

Перевод статьи

Lenzi A., Lombardo F., Sgro`P., Salacone P., Caponecchia L. Dondero F. and Gandini L. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. Elsevier Science Inc. Fertility and Sterility 2003; February; 79: 2: 292–300.

Использование карнитиновой терапии для избранных случаев мужского бесплодия: двойное слепое перекрестное исследование

А. Ленци, Ф. Ломбардо, П. Сгро и др.

Реферат

Цель: определить эффективность терапии L-карнитином в избранных случаях мужского бесплодия.

Схема исследования: плацебо-контролируемое двойное слепое перекрестное исследование.

Место проведения: университетский поликлинический центр.

Пациенты: 100 бесплодных пациентов (возраст 20–40 лет) со следующими критериями включения по характеристикам сперматозоидов: концентрация $10\text{--}20 \times 10^6/\text{мл}$, общая подвижность 10–30 %, подвижность по направлению вперед < 15 %, атипические формы < 70 %, скорость 10–30 мкм/с, линейность < 4. Данное исследование закончили 86 пациентов.

Терапия: пациенты получали 2 г L-карнитина в день или плацебо. Схема исследования была следующей: 2 месяца без препаратов, 2 месяца терапии/плацебо, 2 месяца без препаратов и 2 месяца плацебо/терапии.

Основные измеряемые переменные: изменение в параметрах спермы, использованные в критериях включения пациентов, в частности, подвижность сперматозоидов.

Результаты: за исключением выбывших пациентов, было отмечено статистически достоверное улучшение качества спермы по сравнению с плацебо-группой по таким параметрам как концентрация сперматозоидов, общая подвижность и подвижность по направлению вперед. Увеличение подвижности по направлению вперед было более значительным у тех пациентов, у которых отмечались более низкие начальные показатели, т.е. 5×10^6 или 2×10^6 сперматозоидов,двигающихся по направлению вперед/общее количество сперматозоидов/мл.

Выводы: основываясь на контролируемом исследовании эффективности, терапия L-карнитином показала эффективность в улучшении качества семени, особенно в группах с низкими начальными показателями. Однако данные результаты должны быть подтверждены более обширными клиническими исследованиями и исследованиями in vitro.

Ключевые слова: фертильность, мужское бесплодие, олигозооспермия, сперма, сперматозоиды, терапия, L-карнитин, подвижность сперматозоидов, митохондрии.

Уровни рождаемости в западных странах быстро снижаются. Причины этого снижения очень сложны и включают, прежде всего, социологические изменения (например, урбанизация, загрязнение окружающей среды и пожилые родители). Было предположено, что значительное увеличение случаев бесплодия является следствием ухудшения качества спермы [1–4]. В действительности около 20 % пар вынуждены ждать более чем 12 месяцев (время, предложенное ВОЗ в качестве верхней границы нормы) до достижения беременности. Мужское бесплодие является причиной половины случаев бесплодия и на данный момент представляет собой огромную медицинскую и социальную проблему с точки зрения профилактики и терапии [5].

Мужчина может не подозревать о своем бесплодии до тех пор, пока его неспособность зачать ребенка при незащищенном половом акте не становится очевидной. Необходимость диагностики и терапии становится очевидной, если пара не может зачать ребенка в течение долгого периода времени и анализ спермы показывает дефицит сперматозоидов. За исключением определенных случаев с определенной и распознаваемой этиологией (генетической, гормональной, инфекционной и т.д.), одной из основных проблем является невозможность использования наших знаний о физиологии сперматогенеза и созревании сперматозоидов в научное обоснование для лечения мужского бесплодия [6–10]. Во многих случаях даже интенсивные клинические лабораторные исследования могут не дать достоверных результатов [5].

Был предложен ряд лекарств для лечения мужского бесплодия, связанного с олигоастенотератозооспермией (ОАТ) неизвестного генеза. Однако существует мало клинических исследований из-за трудностей с отбором пациентов и образованием достаточно большой группы для получения статистически достоверных результатов [11–22].

В результате как врачи общего профиля, так и специалисты (андрологи, эндокринологи, урологи и гинекологи) часто вынуждены использовать для улучшения качества сперматозоидов лекарства, сведения об эффективности которых основаны на отдельных случаях и не базируются на данных доказательной медицины.

В ранее проведенном клиническом исследовании был изучен эффект антиоксидантной терапии на созревание сперматозоидов и на микроокружение яичка и придатка яичка [16]. Были получены положительные результаты, основанные на возможном эффекте, оказываемом на сперматозоиды придатка яичка [23–25]. Таким образом, придаток яичка является возможной мишенью для терапии, действующей на сперматозоиды в случаях первичной ОАТ. Физиологическая роль придатка заключается в его действии на метаболизм сперматозоидов посредством множества соединений, секретируемых эпителием. Среди них выделяется карнитин, который накапливается в форме свободного и ацетилированного L-карнитина и используется сперматозоидами для β -окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях, являясь основными переносчиками ацильной группы к митохондриальному коферменту А [26–27]. Карнитин также действует на ДНК клетки и мембраны, защищая их от повреждения свободными кислородными радикалами [28].

В начале 90-х гг. было проведено пилотное неконтролируемое мультицентровое исследование эффективности L-карнитина в избранных случаях ОАТ, которое показало эффективность L-карнитина для увеличения подвижности сперматозоидов [29]. Более позднее исследование показало эффективность L-карнитина и L-ацетил-карнитина для терапии абактериального простатитовезикулэпидимита и увеличенной продукции свободных кислородных радикалов у мужчин с воспалениями полового тракта и нормальным уровнем лейкоцитов в сперме [30].

В данной работе представлены результаты рандомизированного плацебо-контролируемого двойного слепого перекрестного исследования терапии L-карнитином в группе бесплодных мужчин, страдающих ОАТ, отобранных в соответствии со строгими критериями.

Материалы и методы

Схема исследования

Исследование было одобрено и проведено под контролем министерства здравоохранения Италии и комитета по этике факультета медицины госпиталя Римского университета. Пациенты получали или L-карнитин (2 г карнитина сигма-тау перорально производства Помеция, Рим, Италия), или равный объем внешне неотличимого плацебо. Дозировка L-карнитина была выбрана в соответствии с данными предыдущих исследований [29] и наиболее распространенной дозировкой для других заболеваний, при которых была показана эффективность L-карнитина (заболевания почек, сердца, мышц и т.д.).

Схема исследования: 2 месяца без препаратов (вымывание), 2 месяца терапии/плацебо, 2 месяца без препаратов, 2 месяца плацебо/терапии и 2 месяца дальнейшего наблюдения. Контроль проводили в месяцах T-2, T-1, T0, T+2, T+4, T+6 и T+8. В соответствии с рекомендациями ВОЗ перед началом терапии (месяцы T-2, T-1, T0) для каждого пациента был проведен анализ трех

образцов спермы [31]. Для удобства пациентов и по этическим соображениям для каждого из контролей проводили анализ только одного образца в точках T+2, T+4, T+6 и T+8.

Для каждого из образцов были проведены следующие анализы: 1) полный микроскопический и компьютерный анализ спермы [31] для определения изменений в параметрах спермы и сперматозоидов; 2) измерение концентрации L-карнитина в сперме для определения возможной варибельности концентраций лекарств во время терапии; 3) определение в сперме концентрации α -гликозидазы [31] для определения возможной варибельности функционального индекса придатка яичка; 4) измерение потенциала липидного перекисного окисления спермы (LPO_s с помощью метода тиобарбитуратной кислоты) для изучения возможной варибельности мембран сперматозоидов [33]. Были также отмечены жалобы пациентов и возможные побочные эффекты.

В качестве основного параметра эффективности терапии было выбрано улучшение характеристик сперматозоидов. Среди таких параметров основным являлось увеличение подвижности сперматозоидов (как общей, так и по направлению вперед). Этот выбор был основан на ожидаемом эффекте L-карнитина на метаболизм сперматозоидов, а также наших предыдущих данных [29], подтвержденных другими исследованиями [30]. Хотя беременность не рассматривалась в качестве основной конечной точки исследования, так как в этом случае было бы сложно учесть множество факторов, влияющих на естественное оплодотворение и последующую беременность, нами были зафиксированы беременности, случившиеся в период исследования и предполагаемое время спонтанного оплодотворения (вычисленное по последнему овуляторному периоду женщины перед первым позитивным β -hCG тестом). Это было сделано для получения второго критерия эффективности и последующего включения результатов в будущие метаанализы, использующие параметр частоты зачатий. Все микроскопические анализы спермы для каждого пациента были выполнены специалистом, использующим стандартные процедуры ВОЗ (31) и наши собственные стандарты. Наша лаборатория аккредитована Итальянским институтом здоровья в качестве ведущей лаборатории для национального внешнего контроля качества (EQC) в семинологии [34] и аккредитована международной организацией EQC [United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UKNEQAS)]. Компьютерный анализ подвижности спермы (CASA) был проведен с использованием стандартов ВОЗ (31) и наших собственных стандартов (35) с использованием системы HTM-Ivos (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA).

Образцы были получены с помощью мастурбации после 3–5-дневного периода сексуального воздержания. Рассматривались следующие параметры спермы: объем (мл) и pH эякулята, концентрация сперматозоидов ($n \times 10^6/\text{мл}$), общее количество сперматозоидов ($n \times$ общий объем эякулята), общая подвижность и подвижность по направлению вперед (% через 1 час после эякуляции), морфология сперматозоидов (% атипичных форм), скорость сперматозоидов (мкм/с) и линейность (индекс).

Количество подвижных сперматозоидов в 1 мл и подвижных сперматозоидов в эякуляте, а также сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, в 1 мл и сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, в эякуляте, было вычислено умножением процента подвижных сперматозоидов и сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, на концентрацию сперматозоидов в мл или общее количество сперматозоидов в эякуляте.

Исследуемая группа и критерии включения

Исследуемая группа была выбрана коллективом андрологов из более чем 1000 пациентов, посещавших амбулаторное отделение (с конца 1998 по начало 2000 г.) для первичной консультации по мужскому бесплодию. Нами было выбрано 100 пациентов на основании размера выборки, необходимой для получения статистически достоверных результатов. У всех участников было получено информированное письменное согласие. Общими критериями включения были возраст от 30 до 40 лет, бесплодие, продолжавшееся более чем 2 года, и регулярные половые акты с гинекологически нормальным партнером, без явных факторов женского бесплодия, определенных в клинике (бифазной базальной температуры тела, Р-оценки в фазе желтого тела, ультразвукового исследования яичников и матки, гистеросальпингограммы). Частными критериями включения

были отсутствие: 1) общих эндокринологических заболеваний (по результатам клинического обследования и общих и гормональных анализов); 2) отсутствие крипторхизма в настоящее время или ранее; 3) отсутствие генитальных инфекций или обструкции полового тракта по данным культуры сперматозоидов, уретрального мазка на хламидии и биохимического исследования плазмы семени; 4) отсутствие варикоцеле или гипертрофии яичка (по данным ультразвукового исследования и исследования цветной доплеровской эхографии); 5) или отсутствие антител на сперматозоиды (исследование по присутствию в сыворотке или связыванию со сперматозоидами) [36]. От пациентов требовалось следовать стандартной диете, для того чтобы исключить фактор вариативности содержания L-карнитина в еде. Ни у одного из пациентов не был отмечен дефицит L-карнитина.

Семинологическими критериями включения были: реологические характеристики в пределах нормы (внешний вид, плотность, конденсация), нормальный объем, pH, концентрация сперматозоидов $10\text{--}20 \times 10^6$, общая подвижность $10\text{--}30\%$, подвижность по направлению вперед $< 15\%$, атипичные формы $< 70\%$, количество лейкоцитов в семени $< 1 \times 10^6/\text{мл}$, скорость и линейность сперматозоидов (по данным CASA) $10\text{--}30$ мкм/с и < 4 соответственно. Данные верхние и нижние пределы позволяли включить случаи умеренной олигоастеноспермии и были выбраны из-за возможного влияния L-карнитина на энергетический метаболизм сперматозоидов и защиту от РФК. Нижние пределы позволили исключить тяжелые случаи ОАТ, связанные с неизлечимым первичным или вторичным повреждением яичек, поскольку такие повреждения затрудняют наблюдение позитивных и негативных эффектов L-карнитина на характеристики сперматозоидов. По нашим данным, проведенное исследование является первым плацебо-контролируемым исследованием использования карнитина для терапии ОАТ.

Для включения в исследование пациенты должны были соответствовать критериям включения в момент первого контроля (Т-2) и в течение следующих двух контролей перед началом исследования (Т-1, Т0). Между семинологическими характеристиками первых двух измерений не должно было наблюдаться статистически достоверной разницы (Т-2, Т-1, Т0).

Статистический анализ

Для каждой клинической и семинологической характеристики для каждого контроля были вычислены среднее и СО. Затем был проведен анализ вариативности в первых трех пробах с вымыванием, для определения разницы между пробами. Для определения однородности контрольной и экспериментальной групп перед началом испытания был использован t-тест Стьюдента. Эффект переноса был оценен с помощью метода Гривзла [37] с использованием критерия суммы рангов Вилкоксона ($\alpha = 0,05$) со следующими основными факторами: пациент (код), последовательность (терапия/плацебо или плацебо/терапия), контроль (время) и терапия (терапия или плацебо).

Для сравнения реального влияния плацебо или терапии на улучшение характеристик сперматозоидов и для уменьшения значения вариативности исходной линии у пациентов был проведен первичный и вторичный анализ эффективности, с использованием разницы (Δ) между конечной точкой и исходной линией в каждой временной точке. Для этого использовался критерий суммы рангов Вилкоксона для перекрестных исследований ($\alpha = 0,05$) для терапии (плацебо или контроль) и контроля в качестве основных факторов. Параметр Δ был получен вычислением разницы для каждой характеристики сперматозоидов в каждый период времени (т. е. [переменная в Т+2 – переменная в Т0] и [переменная в Т+6 – переменная в Т+4] соответственно). Данные вычисления были проведены как для исходных данных (например, процент подвижных сперматозоидов), так и для абсолютных значений в перерасчете на миллион сперматозоидов в 1 мл и сперматозоиды в эякуляте, которые были получены умножением концентрации сперматозоидов в 1 мл и сперматозоидов в эякуляте на процент общей подвижности и подвижности по направлению вперед. Последний параметр был использован для построения диаграмм.

Для исключения резкого снижения качества спермы во время периодов вымывания, за которыми последовали бы резкое улучшение, не связанное с терапией, были оценены случаи резко

отклоняющихся значений. Такие эффекты наблюдались у 5 пациентов в период от T-2 до T+2. Были добавлены следующие критерии исключения: исключались пациенты с резким снижением подвижности (с 30 до 10 %) в период от T-2 до T-0 и с резким эффектом от терапии (> 30 %) между T0 до T+2.

Был проведен отдельный анализ эффективности для значения Δ и абсолютного количества подвижных сперматозоидов в подгруппах с более критическими показателями подвижных сперматозоидов и сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, на эякулят и на мл (< 5 и $< 2 \times 10^6$ соответственно).

Для оценки достоверности разницы медиан у пациентов, получающих плацебо и L-карнитин, в первый период терапии был также использован критерий суммы рангов Вилкоксона. Это было сделано для дальнейшего анализа вопросов, связанных с перекрестной схемой исследования и длительности периода вымывания.

Разница между плацебо и L-карнитином, выраженная в количестве пациентов с улучшением характеристик сперматозоидов, была оценена с помощью точного критерия Фишера. Точный критерий Фишера также был использован для оценки связи между концентрацией свободного L-карнитина в сперме и вариабельности характеристик сперматозоидов.

Результаты

86 пациентов из 100 закончили данное исследование. В период наблюдения было зафиксировано 8 беременностей. Все зачатия произошли в период терапии L-карнитином (6 во время первого периода терапии, 2 во время первого периода терапии после плацебо). Из 14 пациентов, не завершивших исследование, 4 решили воспользоваться ЭКО (2 во время терапии, 2 во время плацебо периода), 6 не вернулись на второй раунд терапии (3 после периода терапии и 3 после периода плацебо) и 4 из 8 пациентов, которые смогли вызвать беременность, решили прекратить лечение (после периода терапии).

В таблице 1 представлены данные об объеме спермы, концентрации сперматозоидов, подвижности и морфологии в предтерапевтический период. Эти три анализа, проведенные до лечения, не показали статистически достоверной разницы в вариабельности повторных измерений для всех пациентов (3×100 пациентов). Таким образом, параметры, полученные в период T0, были приняты в качестве исходной линии для дальнейшего сравнения.

Достоверных различий в характеристиках спермы между группами пациентов в момент T0 не наблюдалось. Более того, анализ эффекта переноса показал, что последовательность терапии и плацебо также не оказывает достоверного влияния на эти характеристики. В частности, анализ подвижности и подвижности по направлению вперед показал, что коэффициент $P = 0,461$ и $0,526$ соответственно. Это позволило использовать обе последовательности для дальнейшего анализа. Т.к. каждый пациент получал как терапию, так и плацебо, то всего было 172 результата для сравнения.

Таблица 1. Анализ вариабельности для повторных измерений в 3 предтерапевтических периодах вымывания для всех пациентов (среднее \pm СО и значение P)

| | T-2 | T-1 | T0 | P |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| Объем спермы (мл) | 3,28 \pm 1,56 | 3,21 \pm 1,50 | 3,25 \pm 1,58 | 0,945 |

| | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|-------|
| Концентрация сперматозоидов ($n \times 10^6/\text{мл}$) | 15,88 ± 3,17 | 16,04 ± 4,19 | 16,17 ± 4,66 | 0,890 |
| Общая подвижность (%) | 25,35 ± 5,51 | 24,14 ± 5,0 | 25,51 ± 5,18 | 0,128 |
| Подвижность по направлению вперед (%) | 12,53 ± 3,30 | 11,67 ± 3,50 | 12,58 ± 3,47 | 0,126 |
| Атипические формы | 68,57 ± 2,97 | 68,06 ± 3,07 | 68,17 ± 2,68 | 0,441 |

Lenzi A. L-carnitine therapy in male factor infertility. Fertil Steril 2003.

У пяти пациентов в момент T0 было отмечено нижнеграничное значение подвижности (т.е. 10 %), с понижением в течение периода вымывания (с 30 % в T-2 до 10 % в T0), и резкое увеличение (>30 %) за период терапии с T0 до T+2. Эта вариабельность была независимой от терапии: 3 пациента получали плацебо и 2 L-карнитин в первый период. Как первый, так и второй период терапии для этих пациентов был исключен из дальнейшего анализа. Таким образом, было исключено 10 циклов терапии/плацебо и общее количество циклов для анализа составило 162.

Для плацебо-группы также было отмечено улучшение характеристик сперматозоидов. Статистический анализ эффективности, при котором сравнивалась Δ характеристик сперматозоидов до и после терапии и плацебо, позволил исключить влияние значений исходной линии и вычислить настоящую разницу между терапией и плацебо.

Первый анализ разницы (Δ) в общей подвижности и подвижности по направлению вперед с помощью критерия Вилкоксона по первому периоду и полному перекрестному циклу для всех 172 циклов терапии/плацебо не выявил достоверных различий, хотя улучшение в подвижностях было большим в терапевтической группе, чем в группе плацебо.

Однако при исключении 5 пациентов с граничными значениями подвижности разница между плацебо и терапией была достоверной ($p = 0,4$ для общей подвижности и $p = 0,5$ для подвижности по направлению вперед) (табл. 2). Сходные достоверные различия, при исключении 5 граничных пациентов, были отмечены для концентрации сперматозоидов ($P = 0,1$) линейности, измеренной с помощью CASA ($P = 0,3$).

Не было отмечено статистически достоверных различий при анализе 172 или 162 циклов в объеме спермы, скорости сперматозоидов (CASA), концентрации α -гликозидазы, LPOp или морфологии сперматозоидов, хотя увеличение скорости было большим в терапевтической группе.

На рисунках 1 и 3 показано увеличение количества подвижных сперматозоидов/мл и сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/мл, выраженного в абсолютных значениях миллионов подвижных сперматозоидов/эякулят и их Δ -значений. Таким образом, исключается вариабельность, обусловленная разницей в объеме спермы. Полученная разница по критерию Вилкоксона была статистически достоверна ($P = 0,08$ и $P = 0,06$).

Увеличение Δ подвижности по направлению вперед в терапевтический период было более достоверным для пациентов с более критическими начальными значениями – т.е. $< 5 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, на эякулят (51 пациент), и особенно $< 2 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/мл (71 пациент).

Таблица 2. Вариабельность в концентрации сперматозоидов ($n \times 10^6$), их общей подвижности и подвижности по направлению вперед (%) и линейности (индекс) во время терапии (плацебо/терапия или наоборот) с исключением граничных данных пяти пациентов (Δ и P значения по критерию Вилкоксона для 162 циклов терапии/плацебо)

| | Период 1 (от T0 до T+2) | | | | Период 2 (от T+4 до T+6) | | | |
|--|-------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Δ | $\Delta [(T+2)-$ | $\Delta [(T+2)-$ | $\Delta [(T+2)-$ | $\Delta [(T+6)-$ | $\Delta [(T+6)-$ | $\Delta [(T+6)-$ | $\Delta [(T+6)-$ |

| | [(T+2)-T0] | T0] | T0] | T0] | (T+4)] | (T+4)] | (T+4)] | (T+4)] |
|------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Терапия | Общая подвижность | Подвижность по направлению вперед | Концентрация сперматозоидов | Линейность сперматозоидов | Общая подвижность | Подвижность по направлению вперед | Концентрация сперматозоидов | Линейность сперматозоидов |
| L-карнитин | 11,0 ^a | 16,4 ^b | 9,0 ^c | 0,6 ^d | 3,4 ^a | 4,5 ^b | 3,7 ^c | 0,2 ^d |
| Плацебо | 8,8 ^a | 13,9 ^b | 5,3 ^c | 0,4 ^d | -0,1 ^a | 0,7 ^b | -0,7 ^c | -0,2 ^d |

^a – P = 0,04, критерий Вилкоксона для перекрестного исследования.
^b – P = 0,05, критерий Вилкоксона для перекрестного исследования.
^c – P = 0,01, критерий Вилкоксона для перекрестного исследования.
^d – P = 0,03, критерий Вилкоксона для перекрестного исследования.
Lenzi A. L-carnitine therapy in male factor infertility. Fertil Steril 2003.

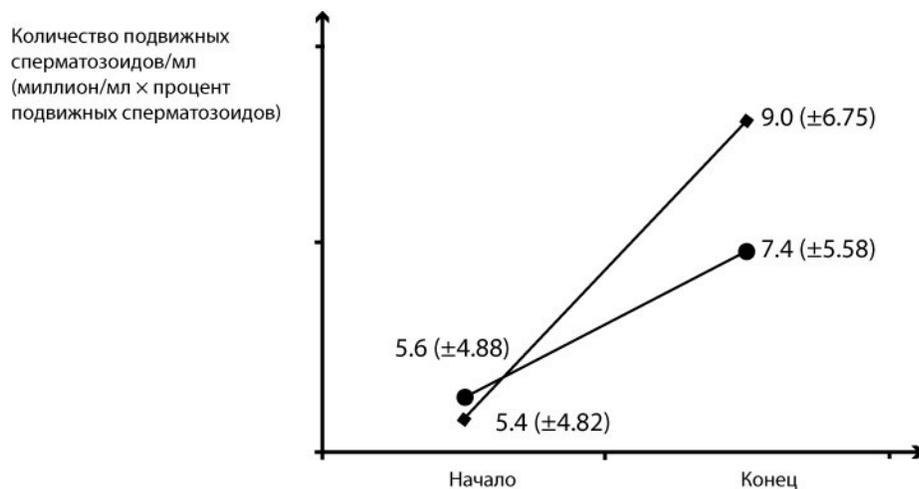


Рисунок 1. На графике представлена разница (Δ) в абсолютных значениях, выраженных в общем количестве подвижных сперматозоидов в 1 мл, от начала до конца периода терапии (линия с ромбом) или плацебо (линия с кругом). Значения – средние \pm CO (P = 0,08)

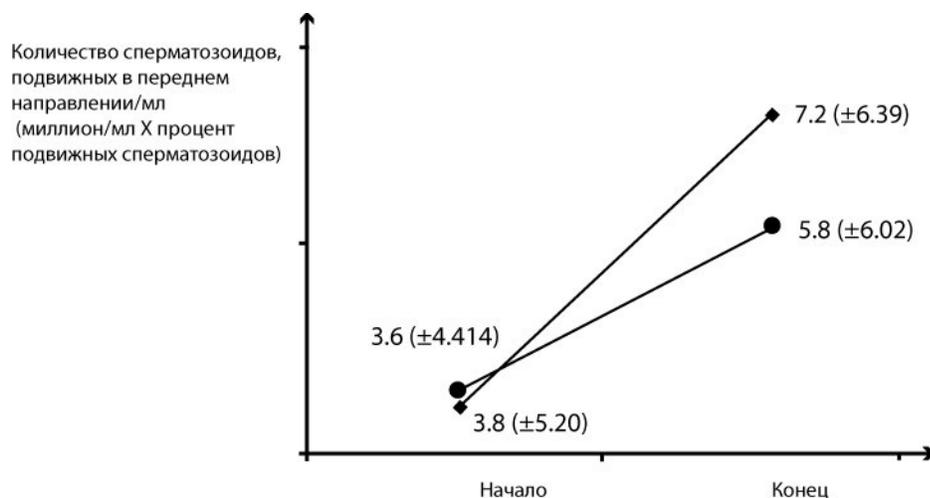


Рисунок 2. На диаграмме представлена разница (Δ) в абсолютных значениях, выраженных в общем количестве сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/мл, от начала до конца периода терапии (линия с ромбом) или плацебо (линия с кругом). Значения – средние \pm СО ($P = 0,06$)

Как показано в таблицах 3 и 4, между периодами плацебо и терапии существует достоверное увеличение в количестве подвижных сперматозоидов и сперматозоидов, подвижных по направлению вперед ($P = 0,3$ и $P = 0,2$ соответственно), в этих подгруппах. Сравнение количества пациентов с улучшением в период терапии с периодом плацебо с помощью точного критерия Фишера показало, что такое улучшение статистически достоверно для групп пациентов с $< 5 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, на эякулят, $< 2 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/мл ($P = 0,4$ и $P = 0,04$ соответственно).

Таблица 3. Вариабельность количества сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, в течение периода терапии (плацебо/терапия или наоборот) у 55 пациентов с $< 5 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/эякулят (среднее \pm СО абсолютного количества сперматозоидов подвижных по направлению вперед, в миллионах, Δ и P -значения по критерию Вилкоксона)

| | Период 1 (от T0 до T+2) | | | Период 2 (от T+4 до T+6) | | |
|------------|-------------------------|-----------------|----------|--------------------------|-----------------|----------|
| | T0 | T+2 | Δ | T+4 | T+6 | Δ |
| L-карнитин | 2,9 \pm 1,2 | 14,1 \pm 11,0 | 11,2 | 2,0 \pm 1,7 | 17,4 \pm 28,0 | 15,4 |
| Плацебо | 3,3 \pm 1,1 | 10,2 \pm 7,3 | 6,9 | 2,3 \pm 1,4 | 6,3 \pm 7,8 | 3,9 |

$P=0,03$, критерий Вилкоксона для перекрестных исследований.
Lenzi A. L-carnitine therapy in male factor infertility. Fertil Steril 2003.

Наконец, даже если увеличение концентрации карнитина в семени во время терапии не было достоверным, точный критерий Фишера показал достоверную связь между характеристиками подвижности (общая и в переднем направлении) и концентрации карнитина в сперме у пациентов с улучшением этих параметров ($P < 0,0001$, $P = 0,14$, $P = 0,45$ соответственно).

Таблица 4. Вариабельность количества сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, в течение периода терапии (плацебо/терапия или наоборот) у 71 пациента с $< 2 \times 10^6$ сперматозоидов, подвижных по направлению вперед/мл (среднее \pm СО абсолютного количества)

сперматозоидов, подвижных по направлению вперед, в миллионах, Δ и P-значения по критерию Вилкоксона)

| | Период 1 (от T0 до T+2) | | | Период 2 (от T+4 до T+6) | | |
|------------|-------------------------|-----------|----------|--------------------------|-----------|----------|
| | T0 | T+2 | Δ | T+4 | T+6 | Δ |
| L-карнитин | 1,5 ± 0,4 | 6,2 ± 3,9 | 4,7 | 1,0 ± 0,6 | 5,5 ± 8,2 | 4,5 |
| Плацебо | 1,4 ± 0,4 | 5,0 ± 4,0 | 3,6 | 1,0 ± 0,7 | 2,4 ± 2,8 | 1,4 |

P=0,02, критерий Вилкоксона для перекрестных исследований.
Lenzi A. L-carnitine therapy in male factor infertility. Fertil Steril 2003.

Обсуждение результатов

В последние годы было предложено множество методов ассистированной репродукции для решения проблемы мужского бесплодия. Эти методы, вместо того чтобы стать смертельным ударом для андрологии, способствовали исследованию функции сперматозоидов. Однако они также стали тормозом для развития новых стратегий для терапии мужского бесплодия.

Клинические контролируемые исследования в этой области имеют как общие проблемы и методы с другими клиническими исследованиями, так и специфичные проблемы: критерии отбора пациентов, согласие пациентов на период плацебо, анализируемые параметры, спонтанная вариабельность характеристик сперматозоидов, не до конца стандартизированные функциональные тесты, произвольные частоты беременностей (зависящие от «вклада» женщины) и высокая вероятность *in vitro* оплодотворения (слишком высокая для оценки влияния терапии на функцию сперматозоидов).

К сожалению, по этим причинам многие лекарства используются в терапии без достаточного основания: такие средства прописываются одно за другим без какого-либо эффекта, и любые улучшения могут быть или только кажущимся, или вызванными естественными флуктуациями качества семени. Некоторые из таких методов терапии были описаны в литературе и подвергались обширной критике [38]. Среди заявленных целей такого лечения – улучшение сперматогенеза, улучшение качества популяций сперматозоидов, влияние на созревание сперматозоидов и энергетический метаболизм, а также на микроокружение яичка и придатка.

Среди мишеней таких терапий одна из наиболее рациональных и интересных – это постгонадное созревание сперматозоидов, происходящее в основном в эпидидимальной жидкости, где сперматозоиды не подвергаются влиянию сложной и не до конца понятной гормональной системы яичек. В придатке эпителий удаляет некоторые тестикулярные вещества и синтезирует собственные специфические вещества, влияющие на созревание и подвижность сперматозоидов. Среди таких веществ выделяется L-карнитин, который забирается эпителием из крови, транспортируется в эпидидимальную жидкость к сперматозоидам, в которых он аккумулируется в виде свободного и ацетилированного L-карнитина. Эта небольшая четырехчленная молекула является одним из наиболее концентрированных водорастворимых полярных веществ, присутствующих в эпидидимальной жидкости (в сотни раз концентрированнее, чем в плазме крови).

Свободный L-карнитин (3-гидрокси-4-N-триметиламиномасляная кислота) был впервые выделен из мышечной ткани быка в 1905 г., и его химическая структура была точно установлена в 1927 г. [26]. В 1963 г. Фритц установил, что L-карнитин участвует в бета-окислении длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях. Для транспортировки в митохондрии жирные кислоты должны быть активированы, т.е. они должны быть присоединены к коферменту А с образованием ацил-кофермента А. Длинноцепочечные молекулы ацил-кофермента А не могут транспортироваться через внутреннюю митохондриальную мембрану, поэтому для них необходима особая ферментативная транспортная система. После перемещения ацильной группы внутрь митохондрии ацил-карнитин транспортирует ее к митохондриальному коферменту А и в виде свободного карнитина вступает в новый транспортный цикл [26].

Карнитин также действует как «средство от старения», защищая клеточные мембраны от повреждения свободными радикалами кислорода. Он предотвращает окисление белков и окислительное повреждение лактата и пирувата. У людей 75 % карнитина поступает с диетой, так же как и другие водорастворимые вещества, и еще 25 % синтезируется из лизина и метионина, хотя фермент, катализирующий превращение 4-бутиробетаина в L-карнитин – 4-бутиробетаингидроксилаза, присутствует только в ограниченном количестве тканей [27].

На основании данных о действии карнитина на клеточный метаболизм и данных предыдущих мультицентровых плацебонеконтролируемых исследований [29] и недавних данных о роли карнитина в некоторых андрогенных патологиях [30] L-карнитин был выбран в качестве возможного терапевтического агента, влияющего на характеристики спермы, для проведения данного исследования (двойное слепое, плацебо-контролируемое, перекрестное). Были использованы двухмесячные периоды терапии/плацебо для выявления прямого эффекта карнитина на сперматогенез и сперматозоиды. Выбранное количество пациентов, учитывая строгие критерии отбора и количество анализов одного пациента, позволяет утверждать, что исследование достоверно, с учетом хорошо известных проблем, связанных с проведением исследований такого рода.

Мы старались исключить влияние возможных систематических ошибок на результаты исследования. Предтерапевтический период, в течение которого проводилось 3 анализа спермы, позволил оценить терапевтический эффект, исключив возможность случайной вариативности характеристик спермы [31]. Двухмесячные периоды вымывания между циклами терапии и плацебо (и наоборот) позволили исключить ложное приписывание их эффектов. Однако для исключения возможного сомнения в схеме перекрестного исследования или длительности периодов вымывания был также проведен анализ с использованием критерия Вилкоксона для периодов перекреста и отдельно для первого периода.

Во-первых, были отмечены улучшения в характеристиках спермы в группе плацебо, что связано со статистическим эффектом регрессии к среднему. Первый раунд терапии был эффективнее второго. Эти результаты свидетельствуют о важности психологического элемента в мужском бесплодии, связанного с новизной опыта лечения, доступностью медицинского персонала и консультирования. Эти эффекты особенно сильны в первую фазу терапии.

Во-вторых, не было отмечено увеличения концентрации L-карнитина в сперме в течение терапевтических периодов. Однако из других областей медицины хорошо известно, что активность карнитинов не всегда связана с их концентрацией в сыворотке биологических жидкостей [26, 28]. Т. к. они действуют на внутриклеточном уровне, необходимо изучить возможные молекулярные и метаболические изменения, связанные с терапией. Это особенно важно для такой биологической жидкости, как сперма, где наблюдается огромная концентрация карнитина. Поэтому не стоит удивляться, что концентрация карнитина не претерпела достоверных изменений. Увеличение количества карнитина в сперме или сыворотке, возможно, происходит через некоторое время после перорального приема, однако фармакокинетическими методами не удалось показать такое увеличение [26].

Однако, хотя увеличение концентрации L-карнитина в сперме не было статистически достоверным из-за изначально высокой концентрации, было отмечено достоверное улучшение характеристик спермы у пациентов, получавших терапию, по сравнению с теми, кто получал плацебо. Это улучшение статистически связано с вариативностью концентрации карнитина в сперме. Это означает, что хотя изменения в концентрации семянального карнитина статистически недостоверны, улучшение в параметрах сперматозоидов связано с небольшими изменениями в уровне семянального карнитина. В частности, в соответствии с тестом Фишера существует высокая корреляция между изменениями в концентрации карнитина и концентрацией сперматозоидов ($P < 0,0001$), что может свидетельствовать: увеличение происходит в основном во внутриклеточной концентрации карнитина.

Более того, отсутствие достоверных изменений в концентрации α -гликозидазы в сперме подтверждает отсутствие общего улучшения функции придатка яичка. К тому же недостоверные

изменения в значениях LPOp свидетельствуют об отсутствии прямого эффекта на состав мембранных жирных кислот. Возможно, из-за короткого терапевтического периода большее значение, по сравнению с влиянием на структуру мембран и их защиту от РФК, имеет антиоксидативное влияние L-карнитина на микроокружение.

С прогностической точки зрения на фертильность наиболее интересен эффект карнитина на подвижность сперматозоидов. Данный эффект обусловлен влиянием L-карнитина на метаболизм и его антиоксидантной активностью [39]. При использовании параметров процент подвижных сперматозоидов в 1 мл и процент подвижных сперматозоидов в эякуляте для анализа эффектов у всех 86 пациентов разница между плацебо и терапией была статистически недостоверна.

Улучшение становилось статистически достоверным при исключении 5 пациентов, у которых наблюдались спонтанные изменения в подвижности сперматозоидов в течение предтерапевтического периода. Эти изменения были слишком велики, для того чтобы исключить временную несимптоматическую патологию, за которой следовало внезапное и значительное улучшение в первом раунде терапии, не связанное с действием самой терапии. Более того, результаты становились еще более достоверными при использовании абсолютного значения общего количества сперматозоидов на количество подвижных или подвижных в прямом направлении на эякулят. Это позволило исключить влияние вариабельности объема спермы, которая не зависит от терапии. Достоверное увеличение в линейности сперматозоидов и недостоверные изменения в скорости сперматозоидов свидетельствуют о том, что карнитин оказывает эффект на качественные параметры сперматозоидов, а не на их кинетику.

Любопытен тот факт, что наибольший эффект наблюдался у пациентов с изначальными значениями подвижности по направлению вперед. Эффект для этих подгрупп интересен как с теоретической, так и с клинической точки зрения. Во-первых, можно предположить, что даже при сниженном сперматогенезе биохимические нарушения в энергетическом метаболизме митохондрий у таких пациентов могут быть скорректированы высокими дозами внутриклеточного карнитина. Во-вторых, эти результаты свидетельствуют о возможной пользе L-карнитина при тяжелых формах ОАТ (т.е. с подвижностью сперматозоидов <10 %), которые не были включены в данное исследование.

В то время как эффект карнитина на подвижность сперматозоидов был ожидаем, в свете метаболического механизма действия карнитина влияние лечения на концентрацию сперматозоидов был неожиданным. Свойства карнитина не позволяют предполагать того, что он может действовать на первых этапах сперматогенеза. Более того, выбранный терапевтический период (2 месяца) был недостаточно долгим, для того чтобы повлиять на полный цикл сперматогенеза (75 дней). Возможно, что данный эффект обусловлен действием препарата на взаимодействие сперматозоидов и клеток Сертоли, или на постмейотические фазы сперматогенеза (например, на митохондриальную функцию или стабильность хроматина у сперматоцитов и спарматид), или на улучшение гомеостаза и качества микроокружения, сокращение фагоцитоза гамет и увеличение количества эякулируемых сперматозоидов.

Отсутствие влияния на морфологию сперматозоидов, которая рассматривается как один из важных индикаторов эффективности сперматогенеза, подтверждает теорию о посттестикулярном воздействии.

Наконец, хотя достижение беременности не рассматривалось как конечная точка данного исследования, из-за множества факторов, влияющих на естественное оплодотворение и последующую беременность, 8 естественных беременностей, произошедших во время терапевтического периода в группе пациентов с долговременным бесплодием, позволяют предположить, что карнитины положительно влияют на вероятность оплодотворения. Эти данные свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований в этом направлении.

Для подтверждения всего вышеизложенного также необходимо изучить влияние карнитина на метаболизм мужских гамет *in vitro*, с помощью молекулярных и цитологических методов, а также произвести более длительные и мультицентровые клинические испытания.

В заключение мы рекомендуем проходить андрологическую подготовку всем клиническим специалистам по репродукции и врачам общего профиля для того, чтобы уметь распознавать и лечить патологии, ассоциированные со снижением мужской фертильности, т. е. крипторхизм, варикоцеле, заболевания, передающиеся половым путем, факторы, связанные с окружающей средой, работой и образом жизни [40–43]. Если андрогенные патологии не выявляются, следует использовать только те методы терапии, которые успешно прошли клинические испытания [9]. Лечение L-карнитином, представленное в данном исследовании, показало интересное положительное влияние на параметры спермы и нуждается в дальнейшем изучении.

Литература

1. Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *Br Med J* 1992; 305: 609–13.
2. Auger J., Kunstmann J.M., Czyglik F., Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995; 332: 281–5.
3. Gandini L., Lombardo F., Culasso F., Dondero F., Lenzi A. Myth and reality of the decline in semen quality: an example of the relativity of data interpretation. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 402–11.
4. Swan S.H., Elkin E.P., Fenster L. The question of declining sperm density revisited, an analysis of 101 studies published 1934–1996. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 961–6.
5. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Rowe P., Comhaire F., Hargreave B., Mahmoud A., eds. Cambridge: Cambridge University Press: 2000: 37–60.
6. Nieschlag E. Care for the infertile male. *Clin Endocrinol* 1993; 38: 123–33.
7. O'Donovan P.A., Vandekerckhove P., Lilford R.J., Hughes E. Treatment of male infertility: Is it effective? Review and Meta-analyses of published randomized controlled trials. *Hum Reprod* 1993; 8: 1209–22.
8. Kamischke A., Nieschlag E. Analysis of medical treatment of male infertility. *Hum Reprod* 1999; 14(Suppl 1): 1–23.
9. Adamopoulos D.A. Present and future therapeutic strategies for idiopathic oligozoospermia. *Int J Androl* 2000; 23: 320–31.
10. Oehninger S. Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. *J Androl* 2000; 21: 814–21.
11. Scottish Infertility Group. The effect of clomiphene citrate and vitamin C for male infertility: a randomized trial. *Brit J Urol* 1982; 54: 780–4.
12. Scottish Infertility Group. The effect of mesterolone versus vitamin C for male infertility: a randomized trial. *Brit J Urol* 1984; 56: 740–4.
13. Knuth U.A., Honingl W., Bals-Pratsch M., Schleicher G., Nieschlag E. Treatment of severe oligozoospermia with hCG/hMG, a placebo-controlled, double blind trial. *J Clin Endoc Metab* 1987; 65: 1081–7.
14. World Health Organization. Mesterolone and idiopathic male infertility, a double blind study. *Int J Androl* 1989; 12: 254–9.
15. World Health Organization. A double-blind trial of clomiphene citrate for the treatment of idiopathic male infertility. *Int J Androl* 1992; 15: 299–307.
16. Lenzi A., Culasso F., Gandini L., Lombardo F., Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod* 1993; 8: 1657–62.
17. Keck C., Behre H.M., Jockenhövel F., Nieschlag E. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 1994; 9: 325–9.
18. Kessopoulou E., Powers H.J., Sharma K.K., Pearson M.J., Russell J.M., Cooke I.D. et al. A double blind randomized placebo controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril* 1995; 64: 825–31.
19. Vandekerckhove P., Lilford R., Hughes E. The medical treatment of idiopathic oligo/asthenospermia, androgens (mesterolone or testosterone) versus placebo or no treatment. In: Lilford R., Hughes E., Vandekerckhove P., eds. Subfertility module of the Cochrane database of systematic reviews. Oxford: The Cochrane Library, Update Software, 1996.
20. Vandekerckhove P., Lilford R., Hughes E. The medical treatment of oligo/asthenospermia, anti-oestrogens (clomiphene or tamoxifen) versus placebo or no treatment. In: Lilford R., Hughes E., Vandekerckhove P., eds. Subfertility module of the Cochrane database of systematic reviews. Oxford: The Cochrane Library, Update Software, 1998.
21. Kamischke A., Behre H.M., Bergmann M., Simoni M., Schafer T., Nieschlag E. Recombinant human follicle stimulating hormone for treatment of male idiopathic infertility: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 1998; 13: 596–603.
22. Rolf C., Cooper T.G., Yeung C.H., Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia a moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebocontrolled, double blind study. *Hum Reprod* 1999; 14: 1028–33.

23. Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Lombardo F., Terminali O., Passi S. et al. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994; 9: 2044–50.
24. Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F. Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acid considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 246–56.
25. Lenzi A., Gandini L., Picardo M. A rationale for glutathione therapy. In debate on: is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? *Hum Reprod* 1998; 13: 1419–22.
26. Frenkel R.A., Mc Garry J.D., eds. Carnitine biosynthesis, metabolism and function. [Italian edition] New York: Academic Press, 1984.
27. Peluso G., Nicolai R., Reda E., Benatti P., Barbarisi A., Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 2000; 182: 339–50.
28. Arduini A. Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants? *Am Heart J* 1992; 123: 1726–7.
29. Costa M., Canale D., Filicori M., D'Iddio S., Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia, a multicenter study. *Andrologia* 1994; 26: 155–9.
30. Vicari E., Calogero A.E. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis. *Hum Reprod* 2001; 16: 2338–42.
31. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
32. Soufir J.C., Marson J., Jouannet P. Free L-carnitine in human seminal plasma. *Int J Androl* 1981; 4: 388–97.
33. Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183–97.
34. Gandini L., Menditto A., Chiodo F., Lenzi A. Italian pilot study for an external quality control scheme in semen analysis and antisperm antibodies detection. *Int J Androl* 2000; 23: 1–3.
35. Lenzi A. Computer-aided semen analysis (CASA) 10 years later, a test-bed for the European scientific andrological community. *Int J Androl* 1997; 20: 1–2.
36. Dondero F., Gandini L., Lombardo F., Salacone P., Caponecchia L., Lenzi A. Antisperm antibody detection: 1. Methods and standard protocol. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 218–23.
37. Bolton S. Pharmaceutical statistics practical and clinical application. New York: Marcell Dekker, 1997: 410–5.
38. Nieschlag E., Leifke E. Empirical therapies for male idiopathic infertility. In: Nieschlag E., Behre G., eds. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer Verlag, 1997: 313–24.
39. Ruiz-Pesini E., Alvarez E., Enriquez J.A., Lopez-Perez M.J. Association between seminal plasma carnitine and mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 2001; 24: 335–40.
40. Comhaire F. Clinical andrology: from evidence-base to ethics. The «E» quintet in clinical andrology. *Hum Reprod* 2000; 15: 2067–71.
41. Radford J.A. Is prevention of sterility possible in men? *Ann Oncol* 2000; 11(Suppl 3): 173–4.
42. Sandlow J.I. Shattering the myths about male infertility. Treatment of male factors may be more successful and cost-effective than you think. *Postgrad Med* 2000; 107: 235–9.
43. Falcone T. What the internist needs to know about infertility. *Cleve Clin J Med* 2001; 68: 65–72.