



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
А61К 31/4178 (2015.12); А61К 2121/00 (2015.12)

(21)(22) Заявка: 2015120055, 27.05.2015
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.05.2015
Дата регистрации:
15.03.2018
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 27.05.2015
(43) Дата публикации заявки: 20.12.2016 Бюл. № 35
(45) Опубликовано: 15.03.2018 Бюл. № 8
Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
Небольсин Владимир Евгеньевич (RU),
Рыдловская Анастасия Владимировна (RU),
Дыгай Александр Михайлович (RU),
Боровская Татьяна Геннадьевна (RU)

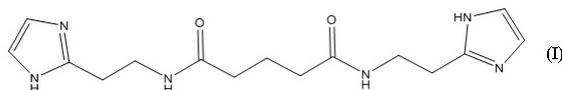
(73) Патентообладатель(и):
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2013116822 А, 20.10.2014.
FERRY G. et al. A zinc chelator inhibiting
gelatinases exerts potent in vitro anti-invasive
effects // European Journal of Pharmacology.
1998. Vol.351, P.225-233;. PODYMINOGIN
M.A., et al. Synthetic RNA-cleaving molecules
mimicking ribonuclease A active center. Design
and cleavage of tRNA transcripts // Nucleic
Acids (см. прод.)

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

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к фармацевтической композиции для стимуляции регенерации эпителиальных и/или соединительных тканей, включающей эффективное количество соединения формулы (I) (Треамида):



или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно ткань выбрана из тестикулярной ткани и ткани простаты. Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств, стимулирующих регенерацию эпителиальных и/или соединительных тканей, в частности тестикулярной ткани и ткани простаты, что приводит к нормализации сниженной мужской фертильности. 1 з.п. ф-лы, 8 пр., 22 табл.

(56) (продолжение):
Research. 1993. Vol.21, No.25, P.5950-5956.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/4178 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/4178 (2015.12); *A61K 2121/00* (2015.12)

(21)(22) Application: 2015120055, 27.05.2015

(24) Effective date for property rights:
27.05.2015Registration date:
15.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: 27.05.2015

(43) Application published: 20.12.2016 Bull. № 35

(45) Date of publication: 15.03.2018 Bull. № 8

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

Nebolsin Vladimir Evgenevich (RU),
Rydlovskaya Anastasiya Vladimirovna (RU),
Dygaj Aleksandr Mihajlovich (RU),
Borovskaya Tatyana Gennadevna (RU)

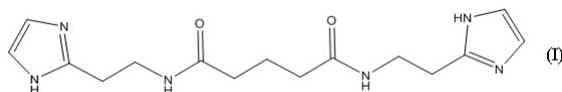
(73) Proprietor(s):

OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOJ
OTVETSTVENNOSTYU
"FARMINTERPRAJSEZ" (RU)(54) **BISAMIDE DERIVATIVE OF DICARBOXYLIC ACID AS AGENT FOR STIMULATING TISSUE REGENERATION AND RECOVERY OF DIMINISHED TISSUE FUNCTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, specifically to a pharmaceutical composition for stimulating the regeneration of epithelial and / or connective tissues comprising an effective amount of a compound of formula (I) (Treamid):



or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically acceptable carrier. Preferably, the tissue is selected from testicular tissue and prostate tissue.

EFFECT: invention widens the range of agents which stimulate the regeneration of epithelial and / or connective tissues, in particular testicular tissue and prostate tissue, which leads to the normalisation of diminished male fertility.

1 cl, 8 ex, 22 tbl

Область техники

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

5 Более конкретно изобретение относится к способу стимуляции регенерации тканей и восстановления сниженных функций тканей, более конкретно регенерации и восстановления сниженных функций тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

10 Изобретение также относится к средству нормализации сниженной мужской фертильности (лечения мужского бесплодия), которая может быть обусловлена гипогонадотропным гипогонадизмом, эректильной дисфункцией, коррелятивной недостаточностью яичек, тестикулярной недостаточностью и другими заболеваниями.

Изобретение также относится к средству для восстановления подвижности сперматозоидов.

15 Уровень техники

В прошлые годы ответственность за бесплодие чаще всего возлагалась на женщин. В настоящее время снижение мужской фертильности приводит к уменьшению рождаемости в 36-60% случаев (WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. - WHO, 3-rd ed.: Cambridge University press, 2000; Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. Clinics. 2011; 66(4): 20 691-700).

Причины угнетения воспроизводящей функции у мужчин могут быть локализованы на разных уровнях и являются следствием нарушений функций многих систем и органов.

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

К воспалительным заболеваниям придаточных желез относят заболевания предстательной железы, сопровождающиеся воспалением тканей простаты, такие как: острый бактериальный простатит, хронический бактериальный простатит, ДГПЖ (доброкачественная гиперплазия предстательной железы), а также воспаление семенных 30 пузырьков, такое как острый или хронический везикулит. К заболеваниям предстательной железы относятся также хронический абактериальный простатит, хронический невоспалительный простатит или простатит категории 3Б (Ludwig M, Vidal A, Diemer Th, Pabst W, Failing K, Weidner W. Chronic prostatitis/ chronic pelvic pain syndrome: seminal markers of inflammation. // World J Urol. 2003. Vol. 21, N 2. P. 82-85).

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

Следует отметить, что хронические воспаления предстательной железы очень часто сопровождаются доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ).

40 Среди патологий предстательной железы это заболевание считается наиболее распространенным.

Наблюдаемая на фоне ДГПЖ гиперпролактинемия приводит к эректильной недостаточности, к олигоспермии. Это, безусловно, снижает мужской репродуктивный потенциал (Johri A.M., Heaton J.P., Morales A. Severe erectile dysfunction is a marker for hyperprolactinemia // Int J Import Res. 2001. Vol. 13 №3. P. 176-82).

Многие факторы проявления заболеваний простаты оказывают влияние на качество эякулята, так как предстательная железа выделяет факторы, поддерживающие, прежде всего, подвижность сперматозоидов. В связи с этим на фоне их развития выявляется

коррелятивная недостаточность яичек (вторичное бесплодие). Таким образом, лечение заболеваний предстательной железы благоприятно сказывается на мужской фертильности.

В настоящее время к числу препаратов, оказывающих положительное действие на факторы, сопровождающие течение абактериальных хронических простатитов и ДППЖ, принадлежат экстракты, выделенные из *Serenoe repens* - Простамол Уно (Bayane C.W., Ross M., Donnelly F., Habib F.K. // J. Urol. 2000. Vol. 164, N3, Pt.1. P. 876-881). Однако их эффективность не всегда оказывается достаточно высокой.

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

Мужской гипогонадизм в настоящее время выявлен у 4-5 млн человек. Гипогонадотропный гипогонадизм (или вторичный гипогонадизм) обусловлен недостаточностью гонадотропинов. Первичный гипогонадизм обусловлен нарушением функции тестикулярной (яичковой) ткани семенника. Его ненаследственные формы (приобретенный гипогонадотропный гипогонадизм) могут быть следствием внешних воздействий, приема лекарственных препаратов (анаболических стероидов, метоклопрамида, фенотиазида, наркотических средств и др.), лучевой терапии (Filicori M. Endocrine basis of reproductive function. - Bologna: Monduzzi Editore, 2000. - R 605.; Meczekalski B., Tonetti A., Monteleone R et al. Hypothalamic amenorrhea with normal body weight: ACTH, allopregnanolone and cortisol responses to corticotrophin - releasing hormone test // Eur. J. Endocrinol. - 2000. - V.142. - R. 280-285).

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

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

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

К числу причин его возникновения относится действие экзогенных факторов, таких как лекарственные препараты, в том числе цитостатические средства, облучение, повышение температуры. Длительное снижение продуктивности сперматогенеза, вплоть до его полной остановки, является следствием повреждения сперматогоний типа А (Захидов С.Т., Кулибин А.Ю., Маршак Т.Л. Стволовые клетки и клетки ниши сперматогенной системы: Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Под ред. М.А. Пальцева. М., Медицина, 2009. С. 311). Восстановление сперматогенеза после повреждения может происходить только за счет этих клеток. Они не теряют специфичность половых клеток, так как необратимо определились как предшественники сперматогенеза, и как стволовые клетки обладают способностью к колониеобразованию. Эти клетки составляют глубокий резерв регенерационной способности сперматогенной ткани.

Известно, что пролиферативный потенциал сперматогенеза может быть восстановлен за счет трансплантации сперматогенных клеток. Для лекарственной терапии гипергонадотропного гипогонадизма рекомендуется применять тестостерон. Он стимулирует заключительную фазу сперматомейоза, то есть постмитотические деления,

приводя тем самым к увеличению количества сперматозоидов и к увеличению продуктивности сперматогенеза за счет стимуляции его конечной фазы. Недостатком этого средства является отсутствие эффективности в отношении стимуляции сперматогоний, которые, как известно, делятся митотически.

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

Во многих случаях снижение фертильности у мужчин обусловлено нарушением качества спермы. К наиболее частой патологии эякулята относится астеноспермия (Као S. H. et.al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. Fertil. and Steril. 15 2008; 89: 5: 1183-1190). Нарушение сперматогенеза по типу астеноспермии рассматривают как отдельную нозологическую форму. Она является следствием возрастных изменений, курения, диабета, воспаления, дисгормональных расстройств, воздействия токсических веществ, высоких температур. Лечение астеноспермии зависит от причин ее возникновения. В большинстве случаев рекомендуют хориогонический гонадотропин
20 и тестостерон. Однако эти гормональные лекарственные средства вызывают серьезные побочные эффекты и имеют противопоказания.

Для лечения астеноспермии рекомендуется препарат Спеман, который стимулирует сперматогенез и повышает подвижность сперматозоидов (Справочник Vidal. Лекарственные препараты в России. М. АстраФармСервис.1995.С.Г-49). Препарат
25 является дорогостоящим, состоит из сложной композиции лекарственных трав, произрастающих в разных странах мира и имеющих ограниченные сырьевые запасы. В качестве недостатка следует отметить, что он обладает не очень высокой эффективностью.

Таким образом, задачей данного изобретения является разработка средства
30 регенерации и восстановления сниженных функций тканей. Такое средство будет, в частности, способствовать восстановлению мужской репродуктивной функции и позволит преодолеть недостатки известных средств, описанных выше.

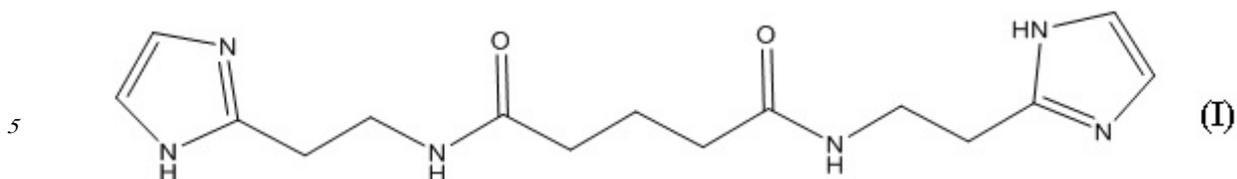
Более конкретно первой задачей настоящего изобретения является разработка средства, которое способствует регенерации тканей, в частности тканей, участвующих
35 в функционировании мужских половых желез и ткани придаточных половых желез. Более конкретно средство по изобретению должно способствовать регенерации тестикулярной ткани и ткани предстательной железы.

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

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка средства восстановления подвижности сперматозоидов, обусловленной, в частности, такими патологиями, как простатит, гипогонадизм, астеноспермия, тестикулярная
45 недостаточность, и другими заболеваниями.

Поставленные задачи решаются тем, что в качестве лекарственного средства, стимулирующего регенерацию тканей и восстановления сниженных функций тканей, предлагается применять Треамид. Последний представляет собой бисамидное

производное дикарбоновой кислоты формулы (I):



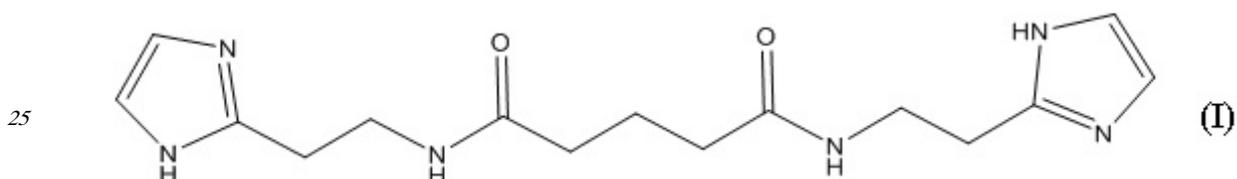
или его фармацевтически приемлемую соль.

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

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

Краткое изложение сущности изобретения

20 Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для регенерации тканей, включающей эффективное количество соединения формулы (I):



30 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. Также настоящее изобретение относится к лекарственному средству для регенерации тканей, представляющему собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, при этом ткань предпочтительно выбрана группы, включающей тестикулярную ткань и ткань простаты.

35 Настоящее изобретение также относится к способу регенерации тканей, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Далее, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для регенерации тканей.

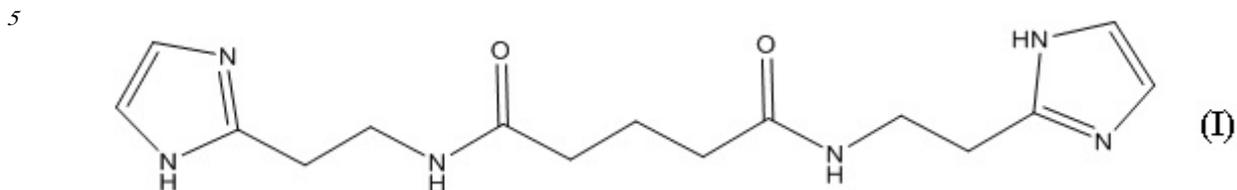
В предпочтительном варианте изобретения ткань представляет собой тестикулярную ткань или ткань простаты.

40 Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения заболеваний, связанных с нарушениями структуры тканей.

45 В предпочтительном варианте заболевание представляет собой гипогонадизм и ассоциированное с ним нарушение эректильной дисфункции и/или либидо, простатит и ассоциированное с ним нарушение эректильной дисфункции и/или либидо, доброкачественную гиперплазию предстательной железы, коррелятивную недостаточность яичек, аутоиммунный орхит, где гипогонадизм предпочтительно представляет собой гипогонатропный гипогонадизм или гипергонадотропный гипогонадизм. Простатит может представлять собой абактериальный, аутоиммунный

или простатит категории Б.

Настоящее изобретение кроме того относится к фармацевтической композиции для нормализации сниженной мужской фертильности, включающей эффективное количество соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель.

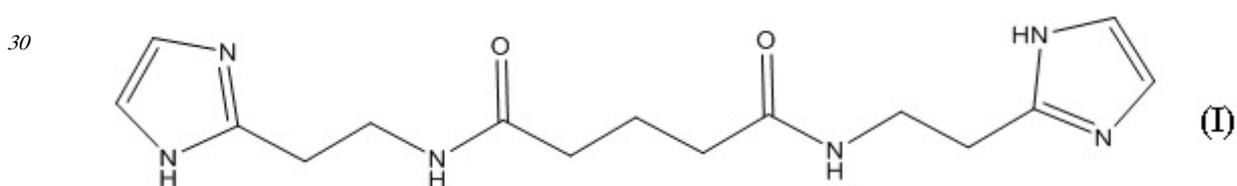
Изобретение также относится к лекарственному средству для нормализации сниженной мужской фертильности, представляющему собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение также относится к способу нормализации сниженной мужской фертильности, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение далее относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для нормализации сниженной мужской фертильности.

20 Снижение мужской фертильности в предпочтительном варианте обусловлено гипогонадизмом, астеноспермией, эректильной дисфункцией, коррелятивной недостаточностью яичек, тестикулярной недостаточностью и другими патологиями. Снижение мужской фертильности может быть также обусловлено угнетением копулятивной активности и либидо, которые, в частности, могут быть спровоцированы заболеваниями, перечисленными выше.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для восстановления подвижности сперматозоидов, включающей эффективное количество соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель.

Также изобретение относится к лекарственному средству для восстановления подвижности сперматозоидов, представляющему собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

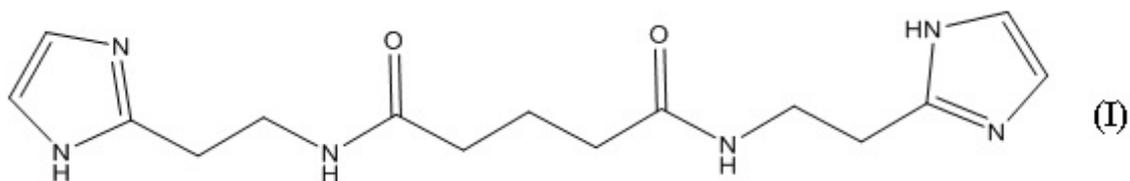
Изобретение далее относится к способу восстановления подвижности сперматозоидов, включающему введение нуждающемуся субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для восстановления подвижности сперматозоидов, где такое снижение может быть обусловлено гипогонадизмом, астеноспермией, эректильной дисфункцией, коррелятивной недостаточностью яичек, тестикулярной недостаточностью. Также снижение подвижности может быть обусловлено угнетением копулятивной активности и либидо разной этиологии.

Подробное описание изобретения

Объектом настоящего изобретения является средство, которое способствует

регенерации тканей, в частности, тканей, участвующих в функционировании мужских половых желез. Более конкретно, средство по изобретению должно способствовать регенерации ткани и восстановлению сниженных функций тканей предстательной железы и тестикулярной ткани. Данное соединение представляет собой бисамидное производное дикарбоновой кислоты формулы (I):



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

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

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

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

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

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

Треамид вводят в эффективном количестве, которое обеспечивает желаемый терапевтический результат.

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

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

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

заболевания у данного индивида, подлежащего лечению.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Дозированные формы настоящего изобретения получают по стандартным методикам, таким как, например, процессы смешивания, гранулирования, формирование драже, 15 растворение и лиофилизация.

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

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

Пример 1

Исследование эффективности Треамида по восстановлению подвижности сперматозоидов при астеноспермии

25 Астеноспермию моделировали путем использования препарата Этопозид, обладающего выраженными прооксидантными свойствами. Использование препарата, индуцирующего повышение уровня свободных радикалов, обусловлено тем, что согласно современным представлениям непосредственной причиной астеноспермии является окислительный стресс (Kao S.H. et.al. Increase of oxidativestress in human sperm 30 with lower motility. Fertil. and Steril. 2008; 89: 5: 1183-1190).

Треамид вводили в дозе 5 мг/кг лечебным курсом и лечебно-профилактическим курсом крысам-самцам, имеющим пониженную подвижность зрелых спермиев.

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

Исследования проводили в двух сериях.

В первой серии Триамид вводили в дозе 5 мг/кг в течение за 5 дней до и 5 дней после введения этопозид (лечебно-профилактический курс).

40 Во второй серии Триамид вводили в течение 10 дней после введения этопозид (лечебный курс).

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

В первой серии результаты исследований сравнивали с таковыми при введении препарата сравнения Спеман, который вводили внутривенно в дозе 140 мг/кг.

45 Результаты исследований представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 Количество подвижных спермиев (в %) у животных, получавших Треамид за 5 дней до и 5 дней (лечебно-профилактический курс) после введения этопозид				
№	Фон	Контроль	Треамид 5,0 мг/кг	Спеман

1	87,37	75,58	74,67	78,04
2	94,74	66,54	85,26	74,67
3	96,84	70,11	77,42	78,15

4	83,12	63,06	79,09	66,67
5	91,35	58,95	82,72	70,18
X±m	90,68±2,48	66,85±2,86 #	79,83±1,88#*∅	73,54±2,25 #*

Примечания: здесь и далее:
 # - различия достоверны по сравнению с фоном;
 * - различия достоверны по сравнению с контролем;
 ∅ - различия достоверны по сравнению с препаратом сравнения

10 Таблица 2
Количество подвижных спермиев (в %)

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

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

Пример 2

Исследование эффективности Треамида по восстановлению подвижности сперматозоидов при гипогонадотропном гипогонадизме

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

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

Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 Количество подвижных спермиев (в %)
--

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

Примечание:
- различия достоверны по сравнению с фоном;
* - различия достоверны по сравнению с контролем;
◇ - различия достоверны по сравнению с препаратом сравнения

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

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

Пример 3

Исследование эффективности Треамида по восстановлению копулятивной активности

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

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

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

Результаты исследования представлены в таблице 4.

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

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

* - различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 005$ при сравнении в одном тестировании;
 ◇ - различия достоверны при $P \leq 005$ внутри группы при сравнении первого и второго тестирований.

Представленные экспериментальные данные показали, что крысы-самцы, получавшие только синестрол, характеризовались отсутствием эякуляций, возрастанием ЛППС. У животных, получавших Треамид, эякуляции выявлялись в 44% случаях (так же, как и у интактных животных-фон). Их количество превышало контрольные значения и таковые у этих же животных при первом тестировании. Кроме того, количество попыток к спариванию в опытной группе восстанавливалось до контрольного уровня. Эффективность препарата сравнения Трибестан была выражена в меньшей степени. Таким образом, лекарственное средство Триамид эффективно восстанавливает копулятивную активность у животных, находящихся в условиях андрогенной недостаточности.

Пример 4

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

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

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

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

Результаты исследований по изучению влияния Треамида на копулятивное поведение и половую мотивацию, проведенных на животных позднего репродуктивного и старческого возраста, представлены в таблицах 5, 6, 7 и 8.

Таблица 5

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

Таблица 6 Показатели копулятивного поведения крыс-самцов позднего репродуктивного возраста после введения Треамида (14 мес)				
Возраст животных (месяцы)	Группа	2 тестирование- После 14-дневного курса введений		
		ЛППС	КС	КЭ
3	Фон	155,88±32,66	11,25±1,88	0,25±0,16
14	Контроль	455,91±92,22 #	3,36±0,75 #	0,00±0,00 #
	Треамид (5 мг/кг)	364,80±127,66	6,90±1,88 ◊	0,60±0,22 ◊ *
	Силденафил (3 мг/кг)	171,09±78,08 ◊ *	6,27±1,27 ◊ #	0,00±0,00 #
Примечания: 1 - ЛППС – латентный период первой садки, 2 - КС – количество садок, 3 - КЭ – количество эякуляций, 4 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), 5 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), 6 - ◊ – различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)				

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

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

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

Таблица 7 Показатели копулятивного поведения крыс-самцов предстарческого возраста (19 мес) до введения и после 14-дневного введения Треамида							
Возраст животных (месяцы)	Название группы	1 тестирование (до введения препаратов)			2 тестирование (после 14-дневного курса введений)		
		ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЭ (абс.)	ЛППС (сек.)	КС (абс.)	КЭ (абс.)
3	Фон	134,80±28,31	8,90±1,66	0,44±0,18	66,70±10,56	10,20±1,58	0,20±0,13
19	Контроль	318,55±100,11#	4,00±0,83 #	0,00±0,00 #	283,91±106,39	6,09±1,52	0,00±0,00 #
	Треамид (5,0 мг/кг)	310,27±94,59 #	4,27±1,04 #	0,00±0,00 #	297,20±117,04	7,90±1,45 ◊	0,20±0,13 ◊ *
Примечания: 1 - ЛППС – латентный период первой садки, 2 - КС – количество садок, 3 - КЭ – количество эякуляций, 4 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), 5 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), 6 - ◊ – различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).							

Представленные в таблице 7 данные показывают, что у животных контрольной

группы оказалось повышенным латентное время первой садки, снижалось количества садок, эякулирующие животные отсутствовали. После 14-дневного введения Треамида в дозе 5 мг/кг отмечалось достоверное возрастание количество садок, выявлялись эякулирующие животные.

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

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

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

20 Примечания:
1 - А – время нахождения в зоне «сексуального» стимула,
2 - Б - время нахождения в зоне «социального» стимула,
3 - БП – балл предпочтения =

$$\frac{A}{A+B} \times 100$$

25 4 - КК – количество пересеченных квадратов,
5 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
6 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
7 - ◊ – различия достоверны при сравнении внутри группы с первым тестированием (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

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

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

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

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

При введении Треамида в дозе 5 мг/кг время нахождения возле «сексуального» стимула возрастало по сравнению с таковым у этих же животных до введения лекарственного средства. Одновременно с этим снижалось (в 2 раза) по сравнению с

контролем время пребывания в зоне «социального» стимула. Балл предпочтения статистически значимо возростал по сравнению с таковым при первом тестировании и достигал $0,64 \pm 0,09$. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение Треамида в дозе 5 мг/кг оказывает стимулирующее влияние на сексуальную мотивацию крыс-самцов позднего репродуктивного периода. Следует отметить, что балл предпочтения в этой группе крыс статистически значимо не отличался от такового у интактных крыс, т.е. у «молодых» животных.

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

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

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

Пример 5

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

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

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

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

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

Таблица 9 Влияние Треамида на показатели копулятивного поведения крыс-самцов на модели его сезонного угнетения						
№	Первое и второе тестирование					
	ЛППС, сек	количество садок, абс.	количество эякуляций, в %	ЛППС, сек	количество садок, абс.	количество эякуляций, в %
Контроль	466,56±114,21	3,44±1,23	0 %	331,11±116,11	4,56±1,28	11 %
Треамид 5,0 мг/кг	462,00±117,81	3,67±1,34	0 %	251,33±103,86♦	6,56±1,68	33%♦
Виагра	473,00±137,58	3,33±1,27	0 %	308,22±117,73	5,67±1,76	0 %

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

Результаты тестирования крыс-самцов фоновой группы показали, что животные характеризуются достаточно высокими и стабильными показателями половой активности. Средний латентный период первой садки составил 114 сек, количество садок - 14,7, количество спариваний - 0,33. Сравнение тестируемых показателей в «летнее» время года с таковым в «зимний период» показывает, что латентный период первой попытки к спариванию возрос в 4 раза, количество попыток к спариванию снизилось в 3,4 раза ($P \leq 0.05$). Кроме того, самцы контрольной группы, в зимний период не осуществили ни одной эякуляции ($P \leq 0.05$).

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

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

Пример 6

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

Это проявляется в уменьшении степени выраженности морфологических изменений, характерных для этих заболеваний. ХАП моделировали прошиванием ventральной доли железы шелковой нитью, ДГПЖ моделировали введением сульпирида [Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Дурнев А.Д. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению простатотропных средств. В кн. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Под. ред. Миронова А.Н. Ч.1. С. 731-732.]. В качестве препарата сравнения использовался Простамол Уно.

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

Животным с ДГПЖ Терамид вводили внутрижелудочно в течение 2 месяцев в дозе 0,5 мг/кг.

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

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах популяции Вистар (возраст 3 мес.). При моделировании хронического абактериального простатита шелковой нитью прошивалась (под наркозом) ventральная доля предстательной железы. Для реализации модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у крыс вызывали гиперпролактинемия, для чего крысам-самцам внутривентрально вводили

сульпирид в дозе 40 мг/ кг ежедневно в течение 2 месяцев (эглонил, «Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

Через 1 месяц после операции животным экспериментальной группы внутрижелудочно вводили Триамид в дозе 0.5 мг/кг 1 раз в сутки в течение 15 дней По окончании курса введений определяли массу тела животных, проводили их эвтаназию в CO₂-камере. Затем препарировали вентральную долю железы, измеряли массу, объем, определяли весовой коэффициент и проводили морфологический анализ. Для этого простату фиксировали в формалине, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали на соединительную ткань по Ван-Гизону, для подсчета относительной площади эпителия - гематоксилин-эозином. Далее проводили количественную оценку выраженности атрофических процессов и развивающегося склероза. Оценку проводили на стандартной площади среза железы с помощью компьютерного графического анализа (микрофотографии последовательных 10 полей зрения, выполненные видеокамерой “AxioCam Erg5s”, установленной на микроскопе “AxioLab A1” (объектив ×10, окуляр ×10), с программой передачи изображения на компьютер фирмы “AxioVision LE”, Carl Zeiss). Определяли площадь, занимаемую секреторными отделами, коллагеновыми волокнами соединительнотканых прослоек. Эффективности лекарственного средства оценивали по следующим критериям: меньшая степень выраженности морфологических признаков хронического абактериального простатита (атрофии и склероза): площадь, занимаемая секреторными отделами, коллагеновыми волокнами соединительно-тканых прослоек.

Результаты исследования представлены в таблицах 10, 11.

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

Примечания:
 1 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)
 2 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
 3 - Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

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

Примечания:

1 - # – различия достоверны при сравнении с фоном (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)
 2 - * – различия достоверны при сравнении с контролем (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
 3 - Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

Представленные экспериментальные данные показывают, что масса железы, ее весовой коэффициент, объем во всех сравниваемых группах достоверно не отличались друг от друга (табл. 10). Морфологический анализ (табл. 11) показал, что в

предстательной железе крыс контрольных животных достоверно снижалась площадь эпителия ацинусов (атрофия) и возрастала (площадь коллагеновых волокон (склероз)). Ведение Треамида крысам-самцам в дозе 0,5 мг/кг приводило к возрастанию (на 22%) площади эпителия ацинусов. Значение этого показателя достоверно не отличалось от фоновых значений, в то время как в контроле он был значимо снижен по сравнению с фоном. Площадь коллагеновых волокон имела тенденцию к снижению. При сравнении полученных данных с таковыми при введении Простамола Уно (Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Пахомова А.В. и др. Экспериментальное изучение эффективности импазы в модели хронического асептического воспаления предстательной железы. Бюлл. exper. Биол. и мед. 2012. Т. 154. №8. С. 180-182) установлено, что Простамол Уно не оказывает влияния на площадь эпителия ацинусов. Полученные данные позволяют заключить, что использование Треамида в дозе 0,5 мг/кг у крыс с ХАП способствует регенерации эпителиальной ткани предстательной железы. Это выражается в снижении степени выраженности атрофических процессов. Последнее, очевидно, приведет к возрастанию функциональной активности эпителия ацинусов и будет способствовать восстановлению качественных характеристик эякулята.

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

Изучали способность Треамида нормализовать структуру предстательной железы на фоне введения сульпирида. Треамид вводили внутрижелудочно в течение 2 месяцев в дозе 0.5 мг/кг одновременно с сульпиридом. Контрольные животные получали растворитель (2% крахмальную слизь) в эквивалентном объеме. Животным группы сравнения внутрижелудочно вводили раствор препарата Простамол Уно в дозе 50 мг/кг. По окончании курса введений определяли массу тела животных, проводили их эвтаназию в CO₂-камере. Известно, что сульпирид вызывает развитие ДГПЖ в боковой доле железы крыс [Van Coppenolle Fabien, Christian Slomianny, Françoise Carpentier Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno - dependence. // *Physiol.Endocrinol. Metab.* - 2001. - P. 120-129]. В связи с этим препарировали эту долю. Определяли ее массу, весовой коэффициент, объем. Далее проводили морфологическое исследование. Боковую долю предстательной железы фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы железы окрашивали гематоксилином и эозином. На гистологических срезах определяли наличие пролиферативных центров и наличие дочерних ацинусов на стандартную площадь среза. Кроме того, на стандартной площади гистологического среза измеряли площадь эпителиальных и стромальных структур. Эти показатели определяли с помощью компьютерного графического анализа на стандартной площади гистологического среза (микрофотографии последовательных 10 полей зрения, выполненные видеокамерой "AxioCam Hrc5s", установленной на микроскопе "AxioLab A1" (объектив ×10, окуляр ×10), с программой передачи изображения на компьютер фирмы "AxioVision LE", Carl Zeiss). Стромально-эпителиальное соотношение определяли как отношение площади стромы к площади эпителия.

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

Результаты экспериментов представлены в таблицах 12-16.

5

10

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

Примечания:
 1 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)
 2 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
 3 - Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол-Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

15

20

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

Примечания: здесь и далее
 1 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни)
 2 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни),
 3 - Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

25

30

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

35

40

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

45

Группа № жив-го	Фон	Контроль	Треамид в дозе 0,5 мг/кг	Простамол Уно
1	32,15	46,03	51,82	49,97
2	40,26	45,87	48,61	51,21

3	23,27	45,78	45,59	48,39
4	36,55	40,40	44,14	41,84
5	41,42	39,53	38,12	40,93
M±m	34,73±3,29	43,52±1,46 #	45,66±2,30 #	46,47±2,13 #
Примечания: 1 - # – различия достоверны при сравнении с фоном в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни) 2 - * – различия достоверны при сравнении с контролем в этом же тестировании (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни), 3 - Ω - различия статистически значимы по сравнению с группой Простамол Уно (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).				

5

10

15

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

20

25

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

30

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

Пример 7

35

Исследование эффективности Треамида по усилению процессов репаративной регенерации тестикулярной ткани и лечению тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением пролиферативного пула сперматогенеза

40

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

45

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

Для изучения влияния Треамида на глубокий резерв регенерации сперматогенной ткани был использован метод оценки колониеобразующей способности, позволяющий

определять количество комметированных стволовых сперматогенных клеток [A.J. Richards, G.C. Enders, J.L Resnick // Biol. Reprod. - 1999. - Vol. 61. - P. 1146-1151].

На 1-й (через 24 ч) день, а также на 45-й и 65-й день после введения паклитаксела проводили эвтаназию животных и препарирование семенников. Далее методом клонирования *in vitro* определяли содержание клеток-предшественников сперматогенеза в семенниках. Для культивирования клеток-предшественников исследуемого органа использовали подслон, который был представлен клетками адгезирующей фракции. Для приготовления подслоя прилипающих клеток в условиях 5% CO₂ и 37°C один семенник интактного животного гомогенизировали в среде DMEM и отмывали центрифугированием (1500 об/мин, 10 мин). Далее полученную взвесь клеток разделяли на адгезирующую и неадгезирующую фракции. Для этого в 24-луночном планшете в каждую лунку помещали по 0,5 мл приготовленной взвеси клеток в концентрации 1×10⁶ /мл в среде для культивирования клеток-предшественников, и далее инкубировали в течение 1 часа в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубирования собирали неадгезирующую часть клеток. В лунки, содержащие фракцию прилипших клеток, помещали 0,5 мл среды для культивирования сперматогенных клеток-предшественников и инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. Через 7 суток проводили замену культуральной среды с последующим наслоением поверх полученной стромы неадгезирующих клеток семенников опытных животных. Для этого по описанной выше методике клетки разделяли на адгезирующую и неадгезирующую фракции. В чашках Петри инкубировали гомогенат органа в течение 1 часа в CO₂ инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. Далее собирали неприлипшую фракцию клеток, в камере Горяева подсчитывали количество клеток/мл. Наслоение не прилипших клеток проводили в концентрации 2×10⁵ /мл поверх полученной стромы в объеме 0,5 мл на лунку. Инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывали количество колониеобразующих единиц сперматогенных (КОЕ-Сп) – скопления более 30 клеток округлой формы и различного диаметра. Критерием эффективности используемого средства являлось достоверное увеличение количества клеток, дающих начало КОЕ-Сп, в ткани семенников опытных животных по сравнению с таковым в контроле.

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

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

Для культивирования клеток-предшественников исследуемого органа использовали подслон (представленный клетками адгезирующей фракции), заранее приготовленный

в 96-луночном планшете, по вышеописанной методике.

Далее, от двух групп животных (интактные животные и животные, которым за 24 часа до исследования вводили паклитаксел внутривенно), выделяли неадгезирующую фракцию клеток сперматогенной ткани и переносили на полученный подслон в полной культуральной среде (80% DMEM, 20% ЭТС, L-глутамин, антибиотики, гепарин) в концентрации 2×10^5 /мл. Перед инкубированием в полную культуральную среду добавляли Треамид в концентрациях 1 нг/мл, 3 нг/мл, 10 нг/мл, 30 нг/мл, 100 нг/мл, 300 нг/мл и 1000 нг/мл. Инкубировали в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывали количество колониеобразующих единиц сперматогенных (КОЕ-Сп) – скопления более 30 клеток округлой формы и различного диаметра.

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

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

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

Для морфологического исследования семенники крыс фиксировали в жидкости Карнуа и готовили парафиновые срезы. Депарафинированные срезы толщиной 5 мкм окрасили гематоксилин-эозином. На срезе семенника определили численность клеточной популяции сперматогоний, количество клеток Сертоли, количество клеток Лейдига, определяли эндокринную активность клеток Лейдига. На основании подсчета клеток Сертоли вычисляли степень зрелости сперматогенного пласта. Расчет проводили по формуле для экспериментальных групп $y = 5,95 - 0,18x$; для группы интактных животных $y = 6,7 - 0,23x$, где x - среднее количество клеток Сертоли на поперечном срезе извитого семенного канальца, y - индекс, характеризующий степень зрелости сперматогенного пласта. При выборе сроков исследований учитывалась длительность сперматогенеза у крыс, которая составляет полтора месяца. Сроки 45- и 65-е сутки после введения паклитаксела соответствуют проявлению эффектов воздействия на клеточную популяцию сперматогоний.

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

Результаты экспериментов представлены в таблицах 17 и 18.

Таблица 17 Динамика содержания КОЕ-Сп в семенниках крыс при введении паклитаксела и исследуемого вещества Треамид (Х; СКО)		
Сроки исследования, сутки	Группа	КОЕ-Сп, на 2×10^5 (M; SD, n=10)
Фон		5,8; 0,70
1-е	паклитаксел	3,5; 0,69*
45-е	паклитаксел	2,9; 0,48*
	Треамид	4,2; 0,29#
65-е	паклитаксел	2,3; 0,42*
	Треамид	3,4; 0,4#
Примечания: 1. * отмечена достоверность различий показателя с интактным контролем (фон), тестировании ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни) 2. # - отмечена достоверность различий между контролем (паклитаксел) и опытными группами ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).		

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

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

Таблица 18 Изменение уровней колониестимулирующей активности кондиционных сред клеток семенников ($\times 10^5$ клеток) при введении паклитаксела и исследуемого вещества Треамид (Х; СКО)		
Сроки исследования, сутки	Группа	КОЕ-Сп, на 2×10^5
Фон		9,25; 0,67
1-е	паклитаксел	3,0; 0,53*
45-е	паклитаксел	6,37; 0,32*
	Треамид	6,12; 0,29*
65-е	паклитаксел	3,25; 0,45*
	Треамид	5,88; 0,52*#
Примечания:		

1. * - отмечена достоверность различий показателя с интактным контролем ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни)
2. # - отмечена достоверность различий между контролем (паклитаксел) и опытными группами ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни)

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

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

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

Результаты эксперимента представлены в таблице 19.

10 Таблица 19
Влияние Треамида на рост колоний из КОЕ-Сп при добавлении *in vitro* ($M \pm SD$, $n=6$)

Концентрация ХС268БГ в культуре	КОЕ-Сп на 4×10^4 нуклеаров	
	Клетки семенников интактных крыс	Клетки семенников крыс на 1-е сутки после введения паклитаксела в/в
Контроль	7,0 \pm 0,58	2,67; 0,33 *
Треамид (1 нг/мл)	6,83 \pm 0,48	6,83; 0,60 #
Треамид (30 нг/мл)	6,0 \pm 0,36	5,17; 0,65 #
Треамид (100 нг/мл)	8,50 \pm 0,42*	4,67; 0,61 #
Треамид (1000 нг/мл)	11,67 \pm 1,81*	5,67; 0,33 #

15

20 Примечания:
1. * - различия достоверны при сравнении с интактным контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни);
2. # - различия достоверны при сравнении с цитостатическим контролем на ($p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).
В результате определения содержания предшественников сперматогенной ткани в семенниках крыс после введения паклитаксела, было обнаружено статистически значимое (табл. 19) снижение колониеобразования на 1-е сутки, что соответствует ранее полученным данным.

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

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

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

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

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

Таблица 20

Оценка состояния сперматогенеза крыс через 45 дней после введения Паклитаксела					
Группа	Среднее количество сперматогоний (абс.)	Среднее количество клеток Сертоли (абс.)	Степень зрелости сперматогенного пласта (усл.ед.)	Общее количество сперматозоидов (млн.)	Количество подвижных сперматозоидов (%)
Фон (интактные животные)	18,47±0,28	1,07±0,03	6,45±0,01	213,00±0,81	80,05±3,20
Контроль (Паклитаксел)	11,88±0,35*	1,51±0,02*	5,68±0,00*	125,00±5,82*	63,68±1,50*
Опыт Паклитаксел + Треамид	14,56±0,19*#	1,61±0,03*#	5,66±0,01#	146,00±9,53*	71,57±3,19#
Примечание: * - различия достоверны по сравнению с фоном # - различия достоверны по сравнению с контролем.					

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

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

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

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

сел + Треамид						
Примечание * - различия достоверны по сравнению с фоном # - различия достоверны по сравнению с контролем.						

5 Это, очевидно, является следствием, отмеченного выше истощения популяции клеток-предшественников сперматогенеза и угнетения гуморальных факторов, стимулирующих их пролиферацию. Оставался сниженным и процент подвижности зрелых половых клеток, что свидетельствует об их частичной неполноценности. Таким образом, и в данный срок наблюдения (через 65 дней опыта) выявлялась тестикулярная недостаточность, обусловленная снижением источников пролиферативного пула сперматогенеза, т.е. воспроизводилась экспериментальная модель патологического процесса. Количество клеток Лейдига оставалось на прежнем уровне. Эндокринная активность клеток Лейдига возрастала. Интенсивность процессов репаративной регенерации не усиливалась. Так, степень зрелости сперматогенного пласта хотя и была снижена по сравнению с контролем, но не уменьшалась по сравнению с 10 предшествующим сроком исследования, не возрастало также и количество клеток Сертоли. Отсутствие положительной динамики в течение регенераторных процессов, очевидно, связано с низким количеством коммитированных колониобразующих клеток сперматогенной ткани.

У животных, получавших терапию Треамидом, на 65-е сутки исследования 20 численность клеточной популяции сперматогоний не возрастала по сравнению с контролем, но продуктивность сперматогенеза, судя по ОКС, увеличивалась (на 43%) (табл. 21). Возрастало также (на 32%) и процент подвижных форм спермиев. Этот показатель статистически значимо не отличался от фоновых значений. Количество клеток Лейдига находилось на уровне контрольных значений. Эндокринная активность 25 клеток Лейдига нормализовалась и достигала контрольных значений. При оценке степени выраженности процессов репаративной регенерации ткани было установлено, что количество клеток Сертоли возрастало, а степень зрелости сперматогенного пласта снижалась. Степень зрелости сперматогенного пласта, напротив, достоверно снижалась. Эти данные, совместно с данными о возрастании количества клеток-предшественников 30 сперматогенеза, свидетельствуют о том, что введение Треамида крысам, получавшим паклитаксел, стимулировало процессы репаративной регенерации сперматогенной ткани. Тестикулярная недостаточность, судя по проценту подвижных форм, проявлялась в меньшей степени. Следует отметить, что отсутствие положительного влияния на численности клеточной популяции сперматогоний, несмотря на увеличение количества 35 клеток-предшественников сперматогенеза и усиление гуморальной регуляции их жизнедеятельности, очевидно, свидетельствует о том, что для проявления эффекта на клетки-предшественники необходим более длительный промежуток времени. С этой целью было исследовано морфологическое и функциональное состояние сперматогенной ткани на 90-й день опыта.

40 При изучении морфологического и функционального состояния сперматогенной ткани на 90-й день опыта было установлено, что численность клеточной популяции сперматогоний, ОКС, процент подвижных форм у крыс, получавших один паклитаксел, были сниженными по сравнению с контролем и не возрастали по сравнению с 45 предшествующими сроками исследования (табл. 22). Эти данные свидетельствуют о сохранении тестикулярной недостаточности, обусловленной истощением источников пролиферативного пула сперматогенеза. Количество клеток Лейдига достоверно снижалось, но их эндокринная активность возрастала. Количество клеток Сертоли (табл. 22) не увеличивалось и было сниженным по сравнению с контролем. Однако

судя по степени зрелости сперматогенного пласта (этот показатель снижен на 10% от фона, табл. 22), можно говорить о некоторой активности процессов репаративной регенерации ткани, но интенсивность их является явно недостаточной для восстановления исходного количества клеток-предшественников и всего процесса сперматогенеза в целом.

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

Примечание * - различия достоверны по сравнению с фоном.

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

Представленные данные свидетельствуют о том, что Треамид позволяет эффективно стимулировать репаративную регенерацию тестикулярной ткани, угнетение которой было обусловлено снижением количества коммитированных колониеобразующих клеток. Эффективность Треамида подтверждается данными морфологического анализа тестикулярной ткани.

Пример 8

Фармацевтическая композиция

Состав на одну таблетку, мг

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

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

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

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

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

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

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

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

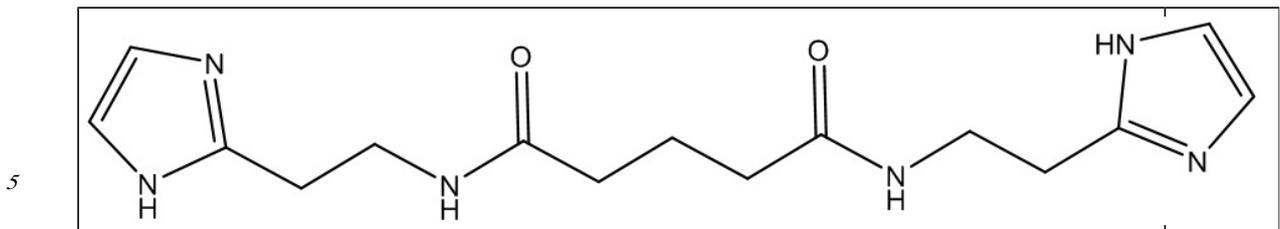
Кроме того, заявителем показана способность Треамида восстанавливать подвижность сперматозоидов при астеноспермии. Полученные данные свидетельствуют о том, что Треамид является эффективным средством восстановления подвижности сперматозоидов.

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

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

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для стимуляции регенерации эпителиальных и/или соединительных тканей, включающая эффективное количество соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где ткань выбрана из группы, включающей тестикулярную ткань и ткань простаты.

10

15

20

25

30

35

40

45