

PharmaMed®

## Плацебо-контролируемое двойное слепое рандомизированное исследование применения L-карнитина, ацетил-L-карнитина или комбинации L-карнитина и ацетил-L-карнитина у мужчин с идиопатической астенозооспермией\*

Giancarlo Balercia<sup>1</sup>, M.D., Francesco Regoli<sup>2</sup>, Ph.D., Tatiana Armeni<sup>2</sup>, Ph.D.,  
Aleardo Koverech<sup>3</sup>, M.D., Franco Mantero<sup>4</sup>, M.D., Marco Boscaro<sup>1</sup>, M.D.

<sup>1</sup>Andrology Unit and Laboratory of Andrology, Endocrinology, Department of Internal Medicine,  
and <sup>2</sup>Department of Biology and Genetics, Umberto I Hospital, School of Medicine, Polytechnic University of Marche, Ancona;

<sup>3</sup>Carnitine Research Unit, Sigma Tau, Pomezia;

and <sup>4</sup>Endocrinology, Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padua, Padua, Italy

Автор перевода:

К.А. Ширанов (кафедра урологии ГБОУ ВПО «Ростовский государственный  
медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону)

Контакты: Кирилл Александрович Ширанов urologgg@mail.ru

**Цель исследования** – оценить эффективность монотерапии L-карнитином (LK), ацетил-L-карнитином (ALK) и их комбинации для улучшения подвижности сперматозоидов и общей способности эякулята к связыванию свободных радикалов кислорода. Дизайн: рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование.

**Место проведения:** отделение андрологии, отдел внутренней медицины, политехнический университет Марке, Италия.

**Пациенты:** 60 мужчин с бесплодием в возрасте 20–40 лет со следующими исходными критериями: концентрация сперматозоидов  $> 20 \times 10^6$ /мл, прогрессивная подвижность  $< 50\%$ , сперматозоиды с нормальной морфологией  $> 30\%$ . Исследование завершили 59 больных.

**Вмешательство:** пациенты получали по двойной слепой схеме 3 г LK в сутки, 3 г ALK в сутки, комбинацию 2 г LK + 1 г ALK в сутки или плацебо. Исследование состояло из 1 мес включения, 6 мес терапии и 3 мес наблюдения.

**Основной оцениваемый критерий:** различия в параметрах эякулята, использованных для отбора пациентов, и различия в общей способности семенной плазмы к связыванию свободных радикалов кислорода.

**Результаты:** у пациентов, получавших ALK в виде моно- или комбинированной терапии с LK, наблюдалось улучшение подвижности сперматозоидов (общей и прогрессивной, включая кинетические характеристики, определяемые компьютерным анализом эякулята). Комбинированная терапия позволила статистически значимо улучшить прямую прогрессивную подвижность через 3 мес. Также отмечалось увеличение общей способности семенной плазмы к связыванию гидроксильных и пероксильных радикалов кислорода, которая положительно коррелировала с улучшением подвижности сперматозоидов. У пациентов с более низкими исходными показателями подвижности и общей связывающей способности семенной плазмы показана более высокая эффективность лечения.

**Выводы:** применение LK и ALK эффективно в увеличении подвижности сперматозоидов у пациентов с идиопатической астенозооспермией и улучшении общей способности семенной плазмы к связыванию свободных радикалов в этой же группе больных.

**Ключевые слова:** мужское бесплодие, прием карнитина, астенозооспермия, общая связывающая способность

### Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia

Giancarlo Balercia<sup>1</sup>, M.D., Francesco Regoli<sup>2</sup>, Ph.D., Tatiana Armeni<sup>2</sup>, Ph.D., Aleardo Koverech<sup>3</sup>, M.D.,  
Franco Mantero<sup>4</sup>, M.D., Marco Boscaro<sup>1</sup>, M.D.

<sup>1</sup>Andrology Unit and Laboratory of Andrology, Endocrinology, Department of Internal Medicine,  
and <sup>2</sup>Department of Biology and Genetics, Umberto I Hospital, School of Medicine, Polytechnic University of Marche, Ancona;

<sup>3</sup>Carnitine Research Unit, Sigma Tau, Pomezia;

and <sup>4</sup>Endocrinology, Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padua, Padua, Italy

\* Оригинальная статья "Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia" опубликована в журнале Fertility and Sterility 2005 September;84(3):662–71.

**Objective:** To evaluate the effectiveness of L-carnitine (LC) or L-acetyl-carnitine (LAC) or combined LC and LAC treatment in improving semen kinetic parameters and the total oxyradical scavenging capacity in semen. Design: Placebo-controlled, double-blind, randomized trial.

**Setting:** Andrology unit, Department of Internal Medicine, Polytechnic University of Marche, Italy.

**Patient(s):** Sixty infertile men, ages 20 to 40 years, with the following baseline sperm selection criteria: concentration  $> 20 \times 10^6/\text{mL}$ , sperm forward motility  $< 50\%$ , and normal sperm morphology  $> 30\%$ ; 59 patients completed the study.

**Intervention(s):** Patients underwent a double-blind therapy of LC 3 g/d, LAC 3 g/d, a combination of LC 2 g/d + LAC 1 g/d, or placebo. The study design was 1 month of run in, 6 months of therapy or placebo, and 3 months of follow-up evaluation.

**Main Outcome Measure(s):** Variations in semen parameters used for patient selection, and variations in total oxyradical scavenging capacity of the seminal fluid.

**Result(s):** Sperm cell motility (total and forward, including kinetic features determined by computer-assisted sperm analysis) increased in patients to whom LAC was administered both alone or in combination with LC; combined LC + LAC therapy led to a significant improvement of straight progressive velocity after 3 months. The total oxyradical scavenging capacity of the semen toward hydroxyl and peroxy radicals also increased and was positively correlated with the improvement of kinetic features. Patients with lower baseline values of motility and total oxyradical scavenging capacity of the seminal fluid had a significantly higher probability of responding to the treatment.

**Conclusion(s):** The administration of LC and LAC is effective in increasing sperm kinetic features in patients affected by idiopathic asthenozoospermia and improves the total oxyradical scavenging capacity of the seminal fluid in the same population (*Fertil Steril*® 2005;84:662–71. ©2005 by American Society for Reproductive Medicine.).

**Key words:** male infertility, carnitine therapy, asthenozoospermia, total scavenging capacity

L-карнитин (LK) играет центральную роль в энергетическом метаболизме клеток, выступая в роли транспортера активированных длинноцепочечных жирных кислот (ацил-КоА) в митохондрии, где происходит их бета-окисление [1–3]. Важная роль в клеточном метаболизме сперматозоидов убедительно подтверждается высоким уровнем LK в аспирате придатков благодаря активному механизму секреции [4], а также тем, что подвижность сперматозоидов связана с повышением уровня LK в просвете придатков и ацетил-L-карнитина (ALK) в сперматозоидах [5–7].

Избыток свободных радикалов кислорода (СРК) и других окислительных радикалов связан с мужским бесплодием [8–15]. Определение общей способности к связыванию свободных радикалов (ОССР) – это недавно разработанный анализ, позволяющий определить общую способность биологических жидкостей или клеточных антиоксидантов к нейтрализации токсичности различных радикалов [16, 17]. Анализ ОССР помогает различить разные формы СРК и определить роль специфических антиоксидантов и пути их формирования при развитии токсикологического или патологического процесса.

Раннее применение анализа ОССР в андрологии позволило обнаружить снижение антиоксидантной эффективности семенной плазмы у мужчин с бесплодием и статистически значимую корреляцию между связывающей способностью к гидроксильным радикалам и подвижностью сперматозоидов [18]. Кроме того, показано, что лечение пациентов с астенозооспермией антиоксидантами приводит к улучшению качества эякулята [19, 20] и частоты наступления беременности [20].

LK применялся для лечения отдельных форм олигоастенозооспермии [21–25], учитывая его роль в энер-

гетическом метаболизме. Хотя предполагалась вторичная роль LK как антиоксиданта [26], еще только предстоит определить механизмы, ответственные за антиоксидантную защиту от окислительного повреждения СРК.

Мы приводим результаты 6-месячного двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования применения LK или ALK или их комбинации у мужчин с бесплодием и астенозооспермией. Основным оцениваемым показателем была эффективность этих препаратов в улучшении подвижности сперматозоидов и изменении общей способности семенной плазмы к связыванию свободных радикалов после лечения.

## Материалы и методы

### Отбор больных

В исследование включено 60 пациентов (возраст 24–38 лет, средний возраст – 30 лет) с идиопатической астенозооспермией. Больных отбирали в отделении андрологии, отделе эндокринологии госпиталя Умберто I политехнического университета Марке (Анкона, Италия). У всех мужчин диагностировано бесплодие в течение более 2 лет, и они проходили скрининг, включавший сбор анамнеза и клинический осмотр. У каждого пациента оценивали объем яичек с помощью орхидометра Прадера. Для подтверждения клинического диагноза проводили следующие исследования: анализ эякулята, Мар-тест (SpermMar test, CGA, Флоренция, Италия) на антиспермальные антитела; посев эякулята и мазок из уретры для выявления *Chlamydia* и *Mycoplasma urealyticum*; определение уровня фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, тестостерона, эстрадиола и пролактина с помощью коммерчески доступных радиоиммунных методов; ультразвуковое исследова-

ние (УЗИ) органов мошонки, простаты и семенных пузырьков, а также УЗИ с доплером сосудов лозовидного сплетения для выявления анатомических изменений и варикоцеле.

Ни в одном из случаев не было выявлено женского фактора бесплодия. У всех партнерш (возраст 21–32 года, средний возраст – 26 лет) были регулярные овуляции, подтвержденные двухфазовым изменением базальной температуры и уровнем прогестерона в лютеиновую фазу. В каждом случае при УЗИ органов малого таза не было выявлено анатомических изменений, а при гистеросальпингографии не показано нарушений проходимости маточных труб.

### **Дизайн исследования и лечения**

Включенные больные получали терапию по двойной слепой схеме: LK (флаконы по 10 мл, содержащие 3 г/сут карнитина (Sigma Tau, Pomezia, Italy),  $n = 15$ ); или ALK (таблетки 3 г/сут, Zibren (Sigma Tau),  $n = 15$ ); или комбинацию LK (флаконы по 10 мл, содержащие 2 г/сут карнитина) и ALK (таблетки, содержащие 1 г/сут Zibren) ( $n = 15$ ); или идентичное по виду плацебо (каждый флакон по 10 мл с плацебо содержал яблочную кислоту, натрия бензоат, натрия сахарината дигидрат, безводный цитрат натрия, ананасовый ароматизатор и негазированную воду). Каждая таблетка плацебо содержала 1-гидролактозу, стеарат магния, поливинилпирролидон, кукурузную муку и оболочку из ацетилфталата целлюлозы, диметикона, этилфталата (Sigma Tau). Все пациенты принимали 1 флакон и 2 таблетки 3 раза в сутки. Выбранную дозу карнитина наиболее часто применяют для лечения других заболеваний (заболевания нервной системы, сердца, мышц), и она совпадает с дозой, используемой в других исследованиях по мужскому бесплодию [21–25].

Дизайн исследования включал 1 мес вводной фазы, 6 мес приема препаратов ( $n = 45$ ) или плацебо ( $n = 15$ ) и 3 мес последующей оценки (контроль при визитах T-1, T0, T3, T6, T9). Для оценки стабильности параметров эякулята каждый пациент сдавал 2 анализа эякулята с разницей в 1 мес (T-1 и T0) до начала лечения согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [27].

Анализ проводился в различные временные точки. Исследование эякулята выполняли при визитах T-1, T0, T3, T6 и T9, включая компьютерный анализ (CASA) при визитах T0, T3, T6, T9 для оценки изменений параметров спермограммы [27]. Для оценки каких-либо различий на фоне терапии при визитах T0 и T6 проводили анализ ОССР семенной плазмы к различным СРК [16, 17]. Все анализы проводили в лечебных группах и группе плацебо. Также анализировались приверженность схеме лечения и возможные побочные эффекты. При визитах T0 и T6 выполняли анализ крови для оценки безопасности лечения.

На основании ранее полученных результатов в нашей группе и данных других исследователей [20–25] основным критерием эффективности было выбрано улучшение подвижности сперматозоидов (общей и прогрессивной).

Данное исследование было одобрено Министерством здравоохранения Италии и этическим комитетом медицинского факультета в госпитале Университета Анконы. Все пациенты подписали информированное согласие.

### **Критерии включения**

В исследовании были следующие критерии включения: 1) возраст 20–40 лет, бесплодие в течение более 2 лет регулярной половой жизни с фертильной партнершей; 2) нормальные реологические параметры эякулята (внешний вид, консистенция и разжижение), объем и pH в пределах нормы; 3) количество сперматозоидов  $> 20 \times 10^6$ /мл, подвижность сперматозоидов (прогрессивная подвижность, класс a и b согласно критериям ВОЗ [27])  $< 50\%$  и количество сперматозоидов с нормальной морфологией  $> 30\%$ ; 4) количество лейкоцитов  $< 1 \times 10^6$ /мл, отрицательный результат посева эякулята и мазка из уретры на *Chlamydia* и *Mycoplasma urealyticum*; 5) нормальный уровень гонадотропинов, тестостерона, эстрадиола и пролактина; 6) отсутствие половых инфекционных заболеваний, анатомических изменений половой системы, включая варикоцеле и антиспермальные антитела; 7) отсутствие системных заболеваний или приема других препаратов в течение 3 мес до включения в настоящее исследование; 8) пациенты не должны были курить, принимать алкоголь или запрещенные препараты или подвергаться воздействию вредных веществ.

Пациентам необходимо было соблюдать стандартную диету, чтобы избежать различий в приеме карнитина с едой. Ни один из пациентов не страдал от недостаточности карнитина.

Для включения в исследование пациентам необходимо было соответствовать вышеприведенным критериям включения при визитах T-1 и T0. Исключались больные со временным снижением качества эякулята во время периода вымывания и пациенты с внезапным (независимым от лечения) улучшением показателей эякулята.

### **Анализ эякулята**

Качество эякулята оценивалось одним биологом по следующим показателям: концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов в соответствии с критериями ВОЗ [27].

Для оценки подвижности сперматозоидов использовали компьютерный анализ эякулята (CASA) по стандартной методике [20]. Один образец (3 мл) погружали в камеру 20 нм. Загружали 2 камеры 20 нм

(Conception Technologies, La Jolla, CA) с последующей рандомной оценкой 6 различных полей в каждой камере; в каждом поле камеры оценивали не менее 200 сперматозоидов. Характеристики движения оценивали с помощью автоматического анализатора (CellTrack VP110, Motion Analysis Corporation, Palo Alto, CA). Кинетические характеристики оценивали только для подвижных сперматозоидов и выражали как средний показатель, учитывая трековую и прямую скорость.

#### **Определение общей способности к связыванию свободных радикалов**

Образец эякулята (1 мл) центрифугировали после разжижения в течение 15 мин с частотой 2000 об/мин, с разделением супернатанта плазмы и обогащенной фракции сперматозоидов, которые хранили до анализа при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Небольшое количество семенной плазмы оценивали до хранения для исключения наличия сперматозоидов в супернатанте.

Анализ ОССР основан на реакции между различными формами СРК и субстратом А-кето-У-метилбутановой кислоты (КМБК), которая окисляется до этилена. Антиоксидантная эффективность образца рассчитывалась по способности связывать выделяющиеся СРК, препятствуя взаимодействию с КМБК и образованию этилена [15]. Техническая процедура анализа ОССР выполнялась согласно ранее опубликованным данным из нашей лаборатории [18]. Для различных систем, создающих свободные радикалы, показатели ОССР рассчитывали по уравнению:  $\text{ОССР} = 100 - (\text{SA}/\text{CA} \times 100)$ , где SA и CA – интегрированные области, рассчитанные под наименьшей площадью кинетической кривой, построенной во время взаимодействия образца (SA) и контрольной реакции (CA) соответственно.

#### **Статистический анализ**

Во всех лечебных группах применялась описательная статистика по каждому изучаемому показателю.

Гомогенность 4 групп больных до начала лечения (визиты Т-1 и Т0) оценивали с помощью анализа вариант с лечением как промежуточным фактором (4 уровня: плацебо, LK, ALK, комбинация LK и ALK).

Для всех непрерывных показателей, определяемых при визитах Т-1, Т0, Т6 и Т9, рассчитывались процентные изменения по отношению к визиту Т-1 (или Т0, если большинство показателей при визите Т-1 не были получены) для исключения влияния возможных различий в начале исследования.

Для разделения влияния 2 молекул – LK и ALK, а также для оценки их комбинированного применения рассчитывалось 2 новых «лечебных» показателя: первый, LKTX, отражал терапию LK в виде моно- или комбинированной терапии; ALKTX отражал прием ALK в виде моно- или комбинированной терапии. Для

оценки значимости времени и влияния терапии на процентные изменения проводился анализ изменений при повторных визитах.

Для непрерывных показателей, определяемых исходно и в конце лечения, рассчитывались абсолютные изменения, также проводился анализ вариант с лечением как промежуточным фактором.

Для дискретных показателей при каждом визите выполнялся тест хи-квадрат для оценки корреляции с лечением (с учетом 1 фактора на 4 уровнях).

Для основного параметра эффективности, подвижности сперматозоидов, как общей, так и прогрессивной, проводились дальнейшие анализы. Для 2 показателей рассчитывались изменения между визитами Т0 и Т6, и улучшение больше или равно медиане считалось ответом на лечение. При этом рассчитывали 2 новых показателя, принимая пациентов с ответом на лечение и без него в отношении общей и прогрессивной подвижности как 1 и 0 соответственно.

Для оценки того, влияют ли исходные и компьютеризированные показатели на более выраженные изменения подвижности, рассчитывались 2 логистические модели, с учетом соответственно 2 показателей ответа как зависимых, а исходной общей подвижности, трековой скорости, прямой скорости, ОССР и концентрации сперматозоидов как независимых переменных.

#### **Результаты**

Один пациент вышел из исследования. После открытия листа рандомизации в конце исследования показано, что исследование завершили 44 из 45 больных в лечебных группах (подгруппа А: LK, 15 пациентов; подгруппа В: ALK, 15 пациентов; подгруппа С: комбинированная терапия, 14 пациентов) и 15 пациентов в группе плацебо.

В табл. 1 представлены средние показатели эякулята со стандартным отклонением при каждом визите; процентные отклонения по сравнению с исходным уровнем приведены в табл. 2. Процентные отклонения прогрессивной подвижности сперматозоидов во всех группах при каждом визите показаны на рис. 1.

Однофакторный анализ вариант, проведенный по показателям для определения гомогенности (процентные отклонения по сравнению с Т-1 или Т0) при исходном визите (Т0 или Т3), показал отсутствие статистически значимых различий между группами в отношении подвижности (общей и прогрессивной), концентрации сперматозоидов, пропорции атипичных сперматозоидов, объема эякулята или трековой скорости. Напротив, процентные отклонения прямой скорости между визитами Т0 и Т3 были статистически значимо выше в подгруппе С (LK и ALK) по сравнению с группой плацебо (44,86 и 76,24 vs  $-4,59$  и 37,05;  $F = 3,077$ ;  $p = 0,035$ ). *Примечание: показатели выражены в процентных отклонениях от визита Т0.* Другими словами,

**Таблица 1.** *Описательная статистика показателей эякулята при каждом визите: среднее ± стандартное отклонение*

Показатель	Лечение	T-1	T0	T3	T6	T9
Общая подвижность сперматозоидов	Плацебо	43,73 ± 10,06	43,93 ± 10,26	44,60 ± 7,68	43,40 ± 9,85	42,73 ± 10,02
	LK	54,33 ± 8,59	51,67 ± 11,08	59,93 ± 8,04	64,53 ± 8,41	54,27 ± 8,96
	ALK	45,07 ± 12,01	43,87 ± 11,36	56,47 ± 11,56	60,43 ± 10,46	50,57 ± 5,71
	LK + ALK	46,73 ± 10,10	44,53 ± 11,84	55,13 ± 10,15	61,07 ± 9,07	49,00 ± 7,80
Прогрессивная подвижность сперматозоидов	Плацебо	24,33 ± 7,93	24,13 ± 7,74	22,33 ± 7,76	24,00 ± 8,50	23,20 ± 8,96
	LK	33,47 ± 6,55	31,20 ± 7,43	38,93 ± 7,09	43,80 ± 7,12	34,00 ± 7,02
	ALK	27,00 ± 10,87	25,53 ± 10,43	34,93 ± 9,24	37,50 ± 9,20	30,21 ± 7,84
	LK + ALK	25,47 ± 8,90	24,60 ± 9,40	33,87 ± 8,37	38,13 ± 8,23	28,47 ± 8,27
Концентрация сперматозоидов	Плацебо	35,27 ± 21,98	29,53 ± 10,07	31,40 ± 12,85	33,73 ± 14,36	30,13 ± 9,30
	LK	35,47 ± 9,21	39,00 ± 10,39	41,00 ± 17,34	45,53 ± 21,42	39,40 ± 13,93
	ALK	27,07 ± 6,47	30,40 ± 10,80	39,33 ± 18,05	39,57 ± 19,99	31,21 ± 8,60
	LK + ALK	29,93 ± 10,57	29,40 ± 9,39	36,93 ± 19,71	37,40 ± 16,42	33,27 ± 13,62
Сперматозоиды с атипичной морфологией	Плацебо	66,40 ± 6,50	68,20 ± 5,86	67,40 ± 6,42	67,27 ± 6,71	67,53 ± 7,42
	LK	63,13 ± 5,04	62,87 ± 4,69	58,47 ± 6,20	54,87 ± 7,27	58,07 ± 11,82
	ALK	65,93 ± 8,19	67,13 ± 7,06	61,73 ± 6,82	58,93 ± 5,62	60,93 ± 10,12
	LK + ALK	65,40 ± 6,22	67,13 ± 6,01	61,73 ± 5,86	59,60 ± 5,82	61,53 ± 8,84
Объем эякулята	Плацебо	2,97 ± 1,36	3,01 ± 0,83	3,08 ± 0,85	2,75 ± 0,68	2,82 ± 0,45
	LK	2,96 ± 0,74	3,12 ± 1,04	3,10 ± 0,68	3,18 ± 0,93	3,03 ± 0,83
	ALK	2,89 ± 0,85	2,59 ± 0,63	2,71 ± 0,62	3,03 ± 0,66	2,76 ± 0,51
	LK + ALK	3,05 ± 0,94	2,87 ± 0,88	2,75 ± 0,80	2,69 ± 0,78	2,50 ± 0,41
Трековая скорость	Плацебо		41,67 ± 14,14	39,67 ± 14,07	42,87 ± 6,83	46,33 ± 11,96
	LK		41,73 ± 13,47	47,73 ± 13,43	57,13 ± 13,95	41,67 ± 6,28
	ALK		39,73 ± 12,57	45,87 ± 11,33	51,79 ± 6,17	44,79 ± 8,19
	LK + ALK		43,00 ± 12,02	44,93 ± 15,72	51,40 ± 13,71	42,53 ± 7,78
Прямая скорость	Плацебо		24,47 ± 15,19	21,80 ± 12,23	15,87 ± 2,47	17,67 ± 2,58
	LK		20,00 ± 7,87	21,13 ± 6,92	21,47 ± 3,52	16,80 ± 2,11
	ALK		23,27 ± 16,28	18,60 ± 5,78	20,36 ± 3,41	16,36 ± 2,41
	LK + ALK		18,60 ± 6,93	25,67 ± 12,75	22,53 ± 10,26	16,73 ± 2,89

у пациентов в группе комбинированной терапии в течение первых 3 мес терапии наблюдалось статистически значимое улучшение.

Также показано статистически значимое улучшение общей подвижности сперматозоидов у больных, получавших ALK, как в виде моно-, так и комбинированной терапии с LK (с  $3,3 \pm 17,4$  при T0 до  $37,7 \pm 27,8$  при T6;  $F = 11,19$ ;  $p = 0,001$ ) (рис. 2).

Анализ прогрессивной подвижности сперматозоидов показал схожие результаты (с  $-2,9 \pm 26$  при T0 до  $63 \pm 66,8$  при T6;  $F = 12,68$ ;  $p = 0,001$ ) (рис. 3). *При-*

*мечание: показатели выражены в процентных отклонениях от визита T-1.*

У пациентов, получавших комбинированную терапию, отмечалось улучшение прогрессивной подвижности по сравнению с группами монотерапии, хотя различия в параметрах подвижности не были статистически значимыми (см. рис. 1). В группе плацебо не выявлено статистически значимых изменений.

Во всех группах больных, получавших карнитин, обнаружена статистически значимая корреляция изменений общей и прогрессивной подвиж-

**Таблица 2.** Процентные отклонения показателей эякулята от исходного уровня: среднее  $\pm$  стандартное отклонение

Показатель	Лечение	T0	T3	T6	T9
Общая подвижность сперматозоидов <sup>a</sup>	Плацебо	1,30 $\pm$ 13,52	4,15 $\pm$ 16,26	0,52 $\pm$ 17,43	-1,22 $\pm$ 17,46
	LK	-5,32 $\pm$ 9,91	11,01 $\pm$ 8,46	19,90 $\pm$ 12,74	0,31 $\pm$ 9,65
	ALK	1,31 $\pm$ 23,07	30,83 $\pm$ 33,99	41,25 $\pm$ 29,98	19,78 $\pm$ 28,51
	LK + ALK	5,16 $\pm$ 10,18	19,59 $\pm$ 16,63	34,46 $\pm$ 26,20	6,75 $\pm$ 14,77
Прогрессивная подвижность сперматозоидов <sup>a</sup>	Плацебо	-0,30 $\pm$ 9,81	-8,31 $\pm$ 13,73	-0,96 $\pm$ 18,99	-4,38 $\pm$ 21,71
	LK	5,92 $\pm$ 16,21	18,01 $\pm$ 15,73	33,08 $\pm$ 17,29	2,67 $\pm$ 14,40
	ALK	4,09 $\pm$ 27,85	41,85 $\pm$ 42,43	56,84 $\pm$ 54,23	22,32 $\pm$ 29,03
	LK + ALK	1,86 $\pm$ 25,16	43,58 $\pm$ 46,86	68,70 $\pm$ 78,18	17,73 $\pm$ 28,61
Концентрация сперматозоидов <sup>a</sup>	Плацебо	-4,31 $\pm$ 27,75	-3,17 $\pm$ 20,06	-6,98 $\pm$ 36,97	-1,51 $\pm$ 32,69
	LK	11,14 $\pm$ 19,58	17,18 $\pm$ 45,99	24,50 $\pm$ 35,55	12,06 $\pm$ 30,16
	ALK	6,95 $\pm$ 22,06	46,55 $\pm$ 55,80	42,88 $\pm$ 50,80	15,90 $\pm$ 32,10
	LK + ALK	1,26 $\pm$ 19,66	24,34 $\pm$ 41,83	29,78 $\pm$ 41,53	15,18 $\pm$ 42,83
Сперматозоиды с атипичной морфологией <sup>a</sup>	Плацебо	2,92 $\pm$ 4,68	1,70 $\pm$ 5,97	1,49 $\pm$ 6,50	1,86 $\pm$ 7,46
	LK	-0,28 $\pm$ 4,86	-7,42 $\pm$ 6,23	-13,24 $\pm$ 7,66	-7,51 $\pm$ 19,46
	ALK	2,20 $\pm$ 5,48	-6,00 $\pm$ 6,90	-10,24 $\pm$ 5,56	-6,32 $\pm$ 18,07
	LK + ALK	2,90 $\pm$ 6,66	-5,27 $\pm$ 8,13	-8,35 $\pm$ 10,41	-5,36 $\pm$ 14,29
Объем эякулята <sup>a</sup>	Плацебо	11,76 $\pm$ 31,35	19,75 $\pm$ 62,98	4,85 $\pm$ 40,95	12,03 $\pm$ 51,56
	LK	3,63 $\pm$ 12,23	6,58 $\pm$ 16,51	11,26 $\pm$ 34,40	4,91 $\pm$ 25,76
	ALK	-5,20 $\pm$ 22,97	0,00 $\pm$ 27,80	11,63 $\pm$ 39,62	2,09 $\pm$ 32,97
	LK + ALK	-4,94 $\pm$ 17,07	-8,27 $\pm$ 16,62	-5,38 $\pm$ 38,63	-13,74 $\pm$ 19,09
Трековая скорость <sup>b</sup>	Плацебо		2,20 $\pm$ 54,71	20,16 $\pm$ 67,30	31,24 $\pm$ 79,69
	LK		26,00 $\pm$ 67,68	64,99 $\pm$ 104,59	20,06 $\pm$ 74,02
	ALK		30,95 $\pm$ 66,09	53,31 $\pm$ 71,53	31,23 $\pm$ 62,97
	LK + ALK		8,27 $\pm$ 33,87	29,05 $\pm$ 51,98	8,44 $\pm$ 44,17
Прямая скорость <sup>b</sup>	Плацебо		-4,59 $\pm$ 37,05	-22,08 $\pm$ 27,78	-15,04 $\pm$ 25,40
	LK		11,08 $\pm$ 22,75	17,07 $\pm$ 32,81	-6,45 $\pm$ 29,37
	ALK		2,05 $\pm$ 43,11	15,57 $\pm$ 46,31	-6,78 $\pm$ 38,88
	LK + ALK		44,86 $\pm$ 76,24	33,26 $\pm$ 70,62	-3,15 $\pm$ 26,25

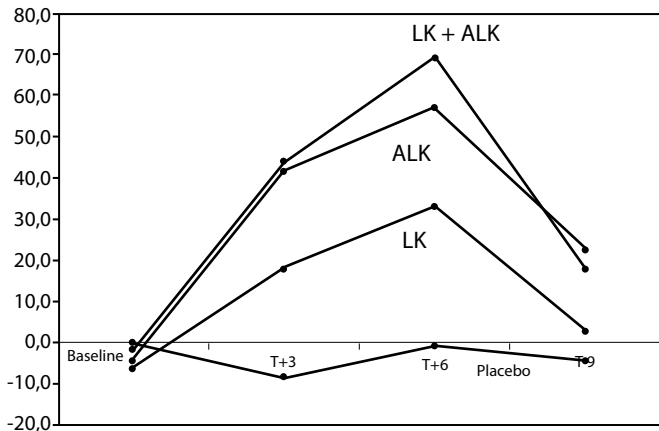
**Примечание.** <sup>a</sup> – процентные отклонения по сравнению с визитом T-1; <sup>b</sup> – процентные отклонения по сравнению с визитом T0

ти и исходных показателей. У пациентов с более низкими исходными показателями подвижности вероятность ответа на лечение была статистически значимо выше.

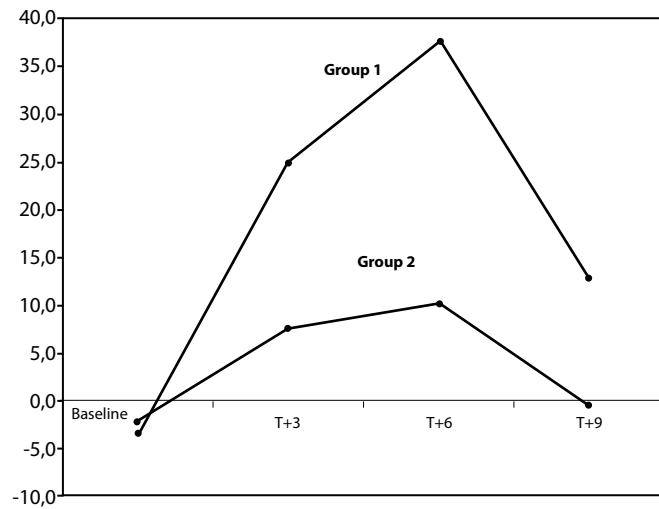
После вымывания (T9) характеристики подвижности сперматозоидов (общая и прогрессивная подвижность, прямая скорость) в лечебных группах были статистически значимо ниже по сравнению с визитом T6.

В группе пациентов, получавших ALK (в виде моноили комбинированной терапии), на фоне терапии наблюдались статистически значимые изменения концентрации (с 6,95  $\pm$  22,06 при визите T0 до 42,88  $\pm$  50,80 при визите T6;  $F=3,611$ ;  $p=0,015$ ). *Примечание: показатели выражены в процентных отклонениях от визита T-1.*

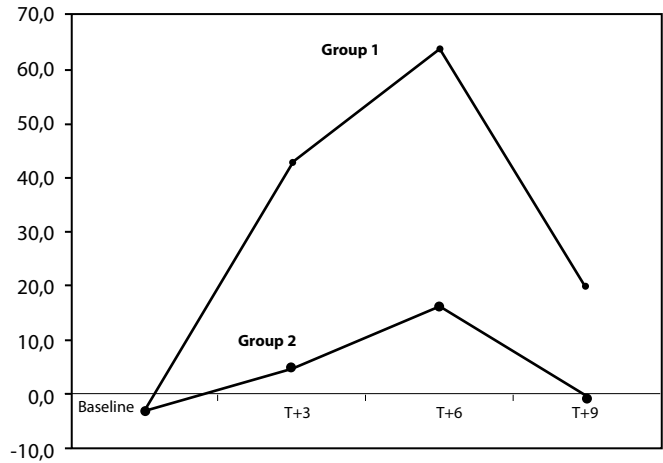
Между визитами T6 и T0 показано статистически значимое снижение числа клеток с атипичной морфо-



**Рис. 1.** Прогрессивная подвижность сперматозоидов при каждом визите в 4 группах: процентные отклонения по сравнению с визитом T-1



**Рис. 2.** Общая подвижность сперматозоидов при каждом визите: процентные отклонения по отношению к визиту T-1 (время:  $p < 0,001$ ; ALKTX:  $p = 0,001$ ). Группа 1: ALK в виде моно- или комбинированной терапии. Группа 2: LK или плацебо



**Рис. 3.** Прогрессивная подвижность сперматозоидов при каждом визите: процентные изменения по отношению к визиту T-1 (время:  $p < 0,001$ ; ALKTX:  $p = 0,001$ ). Группа 1: ALK в виде моно- или комбинированной терапии. Группа 2: LK или плацебо

логией. При этом улучшение было статистически значимым в группе пациентов, получавших LK.

У пациентов не отмечалось статистически значимых различий в объеме эякулята и трековой скорости.

**Общая способность к связыванию свободных радикалов**

В табл. 3 приведены средние показатели ОССР и стандартное отклонение при каждом визите, а также процентное отклонение по сравнению с исходным уровнем. Анализ ОССР семенной жидкости для различных СРК показал статистически значимое снижение уровня гидроксильных и пероксильных радикалов в лечебных группах, но отсутствие статистически значимых изменений в группе плацебо.

Увеличение показателей ОССР между визитом T0 и T6 положительно коррелировало с улучшением общей и прогрессивной подвижности для обоих радика-

**Таблица 3.** Описательная статистика ОССР при каждом визите: абсолютные и процентные отклонения, среднее  $\pm$  стандартное отклонение

ОССР	Лечение	T0	T6	Абсолютное изменение	Процентное изменение
Гидроксильные радикалы	Плацебо	31 276,67 $\pm$ 5467,22	28 931 $\pm$ 5351,48	-2345,53 $\pm$ 3516,51	-7,12 $\pm$ 10,43
	LK	26 301 $\pm$ 6127,76	30 636,20 $\pm$ 5646,47	4334,67 $\pm$ 3454,27	18,52 $\pm$ 15,49
	ALK	27 566 $\pm$ 6139,02	31 645,79 $\pm$ 4680,91	4382,64 $\pm$ 3883,61	20,67 $\pm$ 27,19
	LK + ALK	27 207 $\pm$ 6061,33	31 712,67 $\pm$ 5933,07	4505,07 $\pm$ 2730,59	18,38 $\pm$ 12,72
Пероксильные радикалы	Плацебо	24 879,20 $\pm$ 4865,76	24 358,20 $\pm$ 5466,47	-521,00 $\pm$ 1548,79	-2,43 $\pm$ 6,79
	LK	26 035,60 $\pm$ 4098,60	31 003,00 $\pm$ 5841,52	4967,40 $\pm$ 3900,30	19,48 $\pm$ 15,86
	ALK	22 775,73 $\pm$ 5675,95	24 924,07 $\pm$ 6344,44	2474,00 $\pm$ 3487,15	12,32 $\pm$ 21,72
	LK + ALK	25 899,00 $\pm$ 5147,45	29 889,13 $\pm$ 5345,76	3990,13 $\pm$ 2533,32	16,53 $\pm$ 12,64

лов и с трековой или прямой скоростью для гидроксильных и пероксильных радикалов соответственно (табл. 4). Кроме того, обнаружено, что различия в прогрессивной подвижности зависят от исходных показателей ОССР (для гидроксильных радикалов).

**Таблица 4.** *Описательная статистика ОССР при каждом визите: корреляция между увеличением показателя для гидроксильных или пероксильных радикалов и характеристиками эякулята*

ОССР	Показатель эякулята	Корреляция Пирсона	Значимость (двусторонняя)
Гидроксильные радикалы	Общая подвижность	0,391	0,002
	Прогрессивная подвижность	0,455	< 0,001
	Трековая скорость	3,57	0,006
Пероксильные радикалы	Общая подвижность	0,410	0,001
	Прогрессивная подвижность	0,439	0,001
	Прямая скорость	0,316	0,015

### Спонтанные беременности

В течение периода наблюдения наступило 12 спонтанных беременностей. Открытие протокола рандомизации показало, что 9 беременностей относились к группе пациентов, получавших карнитин. Пять из них наступили у партнерш больных, получавших комбинированную терапию (3 случая через 3 мес и 2 — через 5 мес лечения). Две беременности наблюдались в группе ЛК (после 3 мес терапии). Еще 2 беременности отмечены в группе больных, получавших ALK (1 через 2 мес, другая — через 5 мес терапии). Три из 12 беременностей наступили у партнерш пациентов в группе плацебо (через 1 и 3 мес лечения и после 2 мес вымывания).

### Обсуждение

В нескольких контролируемых и неконтролируемых исследованиях получены данные о положительном влиянии терапии LK и его ациловыми производными при некоторых формах олигоастенозооспермии [21–25]. В частности, в совсем недавно проведенном контролируемом исследовании показана эффективность комбинированной терапии LK и ALK в улучшении подвижности сперматозоидов, особенно у больных с более низкими исходными показателями [25]. Основным объяснением служит центральная роль карнитина в энергетическом метаболизме и его накопление в жидкости придатков и сперматозоидах как в свободной, так и в ацетилированной форме [4]. Хотя некоторые данные отражают вторичную роль карнитина как антиоксиданта [26], его эффективная роль и механизм действия по-прежнему остаются открытым вопросом.

В литературе представлено много данных о неблагоприятном влиянии СРК и других прооксидантов на качество эякулята [8–15]. С другой стороны, некоторые данные говорят о снижении способности семенной плазмы к связыванию свободных радикалов у мужчин с бесплодием и патоспермией [18, 28, 29].

Примечательно, что показано улучшение качества эякулята у мужчин с бесплодием на фоне приема антиоксидантов, таких как глутатион и коэнзим Q<sub>10</sub> [19, 20].

В нашем двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании оценивали следующие показатели: 1) эффективность различных препаратов в улучшении параметров эякулята и сравнение монотерапии LK и ALK или комбинации LK + ALK; 2) различный ответ в зависимости от исходных параметров эякулята; 3) различия в ОССР и ее корреляция с параметрами эякулята после лечения.

Что касается первого показателя, основной целью исследования было улучшение общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов (включая прямую скорость, определяемую анализом CASA) у пациентов, принимавших ALK в виде монотерапии или в комбинации с LK. Интересно отметить, что комбинированная терапия LK и ALK более выраженно улучшила прогрессивную подвижность и прямую скорость сперматозоидов по сравнению с монотерапией каждым из препаратов в отдельности. Хотя это улучшение было статистически значимым только для прямой скорости при визите T3, мы считаем необходимым это отметить с биологической точки зрения, поскольку первый показатель важен для мужской фертильности [27].

Период вымывания и 2 анализа эякулята до начала лечения позволили минимизировать влияние спонтанных различий в показателях спермограммы и оценить лечебный эффект [27]. Статистически значимое снижение подвижности сперматозоидов через 3 мес вымывания (с визита T6 до визита T9) показывает связь между улучшением показателей эякулята и приемом карнитина. Кажется обоснованным связать это с отсутствием положительного влияния карнитина на энергетический метаболизм сперматозоидов и ОССР после прекращения терапии.

Примечательно, что эффективность лечения отличалась в зависимости от исходных данных подвижности, при этом более низкие показатели коррелировали с хорошим ответом на лечение. Полученные данные полностью соответствуют недавно опубликованным результатам 2 других исследований [24, 25].

Улучшение способности семенной плазмы к связыванию свободных гидроксильных и пероксильных радикалов у пациентов, получавших лечение, по анализу ОССР — это один из наиболее важных результатов нашего исследования. Показана положительная корреляция ОССР и улучшения подвижности сперматозоидов; также выявлена статистически значимая



зависимость изменения прогрессивной подвижности и исходных показателей ОССР.

Кроме того, более низкие показатели ОССР (гидроксильных радикалов) коррелировали с более выраженным ответом на прием карнитина. Эти данные убедительно поддерживают роль карнитина как антиоксиданта и патогенетическое участие сниженной ОССР при астенозооспермии согласно ранее опубликованным результатам [18].

В настоящее время остается нерешенным вопрос, как именно карнитин действует в роли антиоксиданта. С биохимической точки зрения он напрямую не связывает СРК.

Мы можем только предполагать наличие непрямого механизма, возможно связанного со снижением перекисного окисления липидов [30–32], и протективного влияния на клеточные мембраны и окисление белков, а также окислительное повреждение пирувата и лактата [33].

У пациентов, получавших LK, также показано статистически значимое уменьшение числа сперматозоидов с нарушенной морфологией. Эти данные можно попробовать объяснить возможной метаболической модификацией на фоне приема карнитина и прямым влиянием на клеточные гаметы, а также улучшением способности семенной плазмы связывать свободные радикалы.

Хотя наступление беременности не было оцениваемым показателем в нашем контролируемом исследо-

вании, что связано со многими другими факторами, интересно отметить, что у партнерш пациентов, получавших карнитин, наступило 9 беременностей, 5 из которых наблюдались в группе комбинированной терапии.

В отношении беременности партнерш пациентов в группе плацебо можно сказать, что 2 из них наступили через 1 мес лечения и 2 мес вымывания соответственно, поэтому ни одна из них по времени не была связана с терапией.

Совместно полученные данные позволяют предположить, что длительный прием карнитина эффективен для улучшения показателей эякулята и способности к зачатию. Следуя оцениваемым критериям исследования, мы можем сделать первый вывод, что прием LK и ALK позволяет улучшить подвижность сперматозоидов у пациентов с идиопатической астенозооспермией, в особенности у больных с более низкими исходными показателями и низкой способностью связывать свободные радикалы. Комбинированная терапия LK и ALK улучшает прогрессивную подвижность (хотя статистически незначимо) и прямую скорость (статистически значимое улучшение) по сравнению с монотерапией отдельно каждым из препаратов. Второй вывод заключается в том, что LK и ALK позволяют улучшить общую способность семенной плазмы связывать свободные радикалы в этой же группе больных.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983;63:1420–80.
2. Jeulin C., Dacheux J.L., Soufir J.C. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa *in vitro* and subsequent acetylation rate. *J Reprod Fertil* 1994;100:263–71.
3. Di Lisa F., Barbato R., Manebo R., Siliprandi N. Carnitine and carnitine esters in mitochondrial metabolism and function. In: De Jong J.W., Ferrari R., eds. *The carnitine system. A new therapeutical approach to cardiovascular diseases*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995:21–38.
4. Enomoto A., Wempe M.F., Tsuchida H. et al. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem* 2002;277:36262–71.
5. Bohmer T., Johansen L. Carnitine-binding related suppressed oxygen uptake by spermatozoa. *Arch Androl* 1978;1:321–4.
6. Jeulin C., Lewin L.M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update* 1996;2:87–102.
7. Radigue C., Es-Slami S., Soufir J.C. Relationship of carnitine transport across the epididymis to blood carnitine and androgens in rats. *Arch Androl* 1996;37:27–31.
8. Alvarez J.G., Storey B. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 1982;27:1102–8.
9. Aitken R.J., Clarkson J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;81:459–69.
10. Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;40:183–97.
11. Rao B., Soufir J.C., Martin M., David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* 1989;24:127–34.
12. Suleiman S.A., Ali M.E., Zaki Z.M. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996;17:530–7.
13. Aitken R.J., Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122:497–506.
14. Aitken R.J., Baker M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl* 2002;25:191–4.
15. Balercia G., Moretti S., Vignini A. et al. Role of nitric oxide concentration on human sperm motility. *J Androl* 2004;25:245–9.
16. Winston G.W., Regoli F., Dugas A.J. Jr et al. A rapid chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med* 1998;24:480–93.
17. Regoli F., Winston G.W. Quantification of total antioxidant scavenging capacity (TOSC) of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:96–105.
18. Balercia G., Mantero F., Armeni T. et al. Oxyradical scavenging capacity toward



different reactive species in seminal plasma and sperm cells. A possible influence on kinetic parameters. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:13–9.

19. Lenzi A., Culasso F., Gandini L. et al. Placebo-controlled, double blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod* 1993;8:1657–62.
20. Balercia G., Mosca F., Mantero F. et al. Coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open uncontrolled pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:93–8.
21. Costa M., Canale D., Filicori M. et al. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. *Andrologia* 1994;26:155–9.
22. Vicari E., Calogero A.E. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis. *Hum Reprod* 2001;16:2338–42.
23. Vicari E., La Vignera S., Calogero A.E. Antioxidant treatment with carnitine is effective in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis and elevated seminal

leukocyte concentration after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 2002;78:1203–8.

24. Lenzi A., Lombardo F., Sgrò P. et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double blind cross-over trial. *Fertil Steril* 2003;79:292–300.
25. Lenzi A., Sgrò P., Salacone P. et al. Placebo controlled double blind randomized trial on the use of L-carnitine and L-acetylcarnitine combined treatment in asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004;81:1578–84.
26. Kobayashi A., Fujisawa S. Effect of L-carnitine on mitochondrial acyl-carnitine, acyl-coenzyme A and high energy phosphate in ischemic dog hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:499–508.
27. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
28. Lewis S., Boyle P., McKinney M.B. et al. Total antioxidant capacity of seminal plasma

is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995;64:868–70.

29. Rhemrev J.P., Van Overveld F.W., Haenen G.R. et al. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contribution of various seminal compounds. *J Androl* 2000;21:913–20.
30. Dayanandan A., Kumar P., Panneerselvam C. Protective role of L-carnitine on liver and heart lipid peroxidation in atherosclerotic rats. *J Nutr Biochem* 2001;12:254–7.
31. Arockia Rani P.J., Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1713–26.
32. Arockia Rani P.J., Panneerselvam C. Effects of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J Gerontol* 2002;57: B134–7.
33. Arduini A. Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants? *Am Heart J* 1992;123:1726–7.