою комп'ютерного моделювання, дозволяють припустити, що етамбутол може безпосередньо взаємодіяти з активним сайтом CYP2E1 та гемом [362]. Таке розташування етамбутолу є характерним для субстратів CYP2E1, але ліганд взаємодіє з гемом за допомогою його гідроксильної групи, тобто він не може бути метаболітом. Енергія зв'язування комплексу фермент-етамбутол наближається до рівня білок-субстратної взаємодії, що, за даними літератури, може свідчити про його здатність виступати у якості слабкого конкурентного інгібітору CYP2E1 [541]. Отже, ми можемо припустити, що етамбутол може взаємодіяти з CYP2E1 за кількома механізмами в залежності від умов, що вимагають додаткових досліджень. Слід зазначити, що етамбутол не єдина хімічна речовина, що спроможна індукувати CYP2E1, не будучи його субстратом. Подібними сполуками є імідазоли (наприклад, кетоконазол) [542]. Дані щодо взаємодії етамбутолу та CYP2E1, незважаючи на їх суперечливість, дозволяють

припустити залучення цієї ізоформи до механізмів розвитку токсичних ефектів даного ПТЗ.

На підставі отриманих нами результатів, які демонструють зростання швидкості аскорбат- та НАДФН-індукованого утворення ТБК-реактивних у сім'яниках щурів за введення етамбутолу, ми вважаємо, що індукція CYP2E1, опосередкована етамбутолом, може провокувати дисбаланс окисних процесів та антиоксидантного захисту в тестикулярних тканинах. Тим не менш, можна припустити, що до змін окисної рівноваги за умов введення етамбутолу залучений не лише CYP2E1, але й здатність даного препарату утворювати комплекси з цинком [543], який бере участь у клітинному метаболізмі [544]. N. Nair та співавт. було продемонстровано, що недостатність цинку викликала підвищення чутливості сім'яників та епідидимісів щурів до окисного стресу внаслідок зростання генерації АФК та/або зниження ефективності залежних від цинку ланок антиоксидантного захисту [545]. Крім того, виснаження пулу цинку може призводити до посилення пошкодження ДНК в результаті порушення механізмів її репарації [546]. Ми припускаємо, що цинк-хелатуючий ефект етамбутолу та його метаболіту [543] також може сприяти розвитку дефіциту тестостерону. Наприклад, за даними інших авторів у щурів, яких утримували на цинк-дефіцитній дієті, дослідження ультраструктури сім'яників виявило ознаки апоптозу, такі як хвиляста базальна мембрана, зміщені ядра, конденсація хроматину, розплавлення плазматичної мембрани, розкладання ядерної мембрани, втрата контактних комплексів між клітинами Сертолі та інтрацелюлярними мітками, а також деформацію мітохондрій [547]. Зв'язок між рівнями цинку та тестостерону також був продемонстрований у чоловіків [548].

Наші результати стосовно зростання фрагментації ДНК в сім'яниках щурів, що отримували етамбутол, добре узгоджуються з нашими попередніми даними, що продемонстрували наявність епігенетичних ефектів інших ПТЗ *in vivo* [69] та результатами інших авторів *in vitro* стосовно індукованої етамбутолом загибелі клітини та інгібування нормального синтезу ДНК [549].

Подібні зміни можуть корелювати із змінами рівня фактору некрозу пухлин альфа (TNF α), інтерлейкіну-10 (IL-10), генерації оксиду азоту та активацією каспази-1 [550].

Проведене нами порівняльне дослідження ефектів двох різних схем фармакотерапії, що використовуються при туберкульозі (перша - передбачала сумісне введення піразинаміду, рифампіцину, ізоніазиду та етамбутолу, а друга – заміну етамбутолу на стрептоміцин) на чоловічу репродуктивну здатність за умов застосування в експерименті виявило певне покращення показників фертильності піддослідних щурів-самців та ембріо-фетального розвитку їх потомства у разі заміни етамбутолу на стрептоміцин [551, 552]. Стрептоміцин, введений окремо, на відміну від етамбутолу не впливав на тестикулярну експресію мРНК CYP2E1. Проте, у сім'яниках щурів, які отримували стрептоміцин в комбінації з іншими ПТЗ, ми спостерігали зростання експресії гену CYP2E1, що можливо відбувалось за рахунок дії ізоніазиду.

Отримані дані є теоретичним обґрунтуванням можливості заміни етамбутолу на стрептоміцин при комбінованій фармакотерапії туберкульозу з метою запобігання ризиків розвитку чоловічого безпліддя та опосередкованого через батька негативного впливу на потомство. Подібна альтернатива доцільна за умови відсутності негативного впливу на лікування основного захворювання.

Наші дані стосовно внеску етанол-залежної ізоформи CYP2E1 до розвитку побічних ефектів ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію дозволяють передбачити зростання ризику застосування ПТЗ за певних умов. Імовірність цього є достатньо високою, оскільки в реальному житті на організм одночасно впливає значна кількість чинників та серед них на особливу увагу заслуговують такі патологічні стани, як алкоголізм та діабет, що характеризуються індукцією CYP2E1.

Слід зазначити, що у щурів, які вживали алкоголь та ПТЗ у порівнянні з тваринами з експериментальним алкоголізмом, ми спостерігали більш серйозні порушення щодо кількості сперматозоїдів, рівня фертильності, а також 100% післяімплантаційну загибель потомства.

Нами було відзначено прогресуюче зростання вмісту мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів, які вживали алкоголь одночасно з ПТЗ. При цьому кількість протеїну CYP2E1 була приблизно на тому ж рівні, що і в групі тварин, які отримували лише етанол, значно перевищуючи контрольні показники. Таке явище найкраще пояснюється існуванням складної молекулярної регуляції індукції CYP2E1 [123]. Збільшення вмісту мРНК CYP2E1 в сім'яниках після тривалого вживання етанолу та за введення на цьому фоні ПТЗ свідчить про транскрипційну регуляцію експресії даного ізоферменту [553]. Враховуючи, що у попередній серії експериментів нами було показано зростання вмісту мРНК тестикулярного CYP2E1 у щурів внаслідок сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду [360, 361, 362, 382], ми припустили, що більш виражене посилення експресії гена CYP2E1 за умов одночасного введення алкоголю та ПТЗ може бути пов'язане з синергічними ефектами різних агентів на рівні транскрипції.

Наші результати стосовно збільшення вмісту протеїну тестикулярного CYP2E1 у експериментальних щурів відображають можливість його стабілізації етанолом та подовженням напівперіоду його розпаду [123,554,555]. Після введення ПТЗ на тлі хронічної алкоголізації рівень білка тестикулярного CYP2E1 також був вищий, ніж у контролі, проте, подальшого підвищення даного показника в порівнянні з групою тварин, які отримували лише алкоголь, не спостерігалось. Це може бути пов'язано зі змінами у обміні білка CYP2E1, інтенсивність якого так само, як і транскрипція, стабільність мРНК та трансляція може змінюватись за дії певних екзогенних чинників. Зокрема, як це було показано для деяких сполук, наприклад чотирьоххлористого вуглецю та глюкагону [556, 557]. Крім того, важливим фактором деградації CYP2E1 шляхом ініціації залежного від протеасом протеолізу може бути оксидативний стрес [558]. Отже, пояснення цього явища може лежати в площині множинних ефектів ПТЗ та етанолу на пост-трансляційну регуляцію CYP2E1.

Встановлено, що застосування ПТЗ у терапевтичних дозах на тлі хронічного алкоголізму призводило до підвищення активності

n-нітрофенолгідроксилази (маркера CYP2E1) у мікросомній фракції клітин печінки в 1,5 рази порівняно з групою «хронічний алкоголізм» та втричі порівняно з контрольною групою. Зростання рівня індукції CYP2E1 за застосування ПТЗ на тлі повторних введень алкоголю може мати серйозні наслідки з огляду на здатність даної ізоформи до масивної генерації АФК [123]. Таке припущення повністю узгоджується з отриманими нами результатами стосовно виразної тенденції до зростання активності НАДФН-залежного ПОЛ в організмі щурів з хронічним алкоголізмом та збільшення цього показника (на 82 %; $p \leq 0,05$) за умов введення на цьому тлі ПТЗ.

Слід відзначити, що за умов дії самого алкоголю чоловіча субфертильність та інфертильність може розвиватись внаслідок порушення сперматогенезу та змін в структурі сполучних білків, як за рахунок прямої дії токсичних метаболітів на сперматогенний епітелій, так і шляхом опосередкованого впливу на біосинтез тестостерону в клітинах Лейдіга. Нами показано, що в сім'яниках щурів, які тривало вживали алкоголь, вміст мРНК CYP2E1 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 ($r = 0,99$; $p = 0,001$). Виявлені нами корелятивні зв'язки між рівнем експресії тестикулярної мРНК CYP2E1 та ушкодженням сперматогенного епітелію у алкоголь-залежних щурів підтверджують можливість залучення даного ізоферменту до розвитку репродуктивних порушень [370, 371].

Результати дослідження рівня фрагментації ДНК, як маркеру апоптотичних процесів, у сім'яниках та печінці тварин, що отримували на фоні хронічної алкоголізації ПТЗ також свідчать про зростання ушкодження клітин сім'яників порівняно з тваринами, які споживали лише етанол. Водночас, в сім'яниках тварин на тлі хронічної алкоголізації поглиблювались порушення тілового статусу, а саме відзначалось зниження вмісту SH-груп білків, вичерпання пулу відновленого глутатіону, зростання активності глутатіон-S-трансферази.

Отримані нами дані дозволяють стверджувати, що введення щурам на тлі споживання алкоголю ПТЗ призводило до різноспрямованих змін активності тестикулярних дегідрогеназ – СДГ та ЛДГ, які відіграють вирішальну роль у енергетичному забезпеченні статевих клітин [559]. Причому ці зміни були більш визначні, ніж за введення або самого етанолу або комбінації ПТЗ.

Таким чином, отримані нами дані продемонстрували значну індукцію CYP2E1, зростання рівня фрагментації ДНК, а також метаболічні зміни в організмі самців щурів за сумісного введення ПТЗ на тлі хронічного алкоголізму. Порушення в сім'яниках тварин, виявлені на рівні генома і протеома, асоціювались зі змінами кількісних та якісних параметрів сперматогенного епітелію, кількості сперматозоїдів, фертильності та постімплантаційного виживання потомства. Отже, введення самцям щурів ПТЗ посилювало негативний вплив від споживання алкоголю на сперматогенез і негативні віддалені наслідки для потомства.

Відомо, що змінювати метаболізм хімічних речовин та посилювати їх токсичність може не тільки екзогенна індукція CYP2E1, але і ендогенна [145]. Враховуючи це нами було проведено дослідження ефектів ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід) за умов їх сумісного введення на тлі патології, що характеризується індукцією CYP2E1 (експериментальний діабет I типу) [455, 456, 457]. За цих умов встановлено поглиблення порушень морфо-функціонального стану сім'яників та репродуктивної здатності щурів-самців. Як сам діабетичний стан, так і особливо введення на цьому тлі ПТЗ негативно позначались на ембріо-фетальному та постнатальному розвитку потомства щурів-самців, що проявлялось зростанням рівня антенатальної смертності, а також впливом на ЦНС - підвищенням рівня тривожності за показниками активності в тесті «відкрите поле» порівняно з контролем у постнатальний період розвитку.

Оскільки згідно до результатів, отриманих нами на попередніх етапах дослідження, індукція CYP2E1 опосередковує побічну дію введених сумісно етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду на чоловічу

репродуктивну здатність, нами було проаналізовано рівень тестикулярної експресії гену *CYP2E1* у сім'яниках щурів із СТЗД, які отримували комбінацію зазначених ПТЗ [139, 560]. Виявилось, що сумісне введення ПТЗ на тлі СТЗД призводило до подальшої стимуляції тестикулярної експресії гену *CYP2E1*, зростання його ензиматичної активності та змін рівня і характеру фрагментації нуклеарної ДНК у клітинах сім'яників.

Важливо, що кореляцію між рівнем експресії мРНК *CYP2E1* та кількістю сперматогоній, виникненням "вікон", відсотком випадків десквамації та злушення сперматогенного епітелію спостерігали не тільки у алкоголь-залежних щурів, але і у тварин із СТЗД, щоправда у тварин даної експериментальної групи була відсутня кореляція між експресією мРНК *CYP2E1* та значенням сперматогенного індексу. Це може обумовлюватись широким спектром механізмів, залучених до формування порушень функціонування клітин Лейдіга, відповідальних за секрецію тестостерону, за умов діабету. Зокрема, відомо, що у пацієнтів з цукровим діабетом реєструють зниження рівнів фолікуло-стимулюючого гормону, ЛГ (відповідального за нормальну стероїдогенну функцію клітин Лейдіга), пролактину та гормону росту [561, 562]. Раніше було запропоновано два паралельні механізми ушкодження клітин Лейдіга при діабеті: по-перше, це зміна рівня ЛГ внаслідок гіпоінсулінемії, а по-друге, сукупний вплив низьких рівнів ЛГ та інсуліну на клітини Лейдіга [563]. Відомо, що інсулін може безпосередньо взаємодіяти з рецепторами клітин Лейдіга, модулюючи процес стероїдогенезу [564], а введення інсуліну в первинні культури Лейдіга викликає посилення утворення тестостерону [565]. Це говорить про те, що низький рівень інсуліну в плазмі може обумовлювати зниження утворення тестостерону, що, як відомо, обмежує процес сперматогенезу [566]. Крім того, діабетичний стан змінює активність аргінази (ферменту, важливого для проліферації клітин) у репродуктивній системі, що може погіршувати проліферацію клітин Лейдіга [567]. Показано, що в сім'яниках щурів з СТЗД знижується вміст АТФ, призводячи до порушення енергетичних процесів важливих для нормального протікання

сперматогенезу [568]. Загалом дослідники не можуть дійти консенсусу, на яких стадіях діабет впливає на чоловічу фертильність - на ранніх етапах сперматогенезу або на рівні зрілих сперматозоїдів. Нещодавно було показано, що тестикулярні клітини можуть експресувати інсулін [569], а отже, незрозуміло, чи впливає діабет на фертильність опосередковано через недостатність інсуліну в сім'яниках, або через системні наслідки даної патології [570]. Зважаючи на наші дані стосовно індукції CYP2E1 у сім'яниках за умов діабету, можна припустити можливість розвитку порушень фертильності на ранніх стадіях сперматогенезу.

Таким чином, згідно з результатами наших досліджень, ПТЗ I ряду (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід) за умов сумісного введення щурам-самцям в терапевтичних дозах протягом періоду сперматогенезу виявляють значний негативний вплив на їх репродуктивну здатність, а також призводять до індукції тестикулярного CYP2E1 й інших метаболічних порушень в гонадах. Подібні порушення поглиблюються за умов введення ПТЗ на тлі станів, що характеризуються екзогенною (хронічний алкоголізм) та ендогенною (діабет I типу) індукцією CYP2E1.

Серед ПТЗ, які застосовуються сумісно при лікуванні туберкульозу, найбільшу здатність індукувати CYP2E1 та найвищу тестикулярну токсичність при нарізному введенні виявляють ізоніазид та етамбутол.

CYP2E1 в сім'яниках, перш за все, локалізується в багатих на ендоплазматичний ретикулум клітинах Лейдіга, які відповідають за біосинтез тестостерону [126, 129]. На нашу думку індукція CYP2E1, окисний стрес і апоптоз в клітинах сім'яників, що викликані введенням комбінації ПТЗ (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин та піразинамід), можуть бути причиною гальмування ферментів стероїдогенезу та порушення здатності сперматогенного епітелію до диференціації нормальних сперматозоїдів [571, 572]. Зокрема, ми припускаємо, що порушення в гонадах щурів-самців, принаймні частково, можуть бути опосередковані CYP2E1-залежною генерацією АФК [573]. Наявність в комбінації ПТЗ піразинамиду і етамбутолу дозволяє припустити, що

до дисбалансу окиснювальних процесів і антиоксидантного захисту в тканинах сім'яників одночасно можуть бути залученні АФК-генеруюча система ксантиноксидази (фермент відповідальний за біотрансформацію піразинамідів) і хелатування цинку та міді (властиві для етамбутолу) [574,575].

Активація CYP2E1-залежних етанол-метаболізуючих систем в клітинах сім'яників за умов введення ПТЗ, особливо на тлі експериментальних алкоголізму та діабету, зумовлює зростання рівня генерації АФК та промоцію ПОЛ, залучених до розвитку оксидативного стресу та наступних репродуктивних розладів [576]. Це підтверджується нашими даними, які продемонстрували порушення про- та антиоксидантного балансу в сім'яниках щурів після повторних введень ПТЗ.

Відомо, що рівень генерації супероксиду корелює з кількістю CYP2E1, який посилює оксидативний стрес як безпосередньо, так і опосередковано через погіршення антиоксидантного захисту [577]. Причому, CYP2E1 є джерелом АФК навіть за відсутності субстратів, викликаючи оксидативний стрес та апоптоз [578]. Утворені із залученням CYP2E1 реактивні інтермедіати кисню, такі як супероксидний аніон (O_2^-), можуть швидко реагувати з органічними молекулами, породжуючи вторинні вільні радикали та АФК [555]. Такі каскади можуть призводити до ушкодження антиоксидантного мікрооточення сім'яників та епідидимісів, створюючи умови для окисного пошкодження дозрілих сперматозоїдів. Загалом, майже незалежно від точної клітинної мішені АФК в репродуктивній системі, найбільш поширеним морфологічним наслідком є сукупне порушення процесів сперматогенезу внаслідок їх високої чутливості до подібних факторів [579]. CYP2E1 є також ефективним генератором пероксиду водню [367]. H_2O_2 може безпосередньо впливати на клітини Лейдіга, пригнічуючи синтез тестостерону шляхом інгібування активності ферменту розщеплення бічного ланцюга цитохрому P450 (P450_{scc}) та експресії стероїдогенного гострого регуляторного білка (StAR) [369].

У свою чергу активація ПОЛ є одним з основних факторів ушкодження клітинних мембран, таким чином, цитотоксична дія реалізується не тільки

внаслідок дії АФК, але й за рахунок кінцевих продуктів катаболізму пероксидів. Пошкодження мікросередовища клітин Лейдіга вільними радикалами внаслідок індукції CYP2E1 та пошкодження клітинних мембран в результаті посилення процесів ПОЛ можуть призводити до зниження активності мембранозв'язаних ферментних комплексів, які беруть участь у біосинтезі стероїдів. Зокрема, нещодавно було показано, що підвищуюча регуляція c-Jun (опосередкована сигнальною системою, пов'язаною з АФК) веде до пригнічення експресії генів стероїдогенних ферментів шляхом інгібування трансактивації Nur77 (одного з основних факторів транскрипції, які регулюють експресію генів стероїдогенних ферментів), а це в свою чергу призводить до зниження тестикулярного стероїдогенезу [580]. Це підтверджується нашими результатами по-перше стосовно рівня тестостерону в сироватці крові, що порівняно з контролем знижувався за сумісного введення ПТЗ (у 2,8 рази; $p \leq 0,05$), а також нарізного – етамбутолу та ізоніазиду (~ 1,6 рази; $p \leq 0,05$). А по-друге характером виявлених морфологічних змін в сім'яниках тварин даних груп - дегенерація сперматоцитів і округлих сперматид в сім'яних каналцях також свідчить про зниження внутрішньотестикулярного рівня тестостерону, який, як правило, приблизно в 50 разів перевищує рівень даного гормону в сироватці крові [491]. В свою чергу, зниження рівня тестостерону може негативно впливати на функціонування клітин Сертолї і нормальне протікання процесів сперматогенезу [581].

Сперматогенез у дорослому організмі проходить в три етапи: проліферація сперматогоній, мейоз сперматоцитів, диференціація сперматид або сперміогенез. Для забезпечення формування генетично збалансованих гамет ці події точно контролюються на кожному етапі [582]. Порушення на будь-якому етапі можуть призвести до продукції дефектних сперматозоїдів [583]. Надмірна генерація вільних радикалів в сім'яниках, в тому числі, може призводити до помилок при сперміогенезі та, як наслідок, виходу з гермінативного епітелію сперматозоїдів з аномально високим рівнем цитоплазматичного утримання [584]. Ушкодження мембран продуктами ПОЛ може сильно вплинути на якість

сперматозоїдів, включаючи відсоток рухливості та специфічні показники рухливості [585]. Ми припускаємо, що порушення сперматогенезу (внаслідок як екзогенної, так і ендогенної індукції CYP2E1), можуть бути результатом прямого впливу АФК на сперматогенний епітелій, зокрема клітини Сертолі та будь-яку популяцію статевих клітин. Крім того, подібні аномалії можуть виникати, як вторинна реакція на гормональні зміни, васкулярні порушення або порушення балансу рідини [343].

Більше того, на морфо-функціональному стані сперматогенного епітелію можуть позначатись виявлені нами за умов експериментальних діабету та алкоголізму зміни в амінокислотному складі колагену. Відомо, що сім'яний епітелій складається з клітин Сертолі та статевих клітин на різних стадіях розвитку, розміщених на власній туніці, яка складається з двох клітинних зон: перитубулярних міоїдних клітин і лімфатичних судин та двох безклітинних зон: базальної мембрани (модифікованої форми позаклітинного матриксу) і сітки фібрил колагену I типу. Важливою стадією сперматогенезу є відокремлення гермінативних клітин від базальної мембрани та їх подальша міграція у просвіт каналця [586]. Схема розподілу проколагену I у сім'яниках дозволяє припустити, що він відіграє роль як у регуляції адгезії сперматогоніїв та прелептотенових сперматоцитів до базальної мембрани, так і від'єднанні та міграції пізніх сперматоцитів і сперматид у бік просвіту каналця під час сперматогенезу [587].

Наші результати надають докази пригнічення сперматогенезу у щурів-самців, що отримували ПТЗ. Ефективність цього процесу залежить від проліферативної активності сперматогоній та втрати гермінативних клітин під час мейозу та сперматогенезу [343]. Гальмування сперматогенної клітинної активності підтверджується виявленим нами зниженням сперматогенного індексу та кількості сперматогоній. Високий рівень позитивної кореляції між рівнем експресії мРНК CYP2E1 та випадками злушення епітелію у наших експериментах може бути свідченням впливу процесів, пов'язаних із CYP2E1 на втрату адгезії між клітинами Сертолі та статевими клітинами або руйнування

цитоскелетних волокон, що призводить до зсуву апікальної цитоплазми Сертолі [343].

Важливе значення для створення унікального мікросередовища для мейозу та розвитку післямейотичних гермінативних клітин шляхом їхньої ізоляції від системної циркуляції має цілісність ГТБ (в іншому випадку будуть утворюватись антитіла до сперматозоїдів). ГТБ між клітинами Сертолі включає щільні контакти (ЩК), десмосоми, щілинні контакти та специфічні для сім'яників адгезивні контакти (АК) [588]. При порушенні міжклітинних ЩК і АК внаслідок окислювального стресу або дії інших токсичних метаболітів, внаслідок активації CYP2E1 може збільшуватися епітеліальна і ендотеліальна проникність. Фактично окислювальний стрес пов'язаний з епітеліальним мезенхімальним переходом - процесом, при якому епітеліальні клітини втрачають свої контактні структури та полярність для отримання міграційної здатності подібної до мезенхімальних клітин [589].

Загалом, до захисту клітин від АФК та токсичних інтермедіатів залучено різні ферментативні та неферментативні механізми [590]. Найважливішим неферментативним антиоксидантом, присутнім у клітинах є відновлений глутатіон. Він відіграє важливу роль у нормальному протіканні процесів в сперматогенезу та реалізації репродуктивної функції [379]. Глутатіонзалежні ферменти мають вирішальне значення для захисту клітин від оксидативного стресу та токсичних продуктів біотрансформації [591]. У тестикулярних тканинах виявлено декілька ізоформ глутатіонпероксидаз, які використовують відновлений глутатіон, як джерело електронів для відновлення H_2O_2 до води. Вони локалізуються в мітохондріях, ядрі та акросомальній області сперматозоїдів, що проходять диференціацію [592]. Таким чином, індуковане ПТЗ зниження вмісту глутатіону в сім'яниках також могло призводити до порушення цілісності статевих клітин. Примітно, що внутрішньоклітинний рівень відновленого глутатіону, як відомо, відіграє ключову роль у регуляції апоптозу [593]. Було показано, що високий внутрішньоклітинний вміст відновленого глутатіону асоціюється з резистентними до апоптозу фенотипами

в ряді моделей, а виснаження його пулу призводить до стимуляції апоптозу [594].

Одночасно у сім'яниках та печінці експериментальних тварин нами показано підвищення активності глутатіон-S-трансферази, основного детоксикаційного та цитопротекторного ферменту [595]. Глутатіон-S-трансфераза бере участь у процесах II фази детоксикації, а, крім того, забезпечує захист мембран від ПОЛ, має глутатіонпероксидазну активність та знижує рівень гідроперекисів ліпідів [595]. Індукція глутатіон-S-трансферази є основною стратегією при дезактивації потенційних токсичних речовин [596]. Виявлена нами підвищуюча регуляція даного ензиму може розглядатись як компенсаційний механізм після виснаження пулу відновленого глутатіону та посилення окисного стресу, індукованого ПТЗ [597, 598].

Щодо СОД, то даний ензим також є дуже важливим для антиоксидантного захисту сім'яників від пошкоджень, які можуть бути спричинені O_2 - та його реакційноздатними похідними. Тестикулярні тканини містять три форми СОД: цитозольні (Cu/Zn), мітохондріальні (Fe/Mn) та позаклітинні, які синтезуються як в клітинах Сертолі, так і в гермінативному епітелії [520]. Виявлене нами значне пригнічення активності СОД в сім'яниках може призводити до зниження нейтралізації O_2 - з наступним каскадом фатальних подій, які негативно впливають на структуру та функції тестикулярних клітин.

У ході нашого експерименту в сім'яниках щурів, які тривало піддавались сумісного впливу ПТЗ та алкоголю, виявлене зниження вмісту білкових SH-груп. Тіолові групи білків являють собою біологічну мішень для АФК. Було підраховано, що білки можуть захоплювати більшість (50-75 %) АФК і їхній рівень може використовуватись як маркер окисної модифікації білків [599, 600]. Одна або декілька відновлених SH-груп можуть бути важливими для функціонування багатьох білків [601]. Наслідком ушкодження білкових SH-груп може бути порушення ферментативної активності, модифікація мембранних та клітинних функцій залежно від природи ураженого

білкового компонента та атакуючих видів вільних радикалів.

Встановлена нами модуляція активності тестикулярних СДГ та ЛДГ за умов введення ПТЗ, в тому числі на тлі експериментального алкоголізму, може негативно впливати на протікання процесів сперматогенезу, оскільки дані ензими є важливими для нормального протікання процесів сперматогенезу та андрогенезу [559]. Дегідрогенази належать до групи ензимів мітохондріального та цитоплазматичного походження, які беруть участь в багатьох окиснювально-відновних реакціях, відповідальних за синтез АТФ. Активність ЛДГ фіксують переважно в сім'яних канальцях, а СДГ також проявляє інтерстиційну активність [602].

Формуючи частину комплексу II дихального ланцюга, СДГ знаходиться на перетині циклу лимонної кислоти та окисного фосфорилування. Подібна комбінація функцій ставить СДГ до центру двох важливих енерго-продукуючих метаболічних процесів клітин [603]. Ферментативна активність СДГ пов'язана з дозріванням статевих клітин [604]. Виявлене нами зниження активності СДГ в сім'яниках тварин за умов введення ПТЗ, яке прогресує при застосуванні їх на тлі хронічного алкоголізму, може бути свідченням метаболічних змін у сперматогенному епітелії та зменшення його енергетичних ресурсів.

ЛДГ є ключовим ензимом для безперервного синтезу АТФ шляхом гліколізу. Крім того, гермінативні клітини експресують специфічний ізофермент ЛДГ, відомий як ЛДГ типу С, на який багаті сперматиди та сперматозоїди [605]. Транспорт глюкози в клітину та ізоферментна система лактат-ЛДГ, яка зворотно каталізує взаємоперетворення пірувату та лактату, є важливими для регуляції продукції лактату [606]. Полегшений перенос глюкози через плазматичну мембрану клітин Сертолї опосередковується білком-носієм, який називається транспортером глюкози 1, єдиним транспортним білком, знайденим в цих клітинах. Стосовно ізоферментної системи ЛДГ, то зростання продукції лактату в клітинах Сертолї корелює зі збільшенням активності ізоензиму ЛДГ5. Перенос глюкози через плазматичну мембрану і рівні мРНК ЛДГ-А регулюються різним чином за допомогою фолікуло-стимулюючого гормону,

інтерлейкіну 1, TNF і фактору росту епідермісу - чинників, які змінюють продукцію лактату в клітинах Сертолі [606]. Після поглинання глюкози клітинами Сертолі і перетворення пірувату в лактат за допомогою ЛДГ необхідно, щоб цей продукт гліколізу став доступний для гермінативних клітин, що розвиваються. Ця подія опосередковується активними мембранними монокарбоксилатними транспортерами, які відповідальні за перенесення лактату через плазматичну мембрану клітин Сертолі [202, 203]. Нещодавно отримані дані стосовно ролі лактату, як сигнальної молекули в каналцях сім'яників. Згідно з ними лактат розглядають як паракринний фактор, який секретується клітинами Сертолі, а отже, крім того, що лактат є джерелом енергії, він може бути залучений до регуляції функціонування гермінативних клітин [607]. Також лактат є модулятором окислення НАДН і пентозо-фосфатного метаболічного шляху в цих клітинах [608]. Було описане залежне від дози лактату зниження смертності клітин [609]. Отже, фактори, які впливають на рівень лактату в сім'яниках або його продукцію клітинами Сертолі (за умов наших експериментів ПТЗ та алкоголь), можуть порушувати розвиток гермінативних клітин із залученням різних механізмів.

Нами показаний високий рівень активності ЛДГ в сім'яниках щурів за введення ПТЗ, хронічного алкоголізму та сумісної дії етанолу і ПТЗ, що вказує на посилення рівня мобілізації лактату та пірувату в циклі лимонної кислоти, відображаючи компенсаторні можливості гонад. Іншими дослідниками також показано, що хімічно-індукований стрес призводить до підвищення активності тестикулярної ЛДГ, а, отже, даний показник можна використовувати як адекватний діагностичний інструмент [610].

Важливо, що будь-які фактори, що викликають окисний стрес у статевих клітинах, автоматично призводять до генерації мітохондріальних АФК, які є ключовим фактором запуску апоптотичного каскаду. За умов порушення процесів сперматогенезу в гонадах, як правило, активізується апоптоз [611]. Треба відзначити, що за нормальних умов апоптоз відіграє важливу роль у регуляції розвитку статевих клітин. Зокрема, він використовується як механізм

для видалення пошкоджених гермінативних клітин із сім'яних каналців таким чином, щоб вони не продовжували диференціюватися у сперматозоїди. Селективне видалення пошкоджених клітин сім'яродного епітелію, вочевидь, є важливою складовою механізмів, що використовуються для захисту генома [611]. З іншого боку, процеси апоптозу в сперматогенному епітелії є важливими в етіології спонтанного чоловічого безпліддя, про що свідчить надмірна кількість апоптотичних гермінативних клітин, яка спостерігається в сім'яниках при цій патології [612]. ДНК є важливою молекулярною мішенню для хімічних речовин, які індукують ендонуклеази для її летального розщеплення [613]. Крім цього, такі сполуки можуть інгібувати процеси репарації ДНК ядерними ДНК-полімеразами. Рівень та характер фрагментації ДНК є маркерами апоптотичних процесів в організмі [291]. Інтенсифікація процесів фрагментації ДНК та виявлення в сім'яниках щурів, які отримували протягом періоду сперматогенезу ПТЗ, сперматоцитів з ядрами в стадії пікнозу та ділянок з відсутністю гермінативного епітелію, дозволяє констатувати активацію апоптотичної загибелі клітин сім'яників за даних умов експерименту.

Пошкодження ДНК у чоловічих статевих клітинах, як правило супроводжується порушенням фертильності, дефектним доїмплантаційним ембріональним розвитком, високими показниками передчасних пологів і захворюваності потомства [614]. Зокрема, виявлений нами надвисокий рівень післяімплантаційної летальності потомства щурів-самців, що отримували на фоні хронічного алкоголізму ПТЗ, може бути спричинений значною мірою ушкодженням ДНК. На користь цього свідчать отримані нами дані стосовно ушкодження нуклеарної ДНК в клітинах щурів, як за введення ПТЗ, так і алкоголю, та результати дослідів *in vitro* інших авторів, де було показано значний цитотоксичний та мутагенний потенціал ПТЗ, особливо при їх комбінованому застосуванні [615]. Показане зростання післяімплантаційної летальності внаслідок введення щурам з діабетом ПТЗ може бути викликане як їхньою генотоксичною дією, так і впливом СТЗ [336]. Загальновизнано, що цитотоксичність СТЗ, залежить від алкілювання ДНК, тоді як є дані, що істотна

роль у механізмах пошкодження ДНК та цитотоксичної дії СТЗ належить вільним радикалам [616, 617]. Так, встановлено, що СТЗ посилює генерацію радикалів O_2 —за допомогою ксантиноксидазної системи клітин підшлункової залози [618], стимулюючи генерацію H_2O_2 і викликаючи фрагментацію ДНК в ізольованих панкреатичних островцях у щурів [619]. Ушкодження ДНК, спричинене СТЗ, включає подвійні та одноланцюгові розриви, ковалентні аддукти та лужно-лабільні ділянки, що може призводити до загибелі клітин через апоптоз або некроз. Крім того, пошкодження ланцюгів ДНК, що виникають внаслідок алкілюючої дії СТЗ, можуть призводити до перебудови хромосом [620]. Ми припускаємо, що за умов нашого експерименту відбувалась сумація мутагенних ефектів СТЗ та ПТЗ, що призводило до зростання показника післяімплантаційної смертності. Ця гіпотеза підтверджується даними експериментів інших авторів, які продемонстрували слабку генотоксичність піразинаміду [68] та ізоніазиду [621, 622], а також мутагенну дію рифампіцину [83] та метаболіту ізоніазиду - моноацетилгідразину [623].

Стосовно виявленого нами зростання доімплантаційної загибелі, слід підкреслити, що тут можуть бути задіяні як мутагенні, так і немутагенні ефекти. Разом із підвищенням генерації внутрішньоклітинних АФК і більш високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів, ряд інших субклітинних факторів може опосередковувати вплив на потомство [624].

Треба зазначити, що досить важко розрізнити ефекти мутацій та епігенетичних модифікацій при прояві опосередкованих батьками негативних впливів на потомство, однак існують певні докази ролі саме епігенетичних чинників для пояснення відтермінованих ефектів на потомство. Враховуючи результати нашого дослідження, важливими є відомості щодо значних епігенетичних ефектів внаслідок індукції CYP2E1 [625]. Отримані дані стосовно інтенсифікації фрагментації ДНК в сім'яниках щурів за введення ПТЗ, в тому числі на тлі експериментальних алкоголізму та діабету, узгоджуються з нашими попередніми даними, які продемонстрували наявність епігенетичних ефектів після введення піразинаміду щурам [69]. Виявлені ж відмінності в

процесах фрагментації ДНК в сім'яниках щурів з алкоголізмом або СТЗД, що отримували або не отримували ПТЗ, можуть бути викликані специфічним впливом цих сполук на активність різних нуклеаз. Як введення ПТЗ, так і зазначені вище патологічні стани можуть призводити до змін у довжині та структурі молекул ДНК [69].

Таким чином, побічна дія ПТЗ на чоловічу репродуктивну здатність (в тому числі на тлі патологій, які характеризуються індукцією CYP2E1) очевидно реалізується внаслідок стимуляції зростання гену протеїну та ензиматичної активності CYP2E1 в сім'яниках, прогресивного зростання продукції АФК, активації ПОЛ та розвитку окислювального стресу з наступним пошкодженням основних внутрішньоклітинних молекул (глутатіон, ДНК, РНК, білки, ліпіди та АТФ). Подібні порушення, у свою чергу, приводять до патологічних змін у сім'яниках, слугуючи тригером апоптотичних процесів у тестикулярних клітинах. Кінцевим результатом є інгібування андрогенної функції, порушення нормальної диференціації статевих клітин та втрата фертильності.

Загалом отримані нами дані, включаючи встановлену кореляцію між рівнем експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках та аномаліями сперматогенезу дозволяють нам припустити високу імовірність залучення даного ізоферменту до неспецифічних патогенетичних механізмів тестикулярних порушень та чоловічого безпліддя. Схема, представлена на рис. 9.1, узагальнює наші висновки стосовно механізмів ушкодження чоловічої репродуктивної здатності в умовах індукції тестикулярного CYP2E1 ПТЗ, та дозволяє визначити ключові ланки для фармакокорекції. На підставі встановлених молекулярно-біохімічних механізмів формування тестикулярної дисфункції за введення ПТЗ були визначені пріоритетні мішені фармакологічної корекції: інгібування CYP2E1, антирадикальні та антиоксидантні властивості, регуляція метаболічних процесів, антиапоптотична дія. З цієї точки зору перспективним є використання амінокислоти метіоніну та ряду вітамінів і мікроелементів. 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 умов введення щурам-самцям комбінації ПТЗ. Склад Метовітану був підібраний розробниками (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України)

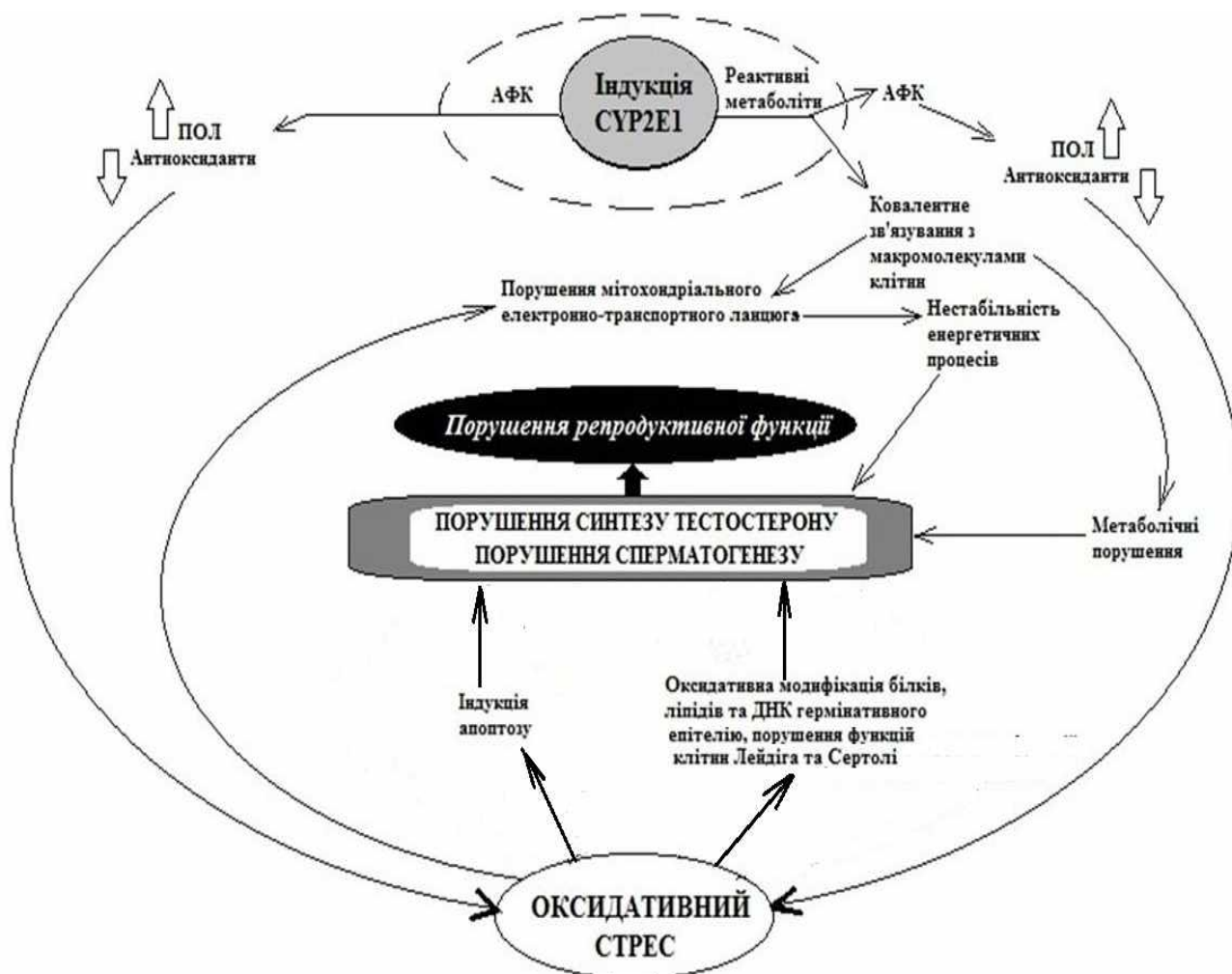


Рис. 9.1. Індукція CYP2E1 у механізмах побічної дії комбінації ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію.

За принципом синергічної дії відібраних сполук. Найважливішу роль в цій дії відіграє метіонін, амінокислота, яка є джерелом сірковмісних похідних, що використовуються при біосинтезі глутатіону, який є вузловою сполукою в обміні речовин, зокрема в системі антиоксидантного захисту організму [626].

У таблиці 9.1. 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.

Таблиця 9.1

Дані стосовно біологічної активності метіоніну та композиції Метовітан

Речовина	Біологічні властивості
Метіонін	- попередник синтезу відновленого глутатіону [626]; - регулює метаболічні процеси, приймає участь в ліпідному обміні, активує ендогенні антиоксидантні ферменти [627]; - метаболіт метіоніну - S-аденозилметіонін: неконкурентно та зворотно інгібує CYP2E1 [483]; донор метильних груп для ДНК [69]; антиоксидант [626]; - гонадопротекторна дія [628].
Тіамін (вітамін B ₁)	- антирадикальна дія [485]; - є критичним для клітинної функції, оскільки його фосфорильована та активна форма – тіамінодифосфат є коензимом для трьох основних ферментів метаболізму глюкози [629]; - дефіцит тіаміну призводить до індукції CYP2E1 [630]; - гонадопротекторна дія [631].
Нікотинамід (вітамін B ₃)	- попередник ряду коферментів [486]; - покращує репарацію ДНК [632]; - здатен інгібувати CYP2E1 [633].
α-Токоферолацетат	- антиоксидантна та антирадикальна дія - стабілізатор мембран [634]; - гонадопротекторна дія [635].
Цинк	- антиоксидантні дія [487]; - антиапоптотична дія [487]; - участь в каталітичній функції та / або структурній стійкості ферментів [636]; - індукує металіонеїн 2A, попереджуючи розвиток CYP2E1-залежного оксидативного стресу [637]; - гонадопротекторна дія [638].

Нами було встановлено, що за умов сумісного введення ПТЗ щурам самцям протягом періоду сперматогенезу метіонін та Метовітан попереджали підвищення експресії гена CYP2E1 у сім'яниках. При цьому ефект Метовітану був виражений більшою мірою. Зважаючи на роль ядерного фактора «каппа-бі» (NF-kB) в регуляції експресії CYPs [639], ми можемо припустити, що визначний ефект Метовітану на експресію гена CYP2E1, принаймні частково, може бути опосередкований дією нікотинамід у його складі, здатного знижувати вміст активованого NF-kB шляхом інгібуючої регуляції рівня білків NF-kB (p50) і NF-kB (p65) [495].

Виявлений нами регуляторний ефект метіоніну та Метовітану на ферментативну активність тестикулярного CYP2E1 реалізується завдяки метаболіту метіоніну - S-аденозилметионіну, який відіграє ключову роль у ряді клітинних функцій. Варто відзначити, що даний метаболіт утворюється шляхом трансметилування та слугує основним донором метильних груп для ДНК та гістон-метилтрансфераз, приймаючи участь у регуляції епігенетичних змін експресії генів. Він необхідний для метилування інших клітинних білків, які виконують різноманітні функції, та синтезу фосфатидилхоліну, що бере участь у клітинній сигналізації [640]. Крім того, S-аденозилметионін може взаємодіяти з цитохромом P-450, особливо ізоформою CYP2E1, неконкурентно та зворотно інгібуючи його [483].

Також і нікотинамід, що входить до складу композиції Метовітан, здатен інгібувати ензиматичну активність CYP2E1 шляхом утворення координаційних зв'язків між атомами азоту піридину та заліза гему [633].

За умов застосування метіоніну та Метовітану нами було показано зниження рівня ПОЛ у тканинах сім'яників щурів, яким тривало вводили ПТЗ. Даний феномен можна пояснити тим, що, з одного боку, пригнічення активності CYP2E1 призводило до зменшення утворення АФК в тестикулах, а з іншого - S-аденозилметионін сам по собі володіє антиоксидантними властивостями. Ймовірно метіонін виступав як попередник біосинтезу відновленого глутатіону та приводячи до підвищення його рівня у сім'яниках тварин, яким вводили ПТЗ

[626]. Більше того, метіонін може слугувати пасткою вільних радикалів [482]. Гонадопротекторна дія метіоніну та Метовітану може реалізуватись внаслідок їхньої антиоксидантної дії як безпосередньо, так і опосередковано. Вважаємо, що гонадопротекторні механізми даних речовин пов'язані з регуляцією експресії та ензиматичної активності CYP2E1, обмеженням генерації АФК та токсичних метаболітів, а також забезпеченням функціонування важливих антиоксидантних ферментів сім'яників, включаючи СОД.

Слід зазначити, що антиоксидантні властивості Метовітану можуть бути опосередковані не тільки метіоніном у його складі, але й іншими його компонентами: тіаміном, нікотинамідом, α -токоферолацетатом та цинком. Існують докази того, що тіамін здатен частково виступати як пастка вільних радикалів $\cdot\text{O}_2$ - (або $\cdot\text{OH}$) [485]. Нікотинамід служить попередником декількох клітинних коферментів, протидіючи оксидативному стресу та запаленню [486]. Вітамін Е (α -токоферол) визнаний як потужний ліпофільний антиоксидант, який є абсолютно необхідним для підтримки сперматогенезу у ссавців. Він присутній у особливо великих кількостях у клітинах Сертолі і сперматоцитах на стадії пахитени та меншою мірою у круглих сперматидях.

Як показано R.J. Aitken та S.D. Roman [487] рівень вітаміну Е в сім'яниках помітно зменшується внаслідок індукції окиснювальних процесів, а його введення сприяє пригніченню ПОЛ в тестикулярних мікросомах і мітохондріях, зменшуючи негативний вплив оксидативного стресу.

Цинк – це антиоксидантний мікроелемент, присутній у високій концентрації у чоловічих статевих органах, особливо у передміхуровій залозі. Він необхідний для підтримки сперматогенезу та оптимальної функції сім'яників, передміхурової залози та епідидимісів. Цинк може діяти як інгібітор окислення, зв'язуючи сульфгідрильні групи в білках, і займаючи місця зв'язування заліза та міді в ліпідах, білках та ДНК [488]. Враховуючи зазначене, очевидно, що введення цинку здатне регулювати рівень окисного стресу в чоловічих статевих органах.

Посилення генерації вільних радикалів або зниження антиоксидантного

захисту супроводжується інтенсифікацією фрагментації хроматину клітин [641,642], що нами і спостерігалось в сім'яниках щурів за умов введення ПТЗ. Використання лише одного метіоніну не сприяло нормалізації процесів фрагментації ДНК в сім'яниках, тоді як введення Метовітану забезпечило зменшення кількості фрагментів ДНК до контрольного рівня. Такі ефекти Метовітану можуть бути пов'язані з наявністю цинку у його складі, який виконує в організмі численні біологічні функції, не тільки антиокиснювальні, але і протизапальні та антиапоптотичні [487]. Вплив цинку на клітинний апоптоз та життєздатність клітин опосередковується металотіонеїном [643]. Встановлено, що дефіцит цинку призводив до гальмування процесів проліферації та посилення апоптозу в клітинах LX-2. Інгібування експресії металотіонеїну, індукованого дефіцитом цинку, провокувало посилення генерації АФК, порушення функції мітохондрій та гальмування активності цитохром С оксидази і, нарешті, призводило до апоптозу клітин [644]. Очевидно, що пошкодження сім'яників у щурів, яким вводили ПТЗ могло бути пов'язане зі зростанням рівня апоптозу статевих клітин, тоді як нормалізуючий ефект Метовітану реалізувався завдяки його антиоксидантним та антиапоптотичним складовим, зокрема цинку.

Порушення сперматогенезу у щурів було наслідком впливу ПТЗ, у тому числі опосередкованого індукцією CYP2E1 в тестикулярних тканинах. Гістологічні дослідження показали, що за умов введення метіоніну та Метовітану зменшувався ступінь дегенерації сім'яників, пов'язаної із застосуванням ПТЗ, а також значно збільшувалась кількість каналців з нормальним розподілом окремих стадій сперматогенного циклу. Метіонін та Метовітан сприяли зниженню рівня дезорганізації сім'яних каналців, що опосередковано може вказувати на відновлення тестикулярної гемодинаміки [343]. Введення обох речовин досліджуваних препаратів сприяло частковому або повному відновленню стану сперматогенного епітелію (сперматогенного індексу, кількості сперматогоній та клітин у XII стадії циклу сперматогенного епітелію) до нормального рівня. Слід зазначити, що Метовітан, на відміну від

метіоніну, сприяв зменшенню випадків злушення гермінативного епітелію у просвіт сім'яних каналців. Це свідчить про попередження даним препаратом руйнування волокон цитоскелету клітин Сертолі та порушень контактів між клітинами Сертолі і статевими клітинами [336]. Високий рівень гонадопротекторної ефективності Метовітану, порівняно з метіоніном цілком очікувано може бути обумовлений наявністю у його складі біологічно активних сполук. Наші спостереження стосовно їх сприятливої дії на сперматогенез узгоджуються з результатами інших авторів, які вивчали ефекти деяких речовин, що є у складі Метовітану [630, 634, 645, 646].

Важливим результатом введення щурам метіоніну та Метовітану на тлі застосування ПТЗ було зростання числа сперматозоїдів з хвостової частини епідидиміса. І нарешті, застосування метіоніну для корекції гонадотоксичної дії комбінації ПТЗ викликало підвищення показника фертильності щурів-самців. Відсоток вагітних інтактних самиць, яких парували з самцями, що отримували ПТЗ разом з Метовітаном, також зростає. Отже, нами було виявлено, що метіонін і Метовітан певною мірою, попереджали гонадотоксичну дію ПТЗ, що можна пояснити їх модулюючим впливом на тестикулярний CYP2E1, а також потужними антиоксидантними властивостями. Більш виражений позитивний вплив Метовітану може бути обумовлений синергічним ефектом його компонентів.

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що тривале нарізне або сумісне введення ПТЗ, здатних індукувати CYP2E1, в тому числі на тлі патологічних станів, які супроводжуються індукцією даної ізоформи, спричиняло ураження сім'яників та порушення репродуктивної здатності щурів-самців.

При прогнозуванні побічної дії лікарських засобів необхідно враховувати потенційну можливість їх екстрапечінкового метаболізму та наявність факторів, здатних його модулювати (генетичний поліморфізм, коморбідні захворювання, шкідливі звички, екологічні чинники, тощо).

Отримані нами результати стосовно гонадопротекторної дії метіоніну та

Метовітану при введенні на тлі протитуберкульозних засобів, що індукують CYP2E1, експериментально обґрунтовують перспективність використання речовин, які володіють ефективними інгібіторними стосовно даної ізоформи та антиоксидантними властивостями у схемах лікування та профілактики чоловічої субфертильності та інфертильності, особливо за умов застосування хіміотерапевтичних засобів, здатних індукувати CYP2E1 та станів, що супроводжуються індукцією цього 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 злучення 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, призводячи 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jung, I., & Gurzu, S. (2017). Adverse Drug Reactions. *Textbook of Iatrogenic Pathology*, 1.
2. Schatz, S., & Weber, R. (2015). Adverse drug reactions. *Pharmacy Practice*, 1, 5-26.
3. Кантемирова, Б. И., Тимофеева, Н. В., Григанов, В. И., & Шилова, А. А. (2011). Проблема нежелательных побочных реакций лекарственных средств. *Астраханский медицинский журнал*, 6(4), 8-12.
4. Mello, F. C. D. Q., Silva, D. R., & Dalcolmo, M. P. (2018). Tuberculosis: where are we? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 44(2), 82-82.
5. Вольф, С. Б. (2016). Нежелательные побочные реакции на химиотерапию туберкулеза. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 3 (55), 141-146.
6. Min, G. H., Kim, Y., Lee, J. S., Oh, J. Y., Hur, G. Y., Lee, Y. S., ... & Lee, S. H. (2017). Social and Clinical Characteristics of Immigrants with Tuberculosis in South Korea. *Yonsei medical journal*, 58(3), 592-597.
7. Иванова, Д. А., & Борисов, С. Е. (2017). Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом. *Туберкулез и болезни легких*, 95(6), 22-29.
8. Щегерцов, Д. Ю., Филинюк, О. В., Буйнова, Л. Н., Земляная, Н. А., Кабанец, Н. Н., & Аллилуев, А. С. (2018). Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. *Туберкулез и болезни легких*, 96(3), 35-43.
9. Mathew, S., & Joseph, A. (2017). Adverse effects of antituberculosis drugs in patients under DOTS category-1. *Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare*, 4(8), 415-422.
10. Semet, M., Paci, M., Saïas-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H., & Perrin, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*, 5(4), 640-663.
11. Pompe, S. V., Strobach, D., Stief, C. G., Becker, A. J., & Trottman, M. (2016).

Drug use among men with unfulfilled wish to father children: a retrospective analysis and discussion of specific drug classes. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 25(6), 668-677.

12. Cavallini, G. (2015). Male Idiopathic (Oligo)±(Asthen)±(Terato)-Spermia. In *Clinical Management of Male Infertility* (pp. 79-87). Springer, Cham.

13. Силуянов, К. А. (2017). Применение низкоинтенсивного лазерного излучения в комплексном лечении мужчин с секреторным бесплодием.[Siluyanov KA. Primeneniye nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya v kompleksnom lechenii muzhchin s sekretornym besplodiyem.(In Russ.)]. *uroweb.ru/arcle/db-arcle-3670.html*. Ссылка активна на, 6.

14. Said, K., Hella, J., Mhalu, G., Chiryankubi, M., Masika, E., Maroa, T., ... & Fenner, L. (2017). Diagnostic delay and associated factors among patients with pulmonary tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania. *Infectious diseases of poverty*, 6(1), 64.

15. Feng, J. Y., Jarlsberg, L. G., Salcedo, K., Rose, J., Janes, M., Lin, S. Y., ... & Graviss, E. A. (2017). Clinical and bacteriological characteristics associated with clustering of multidrug-resistant tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 21(7), 766-773.

16. Deonandan, R., & Jaleel, M. (2012). Global decline in semen quality: ignoring the developing world introduces selection bias. *International journal of general medicine*, 5, 303–306.

17. Girela, J. L., Gil, D., Johnsson, M., Gomez-Torres, M. J., & De Juan, J. (2013). Semen parameters can be predicted from environmental factors and lifestyle using artificial intelligence methods. *Biology of reproduction*, 88(4), 99-1.

18. Keihani, S., Hanson, B., & Hotaling, J. M. (2018). Male factor infertility: an opportunity to investigate individual and family health. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15398>

19. Sengupta, P., Borges Jr, E., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2018). Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human & experimental*

toxicology, 37(3), 247-255.

20. Samplaski, M. K., & Nangia, A. K. (2015). Adverse effects of common medications on male fertility. *Nature reviews urology*, 12(7), 401.

21. Asole, A., Panu, R., & Palmieri, G. (1976). Effects of ethambutol on the seminal epithelium of the rat and chicken. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 52(12), 846-848.

22. Sanati, E., & Nikmanesh, M. (2008). Comparative study of the effects of gentamicin, neomycin, streptomycin and ofloxacin antibiotics on sperm parameters and testis apoptosis in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(13), 1683-9.

23. Trentini, G. P., Botticelli, A., & Barbolini, G. (1974). Testicular lesions in rats treated for one year with ethambutol in low doses. *Virchows Archiv A*, 362(4), 311-314.

24. Rao, A., Nayak, G., Kumari, S., Prabhu, A. D., Khandige, N., Kalthur, S. G., ... & Adiga, S. K. (2016). Ethambutol induces testicular damage and decreases the sperm functional competence in Swiss albino mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 47, 28-37.

25. Kulchavenya, E. V., & Osadchii, A. V. (2016). The role of pathogenetic therapy in preserving ejaculate fertility in patients with tuberculosis of prostate. *Urologiia (Moscow, Russia: 1999)*, (3), 14-18.

26. Kulchavenya, E., & Medvedev, S. (2011). Therapy For Pulmonary Tuberculosis As A Reason For Ejaculatory Disorders: hp-06-002. *The Journal of Sexual Medicine*, 8, 398.

27. Kul'chavenia, E. V., Brizhitiuk, E. V., & Medvedev, S. A. (2002). Toxic effect of antituberculous drugs on spermatogenesis. *Problemy tuberkuleza*, (5), 29-32.

28. Kulchavenya, E., Osadchiy, A., & Khomyakov, V. (2017). Tuberculosis as a Reason for Male and Female Sexual Dysfunction. *Ann Infect Antibiotics*, 1(101), 2.

29. Burger, D. M., te Brake, L. H., & Aarnoutse, R. E. (2018). Mechanisms of Drug Interactions I: Absorption, Metabolism, and Excretion. In *Drug Interactions in Infectious Diseases: Mechanisms and Models of Drug Interactions* (pp. 15-47).

Humana Press, Cham.

30. Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2004). Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 27-42.
31. Колганова, К. А. (2008). Применение гепатопротекторов в клинической практике. *Русский медицинский журнал*, 16(1), 26-29.
32. Przybylski, G., Dąbrowska, A., & Trzcińska, H. (2014). Alcoholism and other socio-demographic risk factors for adverse TB-drug reactions and unsuccessful tuberculosis treatment—data from ten years' observation at the Regional Centre of Pulmonology, Bydgoszcz, Poland. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 20, 444.
33. Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2015). Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *Journal of hepatology*, 63(2), 503-514.
34. Siddiq, F. M., & Sigman, M. (2002). A new look at the medical management of infertility. *The Urologic clinics of North America*, 29(4), 949-963.
35. Горбач, Л. А. (2017). Риск туберкулеза органов дыхания у детей и подростков с различными факторами. *Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности*, 165.
36. Фещенко, Ю. І., Мельник, В. М., Зайков, С. В., Веселовський, Л. В., Линник, М. І. (2016). Особливості сучасної ситуації з туберкульозу в Україні. *Український пульмонологічний журнал*, 1, 2-9.
37. Янов, С. А., Филинюк, О. В., Янова, Г. В., Буйнова, Л. Н., Колоколова, О. В., & Кабанец, Н. Н. (2017). Эффективность противоалкогольной терапии у больных туберкулезом легких с расстройствами, вызванными употреблением алкоголя. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*, (4), 89-94.
38. Савинова, А. А., & Усанина, Л. В. (2017). Механизмы антибиотикоустойчивости микобактерий туберкулеза. *Международный*

студенческий научный вестник, (6), 35-35.

39. Симон, В.А. (2002). Цитохром Р-450 и взаимодействие лекарственных веществ. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, 12 (6), 25-30.
40. Tostmann, A., Boeree, M. J., Aarnoutse, R. E., De Lange, W. C., Van Der Ven, A. J., & Dekhuijzen, R. (2008). Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(2), 192-202.
41. Страчунский, Л. С., & Козлов, С. Н. (2002). Современная антимикробная терапия. Руководство для врачей. М.: *Боргес*.
42. Brennan, P. J., Young, D. B., Robertson, B. D., Andersen, P., Barry III, C. E., & Britton, W. (2008). Handbook of anti-tuberculosis agents. *Tuberculosis*, 88(2), 85-170.
43. Yue, J., Peng, R. X., Yang, J., Kong, R., & Liu, J. (2004). CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(5), 699-704.
44. Zhang, Y. (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 529-564.
45. Huang, Y. S. (2007). Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 3(1), 1-8.
46. Wang, P., Pradhan, K., Zhong, X. B., & Ma, X. (2016). Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta pharmaceutica sinica B*, 6(5), 384-392.
47. Park, K. S., Sohn, D. H., Veech, R. L., & Song, B. J. (1993). Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 248(1), 7-14.
48. Nishimura, Y., Kurata, N., Sakurai, E., & Yasuhara, H. (2004). Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. *Journal of*

pharmacological sciences, 96(3), 293-300.

49. Desta, Z., Soukhova, N. V., & Flockhart, D. A. (2001). Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(2), 382-392.
50. Lockman, P. R., Shum, S., & Allen, D. D. (2001). Case report: visual toxicity in acute isoniazid overdose. *International Journal of Medical Toxicology*, 4, 21-26.
51. Shetty, N. S., & Shah, I. (2018). Isoniazid-induced neuropathy in a pre-pubertal child. *Paediatrics and international child health*, 1-3.
52. Shah, R., Ankale, P., Sinha, K., Iyer, A., & Jayalakshmi, T. K. (2016). Isoniazid induced lupus presenting as oral mucosal ulcers with pancytopenia. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(10), OD03.
53. Faisal, A., Arbab, S., & Naz, F. Q. (2015). Isoniazid induced acute pancreatitis in a young girl. *JCPSP: Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 25(4), 299.
54. Sutter, R., Rüegg, S., & Tschudin-Sutter, S. (2015). Seizures as adverse events of antibiotic drugs A systematic review. *Neurology*, 10-1212.
55. Nolan, C. M., Goldberg, S. V., & Buskln, S. E. (2000). hepatotoxicity Associated with Isoniazid Preventive Therapy: A 7-year Survey from a Public Health Tuberculosis Clinic. *Survey of Anesthesiology*, 44(3), 181-182.
56. Brown, S. J., & Desmond, P. V. (2002). Hepatotoxicity of antimicrobial agents. In *Seminars in liver disease* (Vol. 22, No. 02, pp. 157-168). Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
57. de Gusmão Filho, F. A., Marques-Dias, M. J., Marques, H. H. D. S., & Ramos, S. R. D. S. (2001). Central nervous system tuberculosis in children: 2. Treatment and outcome. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 59(1), 77-82.
58. Miyazawa, S., Matsuoka, S., Hamana, S., Nagai, S., Nakamura, H., Nirei, K., & Moriyama, M. (2015). Isoniazid-induced acute liver failure during preventive therapy for latent tuberculosis infection. *Internal Medicine*, 54(6), 591-595.
59. Barcena, R., Oton, E., Moreno, M. A., Fortún, J., Garcia-Gonzalez, M., Moreno,

- A., & De Vicente, E. (2005). Is liver transplantation advisable for isoniazid fulminant hepatitis in active extrapulmonary tuberculosis? *American journal of transplantation*, 5(11), 2796-2798.
60. Fernandez-Villar, A., Sopena, B., Fernandez-Villar, J., Vazquez-Gallardo, R., Ulloa, F., Leiro, V., ... & Pineiro, L. (2004). The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(12), 1499-1505..
61. Vuilleumier, N., Rossier, M. F., Chiappe, A., Degoumois, F., Dayer, P., Mermillod, B., ... & Hochstrasser, D. (2006). CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *European journal of clinical pharmacology*, 62(6), 423-429.
62. Bürgin, H., Schmid, B., & Zbinden, G. (1979). Assessment of DNA damage in germ cells of male rabbits treated with isoniazid and procarbazine. *Toxicology*, 12(3), 251-257.
63. Miltenburger, H. G., Träger, H., Adler, I. D., Schmaltz, A., Rathenberg, R., Schwegler, H., ... & Müller, D. (1978). The effect of isoniazid (INH) on Chinese hamster and mouse spermatogonia. *Human genetics*, 42(1), 44-49.
64. Arbex, M. A., Varella, M. D. C. L., Siqueira, H. R. D., & Mello, F. A. F. D. (2010). Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations-part 1: first-line drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36(5), 626-640.
65. Dollery, C. T. (Ed.). (1999). *Therapeutic drugs* (Vol. 2). Churchill Livingstone.
66. Delaney, K. A., Ling, L. J., Erickson, T., & Ford, M. D. (2001). Clinical Toxicology. *Saunders, Philadelphia*, 705-711.
67. Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (2001). Editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*.
68. Anitha, B., Sudha, S., Gopinath, P. M., & Durairaj, G. (1994). Genotoxicity evaluation of pyrazinamide in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 321(1-2), 1-5.
69. Kovalenko, V. M., Bagnyukova, T. V., Sergienko, O. V., Bondarenko, L. B.,

- Shayakhmetova, G. M., Matvienko, A. V., & Pogribny, I. P. (2007). Epigenetic changes in the rat livers induced by pyrazinamide treatment. *Toxicology and applied pharmacology*, 225(3), 293-299..
70. Facino, R. M., & Carini, M. (1980). The inhibitory effect of pyrazinamide on microsomal monooxygenase activities is related to the binding to reduced cytochrome P-450. *Pharmacological research communications*, 12(6), 523-537.
71. Nishimura, Y., Kurata, N., Sakurai, E., & Yasuhara, H. (2004). Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 293-300.
72. Коваленко, В.М., Бишовець, Т.Ф., Вороніна, А.К., & Матвієнко, А.В. Морфофункціональний стан гонад самців білих щурів за умов індукції цитохрому Р-450 2Е1 піразинамідом. *Матеріали III Національного з'їзду фармакологів України, 17-20 жовтня 2006 р. Одеса: Видавництво Одеського державного медичного університету*, 73-74.
73. Kovalenko, V. M., Bondarenko, L. B., Byshovetz, T. F., Shayakhmetova, G. M., Voronina, A. K., Voloshina, O. S., & Saprykina, N. A. (2006). Pyrazinamide and disulfiram effects on male rat's reproductive function. *Toxicology Letters*, (164), S303-S304.
74. Acocella, G., & Conti, R. (1980). Interaction of rifampicin with other drugs. *Tubercle*, 61(3), 171-177.
75. Holdiness, M. R. (1984). Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 9(6), 511-544.
76. Westphal, J. F., Vetter, D., & Brogard, J. M. (1994). Hepatic side-effects of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(3), 387-401.
77. Upadhyay, G., Kumar, A., & Singh, M. P. (2007). Effect of silymarin on pyrogallol-and rifampicin-induced hepatotoxicity in mouse. *European Journal of Pharmacology*, 565(1-3), 190-201.
78. Niemi, M., Backman, J. T., Fromm, M. F., Neuvonen, P. J., & Kivistö, K. T. (2003). Pharmacokinetic interactions with rifampicin. *Clinical Pharmacokinetics*,

42(9), 819-850.

79. Takeda, K., Watanabe, J., Inoue, K., & Kanamura, S. (2000). Rifampicin suppresses hepatic CYP2E1 expression and minimizes DNA injury caused by carbon tetrachloride in perivenular hepatocytes of mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(4 Suppl), 87S-92S.

80. Ghanayem, B. I., Witt, K. L., El-Hadri, L., Hoffler, U., Kissling, G. E., Shelby, M. D., & Bishop, J. B. (2005). Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biology of Reproduction*, 72(1), 157-163.

81. Yue, J., & Peng, R. (2009). Does CYP2E1 play a major role in the aggravation of isoniazid toxicity by rifampicin in human hepatocytes? *British journal of pharmacology*, 157(3), 331-333..

82. Saraswathy, S. D., & Shyamala Devi, C. S. (2001). Modulating effect of Liv. 100, an ayurvedic formulation on antituberculosis drug-induced alterations in rat liver microsomes. *Phytotherapy research*, 15(6), 501-505.

83. Aboul-Ela, E. I. (1995). Cytogenetic effects of rifampicin in somatic and germinal cells of the mouse. *Journal of Applied Toxicology*, 15(4), 325-326.

84. IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. (1977). *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man* (Vol. 15). International Agency for Research on Cancer.

85. Micromedex, T. (2005). Drug information for the health care professional. *Volume, 1*, 2569-2572.

86. Nocke-Finck, L., & Breuer, H. (1981). Effect of rifampicin on the biosynthesis of testosterone in rat testis. *Acta endocrinologica*, 97(4), 573-576.

87. Kim, Y. C., Yim, H. K., Jung, Y. S., Park, J. H., & Kim, S. Y. (2007). Hepatic injury induces contrasting response in liver and kidney to chemicals that are metabolically activated: role of male sex hormone. *Toxicology and applied pharmacology*, 223(1), 56-65.

88. Hathway, D. E. (Ed.). (2007). *Foreign compound metabolism in mammals* (Vol.

5). Royal Society of Chemistry.

89. Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (1992). The pharmacological basis of therapeutics,. Vol. II.

90. Becker, C., Dressman, J. B., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Kopp, S., Midha, K. K., ... & Barends, D. M. (2008). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ethambutol dihydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(4), 1350-1360.

91. Cohen, K. A., Stott, K. E., Manson, A. L., Munsamy, V., Earl, A. M., & Pym, A. S. (2018). Untapped Potential for Streptomycin: Using Genomics to Optimize Aminoglycoside Selection in Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. In *A25. Tuberculosis Management: New Insights* (pp. A1152-A1152). American Thoracic Society.

92. Edson, R. S., & Terrell, C. L. (1999, May). The aminoglycosides. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 74, No. 5, pp. 519-528). Elsevier.

93. Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease / Today's Online Textbook of Bacteriology. Режим доступу: http://textbook_of_bacteriology.net/antimicrobial_4.html

94. Скакун, М. П., & Посохова, К. А. (2003). Фармакологія: підручник. Тернопіль: Укрмедкнига.

95. Харкевич, Д. А. (2004) Фармакологія: учебник. 8-е изд., перераб. М.: ГЭОТАР МЕД.

96. Феценко, Ю. І. (2008). Реєстрація побічних реакцій протитуберкульозних препаратів при лікуванні хворих на туберкульоз. *Український пульмонологічний журнал*, (4), 8-13.

97. Польова, С.П., Гошовська, А.В., & Козар Т.І. (2009). Ризик застосування протитуберкульозних препаратів у вагітних, хворих на туберкульоз легень (огляд літератури). *Буковинський медичний вісник*, 13(2), 90-93.

98. Senousy, B. E., Belal, S. I., & Draganov, P. V. (2010). Hepatotoxic effects of therapies for tuberculosis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(10), nrgastro-2010.
99. Ким, М. Е., Мурзагулова, К. Б., & Степанова, Э. Ф. (2016). Противотуберкулезные лекарственные формы: ассортимент, основные преимущества, перспективы технологического совершенствования. *Фармация и фармакология*, (3 (16)).
100. Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 474-485.
101. Kliewer, S. A., Goodwin, B., & Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine reviews*, 23(5), 687-702.
102. Lee, A., Mennone, J., Jones, R., & Paul, W. (2002). Risk factors for hepatotoxicity associated with rifampin and pyrazinamide for the treatment of latent tuberculosis infection: experience from three public health tuberculosis clinics. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(11), 995-1000.
103. Kulchavenya, E., Scherban, M., Brizhatyuk, E., & Osadchiy, A. (2012). Sexual dysfunction in male patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 2(03).
104. Mital, P., Hinton, B. T., & Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of reproduction*, 84(5), 851-858.
105. Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J., & Giwercman, A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction*, 17(11), 2904-2911.
106. Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & De Iuliis, G. N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian journal of andrology*, 16(1), 31–38.
107. Pasqualotto, F. F., Lucon, A. M., Sobreiro, B. P., Pasqualotto, E. B., & Arap, S.

- (2004). Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas*, 59(6), 375-382.
108. Harris, D. L., Huderson, A. C., Niaz, M. S., Ford, J. J., Archibong, A. E., & Ramesh, A. (2009). Comparative metabolism of benzo (a) pyrene by ovarian microsomes of various species. *Environmental Toxicology: an International Journal*, 24(6), 603-609.
109. DiBiasio, K. W., Silva, M. H., Shull, L. R., Overstreet, J. W., Hammock, B. D., & Miller, M. G. (1991). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in rat, mouse, monkey, and human testes. *Drug Metabolism and Disposition*, 19(1), 227-232.
110. Lake, B. G., Hopkins, R., Chakraborty, J., Bridges, J. W., & Parke, D. V. (1973). The influence of some hepatic enzyme inducers and inhibitors on extrahepatic drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 1(1), 342-349.
111. Murray, G. I., Barnes, T. S., Sewell, H. F., Ewen, S. W., Melvin, W. T., & Burke, M. D. (1988). The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 25(4), 465-475.
112. Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., & SATOH, T. (2003). Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku zasshi*, 123(5), 369-375.
113. Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81-151.
114. Pavsek, P., & Dvorak, Z. (2008). Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism*, 9(2), 129-143.
115. Schuppe, H. C., Wieneke, P., Donat, S., Fritsche, E., Köhn, F. M., & Abel, J. (2000). Xenobiotic metabolism, genetic polymorphisms and male infertility.

Andrologia, 32(4-5), 255-262.

116. Wienkers, L. C., & Heath, T. G. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(10), 825–833.
117. Juchau, M. R., Boutelet-Bochan, H., & Huang, Y. (1998). Cytochrome-P450-dependent biotransformation of xenobiotics in human and rodent embryonic tissues. *Drug Metabolism Reviews*, 30(3), 541-568.
118. Leung, G. S., Kawai, M., Tai, J. K., Chen, J., Bandiera, S. M., & Chang, T. K. (2008). Developmental expression and endocrine regulation of CYP1B1 in rat testis. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, (3), 523-528.
119. Jiao, H., Liu, C., Guo, W., Peng, L., Chen, Y., & Martin, F. L. (2010). Association of CYP1B1 polymorphisms with breast cancer: a case-control study in the Han population in Ningxia Hui Autonomous Region, PR China. *Biomarker Insights*, 5, BMI-S4094.
120. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Kumagai, J., Murata, T., Takayama, K., ... & Muramatsu, M. (2009). Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology*, 74(2), 391-397.
121. Daly, A. K. (2006). Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical Pharmacokinetics*, 45(1), 13-31.
122. Dai, D., Cao, Y., Falls, G., Levi, P. E., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2001). Modulation of mouse P450 isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the environmental chemicals mirex, 2, 2-bis (p-chlorophenyl)-1, 1-dichloroethylene, vinclozolin, and flutamide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70(3), 127-141.
123. Lieber, C. S. (2004). CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology Research*, 28(1), 1-11.
124. Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*, 19(1), 38-54.
125. Nishimura, M., Koeda, A., Morikawa, H., Satoh, T., Narimatsu, S., & Naito, S. (2009). Tissue-specific mRNA expression profiles of drug-metabolizing enzymes and transporters in the cynomolgus monkey. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*,

24(2), 139-144.

126. Jiang, Y., Kuo, C. L., Pernecky, S. J., & Piper, W. N. (1998). The detection of cytochrome P450 2E1 and its catalytic activity in rat testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(3), 578-583.

127. DuTeaux, S. B., Berger, T., Hess, R. A., Sartini, B. L., & Miller, M. G. (2004). Male reproductive toxicity of trichloroethylene: sperm protein oxidation and decreased fertilizing ability. *Biology of Reproduction*, 70(5), 1518-1526.

128. DuTeaux, S. B., Hengel, M. J., DeGroot, D. E., Jelks, K. A., & Miller, M. G. (2003). Evidence for trichloroethylene bioactivation and adduct formation in the rat epididymis and efferent ducts. *Biology of Reproduction*, 69(3), 771-779.

129. Forkert, P. G., Lash, L. H., Nadeau, V., Tardif, R., & Simmonds, A. (2002). Metabolism and toxicity of trichloroethylene in epididymis and testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(3), 244-254.

130. Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human reproduction update*, 22(5), 574-587.

131. Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213-227.

132. Foley, G. L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic pathology*, 29(1), 49-63.

133. Carbonari, D., Chiarella, P., Mansi, A., Pignini, D., Iavicoli, S., & Tranfo, G. (2016). Biomarkers of susceptibility following benzene exposure: influence of genetic polymorphisms on benzene metabolism and health effects. *Biomarkers in medicine*, 10(2), 145-163.

134. Jones, A. W., & Holmgren, A. (2015). Occurrence of acetone concentrations > 0.10 g/L in post-mortem femoral blood and association with ethanol and isopropanol concentrations. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 27(4), 226-232.

135. Muñoz, A. (2014). Environmental Toxins and Men's Health. *Integrative Men's Health*, 374-408

136. Forkert, P. G., Lash, L., Tardif, R., Tanphaichitr, N., Vandervoort, C., & Moussa,

- M. (2003). Identification of trichloroethylene and its metabolites in human seminal fluid of workers exposed to trichloroethylene. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(3), 306-311.
137. Zong, C., Zhang, X., Huang, C., Chang, J., Garner, C. E., Sakurai, T., ... & Ichihara, G. (2016). Role of cytochrome P450s in the male reproductive toxicity of 1-bromopropane. *Toxicology Research*, 5(6), 1522-1529.
138. Kulkarni, S. R., Ravindra, K. P., Dhume, C. Y., Rataboli, P., & Rodrigues, E. (2009). Levels of plasma testosterone, antioxidants and oxidative stress in alcoholic patients attending de-addiction centre. *Biology and Medicine*, 1(4), 11-20.
139. Quintans, L. N., Castro, G. D., & Castro, J. A. (2005). Oxidation of ethanol to acetaldehyde and free radicals by rat testicular microsomes. *Archives of Toxicology*, 79(1), 25-30.
140. Muroño, E. P., & Fisher-Simpson, V. (1987). Microsomal ethanol-oxidizing system in purified rat Leydig cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 918(2), 136-140.
141. Oropeza-Hernández, L. F., Quintanilla-Vega, B., Reyes-Mejia, R. A., Serrano, C. J., Garcia-Latorre, E. A., Dekant, W., ... & Albores, A. (2003). Trifluoroacetylated adducts in spermatozoa, testes, liver and plasma and CYP2E1 induction in rats after subchronic in Gmelch, B. S., & Dull, R. O. (2015). CYP2E1: the anesthesia enzyme. In *A Case Approach to Perioperative Drug-Drug Interactions* (pp. 33-36). Springer, New York, NY.
- halatory exposure to halothane. *Toxicology letters*, 144(1), 105-116.
142. Gmelch, B. S., & Dull, R. O. (2015). CYP2E1: the anesthesia enzyme. In *A Case Approach to Perioperative Drug-Drug Interactions* (pp. 33-36). Springer, New York, NY.
143. Chinelato, A. R., & Froes, N. D. T. C. (2002). Genotoxic effects on professionals exposed to inhalational anesthetics. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 52(1), 79-85.
144. Healy, L. N., Pluta, L. J., & Recio, L. (1999). Expression and distribution of cytochrome P450 2E1 in B6C3F1 mouse liver and testes. *Chemico-biological*

Interactions, 121(2), 199-207.

145. Ghanayem, B. I., Bai, R., Kissling, G. E., Travlos, G., & Hoffler, U. (2010). Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biology of Reproduction*, 82(1), 96-104.

146. Volkmann, T., Moonan, P. K., Miramontes, R., & Oeltmann, J. E. (2016). Excess alcohol use and death among tuberculosis patients in the United States, 1997-2012. *Journal of tuberculosis research*, 4(1), 18 -22.

147. Huang, W. (2016). A Study on Epidemical Situation and Risk Factors of Tuberculosis in Mianyang City of Sichuan Province. *Chest*, 149(4), 76A.

148. Przybylski, G., Dąbrowska, A., & Trzcińska, H. (2014). Alcoholism and other socio-demographic risk factors for adverse TB-drug reactions and unsuccessful tuberculosis treatment—data from ten years' observation at the Regional Centre of Pulmonology, Bydgoszcz, Poland. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 20, 444-453.

149. Kapur, A., Harries, A. D., Lönnroth, K., Wilson, P., & Sulistyowati, L. S. (2016). Diabetes and tuberculosis co-epidemic: the Bali Declaration. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(1), 8-10.

150. Schepisi, M. S., Pontali, E., Manika, K., Gomez, M. N. A., Prego, M. R., Esteban, J., ... & Heyckendorf, J. (2016). Socio-demographic and clinical characteristics of patients with tuberculosis and diabetes in European countries. A TB-net study. *European Respiratory Journal*, 48(60), PA2657.

151. Duran, A., Calvo, B., Mendez, M., Ortola, A., Crespo, I., & Marco, J. (2016). The dual burden of tuberculosis and diabetes in hospitalized Spanish patients. *Endocrine Abstracts*, 41, EP486.

152. Simou, E., Britton, J., & Leonardi-Bee, J. (2018). Alcohol consumption and the risk of tuberculosis: a systematic review and Meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.

153. Silva, D. R., Muñoz-Torrico, M., Duarte, R., Galvão, T., Bonini, E. H., Arbex, F.

- F., ... & Mello, F. C. D. Q. (2018). Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 44(2), 145-152.
154. Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol Research*, 29(4), 245-254.
155. Dinis-Oliveira, R. (2016). Oxidative and non-oxidative metabolomics of ethanol. *Current Drug Metabolism*, 17(4), 327-335.
156. Maenhout, T. M., De Buyzere, M. L., & Delanghe, J. R. (2013). Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clinica Chimica Acta*, 415, 322-329.
157. Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health*, 27, 277-284.
158. Rosenblum, E., Gavaler, J. S., & Van Thiel, D. H. (1985). Lipid peroxidation: a mechanism for ethanol-associated testicular injury in rats. *Endocrinology*, 116(1), 311-318.
159. Amanvermez, R., Demir, S., Tunçel, Ö. K., Alvur, M., & Agar, E. (2005). Alcohol-induced oxidative stress and reduction in oxidation by ascorbate/L-cys/L-met in the testis, ovary, kidney, and lung of rat. *Advances in Therapy*, 22(6), 548-558.
160. Harikrishnan, R., Abhilash, P. A., Das, S. S., Prathibha, P., Rejitha, S., John, F., ... & Indira, M. (2013). Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *British journal of nutrition*, 110(4), 689-698.
161. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Errico, F., Bolognino, A. E., Lillo, F., Salerno, M. T., & Altomare, E. (1997, September). Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. In *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications* (Vol. 17, No. 5, pp. 307-311). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

162. Uygur, R., Yagmurca, M., Alkoc, O. A., Genc, A., Songur, A., Ucok, K., & Ozen, O. A. (2014). Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia*, 46(4), 356-369.
163. Ojeda, M. L., Jotty, K., Nogales, F., Murillo, M. L., & Carreras, O. (2010). Selenium or selenium plus folic acid intake improves the detrimental effects of ethanol on pups' Selenium balance. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3486-3491.
164. Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., & Iqbal, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal Reproduction Science*, 146(1-2), 55-62.
165. Behne, D., Höfer, T., von Berswordt-Wallrabe, R., & Elger, W. (1982). Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *The Journal of Nutrition*, 112(9), 1682-1687.
166. Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A., & Remohi, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 6(1), 59-66.
167. Zhang, X., Liu, Q., & Ha, J. (1998). Protection of vitamin E against testis lipid peroxidation induced by iron and ethanol. *Wei sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research*, 27(3), 184-186.
168. Wallock-Montelius, L. M., Villanueva, J. A., Chapin, R. E., Conley, A. J., Nguyen, H. P., Ames, B. N., & Halsted, C. H. (2007). Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. *Biology of Reproduction*, 76(3), 455-465.
169. Zhu, Q., Emanuele, M. A., LaPaglia, N., Kovacs, E. J., & Emanuele, N. V. (2007). Vitamin E prevents ethanol-induced inflammatory, hormonal, and cytotoxic changes in reproductive tissues. *Endocrine*, 32(1), 59-68.
170. Adams, M. L., & Cicero, T. J. (1991). Effects of alcohol on β -endorphin and reproductive hormones in the male rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15(4), 685-692.

171. Messiha, F. S. (1980). Testicular and epididymal aldehyde dehydrogenase in rodents: Modulation by ethanol and disulfiram. *International Journal of Andrology*, 3(1-6), 375-382.
172. Muroño, E. P., & Fisher-Simpson, V. (1986). Partial characterization of alcohol dehydrogenase activity in purified rat Leydig cells. *Archives of Andrology*, 17(1), 39-47.
173. Muroño, E. P., & Fisher-Simpson, V. (1984). Ethanol directly increases dihydrotestosterone conversion to 5α -androstane- 3β , 17β -diol and 5α -androstane- 3α , 17β -diol in rat Leydig cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 121(2), 558-565.
174. Wanderley, M. I., & Udrisar, D. P. (1994). Inhibitory action of in vitro ethanol and acetaldehyde exposure on LHRH-and phorbol ester-stimulated testosterone secretion by rat testicular interstitial cells. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y [de] la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia*, 44(4), 135-141.
175. Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15-24.
176. Lee, S. Y., Gong, E. Y., Hong, C. Y., Kim, K. H., Han, J. S., Ryu, J. C., ... & Lee, K. (2009). ROS inhibit the expression of testicular steroidogenic enzyme genes via the suppression of Nur77 transactivation. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(11), 1591-1600.
177. Herman, M., Kang, S. S., Lee, S., James, P., & Rivier, C. (2006). Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: time course of effect and role of nitric oxide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(9), 1479-1491.
178. Orpana, A. K., Orava, M. M., Vihko, R. K., Härkönen, M., & Eriksson, C. P. (1990). Ethanol-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat Leydig cells: central role of mitochondrial NADH redox state. *Journal of Steroid Biochemistry*, 36(6), 603-608.

179. Chiao, Y. B., Johnston, D. E., Gavalier, J. S., & Thiel, D. H. V. (1981). Effect of chronic ethanol feeding on testicular content of enzymes required for testosteronegenesis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 5(2), 230-236.
180. Widenius, T. V., Orava, M. M., Vihko, R. K., Ylikahri, R. H., & Eriksson, C. J. P. (1987). Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol: multiple sites and mechanisms in dispersed Leydig cells. *Journal of steroid biochemistry*, 28(2), 185-188.
181. Akane, A., Fukushima, S., Shiono, H., & Fukui, Y. (1988). Effects of ethanol on testicular steroidogenesis in the rat. *Alcohol and Alcoholism*, 23(3), 203-209.
182. Muroso, E. P. (1984). Direct stimulatory effect of ethanol on 17 α -hydroxylase activity of rat testis interstitial cells. *Life Sciences*, 34(9), 845-852.
183. Eriksson, C. J. P., Widenius, T. V., Ylikahri, R. H., Härkönen, M., & Leinonen, P. (1983). Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol. Relation to hepatic and testicular acetaldehyde, ketone bodies and cytosolic redox state in rats. *Biochemical Journal*, 210(1), 29-36.
184. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Errico, F., Bolognino, A. E., Lillo, F., Salerno, M. T., & Altomare, E. (1997, September). Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. In *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications* (Vol. 17, No. 5, pp. 307-311). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
185. Farghali, H., Williams, D. S., Gavalier, J., & Thiel, D. H. V. (1991). Effect of short-term ethanol feeding on rat testes as assessed by ³¹P NMR spectroscopy, ¹H NMR imaging, and biochemical methods. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15(6), 1018-1023.
186. Haider, S. G., Hofmann, N., & Passia, D. (1985). Morphological and enzyme histochemical observations on alcohol induced disturbances in testis of two patients. *Andrologia*, 17(6), 532-540.

187. Srikanth, V., Balasubramanian, K., & Govindarajulu, P. (1995). Effects of ethanol treatment on Leydig cellular NADPH-generating enzymes and lipid profiles. *Endocrine journal*, 42(5), 705-712.
188. Radhakrishnakartha, H., Appu, A. P., & Madambath, I. (2014). Reversal of alcohol induced testicular hyperlipidemia by supplementation of ascorbic acid and its comparison with abstention in male guinea pigs. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25(1), 117-124.
189. Srikanth, V., Balasubramanian, K., & Govindarajulu, P. (1995). Effects of ethanol treatment on Leydig cellular NADPH-generating enzymes and lipid profiles. *Endocrine Journal*, 42(5), 705-712.
190. Kavitha, T. S., Parthasarathy, C., Sivakumar, R., Badrinarayanan, R., & Balasubramanian, K. (2006). Effects of excess corticosterone on NADPH generating enzymes and glucose oxidation in Leydig cells of adult rats. *Human & Experimental Toxicology*, 25(3), 119-125.
191. Koh, P. O., Won, C. K., & HO, J. H. (2006). Ethanol decreases the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rat testes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 635-637.
192. Koh, P. O., & Won, C. K. (2006). Decrease of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in rat testes by ethanol exposure. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 537-541.
193. Jang, M. H., Shin, M. C., Shin, H. S., Kim, K. H., Park, H. J., Kim, E. H., & Kim, C. J. (2002). Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. *European Journal of Pharmacology*, 449(1-2), 39-45.
194. Jana, K., Jana, N., De, D. K., & Guha, S. K. (2010). Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. *Molecular Reproduction and Development*, 77(9), 820-833.

195. Hu, J. H., Jiang, J., Hua, Y., Na, Y. A. N. G., Zhang, M. H., Min, W. U., ... & Guo, L. H. (2003). Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice overexpressing Fas Ligand. *Cell Research*, 13(5), 361.
196. Eid, N. A., Shibata, M. A., Ito, Y., Kusakabe, K., Hammad, H., & Otsuki, Y. (2002). Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *International Journal of Andrology*, 25(3), 159-167.
197. Koh, P. O. (2007). Ethanol exposure suppresses survival kinases activation in adult rat testes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(1), 21-24.
198. Giannessi, F., Giambelluca, M. A., & Ruffoli, R. (1998). The ultrastructural localization of NADPH-diaphorase enzymatic activity in the Leydig cells of mouse. effects of ethanol administration. *Italian Journal of Anatomy and Embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 103(4 Suppl 1), 153-165.
199. Wang, Y., Newton, D. C., Miller, T. L., Teichert, A. M., Phillips, M. J., Davidoff, M. S., & Marsden, P. A. (2002). An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *The American Journal of Pathology*, 160(1), 369-380.
200. Herman, M., Kang, S. S., Lee, S., James, P., & Rivier, C. (2006). Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: time course of effect and role of nitric oxide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(9), 1479-1491.
201. Eid, N., Ito, Y., & Otsuki, Y. (2011). Involvement of inducible nitric oxide synthase in DNA fragmentation in various testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Journal of Men's Health*, 8(S1), S36-S40.
202. Lee, H. Y., Naseer, M. I., Lee, S. Y., & Kim, M. O. (2010). Time-dependent effect of ethanol on GnRH and GnRH receptor mRNA expression in hypothalamus and testis of adult and pubertal rats. *Neuroscience Letters*, 471(1), 25-29.
203. Kataoka, S., Yasui, H., Hiromura, M., & Sakurai, H. (2005). Effect of insulin-mimetic vanadyl sulfate on cytochrome P450 2E1-dependent p-nitrophenol

- hydroxylation in the liver microsomes of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Life Sciences*, 77(22), 2814-2829.
204. Webb, E. A., Hesselning, A. C., Schaaf, H. S., Gie, R. P., Lombard, C. J., Spitaels, A., ... & Beyers, N. (2009). High prevalence of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(7), 868-874.
205. Chitturi, S., & Farrell, G. C. (2001). Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. In *Seminars in liver disease* (Vol. 21, No. 01, pp. 027-042).
206. Zhang, Q., Xiao, H., & Sugawara, I. (2009). Tuberculosis complicated by diabetes mellitus at Shanghai Pulmonary Hospital, China. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(5), 390-391.
207. Musicki, B., & Burnett, A. L. (2017). Constitutive NOS uncoupling and NADPH oxidase upregulation in the penis of type 2 diabetic men with erectile dysfunction. *Andrology*, 5(2), 294-298.
208. Kam, J., Tsang, V. H., & Chalasani, V. (2017). Retrograde ejaculation: a rare presenting symptom of type 1 diabetes mellitus. *Urology Case Reports*, 10, 9-10.
209. Bartak, V., Josifko, M., & Horackova, M. (1975). Juvenile diabetes and human sperm quality. *International Journal of Fertility*, 20(1), 30-32.
210. Bartak, V. (1979). Sperm quality in adult diabetic men. *International Journal of Fertility*. 24, 226-232.
211. Padrón, R. S., Dambay, A., Suárez, R., & Más, J. (1984). Semen analyses in adolescent diabetic patients. *Acta Diabetologia Latina*, 21(2), 115-121.
212. Cameron, D. F., Murray, F. T., & Drylie, D. D. (1985). Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *The Anatomical Record*, 213(1), 53-62.
213. Ali, S.T., Shaikh, R.N., Siddiqi, N.A., & Siddiqi P.Q. (1993). Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Archive of Andrology*, 30, 47-54.
214. Niven, M. J., Hitman, G. A., & Badenoch, D. F. (1995). A study of

- spermatozoal motility in type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 12(10), 921-924.
215. Ranganathan, P., Mahran, A. M., Hallak, J., & Agarwal, A. (2002). Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study. *Journal of Andrology*, 23(1), 71-75.
216. Agbaje, I. M., Rogers, D. A., McVicar, C. M., McClure, N., Atkinson, A. B., Mallidis, C., & Lewis, S. E. M. (2007). Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction*, 22(7), 1871-1877.
217. Alves, M. G., Martins, A. D., Rato, L., Moreira, P. I., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (2013). Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(5), 626-635.
218. Riera, M. F., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B., & Cigorraga, S. B. (2009). Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(4), E907-E914.
219. Oliveira, P. F., Alves, M. G., Rato, L., Laurentino, S., Silva, J., Sa, R., ... & Socorro, S. (2012). Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(2), 84-89.
220. Alves, M. G., Martins, A. D., Moreira, P. I., Carvalho, R. A., Sousa, M., Barros, A., ... & Oliveira, P. F. (2015). Metabolic fingerprints in testicular biopsies from type 1 diabetic patients. *Cell and Tissue Research*, 362(2), 431-440.
221. Frenkel, G. P., Homonnai, Z. T., Drasnin, N., Sofer, A., Kaplan, R., & Kraicer, P. F. (1978). Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. *Andrologia*, 10(2), 127-136.
222. Murray, F. T., Cameron, D. F., & Orth, J. M. (1983). Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism*, 32(7), 141-147.
223. Murray, F. T., Cameron, D. F., Orth, J. M., & Katovich, M. J. (1985). Gonadal

- dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat: alterations of testes morphology, serum testosterone and LH. *Hormone and Metabolic Research*, 17(10), 495-501.
224. Seethalakshmi, L., Menon, M., & Diamond, D. (1987). The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *The Journal of Urology*, 138(1), 190-194.
225. Hassan, A. A., Hassouna, M. M., Taketo, T., Gagnon, C., & Elhilali, M. M. (1993). The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *The Journal of Urology*, 149(1), 148-154.
226. Soudamani, S., Malini, T., & Balasubramanian, K. (2005). Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocrine Research*, 31(2), 81-98.
227. Scarano, W. R., Messias, A. G., Oliva, S. U., Klinefelter, G. R., & Kempinas, W. G. (2006). Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *International Journal of Andrology*, 29(4), 482-488.
228. Amaral, S., Moreno, A. J., Santos, M. S., Seica, R., & Ramalho-Santos, J. (2006). Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology*, 66(9), 2056-2067.
229. Kim, S. T., & Moley, K. H. (2008). Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction*, 136(3), 313-322.
230. Jelodar, G., Khaksar, Z., & Pourahmadi, M. (2009). Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(5), 377.
231. Sharaf, A. A., El Din, A. K., Hamdy, M. A., & Hafeiz, A. A. (1978). Effect of ascorbic acid on oxygen consumption, glycolysis and lipid metabolism of diabetic rat testis. Ascorbic acid and diabetes, I. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 16(12), 651-656.
232. Hutson, J. C. (1984). Altered biochemical responses by rat Sertoli cells and

peritubular cells cultured under simulated diabetic conditions. *Diabetologia*, 26(2), 155-158.

233. Jutte, N. H., Grootegeed, J. A., Rommerts, F. F. G., & Van der Molen, H. J. (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62(2), 399-405.

234. Nakamura, M., Hino, A., Yasumasu, I., & Kato, J. (1981). Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testes by lactate. *The Journal of Biochemistry*, 89(4), 1309-1315.

235. Oliveira, P. F., Alves, M. G., Rato, L., Silva, J., Sa, R., Barros, A., ... & Socorro, S. (2011). Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *International journal of andrology*, 34(6pt2), e612-e620.

236. Simoes, V. L., Alves, M. G., Martins, A. D., Dias, T. R., Rato, L., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (2013). Regulation of apoptotic signaling pathways by 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol in immature rat Sertoli cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 135, 15-23.

237. Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553.

238. Jequier, A. M. (2005). Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A clinician's viewpoint. *Human Reproduction*, 20(8), 2039-2042.

239. Gómez, O., Ballester, B., Romero, A., Arnal, E., Almansa, I., Miranda, M., ... & Terrado, J. (2009). Expression and regulation of insulin and the glucose transporter GLUT8 in the testes of diabetic rats. *Hormone and metabolic research*, 41(05), 343-349.

240. Sindhu, R. K., Koo, J. R., Sindhu, K. K., Ehdaie, A., Farmand, F., & Roberts, C. K. (2006). Differential regulation of hepatic cytochrome P450 monooxygenases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free radical research*, 40(9), 921-928.

241. Венгеровский, А. И. (2002). Фармакологические подходы к регуляции функции печени. *Бюллетень сибирской медицины*, 1(1), 25-29.

242. Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Appling, D.R., Anthony-Cahill, S.J., (2012).

Chapter 11, in: Biochemistry.4th ed., pp. 440–444.

243. Wang, X., Cheung, C. M., Lee, W. Y., Or, P. M., & Yeung, J. H. (2010). Major tanshinones of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) exhibit different modes of inhibition on human CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 activities in vitro. *Phytomedicine*, 17(11), 868-875.

244. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., & Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82(10), 667-715.

245. Wei, Y., Tang, C., Sant, V., Li, S., Poloyac, S. M., & Xie, W. (2016). A molecular aspect in the regulation of drug metabolism: does PXR-induced enzyme expression always lead to functional changes in drug metabolism? *Current Pharmacology Reports*, 2(4), 187-192.

246. Creek, D. J., Charman, W. N., Chiu, F. C., Prankerd, R. J., Dong, Y., Vennerstrom, J. L., & Charman, S. A. (2008). Relationship between antimalarial activity and heme alkylation for spiro-and dispiro-1, 2, 4-trioxolane antimalarials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1291-1296.

247. Guengerich, F. P. (1990). Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. *Chemical Research in Toxicology*, 3(4), 363-371.

248. Marks, G. S., McCluskey, S. A., Mackie, J. E., Riddick, D. S., & James, C. A. (1988). Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450. *The FASEB Journal*, 2(12), 2774-2783.

249. Baer, B. R., DeLisle, R. K., & Allen, A. (2009). Benzylic oxidation of gemfibrozil-1-O- β -glucuronide by P450 2C8 leads to heme alkylation and irreversible inhibition. *Chemical research in toxicology*, 22(7), 1298-1309.

250. Baer, B. R., DeLisle, R. K., & Allen, A. (2009). Benzylic oxidation of gemfibrozil-1-O- β -glucuronide by P450 2C8 leads to heme alkylation and irreversible inhibition. *Chemical research in toxicology*, 22(7), 1298-1309.

251. Baer, B. R., DeLisle, R. K., & Allen, A. (2009). Benzylic oxidation of

gemfibrozil-1-O- β -glucuronide by P450 2C8 leads to heme alkylation and irreversible inhibition. *Chemical research in toxicology*, 22(7), 1298-1309.

252. Lin, H. L., Kent, U. M., & Hollenberg, P. F. (2002). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 α -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(1), 160-167.

253. Gaafa, K. M., Badawy, M. M., & Hamza, A. A. (2011). The protective effects of ascorbic acid, cimetidine, and nifedipine on diethyldithiocarbamate-induced hepatic toxicity in albino rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(4), 405-419.

254. Björnsson, E., Nordlinder, H., & Olsson, R. (2006). Clinical characteristics and prognostic markers in disulfiram-induced liver injury. *Journal of Hepatology*, 44(4), 791-797.

255. Abdelmegeed, M. A., Ha, S. K., Choi, Y., Akbar, M., & Song, B. J. (2017). Role of CYP2E1 in mitochondrial dysfunction and hepatic tissue injury in alcoholic and non-alcoholic diseases. *Current Molecular Pharmacology*, 10(3):207-225.

256. Richardson, P. G., Mitsiades, C., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2006). Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu. Rev. Med.*, 57, 33-47.

257. Armstrong, J. L., Flockhart, R., Veal, G. J., Lovat, P. E., & Redfern, C. P. (2009). Regulation of ER stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumour cells. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.

258. Park, W. J., Kim, S. Y., Kim, Y. R., & Park, J. W. (2016). Bortezomib alleviates drug-induced liver injury by regulating CYP2E1 gene transcription. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(3), 613-622.

259. Oliva, J., Bardag-Gorce, F., Tillman, B., & French, S. W. (2011). Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*, 90(3), 295-299.

260. Park, C. M., Cha, Y. S., Youn, H. J., Cho, C. W., & Song, Y. S. (2010). Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression

against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in sprague-dawley rats. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1347-1353.

261. Shim, J. Y., Kim, M. H., Kim, H. D., Ahn, J. Y., Yun, Y. S., & Song, J. Y. (2010). Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), 318-325.

262. Ibrahim, Z. S., Ishizuka, M., Soliman, M., ElBohi, K., Sobhy, W., Muzandu, K., ... & Fujita, S. (2008). Protection by *Nigella sativa* against carbon tetrachloride-induced downregulation of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 56(3), 119-128.

263. Palanisamy, N., & Manian, S. (2012). Protective effects of *Asparagus racemosus* on oxidative damage in isoniazid-induced hepatotoxic rats: an in vivo study. *Toxicology and Industrial Health*, 28(3), 238-244.

264. Zhou, X., Cheung, C. M., Yang, J. M., Or, P. M., Lee, W. Y., & Yeung, J. H. (2015). Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water extract inhibits paracetamol-induced toxicity in primary rat hepatocytes via reducing CYP 2 E 1 activity and oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(7), 980-989.

265. Yang, G., Zhang, L., Ma, L., Jiang, R., Kuang, G., Li, K., ... & Gong, X. (2017). Glycyrrhetic acid prevents acetaminophen-induced acute liver injury via the inhibition of CYP2E1 expression and HMGB1-TLR4 signal activation in mice. *International immunopharmacology*, 50, 186-193.

266. Sumioka, I., Matsura, T., & Yamada, K. (2001). Therapeutic effect of S-allylmercaptocysteine on acetaminophen-induced liver injury in mice. *European Journal of Pharmacology*, 433(2-3), 177-185.

267. Jian, T., Ao, X., Wu, Y., Lv, H., Ma, L., Zhao, L., ... & Li, W. (2017). Total sesquiterpene glycosides from Loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf alleviate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through cytochrome P450 2E1 inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 229-237.

268. Yoshioka, H., Usuda, H., Fujii, H., & Nonogaki, T. (2017). *Sasa veitchii* extracts

suppress acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Environmental health and preventive medicine*, 22(1), 54.

269. Miron, A., Aprotosoiaie, A. C., Trifan, A., & Xiao, J. (2017). Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 152-167.

270. Buening, M. K., Chang, R. L., Huang, M. T., Fortner, J. G., Wood, A. W., & Conney, A. H. (1981). Activation and inhibition of benzo (a) pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Research*, 41(1), 67-72.

271. Ho, P. C., Saville, D. J., & Wanwimolruk, S. (2001). Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci*, 4(3), 217-27.

272. Pang, C. Y., Mak, J. W., Ismail, R., & Ong, C. E. (2012). In vitro modulatory effects of flavonoids on human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(5), 495-502.

273. Li, Y., Wang, E., Patten, C. J., Chen, L., & Yang, C. S. (1994). Effects of flavonoids on cytochrome P450-dependent acetaminophen metabolism in rats and human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 22(4), 566-571.

274. Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38..

275. Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-337.

276. Кітам, В. О., & Чашин, М. О. (2010). Комп'ютерне моделювання комплексоутворення цитохрому Р-450 2Е1 людини. *Український біохімічний журнал*, 82,(2), 94-103.

277. Tang, Y., Tian, H., Shi, Y., Gao, C., Xing, M., Yang, W., ... & Yao, P. (2013). Quercetin suppressed CYP2E1-dependent ethanol hepatotoxicity via depleting heme pool and releasing CO. *Phytomedicine*, 20(8-9), 699-704.
278. Surapaneni, K. M., Priya, V. V., & Mallika, J. (2014). Pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid effect on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) enzyme levels in experimentally induced non alcoholic steatohepatitis (NASH). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(18), 2736-41.
279. Oliva, J., Bardag-Gorce, F., Tillman, B., French, B. A., & French, S. W. (2011). The effects of dietary supplements on reducing ethanol induced oxidative stress. *The FASEB Journal*, 25,794.2.
280. Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirmeier, A., & Nussler, N. (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology*, 47(2), 253-261.
281. Yao, P., Hao, L., Nussler, N., Lehmann, A., Song, F., Zhao, J., ... & Nussler, A. (2009). The protective role of HO-1 and its generated products (CO, bilirubin, and Fe) in ethanol-induced human hepatocyte damage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1318-G1323.
282. Huang, Q., Bai, F., Nie, J., Lu, S., Lu, C., Zhu, X., ... & Lin, X. (2017). Didymine ameliorates hepatic injury through inhibition of MAPK and NF- κ B pathways by up-regulating RKIP expression. *International Immunopharmacology*, 42, 130-138.
283. Bedada, S. K., & Neerati, P. (2016). Resveratrol pretreatment affects CYP2E1 activity of chlorzoxazone in healthy human volunteers. *Phytotherapy Research*, 30(3), 463-468.
284. Yang, C. S., Chhabra, S. K., Hong, J. Y., & Smith, T. J. (2001). Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 1041S-1045S.
285. Sapkota, M., Hottor, T. K., DeVasure, J. M., Wyatt, T. A., & McCaskill, M. L. (2014). Protective Role of CYP 2E1 Inhibitor Diallyl Disulfide (DADS) on

Alcohol-Induced Malondialdehyde-Deoxyguanosine (M1dG) Adduct Formation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(6), 1550-1558.

286. Ko, J. W., Shin, J. Y., Kim, J. W., Park, S. H., Shin, N. R., Lee, I. C., ... & Kim, J. C. (2017). Protective effects of diallyl disulfide against acetaminophen-induced nephrotoxicity: A possible role of CYP2E1 and NF- κ B. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 156-165.

287. Cho, H. J., & Yoon, I. S. (2015). Pharmacokinetic interactions of herbs with cytochrome p450 and p-glycoprotein. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

288. Raner, G. M., Cornelious, S., Moulick, K., Wang, Y., Mortenson, A., & Cech, N. B. (2007). Effects of herbal products and their constituents on human cytochrome P4502E1 activity. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2359-2365.

289. Tassaneeyakul, W., Guo, L. Q., Fukuda, K., Ohta, T., & Yamazoe, Y. (2000). Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378(2), 356-363.

290. Lian, Y., Zhao, J., Wang, Y. M., Zhao, J., & Peng, S. Q. (2017). Metallothionein protects against isoniazid-induced liver injury through the inhibition of CYP2E1-dependent oxidative and nitrosative impairment in mice. *Food and chemical toxicology*, 102, 32-38.

291. Wang, X., & Cederbaum, A. I. (2006). S-adenosyl-L-methionine attenuates hepatotoxicity induced by agonistic Jo2 Fas antibody following CYP2E1 induction in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), 44-52.

292. Cederbaum, A. I. (2010). Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol-and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(11), 1366.

293. Dey, A., Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2007). S-adenosyl methionine protects ob/ob mice from CYP2E1-mediated liver injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), G91-G103.

294. Richter, C. P., & Campbell, K. H. (1940). Alcohol taste thresholds and

concentrations of solution preferred by rats. *Science*, 91(2369), 507-508.

295. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, M. S. M., & Gurtu, S. (2010). Antioxidant protective effect of glibenclamide and metformin in combination with honey in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2056-2066.

296. Giknis, M.L.A., Clifford, CB. (2008). Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han) Rats. Charles River. Available from: via http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_Wistar_Han_clin_lab_parameters_08.pdf).

297. Joshi, J. M. (2011). Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society*, 28(3), 193.

298. US Food and Drug Administration. (2002). Guidance for industry and reviewers: estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy Volunteers. *US Department of Health and Human Services, Rockville, MD*.

299. Danckwerts, M. P., Ebrahim, S., & Pillay, V. (2003). Pharmaceutical formulation of a fixed-dose anti-tuberculosis combination. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7(3), 289-297.

300. Boekelheide, K., & Chapin, R. (2005). Male reproductive toxicology. *Current protocols in toxicology*, 26(1), 16-0.

301. Калыев, А. В. (1998). Стресс, тревожность и поведение. *Актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных/Калыев АВ–К*.

302. Буреш, Я., Бурешова, О., & Дж, П. (1991). Хьюстон. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения/Под ред. АС Батуева. М., *Высшая школа*.

303. Пирс, Э. (1962). *Гистохимия. Теоретическая и прикладная: Пер. с англ.* Изд-во иностр. лит.

304. Смольникова, Н. М., Любимов, Б. И., Дурнев, А. Д., Скосырева, А. М., Чиркова, Е. М., Гуськова, Т. А., ... & Верстакова, О. Л. (2005). Методические указания по изучению репродуктивной токсичности фармакологических

веществ. *Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ*, 87-100.

305. Chitra, K. C., Rao, K. R., & Mathur, P. P. (2003). Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. *Asian Journal of Andrology*, 5(3), 203-208.

306. Kamath, S. A., Kummerow, F. A., & Narayan, K. A. (1971). A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Febs Letters*, 17(1), 90-92.

307. Стальная, И. Д., & Гаришвили, Т. Г. (1977). Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*.—М.: Медицина, 66-68.

308. Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.

309. Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in enzymology* (Vol. 77, pp. 398-405). Academic Press.

310. Mannervik, B. (1999). Measurement of glutathione reductase activity. *Current protocols in toxicology*, (1), 7-2.

311. Королюк, М. А., Иванова, Л. К., Майорова, И. Г., & Токарева, В. А. (1988). Метод определения активности каталазы. *Клиническая лабораторная диагностика*, (4), 44-47.

312. Сирота, Т. В. (1999). Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*, 45(3), 263-272.

313. Koop, D.R. (1990) Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 by 3-amino-1,2,4-triazole. *Chem Res Toxicol*, 3, 377-383.

314. Hevel, J. M., White, K. A., & Marletta, M. A. (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 22789-22791.

315. Колб, В. Г., & Камышников, В. С. (1976). Клиническая биохимия. *Минск: Беларусь*, 313, 13.
316. Kuchmerovska, T., Shymanskyu, I., Bondarenko, L., & Klimenko, A. (2008). Effects of nicotinamide supplementation on liver and serum. *Eur J Med Res*, 13, 275-280.
317. 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 Research*, 68, 285-290.
318. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
319. Lankford, S. M., Bai, S. A., & Goldstein, J. A. (2000). Cloning of canine cytochrome P450 2E1 cDNA: identification and characterization of two variant alleles. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(8), 981-986.
320. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
321. Hayes, A. W. (2007). *Principles and methods of toxicology*. Crc Press.
322. Nachlas, M. M., Tsou, K. C., De Souza, E., Cheng, C. S., & Seligman, A. M. (1957). Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 5(4), 420-436.
323. Hess, R., Scarpelli, D. G., & Pearse, A. G. E. (1958). The cytochemical localization of oxidative enzymes: II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *The Journal of Cell Biology*, 4(6), 753-760.
324. Pearse, A. G. E. (1968). Histochemistry. *Theoretical and applied*, 1, 1-759.
325. Шубич, М.Г. (1965) Метод окраски плазматических клеток. Архив патологии, 4, 80.
326. Кітам, В. О., & Чашин, М. О. (2010). Комп'ютерне моделювання комплексоутворення цитохрому Р-450 2Е1 людини. *Український біохімічний*

журнал, 82 (2), 94-103.

327. Данко, И. М., Одынец, К. А., Китаю, В. О., & Чашин, Н. А. (2006). Компьютерное моделирование пространственной структуры цитохрома P-450 2E1. *Український біохімічний журнал*, 78(2), 80.

328. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1781-1802.

329. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38.

330. Price, D. J., & Brooks III, C. L. (2004). A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *The Journal of Chemical Physics*, 121(20), 10096-10103.

331. Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell Jr, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., ... & Caflisch, A. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545-1614.

332. Joy, S., Nair, P. S., Hariharan, R., & Pillai, M. R. (2006). Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In silico biology*, 6(6), 601-605.

333. Glantz, S. A. (2002). Primer of biostatistics.

334. Квіташвілі, О. М., Павленко, О. С., Перегінєць, І. Б., Слабкий, Г. О., Мельник, П. С., Голубчиков, М. В., ... & Чепелевська, Л. А. (2016). Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України. 2015 рік.

335. Santiago, J., Silva, J. V., Alves, M. G., Oliveira, P. F., & Fardilha, M. (2018). Testicular aging: an overview of ultrastructural, cellular and molecular alterations. *The Journals of Gerontology: Series A*, gly082.

336. Clegg, E. D., Perreault, S. D., & Klinefelter, G. R. (2001). Assessment of male reproductive toxicity. *Principles and Methods of Toxicology*, 4, 1263-1300.

337. Шаяхметова, Г. М. (2013). Вплив етамбутолу на структурно-функціональні

показники гонад та фертильність щурів-самців. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 6(36), 45-50.

338. 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.

339. Трахтенберг, И. М. (1991). Проблемы нормы в токсикологии.

340. 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.

341. Шаяхметова, Г.М. (2011). Репродуктивна здатність самців-щурів та експресія мРНК цитохромів Р-450 2E1, 2C23 та 3A2 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.

342. 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

343. Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507-520.

344. 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

345. 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

346. 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.

347. 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.

348. 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*

349. 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

350. 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.

351. 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.

352. 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.

353. 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.

354. *Current Protocols in Toxicology* (2005). Ed. by M. Maines, John Wiley & Sons, Inc.

355. Падалко, В. И., & Севастьянова, Т. В. (2005). Клинические аспекты функционирования системы цитохрома Р-450 микросом печени. *Вестник Харьковского национального университета имени ВН Каразина. Серия «Медицина»*, (11 (705)).

356. Liu, X., Zhao, M., Mi, J., Chen, H., Sheng, L., & Li, Y. (2017). Protective effect of bicyclol on anti-tuberculosis drug induced liver injury in rats. *Molecules*, 22(4), 524.

357. Yue, J., & Peng, R. (2009). Does CYP2E1 play a major role in the aggravation of isoniazid toxicity by rifampicin in human hepatocytes? *British Journal of Pharmacology*, 157(3), 331-333.

358. Шаяхметова, Г.М., Анісімова, С.І., Блажчук, І.С., Карацуба, Т.А., Вороніна, А.К., Волошина, О.С., Сфйфетдінова, 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.

359. Шаяхметова, Г. (2011). Експресія цитохрому Р-450 2Е1 у сім'яниках та репродуктивна здатність щурів-самців за умов введення ізоніазиду. *Вісник Київського національного університету імені Т. Шевченка. Серія: Біологія*, 58, 51-53.
360. 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.
361. 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.
362. 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.
363. Ларина, С. Н., Игнатьев, И. В., Чебышев, Н. В., & Кулес, В. Г. (2009). Ядерные рецепторы и метаболизм ксенобиотиков. *Антибиотики и химиотерапия*, 54(3-4).
364. 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 2Е1, 2С23, та 3А2 у їх сім'яниках. *Збірник тез наукових робіт міжнародної науково-практичної конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ столітті», 20-21 квітня, м. Одеса*, 7.
365. Анісімова, С.І., Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., & Коваленко, В.М.

- (2011) Вплив етамбутолу на деякі ізоформи цитохрому Р-450 у печінці білих щурів. *Український науково-молодіжний журнал*, 4, 29.
366. Anisimova, S., Shayakhmetova, G., Bondarenko, L., Voronina, A., & Kovalenko, V. (2011). effect of ethambutol therapeutic dose administration on CYP2E1 expression in rats liver: p10. 2. *The Febs Journal*, 278, 174.
367. Cederbaum, A. I. (2006). CYP2E1 - biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 73(4), 657-672.
368. Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology*, 63(1), 193-213.
369. Tsai, S. C., Lu, C. C., Lin, C. S., & Wang, P. S. (2003). Antisteroidogenic actions of hydrogen peroxide on rat Leydig cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(6), 1276-1286.
370. 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.
371. 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.
372. Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F. K., & Ciarcia, G. (2014). Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 56.
373. Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedûs, B., Demaurex, N., & Krause, K. H. (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37594-37601.
374. Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., ... & Tanaka, T. (2002). Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell

apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction*, 8(2), 118-123.

375. Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316-331.

376. 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.

377. Кулинский, В. И., & Колесниченко, Л. С. (2009). Система глутатиона. І. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*, 55(3), 255-277.

378. Beckett, G. J., & Arthur, J. R. (2005). Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, 184(3), 455-465.

379. Kaneko, T., Iuchi, Y., Kobayashi, T., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., & Fujii, J. (2002). The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European Journal of Biochemistry*, 269(5), 1570-1578.

380. Coniglio, J. G., Grogan Jr, W. M., & Rhamy, R. K. (1975). Lipid and fatty acid composition of human testes removed at autopsy. *Biology of Reproduction*, 12(2), 255-259.

381. Srivastava, R., Mishra, N., Singh, U. M., & Srivastava, R. (2016). Genotoxicity: mechanisms and its impact on human diseases. *Octa Journal of Biosciences*, 4(2), 67-70.

382. 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

383. 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*, 15, S99-S100.
384. 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.
385. Coban, A. Y., Deveci, A., Sunter, A. T., Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: updated meta-analysis. *International Journal of Mycobacteriology*, 3(4), 230-241.
386. 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.
387. 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.
388. 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: ПАЛІВОДА А.В., 120-121.
389. Beard, N. S., Armentrout, S. A., & Weisberger, A. S. (1969). Inhibition of mammalian protein synthesis by antibiotics. *Pharmacological Reviews*, 21(3), 213-245.

390. Mukherjee, S., Vaidyanathan, K., Vasudevan, D. M., & Das, S. K. (2010). Role of plasma amino acids and gaba in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease-a pilot study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25(1), 37-42.
391. Kessova, I., & Cederbaum, A. I. (2003). CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Current Molecular Medicine*, 3(6), 509-518.
392. Weathermon, R., & Crabb, D. W. (1999). Alcohol and medication interactions. *Alcohol research and Health*, 23(1), 40-54.
393. Harris, D. (2015) Drug-alcohol interactions. *In ABC of Alcohol*.
394. Chen, R., Wang, J., Zhang, Y., Tang, S., & Zhan, S. (2015). Key factors of susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 89(6), 883-897.
395. Litten, R. Z., Egli, M., Heilig, M., Cui, C., Fertig, J. B., Ryan, M. L., ... & Noronha, A. (2012). Medications development to treat alcohol dependence: a vision for the next decade. *Addiction biology*, 17(3), 513-527.
396. Мамина, В. П. (2010). Механизмы формирования эмбриональных потерь у мышевидных грызунов. *Успехи современной биологии*, 130(4), 426-432.
397. 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
398. 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.
399. Voronina, A., Shayakhmetova, G. M., & Kovalenko, V. M. (2016). Behavioral disorders in long-term alcohol exposed male rats' offspring. *European Neuropsychopharmacology*, 26, S670.
400. Cederbaum, A. I., Lu, Y., & Wu, D. (2009). Role of oxidative stress in alcohol-

induced liver injury. *Archives of toxicology*, 83(6), 519-548.

401. 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.

402. 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.

403. 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.

404. Ronis, M. J., Huang, J., Crouch, J. A., Mercado, C., Irby, D., Valentine, C. R., ... & Badger, T. M. (1993). Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(2), 944-950.

405. 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

406. 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.

407. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., ... & Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(4), 830-839.

408. Wang, S., Pacher, P., De Lisle, R. C., Huang, H., & Ding, W. X. (2016). A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(6), 1215-1223.

409. Ma, Z., Hou, T., Shi, W., Liu, W., & He, H. (2015). Inhibition of hepatocyte apoptosis: an important mechanism of corn peptides attenuating liver injury induced by ethanol. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22062-22080.
410. Wang, X., Lu, Y., & Cederbaum, A. I. (2005). Induction of cytochrome P450 2E1 increases hepatotoxicity caused by Fas agonistic Jo2 antibody in mice. *Hepatology*, 42(2), 400-410.
411. Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667-685.
412. Gaggini, M., Carli, F., Rosso, C., Buzzigoli, E., Marietti, M., Della Latta, V., ... & Bugianesi, E. (2018). Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology*, 67(1), 145-158.
413. Bondarenko, L. B., Saprykina, N. A., & Kovalenko, V. M. (2006). Lung and spleen contents of free amino acids after pyrazinamide treatment. *Acta Toxicologica*, 14, 79–86.
414. 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.
415. Шаяхметова, Г.М., Бондаренко, Л.Б., & Коваленко, В.М. (2012). Зміни структури сполучнотканинних білків та тестикулярної експресії цитохрому P450 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
416. Ramachandran, G. (Ed.). (2013). *Biochemistry of collagen*. Springer Science & Business Media.
417. Preedy, V. R., Sherwood, R. A., Akpoguma, C. I., & Black, D. (1991). The urinary excretion of the collagen degradation markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an experimental rat model of alcoholic bone disease. *Alcohol*

and *Alcoholism*, 26(2), 191-198.

418. Patouillard, G., Farjanel, J., Cordier, S., Bayle, J. J., & Frey, J. (1978). Discussion of the interest of estimation of hydroxyprolinuria in chronic alcoholism (author's transl). In *Annales de biologie clinique* (Vol. 36, No. 1, pp. 19-22).

419. Mezey, E., Potter, J. J., Slusser, R. J., & Abdi, W. (1977). Changes in hepatic collagen metabolism in rats produced by chronic ethanol feeding. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 36(2), 206-214.

420. Forsander, O. A., Pikkarainen, J. A., & Salaspuro, M. P. (1983). A high hepatic concentration of free proline does not induce collagen synthesis in rat liver. *Hepato-gastroenterology*, 30(1), 6-8.

421. Pedchenko, V. K., Chetyrkin, S. V., Chuang, P., Ham, A. J. L., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., ... & Voziyan, P. A. (2005). Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 54(10), 2952-2960.

422. Kornblihtt, A. R., & Gutman, A. (1988). Molecular biology of the extracellular matrix proteins. *Biological Reviews*, 63(4), 465-507.

423. Loeser, R. F., & Wallin, R. (1992). Cell adhesion to matrix Gla protein and its inhibition by an Arg-Gly-Asp-containing peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9459-9462.

424. Koide, T., Takahara, Y., Asada, S., & Nagata, K. (2002). Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6178-6182.

425. Novitskiy, G., Traore, K., Wang, L., Trush, M. A., & Mezey, E. (2006). Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(8), 1429-1435.

426. Fox, H. L., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., & Lynch, C. J. (1998). Amino acids stimulate phosphorylation of p70 S6k and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274(1), C206-C213.

427. Inamasu, J., Guiot, B. H., & Sachs, D. C. (2006). Ossification of the posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history. *Neurosurgery*, 58(6), 1027-1039.
428. Lee, B., D'Alessio, M., Vissing, H., Ramirez, F., Steinmann, B., & Superti-Furga, A. (1991). Characterization of a large deletion associated with a polymorphic block of repeated dinucleotides in the type III procollagen gene (COL3A1) of a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *American Journal of Human Genetics*, 48(3), 511-517.
429. Wirtz, M. K., Rao, V. H., Glanville, R. W., Labhard, M. E., Pretorius, P. J., de Vries, W. N., ... & Hollister, D. W. (1993). A cysteine for glycine substitution at position 175 in an $\alpha 1$ (I) chain of type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta. *Connective tissue research*, 29(1), 1-11.
430. Nieto, N., Friedman, S. L., & Cederbaum, A. I. (2002). Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *Journal of biological chemistry*, 277, 9853-9864.
431. Gautieri, A., Redaelli, A., Buehler, M. J., & Vesentini, S. (2014). Age-and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: Candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products. *Matrix Biology*, 34, 89-95.
432. Novitskiy, G., Traore, K., Wang, L., Trush, M. A., & Mezey, E. (2006). Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(8), 1429-1435.
433. Reilly, M. E., Mantle, D., Richardson, P. J., Salisbury, J., Jones, J., Peters, T. J., & Preedy, V. R. (1997). Studies on the time-course of ethanol's acute effects on skeletal muscle protein synthesis: Comparison with acute changes in proteolytic activity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(5), 792-798.
434. Rhee, E. P. (2018, March). A systems-level view of renal metabolomics. In *Seminars in nephrology* (Vol. 38, No. 2, pp. 142-150). WB Saunders.
435. Tong, B. C., & Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(8), 823-832.

436. Jankowski, J., Kubińska, M., & Zduńczyk, Z. (2014). Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets—a review. *Annals of Animal Science*, 14(1), 17-32.
437. Hipkiss, A. R. (2012). Can the beneficial effects of methionine restriction in rats be explained in part by decreased methylglyoxal generation resulting from suppressed carbohydrate metabolism?. *Biogerontology*, 13(6), 633-636.
438. Jové, M., Ayala, V., Ramírez-Núñez, O., Naudí, A., Cabré, R., Spickett, C. M., ... & Pamplona, R. (2013). Specific lipidome signatures in central nervous system from methionine-restricted mice. *Journal of proteome research*, 12(6), 2679-2689.
439. Jung, Y. S., Kim, S. J., Kwon, D. Y., Jun, D. S., & Kim, Y. C. (2013). Significance of alterations in the metabolomics of sulfur-containing amino acids during liver regeneration. *Biochimie*, 95(8), 1605-1610.
440. Thomas, A., Klein, M. S., Stevens, A. P., Reinders, Y., Hellerbrand, C., Dettmer, K., ... & Reinders, J. (2013). Changes in the hepatic mitochondrial and membrane proteome in mice fed a non-alcoholic steatohepatitis inducing diet. *Journal of proteomics*, 80, 107-122.
441. Fernández, A., Colell, A., Caballero, F., Matías, N., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial S-Adenosyl-l-Methionine Transport is Insensitive to Alcohol-Mediated Changes in Membrane Dynamics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(7), 1169-1180.
442. Ruiz-Ramírez, A., Ortiz-Balderas, E., Cardozo-Saldaña, G., Diaz-Diaz, E., & El-Hafidi, M. (2014). Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clinical Science*, 126(1), 19-29.
443. Wu, X., Busschaert, N., Wells, N. J., Jiang, Y. B., & Gale, P. A. (2015). Dynamic covalent transport of amino acids across lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 137(4), 1476-1484.
444. Wang, M., Zhang, X., Wang, Y., Li, Y., Chen, Y., Zheng, H., ... & Liao, Q. (2018). Metabonomic strategy for the detection of metabolic effects of probiotics combined with prebiotic supplementation in weaned rats. *RSC Advances*, 8(9), 5042-

5057.

445. Radhakrishnakartha, H., Appu, A. P., & Madambath, I. (2014). Reversal of alcohol induced testicular hyperlipidemia by supplementation of ascorbic acid and its comparison with abstention in male guinea pigs. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25(1), 117-124.

446. Orpana, A. K., & Peter Eriksson, C. J. (1990). Ethanol-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat leydig cells: role of mitochondrial substrate shuttles and citrate. *Alcohol and alcoholism*, 25(5), 499-507.

447. Adams, M. L., Little, P. J., Bell, B. R. E. N. T., & Cicero, T. J. (1991). Alcohol affects rat testicular interstitial fluid volume and testicular secretion of testosterone and beta-endorphin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 258(3), 1008-1014.

448. Frias, J., Rodriguez, R., Torres, J. M., Ruiz, E., & Ortega, E. (2000). Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones, β -endorphin and prolactin in human adolescents of both sexes. *Life Sciences*, 67(9), 1081-1086.

449. Ye, L., Su, Z. J., & Ge, R. S. (2011). Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16(12), 9983-10001.

450. Jaiswal, D., Sah, R., Agrawal, N. K., Dwivedi, U. S., Trivedi, S., & Singh, K. (2012). Combined effect of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms on human male infertility in north Indian population. *Reproductive Sciences*, 19(3), 312-316.

451. Mladovsky, P., Allin, S., & Masseria, C. (2009). *Health in the European Union: trends and analysis* (No. 19). WHO Regional Office Europe.

452. Choby, B. (2017). Diabetes Update: Prevention and Management of Diabetes Complications. *Fp essentials*, 456, 36-40.

453. Gandhi, J., Dagur, G., Warren, K., L Smith, N., R Sheynkin, Y., Zumbo, A., & A Khan, S. (2017). The Role of Diabetes Mellitus in Sexual and Reproductive Health: An Overview of Pathogenesis, Evaluation, and Management. *Current Diabetes Reviews*, 13(6), 573-581.

454. Sing, K., Devi, S., & Pankaj, P. (2016). Diabetes associated male reproductive dysfunction: Prevalence, diagnosis and risk factors. *Int J Drug Dev Res*, 8, 7-10..
455. Cook, G. A., Lavrentyev, E. N., Pham, K., & Park, E. A. (2017). Streptozotocin diabetes increases mRNA expression of ketogenic enzymes in the rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(2), 307-312.
456. Tran, M., & Elbarbry, T. (2016). Influence of Diabetes Mellitus on Pharmacokinetics of Drugs. *MOJ Bioequiv Availab*, 2(1), 00016.
457. Tomankova, V., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2017). Effects of obesity on liver cytochromes P450 in various animal models. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 161(2).
458. Woodcroft, K. J., Hafner, M. S., & Novak, R. F. (2002). Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology*, 35(2), 263-273.
459. Vincent, A. M., Brownlee, M., & Russell, J. W. (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 368-383.
460. Desco, M. C., Asensi, M., Márquez, R., Martínez-Valls, J., Vento, M., Pallardó, F. V., ... & Viña, J. (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*, 51(4), 1118-1124.
461. Wolff, S. P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin*, 49(3), 642-652.
462. Ding, G. L., Liu, Y., Liu, M. E., Pan, J. X., Guo, M. X., Sheng, J. Z., & Huang, H. F. (2015). The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 17(6), 948.
463. Dias, T. R., Alves, M. G., Silva, B. M., & Oliveira, P. F. (2014). Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 396(1-2), 37-45.

464. El'tseva, T. V., Adamskaya, E. I., Peryshkova, T. A., & Babichev, V. N. (1993). Disturbance of neuroendocrine regulation of sexual behavior of male rats with streptozotocin diabetes. *Neuroscience and behavioral physiology*, 23(6), 538-544.
465. Шаяхметова, Г. М., Бондаренко, Л. Б., Блажчук, І. С., & Коваленко, В. М. (2012). Роль цитохрому Р-450 2Е1 у порушенні репродуктивної здатності щурів-самців зі стрептозотоциновим діабетом. *Український морфологічний альманах*, 10(3), 114-116.
466. 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.
467. 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.
468. Arous, C., & Wehrle-Haller, B. (2017). Role and impact of the extracellular matrix on integrin-mediated pancreatic β -cell functions. *Biology of the Cell*, 109(6), 223-237.
469. Avery, N. C., & Bailey, A. J. (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie Biologie*, 54(7), 387-395.
470. Guo, Y., Tang, C. Y., Man, X. F., Tang, H. N., Tang, J., Zhou, C. L., ... & Zhou, H. D. (2017). Insulin-like growth factor-1 promotes osteogenic differentiation and collagen I alpha 2 synthesis via induction of mRNA-binding protein LARP 6 expression. *Development, growth & differentiation*, 59(2), 94-103.
471. Pallante, K. M., Niu, Z., Zhao, Y., Cohen, A. J., Nah, H. D., & Adams, S. L. (1996). The chick $\alpha 2$ (I) collagen gene contains two functional promoters, and its expression in chondrocytes is regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25233-25239.

472. 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, 285-90.
473. Yavuz, D., Tuğtepe, H., Çetinel, Ş., Uyar, S., Kaya, H., Haklar, G., ... & Akalin, S. (2005). Collagen Ultrastructure and TGF- β 1 Expression Preserved with Aminoguanidine During Wound Healing in Diabetic Rats. *Endocrine Research*, 31(3), 229-243.
474. Kim, B. M., Eichler, J., Reiser, K. M., Rubenchik, A. M., & Da Silva, L. B. (2000). Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 27(4), 329-335.
475. Tabak, O., Gelisgen, R., Erman, H., Erdenen, F., Muderrisoglu, C., Aral, H., & Uzun, H. (2011). Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clinical & Investigative Medicine*, 34(3), 163-171.
476. Boušová, I., Košťáková, Š., Matoušková, P., Bártíková, H., Szotáková, B., & Skálová, L. (2017). Monosodium glutamate-induced obesity changed the expression and activity of glutathione S-transferases in mouse heart and kidney. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(5), 257-259.
477. 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.
478. Singh, A., Jahan, N., Radhakrishnan, G., & Banerjee, B. D. (2016). To evaluate the efficacy of combination antioxidant therapy on oxidative stress parameters in seminal plasma in the male infertility. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(7), QC14.
479. Calogero, A. E., Condorelli, R. A., & La Vignera, S. (2017). Nonhormonal

medical treatment of male infertility. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*, 1-23..

480. Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., & Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1111-1116.

481. Walczak–Jedrzejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska–Hilczek, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 66(1), 60.

482. Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 93-105.

483. Cederbaum, A. I. (2010). Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol-and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(11), 1366-1376.

484. Lu, S. C., Mato, J. M., Espinosa-Diez, C., & Lamas, S. (2016). MicroRNA-mediated regulation of glutathione and methionine metabolism and its relevance for liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 66-72.

485. Jung, I. L., & Kim, I. G. (2003). Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15(1), 19-26.

486. Philips, N., Chalensouk-Khaosaat, J., & Gonzalez, S. (2015). Stimulation of the Fibrillar Collagen and Heat Shock Proteins by Nicotinamide or Its Derivatives in Non-Irradiated or UVA Radiated Fibroblasts, and Direct Anti-Oxidant Activity of Nicotinamide Derivatives. *Cosmetics*, 2(2), 146-161.

487. Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15-24.

488. Jung, J. H., & Seo, J. T. (2014). Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea?. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 41(3), 108-114.

489. Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *The Journal of*

nutrition, 130(5), 1447S-1454S.

490. 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.

491. Vidal, J. D., & Whitney, K. M. (2014). Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis*, 4(2), e979099.

492. Шаяхметова, А.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, И.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

493. 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.

494. 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

495. Crowley, C. L., Payne, C. M., Bernstein, H., Bernstein, C., & Roe, D. (2000). The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate. *Cell Death and Differentiation*, 7(3), 314 – 326.

496. Шаяхметова, Г.М., Блажчук, И.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.
497. Lieber, C. S. (2002). S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5), 1183S-1187S.
498. Mato, J., Alvarez, L., Ortiz, P., & Pajares, M. A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 265-280.
499. Avila, M. A., García-Trevijano, E. R., Martínez-Chantar, M. L., Latasa, M. U., Pérez-Mato, I., Martínez-Cruz, L. A., ... & Mato, J. M. (2002). S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol*, 27(3), 163-167.
500. Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2005). Inhibition of CYP2E1 catalytic activity in vitro by S-adenosyl-L-methionine. *Biochemical Pharmacology*, 69(7), 1081-1093.
501. Kumar, N., & Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191-196.
502. Thomas, S. C. (2018). Exploring Literature for Conceptualisations of Male Infertility: A Phenomenological Analysis. *The Qualitative Report*, 23(4), 978-1000.
503. Пенжоян, Г. А., Маркова, Л. М., & Гришанов, Н. В. (2000). Значение этиологических факторов нарушения репродуктивной системы мужчины в лечении мужского бесплодия. *Проблемы репродукции*, (6), 32-35.
504. World Health Organization. (2017). WHO model list of essential medicines, 20th list (March 2017, amended August 2017).
505. Foufelle, F., & Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology research & perspectives*, 4(1), e00211.
506. Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and

Clinical Significance: A Review. *Current drug targets*, 19(1), 38-54.

507. Al-Ghamdi, S. S., Chatterjee, P. K., Raftery, M. J., Thiernemann, C., & Yaqoob, M. M. (2004). Role of cytochrome P4502E1 activation in proximal tubular cell injury induced by hydrogen peroxide. *Renal failure*, 26(2), 103-110.

508. Guengerich, F. P., & Johnson, W. W. (1997). Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH– cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry*, 36(48), 14741-14750.

509. Robertson, G., Leclercq, I., & Farrell, G. C. (2001). II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(5), G1135-G1139.

510. Cederbaum, A. I. (2006). Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21, S22-S25.

511. Gonzalez, F. J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1), 101-110.

512. 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](http://dx.doi.org/10.4172/2324.8793), 2.

513. 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.

514. Шаяхметова, А.М., Бондаренко, Л.Б., Блажчук, И.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.

515. Walubo, A., Coetsee, C., Arti, D., & Du, J. P. (2005). The effect of isoniazid containing regimen on CYP2E1 during antituberculosis therapy. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 117, 137-151.

516. Preziosi, P. (2007). Isoniazid: metabolic aspects and toxicological correlates. *Current Drug Metabolism*, 8(8), 839-851.

517. Schaaf, H. S., Parkin, D. P., Seifart, H. I., Werely, C. J., Hesselning, P. B., Van Helden, P. D., ... & Donald, P. R. (2005). Isoniazid pharmacokinetics in children treated for respiratory tuberculosis. *Archives of Disease in Childhood*, 90(6), 614-618.

518. Park, K. S., Sohn, D. H., Veech, R. L., & Song, B. J. (1993). Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 248(1), 7-14.

519. Hartley, D. P., & Klaassen, C. D. (2000). Detection of chemical-induced differential expression of rat hepatic cytochrome P450 mRNA transcripts using branched DNA signal amplification technology. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(5), 608-616.

520. Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15-24.

521. Zhang, B., Sun, S., Shen, L., Zu, X., Chen, Y., Hao, J., ... & Feng, F. (2011). DNA methylation in the rat livers induced by low dosage isoniazid treatment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 486-490.

522. Bürgin, H., Schmid, B., & Zbinden, G. (1979). Assessment of DNA damage in germ cells of male rabbits treated with isoniazid and procarbazine. *Toxicology*, 12(3), 251-257.

523. Bhadauria, S., Mishra, R., Kanchan, R., Tripathi, C., Srivastava, A., Tiwari, A., & Sharma, S. (2010). Isoniazid-induced apoptosis in HepG2 cells: generation of

oxidative stress and Bcl-2 down-regulation. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(5), 242-251.

524. Mishin, V., Heck, D. E., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2014). Human recombinant cytochrome P450 enzymes display distinct hydrogen peroxide generating activities during substrate independent NADPH oxidase reactions. *Toxicological Sciences*, 141(2), 344-352.

525. Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Yin, J., Zhou, H., ... & Huang, S. (2010). Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells. *Laboratory Investigation*, 90(5), 762.

526. Xu, B., Chen, S., Luo, Y., Chen, Z., Liu, L., Zhou, H., ... & Huang, S. (2011). Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PloS one*, 6(4), e19052.

527. Matassov, D., Kagan, T., Leblanc, J., Sikorska, M., & Zakeri, Z. (2004). Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. In *Apoptosis Methods and Protocols* (pp. 1-17). Humana Press.

528. Place, V., Peets, E. A., Buyske, D. A., & Little, R. R. (1966). Metabolic and special studies of ethambutol in normal volunteers and tuberculous patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 135(2), 775-795.

529. Buyske, D. A., Sterling, W., & Peets, E. (1966). Pharmacological and biochemical studies on ethambutol in laboratory animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 135(2), 711-725.

530. Peets, E. A., & Buyske, D. A. (1964). Comparative metabolism of ethambutol and its l-isomer. *Biochemical pharmacology*, 13(10), 1403-1419.

531. Becker, C., Dressman, J. B., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Kopp, S., Midha, K. K., ... & Barends, D. M. (2008). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ethambutol dihydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(4), 1350-1360.

532. Hall, R. G., Swancutt, M. A., Meek, C., Leff, R., & Gumbo, T. (2011).

- Ethambutol pharmacokinetic variability is linked to body mass in overweight, obese, and extremely obese people. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-05623.
533. McEvoy, G. K. (2000). American Hospital Formulary Service/AHFS Drug Information 2000. Bethesda: The American Society of Health-System Pharmacists.
534. Jönsson, S., Davidse, A., Wilkins, J., Van der Walt, J. S., Simonsson, U. S., Karlsson, M. O., ... & McIlleron, H. (2011). Population pharmacokinetics of ethambutol in South African tuberculosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-00274.
535. Chimote, G., & Banerjee, R. (2008). Evaluation of antitubercular drug insertion into preformed dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(2), 258-264.
536. Mejia-Garcia, A., Sanchez-Ocampo, E. M., Galindo-Gomez, S., Shibayama, M., Reyes-Hernandez, O., Guzman-Leon, S., ... & Elizondo, G. (2013). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances CCl₄-induced hepatotoxicity in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner. *Xenobiotica*, 43(2), 161-168.
537. Raucy, J. L., Lasker, J., Ozaki, K., & Zoleta, V. (2004). Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 79(2), 233-241.
538. Raucy, J. L., Lasker, J., Ozaki, K., & Zoleta, V. (2004). Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 79(2), 233-241.
539. Roberts, B. J., Song, B. J., Soh, Y., Park, S. S., & Shoaf, S. E. (1995). Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29632-29635.
540. Bardag-Gorce, F., Yuan, Q. X., Li, J., French, B. A., Fang, C., Ingelman-Sundberg, M., & French, S. W. (2000). The effect of ethanol-induced cytochrome p4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(1), 23-29.
541. Lee, S. Y., Jang, H., Lee, J. Y., Kwon, K. I., Oh, S. J., & Kim, S. K. (2014).

Inhibition of cytochrome P450 by ethambutol in human liver microsomes. *Toxicology Letters*, 229(1), 33-40.

542. Dart, R. C. (Ed.). (2004). *Medical Toxicology*. Lippincott Williams & Wilkins.

543. Cole, A., May, P. M., & Williams, D. R. (1981). Metal binding by pharmaceuticals. Part 1. Copper (II) and zinc (II) interactions following ethambutol administration. *Agents and Actions*, 11(3), 296-305.

544. Classen, H. G., Gröber, U., Löw, D., Schmidt, J., & Stracke, H. (2011). Zinc deficiency. Symptoms, causes, diagnosis and therapy. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 34(3), 87-95.

545. Nair, N., Bedwal, S., Prasad, S., Saini, M. R., & Bedwal, R. S. (2005). Short-term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymis of rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 786–794.

546. Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.

547. Nixon, B. J., Katen, A. L., Stanger, S. J., Schjenken, J. E., Nixon, B., & Roman, S. D. (2014). Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *PloS One*, 9(5), e94904.

548. Chang, C. S., Choi, J. B., Kim, H. J., & Park, S. B. (2011). Correlation between serum testosterone level and concentrations of copper and zinc in hair tissue. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 264-271.

549. Васильева, О. А., Серебрякова, В. А., Уразова, О. И., Новицкий, В. В., Кононова, Т. Е., & Наследникова, И. О. (2010). Апоптозиндуцирующее действие противотуберкулёзных препаратов основного ряда in vitro. *Антибиотики и химиотерапия*, 55(11-12).

550. Gil, D., Garcia, L. F., & Rojas, M. (2003). Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: physiological role of apoptosis in the control of Mycobacterium tuberculosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190(2), 111-119.

551. 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.

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

553. Heijne, W. H., Stierum, R. H., Leeman, W. R., & van Ommen, B. (2005). The introduction of toxicogenomics; potential new markers of hepatotoxicity. *Cancer Biomarkers*, 1(1), 41-57.

554. Tompkins, L. M., & Wallace, A. D. (2007). Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(4), 176-181.

555. Gonzalez, F. J. (2006). The 2006 bernard B. Brodie award lecture: CYP2E1. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(1), 1-8.

556. Dai, Y., & Cederbaum, A. I. (1995). Inactivation and degradation of human cytochrome P4502E1 by CCl₄ in a transfected HepG2 cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(3), 1614-1622.

557. Eliasson, E., Mkrtchian, S., & Ingelman-Sundberg, M. (1992). Hormone-and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15765-15769.

558. Goasduff, T., & Cederbaum, A. I. (1999). NADPH-dependent microsomal electron transfer increases degradation of CYP2E1 by the proteasome complex: role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370(2), 258-270.

559. Mathur, M. (2012). Histochemical shifts in the profile of ovarian dehydrogenases of sexually mature cycling females of Swiss albino mice due to sodium fluoride ingestion. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 2, 115-117.

560. Knockaert, L., Fromenty, B., & Robin, M. A. (2011). Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. *The FEBS Journal*, 278(22), 4252-4260.
561. Hutson, J. C., Stocco, D. M., Campbell, G. T., & Wagoner, J. (1983). Sertoli cell function in diabetic, insulin-treated diabetic, and semi-starved rats. *Diabetes*, 32(2), 112-116.
562. Benitez, A., & Diaz, J. P. (1985). Effect of streptozotocin-diabetes and insulin treatment on regulation of Leydig cell function in the rat. *Hormone and Metabolic Research*, 17(01), 5-7.
563. Ballester, J., Muñoz, M. C., Domínguez, J., Rigau, T., Guinovart, J. J., & Rodríguez-Gil, J. E. (2004). Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH-and LH-linked mechanisms. *Journal of Andrology*, 25(5), 706-719.
564. Kimura, M., Lukinius, A., Ericsson, J. L. E., & Grimelius, L. (1992). Distribution of insulin binding sites on Leydig cells of rat testes using insulin-coated gold particles. *Histochemistry*, 97(3), 213-220.
565. Lin, T., Haskell, J., Vinson, N., & Terracio, L. (1986). Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology*, 119(4), 1641-1647.
566. Spaliviero, J. A., Jimenez, M., Allan, C. M., & Handelsman, D. J. (2004). Luteinizing hormone receptor-mediated effects on initiation of spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice are replicated by testosterone. *Biology of Reproduction*, 70(1), 32-38.
567. Jelodar, G., Razmi, N., & Gholampour, V. (2007). Arginase alteration in the reproductive system of alloxan-diabetic dogs. *Journal of Reproduction and Development*, 53(2), 317-321.
568. Amaral, S., Moreno, A. J., Santos, M. S., Seica, R., & Ramalho-Santos, J. (2006). Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology*, 66(9), 2056-2067.

569. Gómez, O., Ballester, B., Romero, A., Arnal, E., Almansa, I., Miranda, M., ... & Terrado, J. (2009). Expression and regulation of insulin and the glucose transporter GLUT8 in the testes of diabetic rats. *Hormone and Metabolic Research*, 41(05), 343-349.
570. Schoeller, E. L., Albanna, G., Frolova, A. I., & Moley, K. H. (2012). Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes*, 61(7), 1869-1878.
571. Naughton, C. K., Nangia, A. K., & Agarwal, A. (2001). Varicocele and male infertility: Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Human Reproduction Update*, 7(5), 473-481.
572. Hales, D. B., Allen, J. A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., & Hales, K. H. (2005). Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(1), 120-134.
573. Hales, D. B., Allen, J. A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., & Hales, K. H. (2005). Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(1), 120-134.
574. Shih, T. Y., Pai, C. Y., Yang, P., Chang, W. L., Wang, N. C., & Hu, O. Y. P. (2013). A novel mechanism underlies the hepatotoxicity of pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-01866.
575. Cole, A., May, P. M., & Williams, D. R. (1981). Metal binding by pharmaceuticals. Part 1. Copper (II) and zinc (II) interactions following ethambutol administration. *Agents and Actions*, 11(3), 296-305.
576. Sikka, S. C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 851-862.
577. Ekström, G., & Ingelman-Sundberg, M. (1989). Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochemical Pharmacology*, 38(8), 1313-1319.
578. Lu, D., Ma, Y., Zhang, W., Bao, D., Dong, W., Lian, H., ... & Zhang, L. (2012). Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the

- cTnTR141W dilated cardiomyopathy transgenic mice. *Hypertension*, 60(1), 81-89.
579. Fujii, J., & Tsunoda, S. (2011). Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 420-423.
580. Lee, S. Y., Gong, E. Y., Hong, C. Y., Kim, K. H., Han, J. S., Ryu, J. C., ... & Lee, K. (2009). ROS inhibit the expression of testicular steroidogenic enzyme genes via the suppression of Nur77 transactivation. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(11), 1591-1600.
581. Sharpe, R. M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1546), 1697-1712.
582. Shrivastava, V., Pekar, M., Grosser, E., Im, J., & Vigodner, M. (2010). SUMO proteins are involved in the stress response during spermatogenesis and are localized to DNA double-strand breaks in germ cells. *Reproduction*, 139(6), 999-1010.
583. De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13(1), 1-8.
584. Aitken, R. J., & Sawyer, D. (2003). The human spermatozoon—not waving but drowning. In *Advances in male mediated developmental toxicity* (pp. 85-98). Springer, Boston, MA.
585. Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 7, 1–7.
586. Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2009). An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 245-263.
587. He, Z., Feng, L., Zhang, X., Geng, Y., Parodi, D. A., Suarez-Quian, C., & Dym, M. (2005). Expression of Col1a1, Col1a2 and procollagen I in germ cells of immature and adult mouse testis. *Reproduction*, 130(3), 333-341.
588. Griswold, M. D. (Ed.). (2014). *Sertoli cell biology*. Academic Press.
589. Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfrè di Bonzo, L., Busletta, C.,

- Zamara, E., ... & Cravanzola, C. (2008). Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial–mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(12), 2267-2278.
590. Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfrè di Bonzo, L., Busletta, C., Zamara, E., ... & Cravanzola, C. (2008). Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial–mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(12), 2267-2278.
591. Bhattacharya, S. (2015). Reactive oxygen species and cellular defense system. In *Free Radicals in Human Health and Disease* (pp. 17-29). Springer, New Delhi.
- 592 Vaisberg, C. N., Jelezarsky, L. V., Dishlianova, B., & Chaushev, T. A. (2005). Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology*, 64(2), 416-428.
593. Higuchi, Y. (2004). Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(4), 455-464.
594. Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell death and differentiation*, 16(10), 1303.
595. Board, P. G., & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3267-3288.
596. M Galal, A., A Walker, L., & A Khan, I. (2014). Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(24), 2802-2821.
597. Enriquez-Cortina, C., Almonte-Becerril, M., Clavijo-Cornejo, D., Palestino-Domínguez, M., Bello-Monroy, O., Nuño, N., ... & Muñoz, L. (2013). Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicological Sciences*, 135(1), 26-36.

598. Marí, M., & Cederbaum, A. I. (2001). Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology*, 33(3), 652-661.
599. Mimic-Oka, J., Simic, T., Pljesa, M., Stupar, N., & Turkovic, S. (2001). Oxidative modifications of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *Facta Universitatis*, 8, 1-5.
600. Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., & Dean, R. T. (2001). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. In *Bio-Assays for Oxidative Stress Status* (pp. 17-29).
601. Topçuoglu, A., Uzun, H., Balci, H., Karakus, M., Coban, I., Altug, T., ... & Cakatay, U. (2009). Effects of estrogens on oxidative protein damage in plasma and tissues in ovariectomised rats. *Clinical & Investigative Medicine*, 32(2), 133-143.
602. Blackshaw, A. W., & Massey, P. F. (1978). The effect of cryptorchidism on the quantitative histology, histochemistry and hydrolytic enzyme activity of the rat testis. *Australian Journal of Biological Sciences*, 31(1), 53-64.
603. Cervera, A. M., Bayley, J. P., Devilee, P., & McCreath, K. J. (2009). Inhibition of succinate dehydrogenase dysregulates histone modification in mammalian cells. *Molecular Cancer*, 8(1), 89.
604. Hodgen, G. D., & Sherins, R. J. (1973). Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat. *Endocrinology*, 93(4), 985-989.
605. Goldberg, E., Eddy, E. M., Duan, C., & Odet, F. (2010). LDHC: The Ultimate Testis-Specific Gene. *Journal of Andrology*, 31(1), 86-94.
606. Riera, M. F., Meroni, S. B., Schteingart, H. F., Pellizzari, E. H., & Cigorraga, S. B. (2002). Regulation of lactate production and glucose transport as well as of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase A mRNA levels by basic fibroblast growth factor in rat Sertoli cells. *Journal of Endocrinology*, 173(2), 335-343.
607. Galardo, M. N., Regueira, M., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., & Meroni, S. B. (2014). Lactate regulates rat male germ cell function through reactive oxygen species. *PLoS One*, 9(1), e88024.

608. Grootegoed, J. A., Jansen, R., & Van der Molen, H. J. (1986). Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. *Journal of reproduction and fertility*, 77(1), 99-107.
609. Erkkilä, K., Aito, H., Aalto, K., Pentikäinen, V., & Dunkel, L. (2002). Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Molecular human reproduction*, 8(2), 109-117.
610. Ksheerasagar, R. L., & Kaliwal, B. B. (2013). Temporal effects of carbosulfan on testicular biochemical parameters and enzyme activities in albino mice. *Int J Pharm Bio Sci*, 4, 173-181.
611. Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, 57(2-3-4), 265-272.
612. Minutoli, L., Arena, S., Antonuccio, P., Romeo, C., Bitto, A., Magno, C., ... & Galfo, F. (2015). Role of inhibitors of apoptosis proteins in testicular function and male fertility: effects of polydeoxyribonucleotide administration in experimental varicocele. *BioMed research international*, 2015.
613. Kumar, S. B., Dada, R., & Gupta, N. P. (2018). Environmental Toxicants–Induced Male Reproductive Toxicity: Role of Oxidative Stress. In *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health* (pp. 305-322).
614. Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(6), 727-733.
615. Fatima, R., Ashraf, M., Ejaz, S., Rasheed, M. A., Altaf, I., Afzal, M., ... & Anwar, K. (2013). In vitro toxic action potential of anti tuberculosis drugs and their combinations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 501-513.
616. Tjalve, H. (1983). Streptozotocin-distribution, metabolism and mechanisms of action. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 145-157.
617. Bennett, R. A., & Pegg, A. E. (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Research*, 41(7), 2786-2790.

618. Nukatsuka, M., Sakurai, H., Yoshimura, Y., Nishida, M., & Kawada, J. (1988). Enhancement by streptozotocin of O⁻ 2 radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic β -cells. *FEBS Letters*, 239(2), 295-298.
619. Takase, N., Komiya, I., & Asawa, T. (1991). Streptozotocin and alloxan induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes*, 40(9), 1141-1145.
620. Bolzán, A. D., & Bianchi, M. S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512(2), 121-134.
621. Braun, R., Jäkel, H. P., & Schöneich, J. (1984). Genetic effects of isoniazid and the relationship to in vivo and in vitro biotransformation. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 137(2-3), 61-69.
622. Yue, J., Dong, G., He, C., Chen, J., Liu, Y., & Peng, R. (2009). Protective effects of thiopronin against isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, 264(3), 185-191.
623. Bhide, S. V., Bhalerao, E. B., Sarode, A. V., & Maru, G. B. (1984). Mutagenicity and carcinogenicity of mono-and diacetyl hydrazine. *Cancer Letters*, 23(2), 235-240.
624. Roessner, C., Paasch, U., Kratzsch, J., Glander, H. J., & Grunewald, S. (2012). Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reproductive biomedicine online*, 25(3), 292-299.
625. French, S. W. (2013). The importance of CYP2E1 in the pathogenesis of alcoholic liver disease and drug toxicity and the role of the proteasome. In *Cytochrome P450 2E1: Its Role in Disease and Drug Metabolism* (pp. 145-164). Springer, Dordrecht.
626. Dash, P. K., Hergenroeder, G. W., Jeter, C. B., Choi, H. A., Kobori, N., & Moore, A. N. (2016). Traumatic brain injury alters methionine metabolism: implications for pathophysiology. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10, 36.
627. Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., ... & Yin, Y. (2017). The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49(12), 2091-2098.

628. Elnaga, N. A. M. A., & Moustafa, N. A. (2012). Effect of Cholesterol and/or Methionine on the Testis of Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 31(760), 1-44.
629. Liu, H., Sang, S., Lu, Y., Wang, Z., Yu, X., & Zhong, C. (2017). Thiamine metabolism is critical for regulating correlated growth of dendrite arbors and neuronal somata. *Scientific Reports*, 7(1), 5342.
630. Yoo, J. S. H., Park, H. S., Ning, S. M., Lee, M. J., & Yang, C. S. (1990). Effects of thiamine deficiency on hepatic cytochromes P450 and drug-metabolizing enzyme activities. *Biochemical Pharmacology*, 39(3), 519-525.
- ⁶³¹ Oishi, K., Barchi, M., Au, A. C., Gelb, B. D., & Diaz, G. A. (2004). Male infertility due to germ cell apoptosis in mice lacking the thiamin carrier, Tht1. A new insight into the critical role of thiamin in spermatogenesis. *Developmental biology*, 266(2), 299-309.
632. Minocha, R., Damian, D. L., & Halliday, G. M. (2018). Melanoma and nonmelanoma skin cancer chemoprevention: A role for nicotinamide? *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 5-12.
633. Gaudineau, C., & Auclair, K. (2004). Inhibition of human P450 enzymes by nicotinic acid and nicotinamide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(3), 950-956.
634. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592-607.
635. Ourique, G. M., Saccol, E. M., Pês, T. S., Glanzner, W. G., Schiefelbein, S. H., Woehl, V. M., ... & Barreto, K. P. (2016). Protective effect of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in valproic acid treated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 159-167.
636. Hooper, N. M. (2014). The biological roles of zinc and families of zinc metalloproteases. In *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (pp. 21-42). CRC Press.

637. Pérez, M. J., & Cederbaum, A. I. (2003). Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4), 443-455.
638. Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. (2014). Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(3), 591-596.
639. Zordoky, B. N., & El-Kadi, A. O. (2009). Role of NF- κ B in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Current Drug Metabolism*, 10(2), 164-178.
640. Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L., & Lu, S. C. (2015). S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Annals of hepatology*, 12(2), 183-189.
641. Maneesh, M., Jayalekshmi, H., Dutta, S., Chakrabarti, A., & Vasudevan, D. M. (2005). Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis—an experimental study in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(2), 62-67.
642. Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & De Iuliis, G. N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16(1), 31.
643. Chandhok, G., Horvath, J., Aggarwal, A., Bhatt, M., Zibert, A., & Schmidt, H. H. (2016). Functional analysis and drug response to zinc and D-penicillamine in stable ATP7B mutant hepatic cell lines. *World Journal of Gastroenterology*, 22(16), 4109.
644. Kang, M., Zhao, L., Ren, M., Deng, M., & Li, C. (2015). Reduced metallothionein expression induced by zinc deficiency results in apoptosis in hepatic stellate cell line LX-2. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20603.
645. Mora-Esteves, C., & Shin, D. (2013). Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med*, 31(4), 293-300.
646. Rawi, S. M., & Seif Al Nassr, F. M. (2015). Zinc sulphate and vitamin E

alleviate reproductive toxicity caused by aluminium sulphate in male albino rats.
Toxicology and Industrial Health, 31(3), 221-234.

ДОДАТОК 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. проректора з наукової роботи
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця

Д.м.н., доцент М.В. Хайтович

«30» листопада 2010 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Шаяхметової Ганни Михайлівни в навчальний процес

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 в реалізації токсичної дії протитуберкульозних засобів (ізоніазид, піразинамід, рифампіцин та етамбутол), в тому числі введених на тлі патологічних станів, що супроводжуються індукцією цитохрому Р-450 Е1 (хронічний алкоголізм, діабет) та токсичної біотрансформації у печінці та гонадах самців щурів.
2. **Члени комісії:** член-кореспондент НАН і НАМН України, професор Чекман І.С., професор Горчакова Н.О., докт. мед. наук Казак Л.І.
3. **Ким запропоновано:** кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником Шаяхметовою Г.М.
4. **Джерела інформації:** Звіт про науково-дослідну роботу відділу загальної токсикології та патоморфології ДУ «Інститут фармакології та токсикології» НАМН України «Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у печінці та гонадах самців щурів».
5. **Де й коли впроваджено:** кафедра фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця в лекційному курсі та при проведенні практичних занять по темі «Загальна фармакологія», «Фармакологія протитуберкульозних засобів».
6. **Ефект впровадження:** використання результатів наукових досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про біотрансформацію лікарських засобів за участю цитохрому Р450 Е1. Введення протитуберкульозних препаратів у щурів самців на тлі екзогенної (алкоголізація) та ендогенної (експериментальний діабет) індукції СYP 2Е1 веде до переважно незворотних порушень ЦНС їх потомства.
7. **Зауваження та пропозиції:** не внесено.

Протокол №14 від 30.11. 2010 р.

Голова комісії: член-кореспондент НАН і НАМН України,
докт. мед. наук, професор Чекман І.С.

Члени комісії: докт. мед. наук, професор Горчакова Н.О.
докт. мед. наук Казак Л.І.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М. «Роль індукції цитохрому р-450 2e1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулоstaticів у печінці та гонадах самців щурів»

1. Назва пропозиції для впровадження: Роль індукції цитохрому р-450 2e1 у реалізації токсичної дії протитуберкульозних засобів.

2. Установа, її адреса, виконавці: ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України», відділ загальної токсикології, вул. Ежена Потьє, 14, м. Київ, 03057, к.б.н., ст.н.с. відділу загальної токсикології Шаяхметова Ганна Михайлівна.

3. Джерело інформації:

1. Shayakhmetova G., Bondarenko L., Byshovetz T., Voronina A., Matvienko A., Kovalenko V. Male and female reproductive toxicity of antitubercular agent mediated by cytochrome P450 2E1 // International Journal of Infectious Diseases. – 2009.- V. 13, Supp. 1 - P. S104.

2. Shayakhmetova G., Byshovetz T., Voronina A., Kovalenko V. Possible role of CYP450 2E1-induction in adverse reaction on reproductive system of male and female rats // The Journal of Physiological Sciences – 2009. – V.59, S.1. – P.335.

3. Шаяхметова Г.М., Блажчук І.С., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. Можлива роль індукції цитохрому Р-450 2E1 у розвитку репродуктивної токсичності (експериментальне дослідження) // Матеріали XIII Конгресу світової федерації лікарських товариств, м. Львів, 30 вересня – 03 жовтня 2010 р. – Київ: КПП „Друкар”, 2010. – С.619.

5. Де і коли впроваджено: в навчальний процес на кафедрі фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету за темами «Загальна фармакологія», «Протитуберкульозні засоби».

6. Результати впровадження: отримані в науковому дослідженні Шаяхметової Г.М. дані та їх використання в навчальному процесі дозволяють поглибити знання з фармакокінетики та фармакодинаміки протитуберкульозних засобів, зокрема про механізм їх негативного впливу на процеси детоксикації в печінці та статеві органи.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та медичної рецептури, протокол № 3 від 17.11.2010 р.

Завідувач кафедри фармакології
та медичної рецептури
Харківського національного
медичного університету,
д.мед.н., професор

Т.В. Звягінцева

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М. «Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у гонадах самців щурів»
у науково-дослідний процес

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** «Цитохром Р-450 2Е1-опосередковані механізми негативного впливу етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду за умов сумісного введення в терапевтичних дозах на чоловічу репродуктивну функцію в експерименті».
- 2. Автор:** Шаяхметова Г.М. – провідний науковий співробітник відділу загальної токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України»
- 3. Установа розробник:** Державна Установа «Інститут фармакології та токсикології АМН України», відділ загальної токсикології (вул. Єжена Потьє, 14, м. Київ, 03057).
- 4. Джерело інформації:**
 1. Shayakhmetova G. , Bondarenko L. , Byshovetz T. , Voronina A., Matvienko A., Kovalenko V. Male and female reproductive toxicity of antitubercular agent mediated by cytochrome P450 2E1// International Journal of Infectious Diseases. – 2009.- V. 13, Supp. 1 - P. S104.
 2. Шаяхметова Г.М., Бишовець Т.Ф., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Токсична дія протитуберкульозних засобів, введених у режимі ДОТС-терапії на фертильність та життєздатність потомства білих щурів самців // Матеріали Ювілейного Х З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, м. Євпаторія, 24-27 вересня 2009 року. –/ 2009. - С.385.
 3. Shayakhmetova G. , Byshovetz T., Voronina A., Kovalenko V. Possible role of CYP450 2E1-induction in adverse reaction on reproductive system of male and female rats // The Journal of Physiological Sciences – 2009. –V.59, S.1. – P.335.
 4. Шаяхметова Г.М., Блажчук І.С., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. 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”, 2010. – С.619.
- 5. Базова установа, що проводить впровадження:** відділ біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.
- 6. Ким і куди впроваджено:** у відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні , протокол № 10 від «02» 12.2010 р.
8. **Короткий зміст основних положень впровадження:** використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в роботі відділу біохімії коферментів сприяє визначенню підходів щодо встановлення механізмів гено- та цитопротекторної дії біологічно активних речовин щодо клітин репродуктивних органів.
9. **Ефект впровадження:** соціально-економічний – розробка підходів до створення лікувально-профілактичних засобів щодо репродуктивного здоров'я.
10. **Зауваження та пропозиції:** не внесено

Завідуючий відділом
біохімії коферментів
Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
чл.-кор. НАН України



Г.В. Донченко



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з навчальної роботи
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова
проф. Гумінський Ю. Й.

“23” 02 2011 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. НАЗВА ПРОПОЗИЦІЇ для впровадження в навчальний процес кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології

«Цитохром Р-450 2Е1-опосередковані механізми негативного впливу етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду за умов сумісного введення в терапевтичних дозах на чоловічу репродуктивну функцію в експерименті»

2. КИМ ЗАПРОПОНОВАНО, адреса виконавця

Шаяхметова Г. М. (ДУ „Інститут фармакології та токсикології АМН України”, вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03057)

3. ДЖЕРЕЛО ІНФОРМАЦІЇ:

1. Shayakhmetova G. , Bondarenko L. , Byshovetz T. , Voronina A., Matvienko A., Kovalenko V. Male and female reproductive toxicity of antitubercular agent mediated by cytochrome P450 2E1 // International J. of Infectious Diseases. – 2009.- V. 13, Supp. 1 - P. S104.

2. Шаяхметова Г.М., Бишовець Т.Ф., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Токсична дія протитуберкульозних засобів, введених у режимі ДОТС-терапії на фертильність та життєздатність потомства білих щурів самців // Матеріали Ювілейного Х З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, м. Євпаторія, 24-27 вересня 2009 року. – 2009. - С. 385.

3. Shayakhmetova G., Byshovetz T., Voronina A., Kovalenko V. Possible role of CYP450 2E1-induction in adverse reaction on reproductive system of male and female rats // The Journal of Physiological Sciences – 2009. – V.59, S.1. – P. 335.

4. Шаяхметова Г.М., Блажчук І.С., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. 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”, 2010. – С. 619.

4. ДЕ ВПРОВАДЖЕНО

Кафедра клінічної фармації і клінічної фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова
Одночасне введення протитуберкульозних засобів у ДОТС-режимі може спричинити негативні ефекти на репродуктивну функцію самців щурів та на їх потомство. Застосування ДОТС-терапії протягом періоду сперматогенезу спричиняло зниження кількості сперматозоїдів та фертильності піддослідних самців, парованих з інтактними самицями.

Наукове дослідження впроваджено для викладання студентам фармацевтичного та лікувального факультетів.

5. СТРОКИ ВПРОВАДЖЕННЯ вересень 2010 – лютий 2011 року

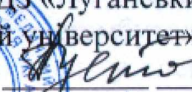
6. ЗАУВАЖЕННЯ, ПРОПОЗИЦІЇ - немає



Відповідальна за впровадження –
Зав. кафедри клінічної фармації та
клінічної фармакології, професор
ЯКОВЛЕВА О.О.

Підпис *Яковлева О.О.*
Завіряю
/Начальник відділу кадрів
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова
Яковлева
"23" "02" 2011 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор ДЗ «Луганський Державний
медичний університет» МОЗ України
Професор  Івченко В. К.
« 12 » 2012

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М. «Механізми гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі» у навчальний процес

1. Назва пропозиції для впровадження: „Зниження негативного впливу комбінації протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну здатність за умов заміни етамбутолу на стрептоміцин”.

2. Автор: Шаяхметова Г.М. – провідний науковий співробітник відділу загальної токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

3. Установа розробник: Державна Установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», відділ загальної токсикології (вул. Єжена Потьє, 14, м. Київ, 03057).

4. Джерело інформації:

1. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад шурів самців // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. - №6(25). – С.35-40.

2. Shayakhmetova G., Bondarenko L., Kovalenko V. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V.5 (1). P.9-14.

3. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках шурів та стан їх сперматогенного епітелію // Одеський медичний журнал. - 2012. - №4. – С.11-14

4. Шаяхметова Г.М., Коваленко В.М. 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, 2012.

5. Базова установа, що проводить впровадження: кафедра фармакології

6. Ким і куди впроваджено: на кафедрі фармакології ДЗ «Луганський Державний медичний університет» МОЗ України в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темою: «Протитуберкульозні засоби».

7. Дати впровадження: Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, протокол № 8 від «10» грудня 2012 р.

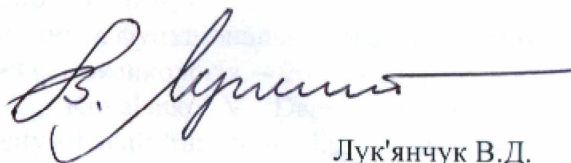
8. Короткий зміст основних положень впровадження: застосування протитуберкульозних засобів сумісно з етамбутолом, на відміну від комбінації зі стрептоміцином, призводить до суттєвих відхилень в тканинах сім'яників шурів деяких біохімічних показників, що визначають стан метаболічних процесів (збільшення експресії генів цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1), а також зміни

про- та антиоксидантної рівноваги. Біохімічні порушення в репродуктивних органах самців щурів за введення комбінації з етамбутолом супроводжувались рядом морфологічних та морфометричних відхилень у сперматогенному епітелії, зниженням продукції сперматозоїдів, загального часу їх рухової активності та життєздатності, що в кінцевому рахунку позначилось на репродуктивній здатності піддослідних тварин: значно знижувались показник фертильності самців та рівень плодовитості запліднених ними самиць, зростала до- та післяімплантаційна ембріолетальність порівняно з контролем. На відміну від цього, сумісне введення протитуберкульозних засобів із стрептоміцином не вплинуло на фертильність самців, плодовитість запліднених ними самиць та виживаність ембріонів.

Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії лікарських засобів стосовно чоловічого безпліддя та опосередкованого через батька негативного впливу на потомство, пов'язаного з експресією цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1 в тканинах сім'яників.

9. Ефект впровадження: соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

10. Зауваження та пропозиції: не внесено



Зав каф. фармакології, д.мед.н., проф.

Лук'янчук В.Д.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор Національного
фармацевтичного університету
професор І.С. Гриценко

2012 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ*

результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М. «Механізми гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі» у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** „Зниження негативного впливу комбінації протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну здатність за умов заміни етамбутолу на стрептоміцин”.
2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – провідний науковий співробітник відділу загальної токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».
3. **Установа розробник:** Державна Установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», відділ загальної токсикології (вул. Єжена Потьє, 14, м. Київ, 03057).
4. **Джерела інформації:**
 1. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад щурів самців // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №6(25). – С.35-40.
 2. Shayakhmetova G., Bondarenko L., Kovalenko V. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V.5 (1). – P.9-14.
 3. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках щурів та стан їх сперматогенного епітелію // Одеський медичний журнал: – 2012. – №4. – С.11-14.
 4. Шаяхметова Г.М., Коваленко В.М. 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, 2012.
5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра фармакології Національного фармацевтичного університету, м. Харків.
6. **Ким і куди впроваджено:** в лекційний курс на кафедрі фармакології за темою «Протитуберкульозні засоби».
7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології протокол № 8 від «12» жовтня 2012 р.
8. **Короткий зміст основних положень впровадження:** застосування протитуберкульозних засобів сумісно з етамбутолом, на відміну від комбінації зі стрептоміцином, призводить до суттєвих відхилень в тканинах сім'яників щурів

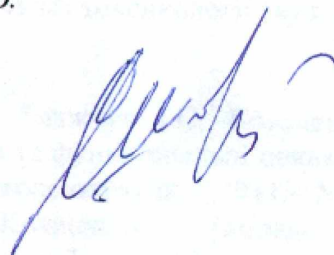
деяких біохімічних показників, що визначають стан метаболічних процесів (збільшення експресії генів цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1), а також зміни про- та антиоксидантної рівноваги. Біохімічні порушення в репродуктивних органах самців щурів за введення комбінації з етамбутолом супроводжувались рядом морфологічних та морфометричних відхилень у сперматогенному епітелії, зниженням продукції сперматозоїдів, загального часу їх рухової активності та життєздатності, що в кінцевому рахунку позначилось на репродуктивній здатності піддослідних тварин: значно знижувались показник фертильності самців та рівень плодовитості запліднених ними самиць, зростала до- та післяімплантаційна ембріолетальність порівняно з контролем. На відміну від цього, сумісне введення протитуберкульозних засобів із стрептоміцином не вплинуло на фертильність самців, плодовитість запліднених ними самиць та виживаність ембріонів.

Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії лікарських засобів стосовно чоловічого безпліддя та опосередкованого через батька негативного впливу на потомство, пов'язаного з експресією цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1 в тканинах сім'яників.

9. Ефект впровадження: соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

10. Зауваження та пропозиції: не внесено.

Відповідальний за впровадження,
завідувач кафедри фармакології,
доктор мед. наук, професор



С.Ю. Штриголь

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи

Буковинського державного

медичного університету

доцент

І. В. Геруш

2013 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М. «Механізми гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі» у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** „Зниження негативного впливу комбінації протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну здатність за умов заміни етамбутолу на стрептоміцин”.
2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – провідний науковий співробітник відділу загальної токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»
3. **Установа розробник:** Державна Установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», відділ загальної токсикології (вул. Ежена Потьє, 14, м. Київ, 03057).
4. **Джерело інформації:**
 1. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад шурів самців // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. - №6(25). – С.35-40.
 2. Shayakhmetova G., Bondarenko L., Kovalenko V. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V.5 (1). P.9-14.
 3. Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Матвієнко А.В., Коваленко В.М. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках шурів та стан їх сперматогенного епітелію // Одеський медичний журнал. - 2012. - №4. – С.11-14
 4. Шаяхметова Г.М., Коваленко В.М. 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, 2012.
5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра фармакології Буковинського державного медичного університету.
6. **Ким і куди впроваджено:** в лекційний курс на кафедрі фармакології Буковинського державного медичного університету по темах «Протитуберкульозні засоби», «Побічна дія хіміотерапевтичних засобів».
7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету., протокол № 11 від « 10 » січня 2013 р.

8. Короткий зміст основних положень впровадження: застосування протитуберкульозних засобів сумісно з етамбутолом, на відміну від комбінації зі стрептоміцином, призводить до суттєвих відхилень в тканинах сім'яників щурів деяких біохімічних показників, що визначають стан метаболічних процесів (збільшення експресії генів цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1), а також зміни про- та антиоксидантної рівноваги. Біохімічні порушення в репродуктивних органах самців щурів за введення комбінації з етамбутолом супроводжувались рядом морфологічних та морфометричних відхилень у сперматогенному епітелії, зниженням продукції сперматозоїдів, загального часу їх рухової активності та життєздатності, що в кінцевому рахунку позначилось на репродуктивній здатності піддослідних тварин: значно знижувались показник фертильності самців та рівень плодовитості запліднених ними самиць, зростала до- та післяімплантаційна ембріолетальність порівняно з контролем. На відміну від цього, сумісне введення протитуберкульозних засобів із стрептоміцином не вплинуло на фертильність самців, плодовитість запліднених ними самиць та виживаність ембріонів.

Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії лікарських засобів стосовно чоловічого безпліддя та опосередкованого через батька негативного впливу на потомство, пов'язаного з експресією цитохромів CYP2C, CYP3A та CYP2E1 в тканинах сім'яників.

9. Ефект впровадження: соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

10. Зауваження та пропозиції: не внесено

Завідувач кафедри фармакології

Буковинського державного медичного університету.

д.мед.н., проф.



І. І. Заморський

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

Сокур О.В.

2018 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М.

«Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції («експериментальне дослідження») у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Роль індукції CYP2E1 в механізмах побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію».
2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – канд. біол. наук, провідний науковий співробітник відділу токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».
3. **Установа розробник:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (вул. А. Цедіка, 14, 03057, м. Київ)
4. **Джерело інформації:**
 1. 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.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.

5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра фундаментальної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

6. **Ким і куди впроваджено:** на кафедрі фундаментальної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в лекційному курсі та при проведенні лабораторних занять з дисципліни «Фармакологія та медична рецептура» для студентів 2-го курсу спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування» (лекції – 24 год, лабораторні – 20 год.).

7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фундаментальної медицини, протокол № 4 «11» травня 2018 р.

Короткий зміст основних положень впровадження:

Експериментально 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. За умов екзогенної (алкоголізм) та ендогенної (цукровий діабет) індукції CYP2E1 негативні ефекти протитуберкульозних засобів зростають. Отримані дані, включаючи встановлену кореляцію між рівнем експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках та аномаліями сперматогенезу, свідчать про залучення даного ізоферменту до патогенетичних механізмів тестикулярних порушень. Індукція CYP2E1 в сім'яниках призводить до утворення великої кількості вільних радикалів та інших токсичних аддуктів, змінюючи нормальні метаболічні процеси та, головним чином, негативно впливаючи на обмін нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів, а також порушує енергетичний обмін та біосинтез низькомолекулярних біорегуляторів. Подібний каскад, у свою чергу, призводить до патологічних змін у сім'яниках, слугуючи тригером апоптотичних процесів. Кінцевим результатом є інгібування андрогенної функції, порушення нормальної диференціації статевих клітин та втрата фертильності. Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії протитуберкульозних лікарських засобів на чоловічу репродуктивну функцію.

8. **Ефект впровадження:** соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

9. **Зауваження та пропозиції:** не внесено.

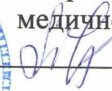
Завідувач
кафедри фундаментальної медицини
докт. мед. наук, с.н.с.



Хоперія В.Г.

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з науково-педагогічної та
навчальної роботи Запорізького державного
медичного університету

доп.  С.А.Моргунцова



» _____ 2018

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М.

«Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції («експериментальне дослідження») у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Коригуюча дія метіоніну та метовітану стосовно побічних ефектів на сім'яники протитуберкульозних засобів I ряду».
2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – канд. біол. наук, провідний науковий співробітник відділу токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».
3. **Установа розробник:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (вул. А. Цедіка, 14, 03057, м. Київ)
4. **Джерело інформації:**
 1. 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.
 2. 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.
 3. 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.

4. 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

5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра...

6. **Ким і куди впроваджено:** на кафедрі фармакології та медичної ркецптури Запорізького державного університету в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темою: «Протитуберкульозні засоби».

7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та медичної ркецптури протокол №5 «б» травня 2018 р.

Короткий зміст основних положень впровадження: В дослідях на щурах показано суттєвий негативний вплив на репродуктивну функцію самців рифампіцину, ізоніазиду, піразинаміду та етамбутолу, введених сумісно в терапевтичних дозах. Метіонін та препарат цілеспрямованої метаболічної дії – Метовітан, що містить метіонін, тіамін, нікотинамід, α -токоферолацетат та сіль цинку, за умов тривалого введення щурам протитуберкульозних засобів виявили здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену CYP2E1 та інгібувати його ензиматичну активність в сім'яниках, попереджаючи зміни параметрів про/антиоксидантної системи тестикулярних клітин. Метовітан більш ефективно, у порівнянні з метіоніном, інгібував експресію мРНК CYP2E1 і його каталітичну активність, сприяючи збереженню цілісності сперматогенного епітелію та фертильності щурів-самців.

Отримані дані є теоретичним фармакологічним обґрунтуванням перспективності застосування препаратів, які володіють інгібіторними властивостями стосовно CYP2E1 та антиоксидантною дією за умов негативного впливу хіміотерапевтичних засобів профілактики та лікування чоловічої субфертильності та інфертильності.

Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про побічну дію протитуберкульозних лікарських засобів та фармакологічні підходи до зниження їх небажаної дії на чоловічу репродуктивну функцію..

8. **Ефект впровадження:** соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

9. **Зауваження та пропозиції:** не внесено.

Зав. кафедри фармакології та
медичної рецептури Запорізького
державного медичного університету,
професор

Заснований підпис І.Ф.Беленічев
ПІДТВЕРДЖУЮ
Нач. відділу кадрів Запорізького
державного медичного університету
* * * 20 * * р. Підпис



„Затверджую”

Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного
університету імені І.І. Мечникова
к.б.н., доцент Запорожченко О.В.

”_____” _____ 2018 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М.

«Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції («експериментальне дослідження») у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Роль індукції CYP2E1 в механізмах побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію».
2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – канд. біол. наук, провідний науковий співробітник відділу токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».
3. **Установа розробник:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (вул. А. Цедіка, 14, 03057, м. Київ)
4. **Джерело інформації:**
 1. 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.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.

5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра фармацевтичної хімії хімічного факультету Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

6. **Ким і куди впроваджено:** на кафедрі фармацевтичної хімії в лекційному курсі та на лабораторних заняттях з дисципліни «Фармакологія» та в лекційному курсі зі спецкурсу «Взаємодія лікарських препаратів».

7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії, протокол № 10 «18» травня 2018 р.

Короткий зміст основних положень впровадження:

Експериментально 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. За умов екзогенної (алкоголізм) та ендогенної (цукровий діабет) індукції CYP2E1 негативні ефекти протитуберкульозних засобів зростають. Отримані дані, включаючи встановлену кореляцію між рівнем експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках та аномаліями сперматогенезу, свідчать про залучення даного ізоферменту до патогенетичних механізмів тестикулярних порушень. Індукція CYP2E1 в сім'яниках призводить до утворення великої кількості вільних радикалів та інших токсичних інтермедіатів, змінюючи нормальні метаболічні процеси та, головним чином, негативно впливаючи на обмін нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів, а також порушує енергетичний обмін та біосинтез низькомолекулярних біорегуляторів. Подібний каскад, у свою чергу, призводить до патологічних змін у сім'яниках, слугуючи тригером апоптотичних процесів. Кінцевим результатом є інгібування андрогенної функції, порушення нормальної диференціації статевих клітин та втрата фертильності. Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії протитуберкульозних лікарських засобів на чоловічу репродуктивну функцію.

8. **Ефект впровадження:** соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

9. **Зауваження та пропозиції:** не внесено.

Зав. кафедри фармацевтичної хімії
Одеського національного університету
імені І. І. Мечникова
академік НАН України



С.А. Андронаті

„Затверджую”

Проректор з науково-педагогічної роботи

Одеського національного

університету імені І.І. Мечникова

к.б.н., доцент Запорожченко О.В.

”_____” _____ 2018 р

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

Результатів науково-дослідної роботи Шаяхметової Г.М.

«Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції («експериментальне дослідження» у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Роль індукції CYP2E1 в механізмах побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію».

2. **Автор:** Шаяхметова Г.М. – канд. біол. наук, провідний науковий співробітник відділу токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

3. **Установа розробник:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (вул. А. Цедіка, 14, 03057, м. Київ)

4. **Джерело інформації:**

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

5. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра фізіології людини та тварин біологічного факультету Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

6. **Ким і куди впроваджено:** на кафедрі фізіології людини та тварин в лекційному курсі та на лабораторних заняттях з дисципліни «Фізіологія людини та тварин».

7. **Дати впровадження:** Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фізіології людини та тварин, протокол № 2 «18» вересня 2018 р.

Короткий зміст основних положень впровадження:

Експериментально 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. За умов екзогенної (алкоголізм) та ендогенної (цукровий діабет) індукції CYP2E1 негативні ефекти протитуберкульозних засобів зростають. Отримані дані, включаючи встановлену кореляцію між рівнем експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках та аномаліями сперматогенезу, свідчать про залучення даного ізоферменту до патогенетичних механізмів тестикулярних порушень. Індукція CYP2E1 в сім'яниках призводить до утворення великої кількості вільних радикалів та інших токсичних інтермедіатів, змінюючи нормальні метаболічні процеси та, головним чином, негативно впливаючи на обмін нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів, а також порушує енергетичний обмін та біосинтез низькомолекулярних біорегуляторів. Подібний каскад, у свою чергу, призводить до патологічних змін у сім'яниках, слугуючи тригером апоптотичних процесів. Кінцевим результатом є інгібування андрогенної функції, порушення нормальної диференціації статевих клітин та втрата фертильності. Використання результатів досліджень Шаяхметової Г.М. в навчальному процесі сприятиме розвитку уявлень про механізми побічної дії протитуберкульозних лікарських засобів на чоловічу репродуктивну функцію.

8. **Ефект впровадження:** соціально-економічний – покращення якості професійної підготовки спеціалістів.

9. **Зауваження та пропозиції:** не внесено.

Зав. кафедри фізіології людини та тварин
Одеського національного університету
імені І. І. Мечникова
докт. біол. наук



О.А. Макаренко

ДОДАТОК 2

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА 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 2Е1 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 изоформ 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 2Е1 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 2Е1 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 P450E1 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). Коригуюча 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 DICID 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., Матвиєнко, 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, И.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 ХХІ столітті»*, 20-21 квітня, м. Одеса, 7 (Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка тез доповіді до друку).

ДОДАТОК 3

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Матеріали дисертаційної роботи представлені 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);
- Ювілейний X З'їзд 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 n Alcoholism World Congress (Paris, France, September 13-16, 2010);
- 4th Ditan International Conference on Infectious Diseases (Beijing, China, 14-17 July, 2010);
- XI З'їзд Всеукраїнського лікарського товариства (м. Харків, 28 – 30 Україна, вересня 2011 р.);
- міжнародна науково-практична конференція „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.);
- Всеукраїнська науково-практична конференція «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).
- Міжнародна конференція 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 XXI столітті» (Одеса, Україна, 20-21 квітня, 2018 р.).