

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н. Ю. Фролова, А. В. Бурякина, Т. И. Мельникова, Е. К. Вишневская, Е. В. Дрожжина, Е. Л. Авенирова, А. В. Караваева<sup>1</sup>

Излагаются методические подходы к доклиническому изучению средств для лечения заболеваний предстательной железы.

**Ключевые слова:** простата, специфическая активность, безопасность, экспериментальные модели

#### ВВЕДЕНИЕ

Фармакологическая коррекция нарушений мужской половой функции является одной из важных проблем современной медицины, что определяется широкой распространенностью заболеваний мочеполовой системы у мужчин не только пожилого, но среднего и даже молодого возраста. В структуре таких расстройств существенная роль принадлежит простатиту различного генеза — инфекционного, гемодинамического, аутоиммунного, а также доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) и злокачественным новообразованиям простаты. Ранняя диагностика и применение медикаментозных средств с разными механизмами действия нередко позволяют отсрочить оперативное вмешательство при этих заболеваниях или избежать его. Для проведения скрининга потенциальных простатотропных средств и оценки их специфической активности на этапе доклинических испытаний необходимо использовать адекватные экспериментальные модели. Соответствующих общепринятых рекомендаций в нормативной документации нет.

#### Экспериментальные модели

Для экспериментальной оценки специфического действия препаратов, предназначенных для терапии заболеваний предстательной железы, предложен ряд моделей [1 – 3, 7, 13, 15 – 21] в соответствии с различными теориями развития хронического простатита [8, 12, 14] и ДГПЖ [4, 5, 9] у людей.

Для скрининга простатотропных лекарственных веществ целесообразно использовать информативную и простую в исполнении модель хронического абактериального простатита у крыс, вызываемого однократным

ректальным введением димексид-скипидарной смеси [7, 13]. В этой смеси скипидар выступает как флогогенный агент, а димексид — как пенетрант, способствующий усилению эффекта скипидара за счет активизации его проникновения через слизистую оболочку кишки, а также как обезболивающее средство. Хорошая воспроизводимость модели достигается при использовании модификации И. В. Князькина [7], согласно которой животным вводят ректально 1 мл (0,75 – 1,25 мл) смеси скипидара и 10 % димексида в объемной соотношении 1:4. Чтобы избежать расслоения, непосредственно перед использованием смесь встряхивают в течение 1 мин до образования мелкодисперсной эмульсии. А. В. Бухмин и соавт. [2] предлагают вводить в состав данной эмульсии антисептик ваготил (поликрезулен), чтобы сделать процедуру более щадящей для животных. Эмульсию вводят крысам ректально (животных фиксируют рукой в горизонтальном положении) на глубину 20 – 25 мм с помощью устройства для ректальных вливаний (дозатора), обеспечивающего атравматичность процедуры. Через 28 – 30 сут у 100 % животных наблюдается тяжелое воспалительное поражение предстательной железы, что выражается в нарушении их общего состояния и мочеиспускательной функции. Для оценки тяжести состояния крыс используют гистологический контроль, а также взвешивание простаты перед ее изъятием для морфологического исследования и прижизненную оценку диуреза на разных этапах лечения. Выбор критериев оценки тяжести патологического процесса обоснован в первую очередь тем, что в клинических условиях именно по изменению размеров предстательной железы и характеру мочеиспускания судят не только о тяжести заболевания, но и об эффективности его лечения.

Взвешивание предстательной железы, выполняемое через 28 – 30 сут после введения димексид-скипидарной смеси, показывает существенное увеличение ее массы по сравнению с нормальным показателем у интактных животных — в среднем в 1,5 – 1,8 раза. При

<sup>1</sup> Лаборатория фармакологических исследований (зав. — А. В. Бурякина) Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, СПб., 197376, ул. Проф. Попова, 14.

этом на гистологических срезах выявляются следующие признаки воспаления: уплощение эпителия концевых отделов простатических железок, растянутых плотными белковыми массами, атрофия; отек, воспаление (скопления лимфоцитов, макрофагов) и разрастание стромы предстательной железы; полнокровие капилляров; утолщение стенок артерий.

Так как даже после такого сильного токсического воздействия у некоторых крыс часть желез сохраняет функцию, для объективной оценки выраженности простатита можно использовать подсчет доли животных с частичным сохранением желез нормального строения (в группе нелеченых животных этот показатель обычно не превышает 30–40 %) и учет средней площади поражения в нескольких полях зрения (в группе нелеченых животных с частичным сохранением функции простаты она занимает не менее 4/5 поля зрения).

Суточный форсированный диурез у животных (водная нагрузка 5 % от массы тела) после развития воспаления предстательной железы сначала несколько повышается (на 10–20 % через месяц после введения скипидара), затем (через 2–3 месяца) существенно снижается (в 3 и более раза). При этом у основной массы животных обнаруживается протеин- и гематурия.

Испытуемое средство начинают вводить животным из опытных групп либо на следующий день после ректального введения флогогенного агента (оценка профилактического эффекта), либо через 28–30 дней, т.е. после развития воспаления (оценка лечебного эффекта). На этапе скрининга определяется длительность курса введения, обычно она составляет не менее месяца. Средство можно считать перспективным для дальнейшего исследования, если его применение позволяет уменьшить массу предстательной железы не менее чем на 30–40 % по сравнению с показателем у животных, оставленных без лечения (с соответствующим гистологическим контролем), а также улучшить диурез.

Абактериальный простатит у крыс моделируется также при помощи однократной инъекции капсаицина непосредственно в ткань предстательной железы. Разработаны модели абактериального простатита у мышей [18].

Для углубленной оценки средств, предназначенных для лечения простатита, можно использовать следующие, более трудоемкие в исполнении модели: бактериального простатита (внутрибрюшинное, внутриуретральное, ангиогенное заражение мышей, крыс, собак, обезьян *E. coli*, *Ent. faecalis*, *St. aureus* на фоне кастрации или без нее), развивающегося в среднем в течение 8 недель (те же критерии эффективности + определение числа колониеобразующих клеток в 1 мл гомогената предстательной железы) [6]; аутоиммунного простатита (иммунизация мышей, крыс или собак ауто(изо)логичным гомогенатом предстательной железы в смеси с адьювантом Фрейнда) [20]; криогенного

воздействия и прошивания ткани предстательной железы кролика шелковой лигатурой, вызывающих нарушение гемодинамики → острый простатит → хронический простатит (через 1–2 месяца) → полная утрата функции простаты (через 4–6 месяцев) [1]; аппликации метаксилла на заднюю поверхность предстательной железы кроликов или крыс, вызывающей ту же цепь патогенетических реакций [3].

ДГПЖ является дисгормональной гиперпластической простатопатией, приводящей к нарушению и/или ослаблению половой функции. Железа увеличивается в размерах (особенно средняя ее часть, выдающаяся в просвет мочевого пузыря), гипертрофируются железистая и/или мышечная и соединительная ткани. К осложнениям ДГПЖ относятся сдавление и деформация мочеиспускательного канала и шейки мочевого пузыря, вследствие чего затрудняется отток мочи. Стенка мочевого пузыря подвергается компенсаторной гипертрофии. Однако эта компенсация оказывается недостаточной, в пузыре накапливается избыток мочи, присоединяется вторичная инфекция, развиваются цистит, восходящий пиелит и пиелонефрит. Учитывая, что в патогенезе ДГПЖ основную роль играют гормональные нарушения, при экспериментальном моделировании данного патологического процесса используются приемы, направленные на создание гормонального дисбаланса у подопытных животных. Для скрининга лекарственных веществ, предназначенных для лечения ДГПЖ, целесообразно использовать модель гормонального дисбаланса у крыс самцов, вызванного кастрацией (приводит к увеличению латеральной доли простаты) с последующим введением тестостерона.

С этой целью животных, предварительно рандомизированных по группам, кастрируют под наркозом. На следующий день начинают ежедневное подкожное введение тестостерона пропионата в дозе 0,1 мг/кг (5 % масляный раствор разводят оливковым маслом до расчетной концентрации) в течение 3 недель. Животным из опытных групп в это же время вводят испытуемое вещество или референтный препарат, контрольным — плацебо. До начала введения тестостерона и после окончания эксперимента проводят оценку функционирования мочевыделительной системы. По завершении эксперимента крыс взвешивают, умерщвляют, вскрывают, извлекают предстательную железу, осматривают, взвешивают ее для расчета весового коэффициента (отношение массы железы в мг к 100 г массы тела животного) и готовят препараты для гистологического исследования. При изъятии простаты обращает на себя внимание то, что у контрольных животных (не получавших лечения) она выглядит более рыхлой и существенно большей по объему, чем у интактных, и значительно труднее отделяется от стенки мочевого пузыря. Взвешивание простаты показывает существенное увеличение ее массы при экспериментальной ДГПЖ по сравнению с нормальным показателем — в

среднем в 1,7–2 раза. При этом на гистологических срезах выявляются следующие признаки.

Подавляющее большинство простатических железок, имеющих на срезе (более 70 %), выглядят резко атрофичными с расширенными просветами, которые заполнены плотным гомогенным содержимым; выстланы плоским эпителием. Около 20 % железок умеренно атрофичны, выстланы кубическим эпителием.

Около 10 % железок относительно сохранены, выстланы призматическим эпителием, но обычно без складчатости, характерной для нормально функционирующих желез. Заметно усиление пролиферативных процессов.

Результаты изучения мочевыводящей функции показывают, что в контроле (без лечения) к окончанию эксперимента происходит некоторое снижение диуреза (на 20–30 %). В моче у большинства животных выявляется белок (у некоторых — кровь и глюкоза).

Испытуемое вещество можно считать перспективным для дальнейшего исследования, если его применение позволяет уменьшить массу предстательной железы в условиях экспериментальной ДГПЖ не менее чем на 30–40 % по сравнению с показателем у животных, оставленных без лечения (с соответствующим гистологическим контролем), а также улучшить диурез.

Описаны и другие экспериментальные модели ДГПЖ у крыс, например, с использованием еженедельных внутримышечных инъекций тестостерона и 17β-эстрадиола в течение 4 недель [21], трансдермальной обработки цитралем в течение 4 месяцев [16, 17]. В последнем случае не только развивается ДГПЖ вентральной доли простаты, но и обнаруживаются признаки атипичной гиперплазии железы [16].

Для углубленной оценки простатотропных средств можно использовать еще несколько экспериментальных моделей.

1. Изучение влияния испытуемого вещества на массу половых желез инфантильных крыс самцов (возраст 21–23 дня). Если вещество обладает гонадотропными свойствами, то после его введения в течение 10–14 дней масса семенных пузырьков увеличивается в среднем на 20–30 %, а масса простаты на 30–40 % по сравнению с соответствующими показателями у интактных животных.

2. Изучение влияния испытуемого вещества на массу семенных пузырьков у гонадэктомированных инфантильных крыс самцов. Если вещество обладает андрогенной активностью, то после его введения в течение 7–10 дней на фоне действия тестостерона показатель увеличивается в среднем на 50–60 % по сравнению с соответствующим показателем у контрольных животных, получавших плацебо.

3. Изучение влияния испытуемого вещества на массу предстательной железы после внутрибрюшинного введения сульфпирида крысам в течение 30 дней (индукция гиперпролактинемии с последующим развитием ДГПЖ). Если вещество обладает простатотропными

свойствами, то после его введения в течение 30 дней (параллельно с введением сульфпирида) показатель уменьшается в среднем на 30–40 % по сравнению с соответствующим показателем у контрольных животных, получавших плацебо.

Описание экспериментальных моделей рака предстательной железы для оценки эффективности противоопухолевых средств можно найти в методических рекомендациях по изучению специфической активности фармакологических веществ, предлагаемых для лечения гормонзависимых опухолей [18].

### **Основные этапы исследования специфической активности**

*Скрининговые исследования*, по результатам которых отбирают наиболее перспективные для углубленного исследования средства.

*Углубленное изучение специфической активности* подразумевает изучение отобранного по результатам первого этапа вещества на нескольких моделях патологических состояний, определение широты его терапевтического действия, отработку оптимальных режимов его применения.

*Дополнительные исследования*. Целесообразно изучать такие свойства простатотропных веществ, которые вносят существенный вклад в реализацию их основного эффекта: противовоспалительные — модели формалинового (карагенинового, гистаминового) отека задней конечности у мышей (крыс), перитонита у крыс, ватной (фетровой) гранулемы у крыс; противомикробные — активность в отношении штаммов грамположительной (стафилококки, стрептококки) микрофлоры, играющей важную роль в патогенезе неспецифических воспалительных заболеваний предстательной железы и мочевыводящих путей, а также в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов; ангиопротекторные — модели повышенной сосудистой проницаемости кожи у мышей и крыс (по выходу трипановой сини в очаг воспаления или количеству образовавшихся петехий); анальгетические — модели горячей пластинки, электрического раздражения хвоста, давления на лапу у крыс, уксуснокислых корчей у мышей.

Описания этих методик можно найти в соответствующих разделах методических указаний по проведению доклинических исследований [10]. Для более эффективного использования потенциального простатотропного средства, а также прогнозирования его возможных побочных эффектов важно знать механизмы его специфического действия. В соответствии с возможностями лаборатории целесообразно исследовать влияние испытуемого вещества на активность ферментов, играющих важную роль в метаболическом обеспечении функции предстательной железы (5α-редуктаза, 3α-редуктаза, фосфодиэстераза, ароматаза), уровень факторов роста в простате, рецепторный ап-

парат шейки мочевого пузыря, задней уретры, простаты (прежде всего —  $\alpha_1$ -адренорецепторы).

Исследования безопасности средств, предназначенных для лечения и профилактики заболеваний предстательной железы, проводятся по общепринятой схеме [10]. ЛД<sub>50</sub> следует рассчитывать на первых этапах разработки, чтобы оценить токсический потенциал нового средства и соотношение эффективных и токсических доз. Результаты доклинического исследования протатотропных свойств потенциального лекарственного средства представляются в виде сводного отчета по стандартной схеме [10].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. А. Бондаренко, *Проблемы эндокринологии*, **23**(4), 111 – 114 (1977).
2. А. В. Бухмин, В. В. Россихин, С. Я. Мысько и др. [Электронный ресурс], режим доступа: <http://www.rusnauka.com/SND/Medecine/6/buhminrossihin%20.doc.htm>, свободный, загл. с экрана.
3. А. Г. Горбачев, *Изобретательство и рационализаторство в медицине и медицинской промышленности*, Ленинград (1986), сс. 40 – 41.
4. Л. М. Гориловский, *Доброкачественная гиперплазия предстательной железы*, Москва (1997), сс. 10 – 18.
5. Н. И. Доста, *Рецепт*, № 3, 112 – 121 (2007).
6. М. И. Каплун, *Урология и нефрология*, № 2, 32 – 35 (1976).
7. И. В. Князькин, Патент РФ, рег. № 2001107806 / 14 (2002).
8. Д. Ю. Пушкарь, А. С. Сегал, *Врачебное сословие*, № 5 – 6, 9 – 11 (2004).
9. Ю. А. Пытель, А. З. Винаров, *Доброкачественная гиперплазия предстательной железы*, Москва (1997), сс. 19 – 32.
10. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, 2-е изд., Р. У. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005).
11. З. С. Смирнова, Г. К. Герасимова, А. М. Гарин, А. С. Соколова, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2005), сс. 652 – 668.
12. В. Строчкий, *Медицинские новости*, № 8(1), 19 – 22 (2006).
13. В. Х. Хейфец, М. А. Забежинский, А. Б. Хролович, В. Х. Хавинсон, *Урология*, № 5, 48 – 52 (1999).
14. П. А. Щеплев, Ю. Я. Кузнецкий, *Андрология и генитальная хирургия*, № 1 – 2, 23 – 31 (2004).
15. H. Ceri, M. E. Olsen, J. C., *Textbook of prostatitis*, Oxford (1999), pp. 109 – 121.
16. D. Engelstein, J. Shmueli, S. Bruhis, et al., *Comp-Biochem-Physiol-C-Pharmacol-Toxicol-Endocrinol.*, **115**(2), 169 – 177 (1996).
17. A. A. Geldof, C. Engel, B. R. Rao, *Urol. Res.*, **20**(2), 139 – 144 (1992).
18. D. W. Keetch, P. Humphrey, T. L. Ratliff, *J. Urol.*, **152**(1), 247 – 250 (1994).
19. J. C. Nickel, M. E. Olson, J. W. Costerton, *Infection*, **19**, S3, 126 – 130 (1991).
20. L. Seethalakshmi, R. S. Bala, R. K. Malhotra, et al., *J. Urol.*, **156**(5), 1838 – 1842 (1996).
21. S. Tanemichi, K. Akiyama, M. Kobayashi, et al., *J. Urol.*, **176**(3), 1236 – 1241 (2006).

Поступила 03.08.09

## METHODOLOGICAL APPROACHES TO EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF DRUGS FOR THE PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF PROSTATE GLAND DISORDERS

N. Yu. Frolova, A. V. Buryakina, T. I. Mel'nikova, E. K. Vishnevskaya, E. V. Drozhzhina, E. L. Avenirova, and A. V. Karavaeva

Laboratory of Pharmacology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, ul. Prof. Pavlova 14, St. Petersburg, 197376, Russia

New methodological approaches to preclinical study of the efficiency of potential prostaticotropic drugs are suggested on the basis of original research and published data. An algorithm is proposed to investigate specific activity and safety of potential drugs for the prevention and treatment of prostate disorders.

**Key words:** Prostate gland, specific activity, safety, experimental models, reference drug