

Для цитирования: Боровская Т.Г., Гольдберг В.Е., Полуэктова М.Е., Вычужанина А.В., Щемерова Ю.А., Григорьева В.А., Лигачева А.А., Бохан Е.А. Экспериментальная оценка отдаленных последствий токсического действия цитостатических препаратов на женскую репродуктивную функцию и фармакологические пути их снижения. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(1): 87–96. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-1-87-96

For citation: Borovskaya T.G., Goldberg V.E., Poluektova M.E., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Y.A., Grigoreva V.A., Ligacheva A.A., Bokhan E.A. Experimental evaluation of long-term adverse side effects of cytostatic drugs on female reproductive function and pharmacological ways to reduce them. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(1): 87–96. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-1-87-96

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ЖЕНСКУЮ РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ПУТИ ИХ СНИЖЕНИЯ

Т.Г. Боровская¹, В.Е. Гольдберг², М.Е. Полуэктова¹, А.В. Вычужанина¹,
Ю.А. Щемерова¹, В.А. Григорьева¹, А.А. Лигачева¹, Е.А. Бохан¹

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3. E-mail: reproparm@yandex.ru¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5²

Аннотация

Цель исследования – сравнительная экспериментальная оценка отдаленных токсических эффектов цитостатических препаратов (эпирубицин, этопозид, платидиам, карбоплатин, паклитаксел) на женскую репродуктивную функцию и поиск фармакологических путей их снижения. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на 200 аутбредных крысах-самках сток Вистар, возраст 2,5 мес. Противоопухолевые препараты вводили однократно, внутривенно в максимально переносимой дозе. Оценка репродуктивного статуса проводилась через 90 и 180 сут после введения цитостатиков. Коррекцию овариотоксичности цитостатических препаратов осуществляли использованием препарата рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (рЧГ-КСФ) и экстракта шлемника байкальского (*Scutellariae baicalensis*). Определялись способность крыс-самок к спариванию и зачатию, пре- и постимплантационная смертность плодов. Овариальный резерв оценивался с помощью морфологического анализа яичников с использованием количественной оценки структурных повреждений. Концентрацию антимюллерова гормона в крови крыс-самок, получавших этопозид и рЧГ-КСФ, оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA, Cloud-Clone Corp. Wuhan). Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни и углового преобразования Фишера. **Результаты.** Установлено, что способность животных к спариванию и зачатию сохраняется, однако выявляются признаки раннего истощения овариального резерва и снижение репродуктивного потенциала. Степень риска наступления ранней менопаузы повышена в большей степени после использования эпирубицина, этопозид и паклитаксела, в меньшей степени – платидиама и карбоплатина. Репродуктивный потенциал животных сокращен из-за высокой эмбриональной гибели. Наиболее токсичными в этом плане оказались платиносодержащие препараты. Эффективным средством сохранения овариального резерва от цитостатического воздействия является рЧГ-КСФ. Использование экстракта шлемника байкальского повышает репродуктивный потенциал животных за счет снижения показателей эмбриональной гибели.

Ключевые слова: цитостатические препараты, женская репродуктивная система, отдаленные токсические эффекты, рЧГ-КСФ, экстракт шлемника байкальского.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF LONG-TERM ADVERSE SIDE EFFECTS OF CYTOSTATIC DRUGS ON FEMALE REPRODUCTIVE FUNCTION AND PHARMACOLOGICAL WAYS TO REDUCE THEM

T.G. Borovskaya¹, V.E. Goldberg², M.E. Poluektova¹, A.V. Vychuzhanina¹,
Y.A. Shchemerova¹, V.A. Grigoreva¹, A.A. Ligacheva¹, E.A. Bokhan¹

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

3, Lenin Ave., 634028-Tomsk, Russia. E-mail: repropharm@yandex.ru¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia²

Abstract

The purpose of the study was a comparative experimental assessment of long-term toxic effects of cytostatic drugs (epirubicin, etoposide, platidiam, carboplatin, paclitaxel) on the female reproductive function and search for pharmacological ways to reduce them. **Material and Methods.** Experiments were carried out on 200 outbred male rats, Wistar stock, 2.5 months old. Antitumor drugs were administered once, intravenously, in maximum tolerated dose. The reproductive status in rats was assessed 90 and 180 days after injection of cytostatic drugs. Correction of ovariotoxicity of cytostatic drugs was carried out using a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF, Neupomax, FARMSTANDART-UfaVITA OJSC, Russia) and liquid extract of *Scutellaria Baikalsky* («GNTsLS», Kharkov). The mating and fertility ability of female rats as well as pre- and post-implantation fetal mortality were determined. Ovarian reserve was evaluated using morphological analysis of the ovaries using quantitative assessments of structural damage. Concentration of anti-Muller hormone in the blood of adult rats-females receiving etoposide and rhG-CSF were evaluated by enzyme immunoassay (IFA, ELISA, Cloud clone, Corp. Wuhan). Statistical processing of obtained experimental data was performed using Mann-Whitney U-test and Fisher angular transformation. **Results.** The mating and fertility ability of animals was found to be persisted. However, signs of early depletion of the ovarian reserve and a decrease in reproductive potential were observed. The risk of early menopause was increased to a greater extent after using epirubicin, etoposide and paclitaxel, and to a lesser extent after platidiam and carboplatin. The reproductive potential of animals was reduced due to increased fetal death. Platinum-containing drugs were found to be the most toxic. G-CSF was the effective drug for protecting the ovarian reserve from cytostatic effects. The use of *Scutellaria baicalensis* extract increased the reproductive potential of animals by reducing the rate of embryonic death.

Key words: cytotoxic drugs, female reproductive system, long-term toxic effects, G-CSF, *Scutellaria baicalensis* extract.

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что в отдаленные сроки после цитостатических воздействий у женщин существует вероятность наступления бесплодия, обусловленная ранним истощением овариального резерва. Оно является результатом гибели примордиальных фолликулов [1]. Ранняя диагностика и совершенствование методов лечения онкологических заболеваний значительно улучшили долгосрочную выживаемость пациентов. Для женщин состояние их репродуктивной функции является особо значимым, и профилактика бесплодия становится основной проблемой качества их жизни [1]. В целом по сравнению с общим населением вероятность наступления беременности после химиотерапии снижена на 38 % [2]. Следует отметить, что цитостатические воздействия способны вызывать цитогенетические изменения в ДНК ооцитов при-

мордиальных фолликулов, находящихся в стадии диплотены первого мейотического деления [3]. Это может привести к снижению способности к деторождению при сохранившемся овариальном резерве. Многолетние клинические наблюдения показали, что использование различных схем лечения создает неодинаковые по степени выраженности предпосылки для наступления ранней менопаузы. Это связано с тем, что чувствительность овариальной ткани существенно варьирует в зависимости от индивидуального химического строения используемого цитостатического средства [4]. В настоящее время в ряде онкологических клиник ставится задача использования менее токсичных в плане повреждения репродуктивной функции схем лечения, при которых эффективность химиотерапии не снижается [5]. Достаточно проблематичным является решение вопроса о

том, какое именно лекарственное средство отвечает за эффекты, влияющие на долгосрочные нежелательные последствия для фертильности [3]. К числу наиболее исследованных в этом плане лекарственных средств относятся доксорубин и циклофосфан. Другие антрациклиновые антибиотики, комплексные соединения платины, таксаны, ингибиторы топоизомеразной активности являются менее изученными [2]. Не вызывает сомнения тот факт, что проведение экспериментальных исследований может дать необходимую информацию для оптимизации стратегии поиска менее овариотоксических схем лечения. Прогноз репродуктивных рисков для каждого препарата актуален также для принятия решения о криоконсервации ткани яичников, которая, безусловно, способствует сохранению воспроизводящей функции. В то же время она представляет собой потенциальный источник повреждения ДНК половых клеток [6]. Экспериментальные исследования выполняют также необходимую информацию для выбора фармакологических способов коррекции отдаленных последствий овариотоксичности. Количество публикаций такого плана растет сегодня по экспоненте [1].

Целью исследования явились сравнительная оценка отдаленных токсических эффектов цитостатических препаратов (антрациклиновых антибиотиков, ингибиторов топоизомеразной активности, комплексных соединений платины, таксанов) на женскую репродуктивную функцию и поиск фармакологических путей их снижения.

Материал и методы

Эксперименты проведены на аутбредных крысах-самках линии Вистар ($n=200$) репродуктивного возраста (2,5 мес). Для изучения способности к зачатию дополнительно использовались интактные крысы-самцы ($n=70$). Животные были получены из отдела экспериментальных биологических моделей «НИИФирм им. Е.Д. Гольдберга», г. Томск. Крыс содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), а также в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ от 01.04.2016 №199 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

В настоящем исследовании оценивались отдаленные последствия овариотоксичности таких цитостатических средств, как платидиам, карбоплатин, эпирубин, этопозид, паклитаксел. Состояние воспроизводящей функции у животных изучалось в сроки, соответствующие проявлению воздействия на примордиальные фолликулы, — через 90 и 180 сут после введения препаратов. Репродуктивный статус оценивался по количеству структурно-функциональных элементов яичников, способности крыс-самок к спариванию, зачатию,

по показателям эмбриональной гибели. Коррекция овариотоксичности цитостатических препаратов проводилась с использованием препарата рГ-КСФ (Нейпомакс, ОАО ФАРМСТАНДАРТ-Уфа ВИТА, Россия) и экстракта шлемника байкальского («ГНЦЛС», г. Харьков). На фоне введения рГ-КСФ и этопозид (сразу после окончания введения корректора в момент нахождения животного в фазе эструс) определялись количество структурно-функциональных элементов яичников и содержание антимюллерового гормона.

Защитные свойства растительного экстракта оценивались по показателям эмбриональной гибели, срок исследования — 90 сут после введения карбоплатина. Животные, получавшие только цитостатические препараты на каждом из сроков исследования, распределялись на 6 групп (по 15 особей в каждой), одна из которых составила группу интактных животных (фон). Цитостатические препараты вводили однократно внутривенно в максимально переносимых дозах, которые составили для этопозид (этопозид, Teva, Израиль) — 30 мг/кг, карбоплатин (кемокарб, «Дабур Индия Лтд», Индия) — 60 мг/кг, паклитаксел (митотакс, Dr. Reddy's, Индия) — 4,6 мг/кг, платидиам («Lachema», Чехия) — 4 мг/кг, эпирубин (Farmitalia, Carlo Erba) — 7,5 мг/кг. Препарат рГ-КСФ крысам-самкам ($n=10$) вводили в течение 5 дней 1 раз в день подкожно в дозе 100 мкг/кг на следующий день после введения цитостатического препарата (этопозид). Экстракт шлемника байкальского вводили животным ($n=10$) внутривенно в дозе 50 мл/кг в течение 2 нед, начиная со следующего дня после введения карбоплатина.

Способность к оплодотворению и зачатию оценивалась с помощью индексов плодовитости и беременности. С этой целью часть крыс-самок, получавших препараты (по 10 крыс-самок на каждый срок эксперимента), подсаживали к интактным крысам-самцам на протяжении 10 дней (продолжительность 2 эстральных цикла) в соотношении 1 самец: 2 самки. Спаривание регистрировали с помощью вагинальных мазков. На 20-й день после ссаживания проводилась эвтаназия (в CO_2 камере) крыс-самок. Животных вскрывали, устанавливали факт беременности. Определяли способность к спариванию (индекс плодовитости), способность к зачатию (индекс беременности) [7]. При вскрытии подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, количество живых и мертвых плодов (из расчета на 1 самку). Далее определяли показатели пре- и постимплантационной смертности [7].

Для проведения морфологического исследования половых желез оставшихся крыс-самок ($n=5$ на каждый срок эксперимента), находящихся на стадии эструс, забивали (эвтаназия в CO_2 камере) через 90 и 180 сут после введения цитостатиков. Животных вскрывали, извлекали яичники, фикси-

Таблица 1/Table 1

Содержание структурно-функциональных элементов яичников крыс через 90 сут после однократного введения цитостатических препаратов в МПД ($\bar{X} \pm m$, опыт/контроль)

The content of structural and functional elements of rat ovaries 90 days after a single administration of cytotoxic drugs in the MTD ($\bar{X} \pm m$, experience/control)

Структурно-функциональные элементы яичников крыс/ Structural and functional elements of rat ovaries	Эпирубицин/ Epirubicin	Платидиам/ Platidiam	Карбоплатин/ Carboplatin	Этопозид/ Etoposide	Паклитаксел/ Paclitaxel
Примордиальные фолликулы/ Primordial follicles	270,00 ± 90,00* 695,00 ± 99,80	473,30 ± 90,00 665,00 ± 99,80	500,00 ± 90,00 665,00 ± 99,30	517,50 ± 19,84* 806,25 ± 65,49	577,50 ± 23,23* 844,00 ± 12,08
Фолликулы с несколькими слоями гранулезных клеток/ Follicles with multiple layers of granulosa cells	90,00 ± 29,30* 167,50 ± 15,00	123,30 ± 22,00 167,50 ± 15,00	171,00 ± 18,50 167,50 ± 15,00	91,25 ± 5,15* 156,25 ± 7,46	143,75 ± 9,65 148,00 ± 14,01
Граафовы пузырьки/ Graaf bubbles	1,70 ± 1,70* 7,50 ± 2,50	3,30 ± 3,30 7,50 ± 2,50	10,80 ± 3,00 7,50 ± 2,50	5,00 ± 0,00 6,25 ± 1,25	5,00 ± 0,00 6,00 ± 1,00
Желтые тела/ Yellow bodies	7,70 ± 1,40 8,00 ± 0,40	9,30 ± 0,70 8,00 ± 0,40	9,50 ± 0,80 8,00 ± 0,40	8,75 ± 1,25 7,00 ± 0,91	9,75 ± 1,11 11,20 ± 0,48
Атрезирующиеся фолликулы/ Atresing follicles	440,00 ± 71,50 542,50 ± 47,90	350,00 ± 101,00 542,50 ± 47,90	400,00 ± 18,80 542,50 ± 47,90	236,25 ± 24,35 215,00 ± 12,41	462,50 ± 21,65 300,00 ± 44,41
Общее количество генеративных элементов/ The total number of generative elements	811,00 ± 185,60* 1390,00 ± 137,20	959,33 ± 186,00 1390,00 ± 137,20	1080,00 ± 130,20 1390,00 ± 137,20	866,25 ± 43,25* 1190,75 ± 75,01	1198,50 ± 40,52 1308,80 ± 59,15

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни).

Notes: * – statistically significant differences compared with the corresponding control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U-test).

Таблица 2/Table 2

Содержание структурно-функциональных элементов яичников крыс через 180 сут после однократного введения цитостатических препаратов в МПД ($\bar{X} \pm m$, опыт/контроль)

The content of structural and functional elements of rat ovaries 180 days after a single administration of cytotoxic drugs in the MTD ($\bar{X} \pm m$, experience/control)

Структурно-функциональные элементы яичников крыс/ Structural and functional elements of rat ovaries	Эпирубицин/ Epirubicin	Платидиам/ Platidiam	Карбоплатин/ Carboplatin	Этопозид/ Etoposide	Паклитаксел/ Paclitaxel
Примордиальные фолликулы/ Primordial follicles	130,00 ± 25,20* 475,00 ± 115,00	267,00 ± 63,00* 573,30 ± 83,70	350,00 ± 63,00* 475,00 ± 11,50	508,00 ± 10,20* 742,50 ± 23,59	520,00 ± 15,28* 746,67 ± 8,82
Фолликулы с несколькими слоями гранулезных клеток/ Follicles with multiple layers of granulosa cells	86,70 ± 31,90* 160,00 ± 26,00	108,30 ± 10,10* 183,30 ± 16,20	200,00 ± 10,50 160,00 ± 26,00	91,25 ± 6,57* 155,00 ± 18,48	86,66 ± 7,26* 126,66 ± 6,00
Граафовы пузырьки/ Graaf bubbles	1,70 ± 1,70* 5,70 ± 3,70	3,30 ± 1,70 5,00 ± 3,00	6,70 ± 1,70 5,00 ± 3,00	6,00 ± 1,00 6,25 ± 1,25	5,00 ± 0,00 6,66 ± 1,66
Желтые тела/ Yellow bodies	7,60 ± 1,50 6,70 ± 1,40	8,30 ± 1,80 6,80 ± 0,30	8,50 ± 3,30 6,80 ± 0,30	7,00 ± 0,70 9,00 ± 0,57	10,75 ± 1,88 10,00 ± 1,57
Атрезирующиеся фолликулы/ Atresing follicles	71,70 ± 18,00* 331,00 ± 65,00	251,70 ± 46,90 371,70 ± 72,50	358,00 ± 73,60 331,00 ± 65,00	202,50 ± 14,93 261,25 ± 17,72	266,66 ± 4,40 283,33 ± 10,13
Общее количество генеративных элементов/ The total number of generative elements	342,70 ± 22,89* 915,20 ± 168,40	639,70 ± 35,00* 1056,30 ± 130,30	918,00 ± 145,20 915,25 ± 165,70	811,00 ± 20,75* 1174,00 ± 38,55	890,33 ± 23,38* 1173,33 ± 26,58

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни).

Notes: * – statistically significant differences compared with the corresponding control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U-test).

ровали в жидкости Карнуа, готовили парафиновые срезы (через весь орган) толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. На серийных срезах яичников (через весь орган) подсчитывали количество структурно-функциональных элементов: примордиальные фолликулы, фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток, граафовы пузырьки, желтые тела, атретические фолликулы и общее количество генеративных элементов [7]. Концентрацию антимюллерова гормона в крови крыс-самок, получавших этопозид и рчГ-КСФ, оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA, Cloud-Clone Corp. Wuhan).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили методом вариационной статистики. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 13. Экспериментальные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для определения значимости различий почти по всем исследуемым показателям использовали U критерий Манна – Уитни. Исключение составили такие показатели, как индекс плодовитости и беременности, которые оценивали по угловому преобразованию Фишера. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Через 90 сут после введения всех цитостатических препаратов в яичниках крыс выявлялось разрастание соединительной ткани, которое оказалось более выраженным по сравнению с таковым у интактных животных. Наблюдалось также формирование фолликулярных кист, чего не отмечалось в контроле (фон). Через 180 сут после начала эксперимента выявленные морфологические изменения оказались выраженными в большей степени. Результаты количественного подсчета структурно-функциональных элементов представлены в табл. 1, 2. Установлено, что через 90 сут после начала эксперимента количество структурно-функциональных элементов статистически значимо снижалось в яичниках крыс, которые получали эпирубицин, этопозид и паклитаксел. Пул примордиальных фолликулов у животных этих групп статистически значимо сокращался в 1,5–2 раза. Количество двух- и многослойных фолликулов снижалось на фоне введения эпирубицина и этопозидов. В половых железах крыс, получавших эпирубицин, уменьшалось число граафовых пузырьков. Общее количество структурно-функциональных элементов сокращалось в половых железах животных, которым вводили эпирубицин и этопозид. Через 180 сут по-

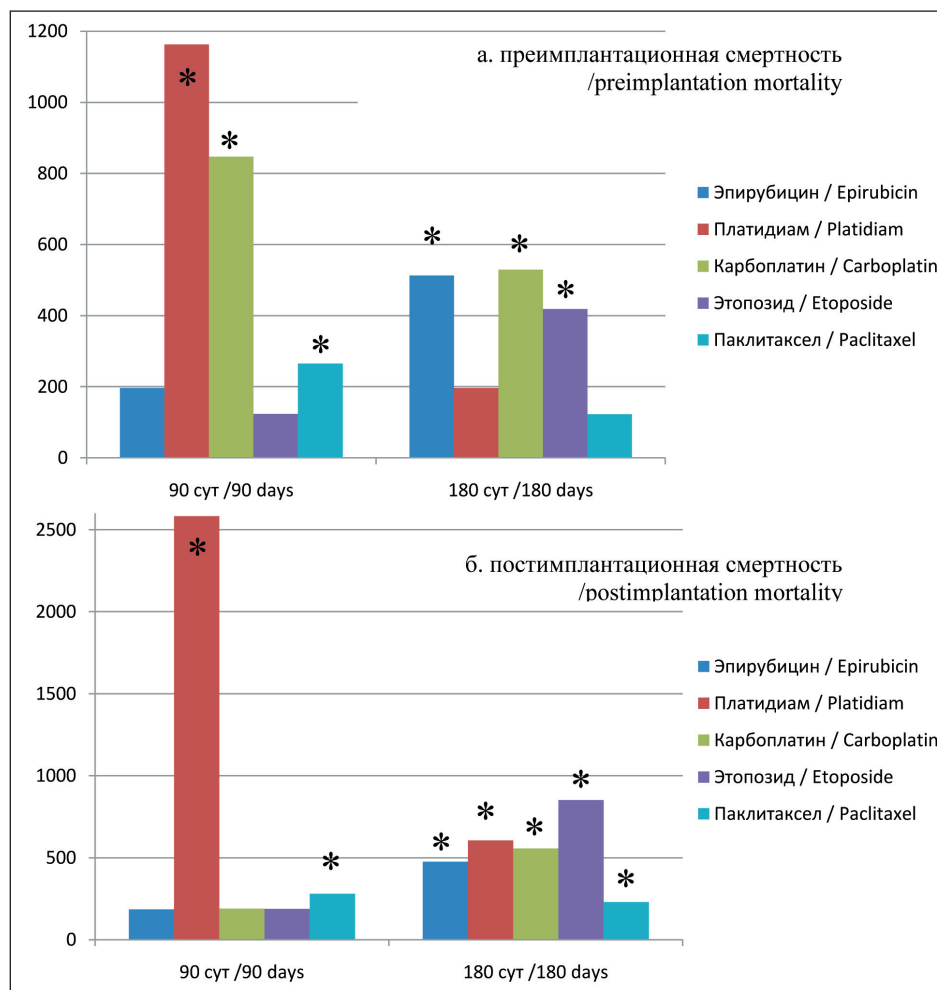


Рис. 1. Эмбриональная гибель у самок в отдаленные сроки после введения цитостатических препаратов (% от контроля). Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$, U -критерий Манна – Уитни)
Fig. 1. Embryonic death in females in the long term after administration of cytostatic drugs (% of control). Notes: * – statistically significant differences compared to the control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test)

сле начала эксперимента признаки более раннего, чем в контроле, снижения фолликулярного пула отмечались в яичниках животных всех экспериментальных групп. Количество примордиальных фолликулов статистически значимо сокращалось – в 1,3–3,6 раза, двух- и многослойных – в 1,4–2,0 раза (исключение составили животные, получавшие карбоплатин), общее число структурно-функциональных элементов – в 1,3–2,7 раза (кроме самок, которым вводили карбоплатин). Введение эпурибидина приводило также к снижению количества овулирующих фолликулов и снижению атретических процессов. Способность животных к спариванию и зачатию сохранялась на уровне контрольных значений у животных всех экспериментальных групп ($p \geq 0,05$). Гибель плодов до и после имплантации через 90 сут после начала эксперимента возрастала у крыс-самок, получавших платиноиды и паклитаксел (рис. 1а, б). Наиболее

высокие значения этих показателей отмечались на фоне введения платидиама. Через 180 дней после начала эксперимента эмбриональная смертность оказалась повышенной у крыс всех экспериментальных групп (рис. 1а, б).

Количество примордиальных фолликулов на фоне совместного использования цитостатического препарата и рГ-КСФ превышало контрольные значения в 1,4 раза, двух- и многослойных фолликулов – в 2,3 раза, количество атретических фолликулов снижалось в 1,4 раза (рис. 2). Содержание антимюллерова гормона в плазме крови у крыс-самок, которым вводили один цитостатический препарат, сокращалось на 25 %, при совместном использовании этопозид и рГ-КСФ этот показатель статистически значимо не отличался от такового у интактных животных (фон, рис. 3.). Показатели эмбриональной смертности через 90 сут после сочетанного введения

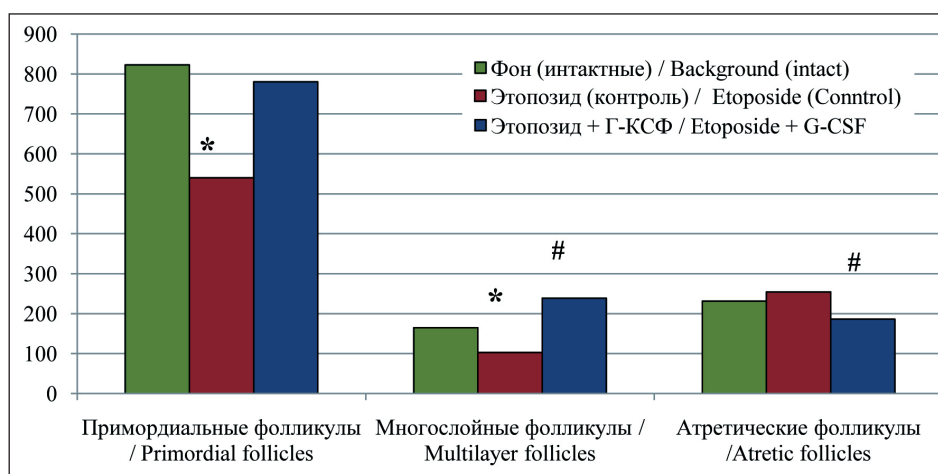


Рис. 2. Количество структурно-функциональных элементов яичников крыс через 1 сут после введения этопозид и Г-КСФ.

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни);

– различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни);

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Fig. 2. The number of structural and functional elements of rat ovaries 1 day after administration of etoposide and G-CSF.

Notes: * – statistically significant differences compared to the background ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test);

– statistically significant differences compared to the control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test);

G-CSF – granulocyte colony stimulating factor

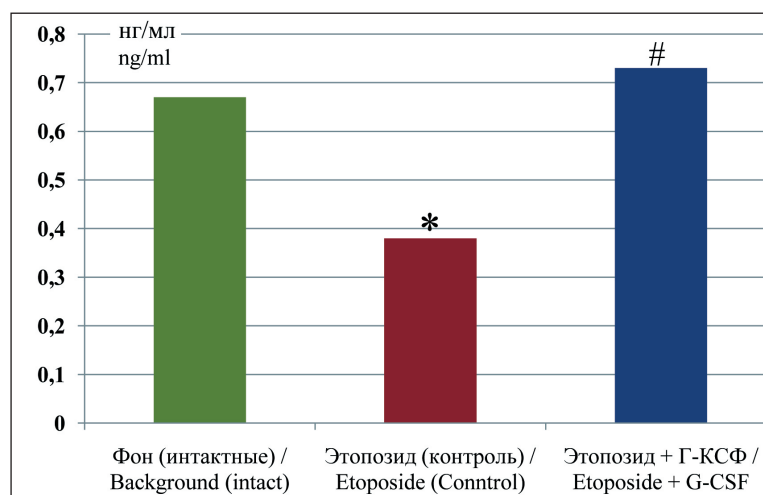


Рис. 3. Влияние ГКСФ на концентрацию антимюллерова гормона (АМГ) в сыворотке крови половозрелых крыс-самок, получавших этопозид.

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни); # – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни); Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Fig. 3. The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the concentration of antimüllerian hormone (AMH) in the blood serum of adult female rats treated with etoposide.

Notes: * – statistically significant differences compared to the background ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test); # – statistically significant differences compared to the control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test);

G-CSF – granulocyte colony stimulating factor

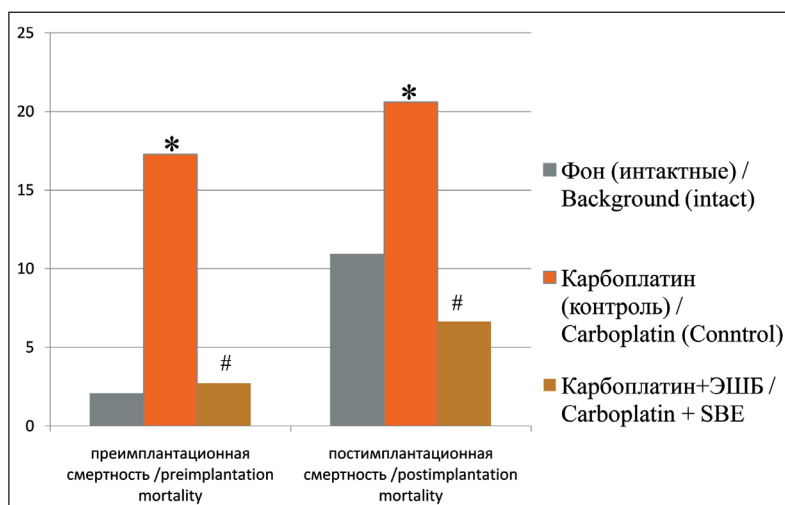


Рис. 4. Влияние экстракта шлемника байкальского на показатели эмбриональной гибели у крыс-самок, получавших карбоплатин за 90 сут до спаривания с интактными самцами. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни);

– статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна – Уитни); ЭШБ – экстракт шлемника байкальского

Fig. 4. Effect of Baikal Scutellaria extract on fetal mortality in female rats treated with carboplatin 90 days before mating with intact males. Notes: * – statistically significant differences compared to the background ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test); # – statistically significant differences compared to the control ($p \leq 0.05$, Mann – Whitney U test); SBE – Scutellaria Baicalensis extract

карбоплатина и экстракта шлемника байкальского оказались сниженными до уровня интактных животных (рис. 4).

Обсуждение

Результаты эксперимента показали, что исследуемые виды цитостатических воздействий приводили к раннему истощению овариального резерва, но сроки его наступления существенно варьировали. Наиболее раннее сокращение фолликулярного пула наблюдалось в яичниках крыс, которым вводили эпирубицин, наименьшее – карбоплатин. Полученные данные подтверждают предположения Н.А. Kim et al. о высокой токсичности антрациклинов (сопоставимой с таковой при использовании циклофосфана) на овариальный резерв [8]. Данные литературы об отдаленных последствиях действия платиноидов на яичники носят противоречивый и предварительный характер [9, 10]. Истощение овариального резерва, по результатам настоящего исследования, на фоне введения платиноидов оказалось менее выраженным, чем при использовании других препаратов, что согласуется с данными Н. Roness et al., свидетельствующими о том, что эти соединения не приводят к существенной гибели примордиальных фолликулов [9]. Сравнительный анализ фолликулярного пула на фоне введения платидиума и карбоплатина показывает, что после использования последнего вероятность наступления более ранней менопаузы ниже. Это может быть обусловлено тем, что платидиум вызывает более высокий уровень окислительного стресса в клетках, чем карбоплатин [11]. Величина репродуктивного токсикологического потенциала паклитаксела на яичники, судя по данным литературы, не позволяет однозначно ответить на вопрос о сроках наступления ранней менопаузы [12]. Результаты настоящего исследования показали, что отдаленные эффекты паклитаксела имеют умеренную степень выраженности. В экспериментальной работе A. Stefansdottir et al., проведенной *in vitro*, показано,

что при введении этопозида ооциты, заключенные в фолликулярный эпителий, сохраняются [13]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о существенном сокращении овариального резерва в отдаленные сроки после введения этопозид. Обобщая полученные данные, можно заключить, что, судя по количественным показателям фолликулярного пула в отдаленные сроки после введения препаратов, токсичность исследуемых средств снижается в следующем порядке: эпирубицин → этопозид → паклитаксел → платидиум → карбоплатин. Способность к оплодотворению и к зачатию сохраняется, что свидетельствует о том, что существенного нарушения гормонального фона не наблюдается. Однако их репродуктивный потенциал, на фоне введения всех препаратов, ограничен из-за повышенной эмбриональной гибели. Анализ причин эмбриональной смертности у женщин показывает, что более чем в 50 % случаев это является результатом генетических аномалий оплодотворенной яйцеклетки, и прежде всего анеуплоидии [14]. Отмеченные выше факты повышения эмбриональной смертности могут быть обусловлены генетическими повреждениями, так как все исследуемые препараты обладают способностью вызывать численные аномалии хромосом, в том числе и в ооцитах примордиальных фолликулов [9]. Исследования последних лет показали, что к числу причин потери плода принадлежит также повреждение митохондриальной ДНК [15], которая является мишенью действия ряда цитостатических препаратов (платиноидов, паклитаксела) [16]. В связи с этим нельзя исключить, что многократное возрастание эмбриональной гибели, выявленное в настоящем исследовании после введения препаратов платины, а также паклитаксела, обусловлено не только анеуплоидией, но и токсичностью на митохондриальную ДНК. При анализе результатов показателей эмбриональной гибели в зависимости от сроков скрещивания (90 и 180 сут) обращает на себя внимание тот факт, что при введении одних

препаратов эмбриональная смертность уменьшается с течением времени (платиноиды, паклитаксел), а при других (этопозид, эпирубицин), напротив, возрастает. Это может быть обусловлено различным функциональным состоянием системы репарации ДНК ооцитов примордиальных фолликулов после воздействия каждого из используемых препаратов. На основании полученных данных можно, вероятно, заключить, что для таксанов и платиноидов сроки зачатия после химиотерапии должны быть максимально продлены, в то время как после введения антрациклиновых антибиотиков и ингибиторов топоизомеразы с течением времени вероятность деторождения снижается.

С точки зрения отдаленных последствий химиотерапии важными являются защита пула ооцитов примордиальных фолликулов от гибели и поиск путей защиты их генома. На начальных этапах таких исследований наиболее важным является вопрос о том, может ли предполагаемое средство защиты использоваться пациентами с онкологическим анамнезом. С этой точки зрения одним из возможных средств защиты примордиальных фолликулов является рчГ-КСФ. В плане онкологической безопасности это лекарственное средство достаточно хорошо протестировано. Кроме того, доказана его терапевтическая активность в лечении ряда репродуктивных патологий женщин [17]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что рчГ-КСФ является эффективным средством предотвращения гибели примордиальных фолликулов, что, безусловно, должно привести к увеличению длительности репродуктивного периода. Защитный эффект рчГ-КСФ может быть следствием его антиапоптотических свойств [18], а также связан с выявленной в настоящем исследовании способностью повышать

уровень антимюллера гормона, который ингибирует рост первичного фолликула [9].

Фармакологические стратегии улучшения репарации ДНК ооцитов примордиальных фолликулов от цитостатического воздействия сегодня активно разрабатываются, но эти исследования находятся пока на предварительных стадиях изучения [3, 19]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что с этой целью можно использовать экстракт шлемника байкальского. Это растительное средство обладает умеренной противоопухолевой активностью и снижает побочные эффекты цитостатических препаратов [20]. Кроме того, экстракт шлемника байкальского характеризуется наличием антимутагенных свойств [21]. Механизм антимутагенной активности этого препарата может быть связан с его установленными антиоксидантными свойствами [22].

Заключение

В отдаленные сроки (через 90 и 180 сут) после введения всех исследуемых препаратов способность животных к спариванию и зачатию сохраняется, однако выявляются признаки раннего истощения овариального резерва и снижение репродуктивного потенциала. Степень риска наступления ранней менопаузы повышена в большей степени после использования эпирубина, этопозиды и паклитаксела, в меньшей степени – после платидиама и карбоплатина. Репродуктивный потенциал животных сокращен из-за высокой эмбриональной гибели. Наиболее токсичными в этом плане оказались платиносодержащие препараты. Эффективными средствами повышения репродуктивного потенциала являются рчГ-КСФ и экстракт шлемника байкальского.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bedoschi G.M., Navarro P.A., Oktay K.H. Novel insights into the pathophysiology of chemotherapy-induced damage to the ovary. *Panminerva Med.* 2019 Mar; 61(1): 68–75. doi: 10.23736/S0031-0808.18.03494-8.
2. Spears N., Lopes F., Stefansdottir A., Rossi V., De Felici M., Anderson R.A., Klinger F.G. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update.* 2019; 25(6): 673–693. doi: 10.1093/humupd/dmz027.
3. Winship A.L., Stringer J.M., Liew S.H., Hutt K.J. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Hum Reprod Update.* 2018 Mar 1; 24(2): 119–134. doi: 10.1093/humupd/dmy002.
4. Yuksel A., Bildik G., Senbabaoglu F., Akin N., Arvas M., Unal F., Kilic Y., Karanfil I., Eryilmaz B., Yilmaz P., Ozkanbas C., Taskiran C., Aksoy S., Guzel Y., Balaban B., Ince U., Iwase A., Urman B., Oktem O. The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depending upon the category of the drugs and the type of granulosa cells. *Hum Reprod.* 2015 Dec; 30(12): 2926–35. doi: 10.1093/humrep/dev256.
5. Poorvu P.D., Frazier A.L., Feraco A.M., Manley P.E., Ginsburg E.S., Laufer M.R., LaCasce A.S., Diller L.R., Partridge A.H. Cancer Treatment-Related Infertility: A Critical Review of the Evidence. *JNCI Cancer Spectr.* 2019 Apr 9; 3(1): pkz008. doi: 10.1093/jncics/pkz008.
6. Garcia-Rodriguez A., Gosalvez J., Ashok A., Roy R., Johnston S.D. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(1): 31. doi: 10.3390/ijms20010031.
7. Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Шреде О.В., Гуськова Т.А., Верстакова О.Л., Сябаев Р.Д. Методические

рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М., 2013. С. 80–93. [Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyeva A.M., Shrede O.V., Gus'kova T.A., Versta-kova O.L., Sjabayev R.D. Methodical recommendations for the study of reproductive toxicity of medicines. Guidelines for preclinical studies of drugs. Moscow, 2013. P. 80–93. (in Russian)].

8. Kim H.A., Choi J., Park C.S., Seong M.K., Hong S.E., Kim J.S., Park I.C., Lee J.K., Noh W.C.; The ASTRRA trial investigators. Post-chemotherapy serum anti-Müllerian hormone level predicts ovarian function recovery. *Endocr Connect.* 2018 Aug 1; 7(8): 949–956. doi: 10.1530/EC-18-0180.

9. Roness H., Kalich-Philosoph L., Meirou D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update.* 2014 Sep-Oct; 20(5): 759–74. doi: 10.1093/humupd/dmu019.

10. Nguyen Q.N., Zerafa N., Liew S.H., Morgan F.H., Strasser A., Scott C.L., Findlay J.K., Hickey M., Hutt K.J. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility. *Cell Death Dis.* 2018 May 23; 9(6): 618. doi: 10.1038/s41419-018-0633-7.

11. Marullo R., Werner E., Degtyareva N., Moore B., Altavilla G., Ramalingam S.S., Doetsch P.W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One.* 2013 Nov 19; 8(11): e81162. doi: 10.1371/journal.pone.0081162.

12. Kim Y.Y., Kim W.O., Liu H.C., Rosenwaks Z., Kim J.W., Ku S.Y. Effects of paclitaxel and cisplatin on in vitro ovarian follicle devel-

opment. Arch Med Sci. 2019 Oct; 15(6): 15101519. doi: 10.5114/aoms.2019.81730.

13. Stefansdottir A., Johnston Z.C., Powles-Glover N., Anderson R.A., Adams I.R., Spears N. Etoposide damages female germ cells in the developing ovary. BMC Cancer. 2016 Aug 11; 16(1): 482. doi: 10.1186/s12885-016-2505-9.

14. Смирнова А.Д., Зыряева Н.А., Анишина М.Б. Возрастные изменения и риск хромосомных аномалий в ооцитах человека. Проблемы репродукции. 2019; (2): 16–26. [Smirnova A.D., Zyrjaeva N.A., Anishina M.B. Age-related changes and the risk of chromosomal abnormalities in human oocytes. Problems of Reproduction. 2019; (2): 16–26. (in Russian)].

15. Mikula-Pietrasik J., Witucka A., Pakula M., Uruski P., Begier-Krasińska B., Niklas A., Tykarski A., Książek K. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. Cell Mol Life Sci. 2019; 76(4): 681–697. doi: 10.1007/s00018-018-2954-1.

16. Cocetta V., Ragazzi E., Montopoli M. Mitochondrial Involvement in Cisplatin Resistance. Int J Mol Sci. 2019; 20(14): 3384. doi: 10.3390/ijms20143384.

17. Eftekhari M., Naghshineh E., Khani P. Role of granulocyte colony-stimulating factor in human reproduction. J Res Med Sci. 2018; 23: 7. doi: 10.4103/jrms.JRMS 628 17.

18. Zhai S.Z., Guo H.D., Li S.Q., Zhao X.S., Wang Y., Xu L.P., Liu K.Y., Huang X.J., Chang Y.J. Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Proliferation and Apoptosis of B Cells in Bone Marrow of Healthy Donors. Transplant Proc. 2020; 52(1): 345–352. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.11.004.

19. Hao X., Anastácio A., Liu K., Rodriguez-Wallberg K.A. Ovarian Follicle Depletion Induced by Chemotherapy and the Investigational Stages of Potential Fertility-Protective Treatments-A Review. Int J Mol Sci. 2019 Sep 23; 20(19): 4720. doi: 10.3390/ijms20194720.

20. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей. М., 2008. 232 с. [Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. Plants in the treatment of tumors. Moscow, 2008. 232 p. (in Russian)].

21. Неупокоева О.В., Воронова О.Л., Чуринов А.А., Шилов И.В., Кузовкина И.Н. Коррекция цитогенетических эффектов паклитаксела и цисплатина экстрактом корней шлемника байкальского. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013; 76(12): 24–27. [Neupokoeva O.V., Voronova O.L., Churin A.A., Shilova I.V., Kuzovkina I.N. Correction of the cytogenetic effects of paclitaxel and cisplatin with an extract of the roots of Scutellaria baicalensis. Experimental and Clinical Pharmacology. 2013; 76(12): 24–27. (in Russian)].

22. Потапова А.А., Доркина Е.Г., Сергеева Е.О., Саджая Л.А. Влияние сухого экстракта из корней Шлемника Байкальского (Scutellaria Baicalensis Georgi) на развитие окислительного стресса, вызванного циклофосфаном. Современные проблемы науки и образования. 2013; (6). [Potapova A.A., Dorkina E.G., Sergeeva E.O., Sadzhaja L.A. The effect of dry extract from the roots of Shlemnik Baikal-sky (Scutellaria Baicalensis Georgi) on the development of oxidative stress caused by cyclophosphamide. Modern Problems Sciences and Education. 2013; (6). (in Russian)].

Поступила/Received 08.06.2020
Принята в печать/Accepted 23.11.2020

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Боровская Татьяна Геннадьевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: repropharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): I-9421-2017. ORCID: 0000-0002-0651-4841. Author ID (Scopus): 6602710212.

Гольдберг Виктор Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, заведующий отделением химиотерапии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7587-0560. Researcher ID (WOS): C-8911-2012. Author ID (Scopus): 54420064600.

Полужикова Марина Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: mariko-tomsk@gmail.com. Researcher ID (WOS): J-1748-2017. ORCID: 0000-0002-9052-3096. Author ID (Scopus): 6506366642.

Выжужанина Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). Researcher ID (WOS): J-1763-2017. ORCID: 0000-0001-6151-0985. Author ID (Scopus): 54400640200.

Щемерова Юлия Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). Researcher ID (WOS): D-1212-2018. ORCID: 0000-0002-0895-9000. Author ID (Scopus): 9842887800.

Григорьева Валерия Александровна, младший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). Researcher ID (WOS): J-2316-2017. ORCID: 0000-0003-1863-088X. Author ID (Scopus): 157649622003.

Лигачёва Анастасия Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: vittelli@mail.ru. Researcher ID (WOS): P-6962-2014. ORCID: 0000-0002-3337-151. Author ID (Scopus): 25653816900.

Бохан Елена Александровна, младший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5289-8079.

ВКЛАД АВТОРОВ

Боровская Татьяна Геннадьевна: существенный вклад в разработку концепции и интерпретацию научной работы, составление черновика рукописи, утверждение публикуемой версии рукописи.

Гольдберг Виктор Евгеньевич: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Полужикова Марина Евгеньевна: сбор, статистический анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи, оформление окончательного варианта рукописи.

Вычужанина Анна Владимировна: сбор, статистический анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи.
Щемерова Юлия Александровна: сбор, статистический анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи, оформление окончательного варианта статьи.

Григорьева Валерия Александровна: сбор, статистический анализ и интерпретация данных, написание черновика рукописи.

Лигачёва Анастасия Александровна: сбор, статистический анализ данных, написание черновика рукописи.

Бохан Елена Александровна: сбор, статистический анализ данных, написание черновика рукописи.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Tatyana G. Borovskaya, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: repharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): I-9421-2017. Author ID (Scopus): 6602710212.

Viktor E. Goldberg, MD, DSc, Professor, Head of Chemotherapy Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: goldbergve@mail.ru. Researcher ID (WOS): C-8911-2012. Author ID (Scopus): 54420064600.

Marina E. Poluektova, PhD, Senior Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): J-1748-2017. Author ID (Scopus): 6506366642.

Anna V. Vychuzhanina, PhD, Senior Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): J-1763-2017. Author ID (Scopus): 54400640200.

Yuliya A. Shchemerova, PhD, Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): 1212-2018. Author ID (Scopus): 9842887800.

Valeria A. Grigoreva, Junior Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): J-2316-2017. Author ID (Scopus): 157649622003.

Anastasia A. Ligacheva, PhD, Research, Laboratory of Immunopharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): P-6962-2014. ORCID: 0000-0002-3337-1516. Author ID (Scopus): 25653816900.

Elena A. Bokhan, Junior Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

AUTHOR CONTRIBUTION

Tatyana G. Borovskaya: significant contribution to the development of the concept and interpretation of scientific work, compilation of a draft manuscript, approval published version of the manuscript.

Viktor E. Goldberg: critical review with valuable intellectual content.

Marina E. Poluektova: collection, statistical analysis and interpretation data, writing a draft manuscript, finalizing manuscripts.

Anna V. Vychuzhanina: collection, statistical analysis and interpretation data, writing a draft manuscript.

Yuliya A. Shchemerova: collection, statistical analysis and interpretation data, writing a draft manuscript.

Valeria A. Grigoreva: collection, statistical analysis and interpretation data, writing a draft manuscript.

Anastasia A. Ligacheva: collection and statistical analysis data, writing a draft manuscript.

Elena A. Bokhan: collection data, writing a draft manuscript.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.