

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЛОСЬЙОНУ, ЩО МІСТИТЬ МІНОКСИДИЛ, З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕСТ-ОБ'ЄКТА – СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

Б.П. Кузьмінов¹, Т.С. Зазуляк¹, Д.Д. Остапів², Н.Є. Юнак¹

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

²Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

РЕЗЮМЕ. Мета. Оцінити цитотоксичний вплив різних концентрацій лосьйону, що містить міноксидил. Як тест-об'єкт використано суспензію спермійв бугая. Проби сперми ділили на контрольну та дослідні: з додаванням 5 % та 10 % лосьйону, що містить міноксидил.

Методи досліджень – визначити виживання спермійв (год) за температури 2–4°C до припинення поступального руху, дихальну активність – полярографічно (нг-атом O_2 /хв × 0,1 мл сперми) за температури 38,5°C і відновну здатність – потенціометрично (мВ/хв × 0,1 мл сперми), активність сукцинат-дегідрогенази (СДГ; од/год × 0,1 мл сперми) і цитохромоксидазу (ЦХО; од/год × 0,1 мл сперми).

Висновки. Встановлено, що дихальна активність і відновна здатність сперми залежить як від дози, так і концентрації міноксидилу у складі лосьйону.

Ключові слова: міноксидил, алопеція, цитотоксичний вплив, спермії бугаїв.

Вступ. Андрогенетична алопеція – найчастіша причина втрати волосся, вона уражає як мінімум 50 % чоловіків, які досягли 50 років і до 70 % чоловіків більш зрілого віку [1]. У світі існує багато різноманітних засобів лікування та профілактики алопецій – від системних медикаментозних до місцевого застосування у вигляді лосьйонів [2]. Найефективнішими для стимулювання росту волосся як при андрогенетичній, так і при інших видах алопеції є препарати, до складу яких входять периферичні вазодилататори (активатори калієвих каналів) [3]. Останнім часом з метою отримання терапевтичного ефекту до складу лосьйонів стали вводити лікарські діючі речовини, зокрема міноксидил, з віднесенням такої продукції до лікувальної косметики, що продається в аптеках та медичних центрах за результатами консультації з фармацевтом або лікарем. При цьому не враховується можливість розвитку побічних та віддалених ефектів.

Дані наукової літератури свідчать про низку недоліків при застосуванні таких лосьйонів. Ефективність спостерігається лише при початкових формах алопецій, а у місцях повного облисіння відновлення росту майже не відбувається. Після припинення вживання лосьйону знову може посилитися випадіння волосся [4].

Згідно з інструкцією виробника застосування лосьйону протипоказане молодим людям віком до 18 років та після 65, можливий розвиток побічних ефектів з боку потенції у чоловіків, зниження лібідо, негативного впливу на репродуктивну функцію та рухливість спермійв.

З 2004 року в Європейському Союзі заборонено тестування косметичних засобів на тваринах [5]. Поширеними є альтернативні методи досліджень з використанням рухливості статевих клітин в якості тест-об'єкту. Доказовим аргументом є те, що він підходить до токсикологічних досліджень з високою кореляцією результатів у порівнянні з класичними токсикологічними методами з використанням тварин [6].

Високою чутливістю до токсичних речовин володіє суспензія спермійв бугая, яка широко використовується в практиці штучного осіменіння і є стандартизованою. Переваги даного методу дозволили поширити його в медицині та ветеринарії при токсикологічних дослідженнях.

Мета роботи. Визначити наявність цитотоксичної дії різних концентрацій лосьйону, що містить міноксидил за тривалістю виживання спермійв та інтенсивністю окисних процесів у спермі бугаїв.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень відібрані еякуляти ($n = 3$)

об'ємом – $1,83 \pm 0,14$ мл, концентрацією – $0,7 \pm 0,10 \times 10^9$ клітин/мл та активністю $7,4 \pm 2,37$ бала спермійв. Сперму ділили на частини: одну використовували для визначення дихальної та відновної здатності сперми *ex tempore* у фосфатно–сольовому буфері (NaCl–0,8 г, KCl–0,02 г, Na₂HPO₄–0,11 г, KH₂PO₄–0,02 г, MgCl₂–0,01 г, H₂O до 100 мл), а іншу – для вивчення активності ензимів мітохондрій і виживання спермійв у лактозо–жовтково–гліцериновому розріджувачі. При цьому виділяли контрольний зразок без додавання та дослідні – з додаванням 5 % і 10 % лосьйону, що містить міноксидил, дозами 0,10 мл, 0,05 мл і 0,01 мл на 1 мл розрідженої сперми.

Визначали: виживання спермійв (год) за температури 2–4°C до припинення поступального руху, дихальну активність – полярографічно (нг-атом O₂/хв×0,1 мл сперми) за температури 38,5°C [8] і відновну здатність – потенціометрично (mV/хв×0,1 мл сперми) [9], активність сукцинат-дегідрогенази (СДГ; од/год×0,1 мл сперми) і цитохромоксидази (ЦХО; од/год×0,1 мл сперми) [10, 11]. Статистичний аналіз цифрового матеріалу проведено за М.О. Плохінським [12].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що дихальна активність і відновна здатність сперми залежить як від дози, так

і концентрації міноксиду у складі лосьйону. Так, додавання в комірку полярографа 0,01 мл 5 % лосьйону призводить до гальмування в 2,5 разу ($p < 0,05$) споживання кисню і в 4,0 рази ($p < 0,01$) транспорту протонів (електронів) у позаклітинний простір (табл. 1).

Підвищення дози до 0,05 мл ще на 43,4 % знижує дихальну активність, величина значення якої у 4,3 разу нижча контролю. На противагу, відновна здатність за вказаної дози лосьйону зростає до $3,0 \pm 0,28$ mV/хв×0,1 мл (66,7 %; $p < 0,01$), однак залишається нижчою на 25,0 %, порівняно з контролем. Збільшення до 0,10 мл 5 % лосьйону знижує на 35,3 % ($p > 0,05$) дихальну активність, порівняно з дозою 0,05 мл. При цьому гальмується на 40,0 % відновна здатність сперми.

Подібні зміни виявлені за дослідження дії аналогічних доз 10 % лосьйону на дихальну активність і відновну здатність сперми. За 0,01 мл вказаної концентрації лосьйону в 3,3 разу ($p < 0,01$) дихальна активність і в 2,8 разу ($p < 0,01$) відновна здатність нижчі, ніж у контролі. Збільшення дози до 0,05 мл і більше 10 % лосьйону гальмує у 12,3 – 26,6 разу ($p < 0,01–0,001$) споживання кисню спермою, порівняно з контролем. Відновна здатність за 0,05 мл 10 % лосьйону на 25,0 %, а за 0,10 мл на

Таблиця 1

Дихальна активність і відновна здатність сперми за дії лосьйону, n = 3; M±m

Умови досліджу	Доза, мл	Кількість міноксиду у дозі, мг	Дихальна активність, нг-атом O ₂ /хв×0,1 мл	Відновна здатність, mV/хв×0,1 мл
	η^2		0,874	0,462
Лосьйон 10,0 %	0,10	10,0	$0,3 \pm 0,12^{***}$	$1,4 \pm 0,33^*$
	0,05	5,0	$0,6 \pm 0,21^{**}$	$2,6 \pm 1,14$
	0,01	1,0	$2,2 \pm 0,73^{**}$	$1,4 \pm 0,16^{**}$
	η^2		0,845	0,633
Лосьйон 5,0 %	0,10	5,0	$1,1 \pm 0,20^{**}$	$1,8 \pm 0,75$
	0,05	2,5	$1,7 \pm 0,26^{**}$	$3,0 \pm 0,28$
	0,01	0,5	$3,0 \pm 0,64^*$	$1,0 \pm 0,16^{**}$
Контроль	—	—	$7,4 \pm 0,98$	$4,0 \pm 0,59$

*Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно з контролем:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

65,0 % ($p < 0,05$) нижчі, ніж у контролі.

Оцінюванням активності ензимів мітохондрій сперміїв виявлено, що за дії 0,01 мл 5 % лосьйону на 36 % ($p < 0,05$) СДГ підвищується, а ЦХО не змінюється і знаходиться в межах контролю ($33,3 \pm 2,72$ од/год $\times 0,1$ мл; табл. 2).

Підвищення до 0,05 мл 5 % лосьйону призводить до гальмування активності ензимів, відповідно, СДГ на 35,7 % і ЦХО на 25,2 %, порівняно з контролем. За максимальної дози (0,10 мл 5 % лосьйону) активність ензимів досягає мінімального значення: СДГ – $0,2 \pm 0,03$ і ЦХО – $18,3 \pm 1,36$ од/год $\times 0,1$ мл, що відповідно нижче на 99,2 ($p < 0,001$) і 45,3 % ($p < 0,01$) порівняно до контролю.

Подібні зміни активності ензимів мітохондрій сперміїв встановлені за використання 10 % лосьйону. Однак, за дії 0,01 мл лосьйону активність СДГ і ЦХО знаходяться на рівні контролю і становлять $21,7 \pm 1,36$ та $31,7 \pm 3,60$ од/год $\times 0,1$ мл відповідно. Збільшення дози до 0,05 мл призводить до гальмування активності ензимів майже на однакову величину 60,2 – 64,6 % ($p < 0,01$). За максимальної дози 10 % лосьйону (0,10 мл) на 99,6 % активність СДГ і на 65,0 % ЦХО нижчі, ніж у контролі.

Зниження інтенсивності окиснювальних процесів і активності мітохондріаль-

них ензимів за підвищення вмісту лосьйону в розрідженій сперміїв призводить до змін тривалості виживання сперміїв. Зокрема, при дії 5 % лосьйону в кількості до 0,05 мл величина фізіологічного показника майже не змінюється і знаходиться в межах контролю (104,0 – 106,7 год), а при кількості 0,1 мл – на 61,9 % ($p < 0,01$) зменшується тривалість виживання сперміїв порівняно з контролем.

Додавання 10 % лосьйону у наростаючих дозах призводить до зниження виживання сперміїв. Так, за дії 0,01 мл значення фізіологічного показника на 32 год (28,6 %; $p < 0,05$) нижча, ніж у контролі. Збільшення дози до 0,05 мл знижує на 54,8 % ($p < 0,001$) виживання сперміїв, а до 0,10 мл/мл – на 70,4 % ($p < 0,001$), порівняно з контролем.

З аналізу залежності окисних процесів у спермі та виживання сперміїв за додавання наростаючих доз лосьйону впливає, що діюча субстанція гальмує дихальну активність і відновну здатність та активність мітохондріальних ензимів статевих клітин, що призводить до зниження виживання сперміїв. При цьому зміни досліджених показників залежать від концентрації та дози діючої речовини в розрідженій спермі. Сила впливу за зростаючим вмістом 5 і 10 % лосьйону на дихальну активність та

Таблиця 2

Активність ензимів мітохондрій і виживання сперміїв за дії лосьйону, $n = 3$; $M \pm m$

Умови досліджу	Доза, мл	Кількість міноксиду у дозі, мг	СДГ, од/год $\times 0,1$ мл	ЦХО, од/год $\times 0,1$ мл	Вживання, год
η^2			0,917	0,819	0,942
Лосьйон 10,0 %	0,10	10,0	$0,1 \pm 0,03^{***}$	$11,7 \pm 1,36^{***}$	$22,0 \pm 1,63^{***}$
	0,05	5,0	$8,3 \pm 1,36^{**}$	$13,3 \pm 2,72^{**}$	$50,7 \pm 2,18^{***}$
	0,01	1,0	$21,7 \pm 1,36$	$31,7 \pm 3,60$	$80,0 \pm 6,53$
η^2			0,924	0,704	0,855
Лосьйон 5,0 %	0,10	5,0	$0,2 \pm 0,03^{***}$	$18,3 \pm 1,36^{**}$	$42,7 \pm 7,85^{**}$
	0,05	2,5	$15,0 \pm 2,36$	$25,0 \pm 2,36$	$104,0 \pm 6,53$
	0,01	0,5	$31,7 \pm 1,36^*$	$33,3 \pm 2,72$	$106,7 \pm 5,76$
Контроль	—	—	$23,3 \pm 2,72$	$33,4 \pm 2,70$	$112,0 \pm 6,53$

*Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно до контролю:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

активність мітохондріальних ензимів негативна сильна (відповідно, $\eta_2 = 0,845$ і $0,874$ та $\eta_2 = 0,924$ і $0,917$), а на відновну здатність – середньої сили ($\eta_2 = 0,633$ і $0,462$). На виживання сперміїв вплив наростаючих доз лосьйону негативний, а сила впливу підвищується зі збільшенням відсоткового вмісту міноксиду (відповідно, 5 % - $\eta_2 = 0,855$ і 10 % - $\eta_2 = 0,942$).

Висновки

1. Цитотоксична дія лосьйону, що містить міноксидил, залежить від його концентрації та дози і характеризується порушенням окисних процесів сперми, що проявляється зменшенням споживання кисню і пониженою відновною активністю.

2. При обґрунтуванні оцінки потенційної та реальної небезпеки розвитку віддалених ефектів лосьйону, що містить міноксидил, необхідно провести дослідження гонадотоксичного впливу на лабораторних тваринах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Трюб Ральф М. Сложный пациент трихолога: руководство по эффективному лечению алопеций и сопутствующих заболеваний / Ральф М. Трюб [пер. с англ. год ред. Н.Г. Баруновой, В.П. Ткачева] – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – С. 80.
2. Современные подходы к терапии алопеций / В.Р. Хайрутдинов, О.В. Антонова, Н.Е. Шестопалов [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – № 9. – 2015. – С. 4–8.
3. Український журнал дерматології, венерології, косметології / А.Д. Дюдюн, Н.М. Поліон, Е.Л. Кривенко [та ін.] – № 3 (46). – 2012. – С. 96.
4. Клестова З.С. Альтернативні методи досліджень *in Vitro* – елемент у системі біобезпеки держави / З.С. Клестова, А.М. Головка // Ветеринарна бібліотехнологія. – №25. – 2014. – С. 34–36.
5. Федосеева Т.А. Оценка токсичности синтетических моющих средств методом «*In Vitro*» на кратковременной суспензионной культуре – сперме быка / Т.А. Федосеева, Т.А. Меньшикова // Токсикологический вестник. – 2004. – №6. – С.17–19.
6. Лукьянова Л.Д. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние / Л. Д. Лукьянова, Б. С. Балмуханов, Л. Т. Уголев. — М.: Наука, 1982. — 262 с.
7. Штольц К.Ф. Амперометрическое определение ферроцианида в присутствии субклеточных структур / К. Ф. Штольц, И. М. Мосолова, Л. А. Дронова. Биохимические методы. — М.: Наука, 1980. — С. 147–150.
8. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв /М. В. Косенко, Б. М. Чухрій, І. Я. Коцюмбас [та ін.] Львів: 2007. — 186 с.
9. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В.В. Влізло, Р.С.Федорук, І.Б. Ратич [та ін.]; за ред. В. В. Влізло — Львів: Сполом, 2012. — 764 с.
10. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛОСЬОНА, СОДЕРЖАЩЕГО МИНОКСИДИЛ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-ОБЪЕКТА — СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ

Б.П. Кузьминов¹, Т.С. Зазуляк¹, Д.Д. Остапів², Н.Е. Юнак¹

¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина

²Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

РЕЗЮМЕ. Исследование показало торможение дыхательной активности, восстановительной способности и активности митохондриальных энзимов половых клеток, что приводит к снижению продолжительности выживания сперматозоидов на 54.8–70.4 %. Цитотоксическое действие лосьона, содержащего миноксидил, зависит от его концентрации и дозы, характеризуется нарушением окислительных процессов спермы, проявляется уменьшенным потреблением кислорода и пониженной восстановительной активностью.

Ключевые слова: миноксидил, алопеция, цитотоксическое влияние, сперматозоиды быков.

Надійшла до редакції 27.02.2019 р.