

Е.Д. Гольдберг, Т.Г. Боровская

ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

При изучении морфологического и функционального состояния репродуктивной системы крыс линии Вистар на фоне введения платиносодержащих препаратов и антрациклиновых антибиотиков установлено, что характер отдаленных гонадотоксических эффектов на мужскую репродуктивную систему зависит от принадлежности препарата к определенной группе химических соединений; отдаленные эффекты действия препаратов на женскую репродуктивную систему сходны. Потомство животных, получавших препараты разных групп, характеризуется, в основном, однотипными нарушениями. Степень их проявления зависит от пола родителя, получавшего препарат, и от срока скрещивания после цитостатического воздействия.

Ключевые слова: цитостатические препараты, репродуктивная система, отдаленные токсические эффекты

Практически с каждым онкологическим больным на определенном этапе его заболевания обсуждается вопрос о возможности использования химиотерапии. Арсенал современной противоопухолевой химиотерапии насчитывает около 100 препаратов с различным механизмом действия. В настоящее время ведется интенсивный поиск средств, избирательно повреждающих опухолевые клетки, но основу лекарственного лечения злокачественных опухолей составляют цитостатические препараты. Более того, показана перспективность их использования, так как они при совместном применении с веществами, селективно убивающими опухолевые клетки, значительно повышают эффективность последних.

В настоящее время выявлен ряд злокачественных новообразований, при цитостатическом лечении которых удается добиться длительных полных ремиссий [6]. Обнадёживающие результаты лечения ряда онкологических заболеваний привели к возрастанию интереса к проблеме бесплодия, как к одному из последствий цитостатического воздействия [8, 13, 14]. Высокая чувствительность гонад к цитостатическим препаратам известна давно и объясняется их принадлежностью к быстро обновляющимся клеточным системам. Актуальность этой проблемы сегодня связана также с совершенствованием методов диагностики, что приводит к увеличению количества больных с ранними формами рака, достаточно успешно поддающимися лечению, в том числе и химиотерапевтическому. В связи с этим возникает актуальная задача сохранения качества жизни пациентов, особенно с учетом их молодого возраста. Следует отметить, что 70% из них считают репродуктивную функцию важным фактором их жизни [14]. По данным клинических наблюдений, процент бесплодных больных при разных схемах лечения оказывается не одинаковым, а при некоторых из них – стерильность носит необратимый характер [2]. Это побуждает к экспериментальному изучению гонадотоксических эффектов, позволяющих, прежде всего, оценить действие отдельного препарата, что сложно сделать в условиях клиники.

Имеющиеся в литературе экспериментальные данные в большинстве случаев посвящены изучению гонадотоксических эффектов алкилирующих соединений и

антиметболитов (циклофосфана, Тио-Тэфа, метотрексата) и часто носят фрагментарный характер [3, 5, 12]. Менее изученными в этом плане являются препараты, принадлежащие к комплексным соединениям платины и антрациклиновым антибиотикам. Между тем антибластомные средства этих групп являются базисными во многих схемах и занимают лидирующее положение в химиотерапии опухолей.

Целью данного исследования явилось изучение морфологического и функционального состояния репродуктивной системы крыс линии Вистар на фоне введения комплексных соединений платины I поколения (платидиама), II поколения (карбоплатина) и антибиотиков антрациклинового ряда – доксорубина и фарморубина. В задачи исследования входило выяснение вопроса о том, в какой степени гонадотоксические эффекты, особенно отдаленные, определяются принадлежностью препарата к конкретному классу химических соединений, и зависят ли они от индивидуального химического строения препарата. Изучению отдаленных эффектов (3, 6 мес.) предшествовало исследование ранних эффектов (до 1 мес.), которые во многом определяют отдаленные последствия. Противоопухолевые препараты вводили животным (самцам, самкам) в эквивалентных дозах (однократно, внутривенно в МПД). Крысам-самкам вводили препарат в одной и той же фазе полового цикла – на стадии проэструс.

В первой серии экспериментов изучалось состояние мужской репродуктивной системы. Установлено, что морфологическая картина мужских половых желез в ранние сроки после введения изученных препаратов была, в основном, сходной. Так, на фоне отека интерстиция часть эпителиоцитов погибала, в других – наблюдались деструктивные и дистрофические изменения. Сперматогенная ткань выглядела истонченной. При этом возрастало число извитых семенных канальцев со слущенным эпителием; снижались индекс сперматогенеза, количество сперматогоний, мейотическая активность ($p < 0,05$). Непролиферирующие клетки также оказались чувствительными к препаратам, о чем свидетельствовало, прежде всего, олигоспермия, наблюдаемая в первые дни опыта у животных всех экспериментальных

групп. Следует отметить, что она была выражена в большей степени на фоне применения антрациклиновых антибиотиков. Несмотря на общую направленность, отмеченные эффекты при введении каждого из исследуемых препаратов различались по степени выраженности, срокам проявления, времени наступления репаративных процессов, что может быть связано с неодинаковой чувствительностью половых клеток различных типов к действию каждого из них. Особенно обращают на себя внимание два факта, довольно отчетливо позволяющие выявить механизм нарушения сперматогенеза и объяснить особенности отдаленных гонадотоксических эффектов препаратов разных групп. Первый – большое количество канальцев со слущенным эпителием во все сроки исследования на фоне введения карбоплатина. Второй – происходящее с течением времени угнетение сперматогенеза и прогрессирующее опустошение клеточной популяции сперматогоний в семенниках крыс, получавших фарморубицин. Последнее является, очевидно, результатом повреждающего действия на сперматоциты первого порядка и стволовые клетки.

В отдаленные сроки (через 1, 3 мес.) мужские половые железы животных, получавших препараты разных групп, различались по своей морфологической картине. Так, при введении комплексных соединений платины она была, в основном, сходна с таковой в контроле, но на фоне введения карбоплатина наблюдалась, как и в ранние сроки, усиленная элиминация созревающих половых клеток. В группе крыс, получавших антрациклиновые антибиотики, сперматогенный эпителий выглядел истонченным, а при введении фарморубицина в отдельных канальцах на базальной мембране сохранялось небольшое число сперматогоний, что, судя по времени проявления, может быть результатом повреждения стволовых клеток. Количественная оценка повреждений, соответственно, показала высокий процент канальцев со слущенным эпителием при введении карбоплатина, снижение индекса сперматогенеза, количества сперматогоний в семенниках крыс, получавших фарморубицин ($p < 0,05$). Истончение сперматогенной ткани сопровождалось в последнем случае олигоспермией и увеличением процента патологических форм спермиев ($p < 0,05$). Положительным моментом является тот факт, что через 6 мес. происходила постепенная нормализация выявленных нарушений.

При анализе количественных показателей (с учетом сроков проявления токсических эффектов, степени их выраженности, продолжительности сперматогенеза у крыс) было выявлено, что на фоне введения комплексных соединений платины происходит повреждение половых клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла, что, очевидно, связано с тем, что препараты этой группы являются фазовонеспецифическими. Основной же мишенью действия антрациклиновых антибиотиков оказались клетки, в которых происходит синтез ДНК – сперматогонии и сперматоциты первого порядка, что обусловлено способностью этих антибластомных средств повреждать клетки преимущественно в S-фазе клеточного цикла. Из двух препаратов этой группы фарморубицин угнетал сперматогенез в большей степени, чем доксорубицин. Обращал на себя внимание и тот факт, что при введении антрациклиновых антибиотиков наблюдалось выраженное повреждение неделящихся

клеток, что может быть связано с их способностью оказывать повреждающее действие на мембраны митохондрий клеток семенников [1].

Важным представлялось выяснение вопроса о том, сопровождаются ли отмеченные морфологические изменения семенников снижением интегрального показателя генеративной функции – эффективности спаривания, которая, как известно, зависит от общего количества половых клеток и их функциональной активности. Оказалось, что стерильность наблюдалась на фоне введения двух из исследуемых препаратов – фарморубицина и карбоплатина. Она была обусловлена повреждающим действием первого на сперматозоиды и сперматогонии, второго – на сперматиды. Сроки наступления стерильности у крыс, получавших фарморубицин, совпадали по времени проявления с выраженной олигоспермией. Снижение эффективности спаривания на фоне введения карбоплатина было обусловлено угнетением функциональной активности спермиев, о чем свидетельствовало уменьшение количества их подвижных форм и максимальной продолжительности их движения ($p < 0,05$).

Одним из интегральных показателей, характеризующих генеративную функцию семенников экспериментальных животных, является уровень эмбриональной смертности у спаренных с ними самок [7]. Уменьшение количества выживших зигот свидетельствует о функциональной (в том числе и генетической) неполноценности спермиев. Статистически значимое увеличение эмбриональной смертности у крыс-самок наблюдалось при спаривании их с самцами в ранние сроки после введения фарморубицина, в отдаленные – после введения как фарморубицина, так и платидиама.

Суммируя данные об отдаленных гонадотоксических эффектах препаратов разных групп (табл. 1), можно заключить, что через 1, 3 и 6 мес. после введения антрациклиновых антибиотиков наблюдается угнетение сперматогенеза, которое на фоне использования фарморубицина выражено настолько, что приводит к временной 100% стерильности животных. В отдаленные сроки после введения платиноидов эффективность спаривания не снижена, но наблюдается функциональная неполноценность гамет, причем только при введении платидиама. Морфологические изменения, наблюдаемые в отдаленные сроки после введения карбоплатина, не сопровождаются угнетением воспроизводящей функции. В основе отдаленных эффектов лежит, судя по времени проявления, токсическое действие препаратов на сперматоциты первого порядка и сперматогонии. Следует отметить, что истончение сперматогенной ткани, усиление слущивания эпителиоцитов могут быть следствием повреждения гематотестикулярного барьера, но при морфологическом анализе не было выявлено других признаков аутоиммунного орхита.

Во второй серии экспериментов было изучено состояние женской репродуктивной системы. Установлено, что в ранние сроки после введения всех исследуемых антибластомных средств в яичниках крыс наблюдались сходные по характеру морфологические изменения, которые, судя по данным литературы, отмечаются при введении других цитостатических препаратов [5]. Они характеризуются гибелью клеток фолликулярного эпителия и распадом ядер яйцеклеток, образованием фолли-

кулярных кист, кист желтого тела. На серийных срезах яичников был произведен подсчет их структурно-функциональных элементов, который показал, что количество зрелых фолликулов и желтых тел снижалось незначительно, тогда как число примордиальных фолликулов статистически значимо уменьшалось при введении всех препаратов. Платидиам вызывал также сокращение количества многослойных фолликулов, а фарморубидин усиливал атретические процессы ($p < 0,05$). В первые дни после введения карбоплатина, напротив, наблюдалась стимуляция фолликулогенеза, обусловленная, видимо, гормональным дисбалансом. Так, количество многослойных фолликулов увеличивалось, атретических фолликулов – снижалось ($p < 0,05$).

С точки зрения отдаленных последствий важное значение имеют, очевидно, не индивидуальные особенности действия препаратов на яичники, а уменьшение их резервных возможностей в целом, а также токсическое действие на яйцеклетки примордиальных фолликулов. По клинике в отдаленные сроки после цитостатической химиотерапии возникает большая вероятность наступления ранней менопаузы [2]. В связи с этим важным является выяснение вопроса о том, какие препараты оказываются в этом плане более токсичными. Подсчет количества генеративных элементов яичников крыс через 6 мес. после начала опыта показал, что их число действительно снижено по сравнению с контролем, особенно это касается примордиальных фолликулов ($p < 0,05$). Более выраженные атрофические процессы наблюдались в отдаленные сроки после введения антрациклиновых антибиотиков.

Оценка гормональной функции женских половых желез проводилась по показателям продолжительности каждой из фаз полового цикла животных и способности к спариванию. При изучении эстрального цикла было выявлено, что в ранние сроки (в первые дни) после введения всех препаратов его продолжительность увеличивалась за счет более длительной стадии покоя, что может быть обусловлено повреждением гормонпродуцирующих клеток. С учетом того, что эстральный цикл самок достаточно быстро восстанавливался, способность к спариванию у крыс существенно не снижалась ни в ранние, ни в отдаленные сроки после введения препаратов.

Генеративная функция яичников оценивалась по эффективности спаривания и эмбриональной смертности. Следует отметить, что к снижению воспроизводящей способности самок при цитостатических воздействиях могло привести, прежде всего, токсическое действие препаратов на яйцеклетки созревающих фолликулов, отчетливо видимое при морфологическом анализе. Оценка генеративной функции производилась в первые дни после введения препаратов, а также через 1, 3 и 6 мес.

С учетом длительности созревания фолликулов скрещивание в ранние сроки характеризует воздействие на яйцеклетки зрелых, в том числе преовуляторных, фолликулов, а в отдаленные – воздействие на созревающие и примордиальные фолликулы [7]. При скрещивании в ранние сроки наблюдалось снижение эффективности спаривания ($p < 0,05$), т. е. частичное бесплодие, что может быть связано с высокой чувствительностью яйцеклеток преовуляторных фолликулов к цитостатическим

воздействиям, так как в них происходит завершение (после длительного перерыва) мейотического деления. Эффективность спаривания животных в отдаленные сроки была незначительно снижена только при введении доксорубидина, но в целом она, как правило, не снижалась, что может быть обусловлено меньшей чувствительностью к действию препаратов яйцеклеток созревающих фолликулов, которые находятся на стадии застывшей диктиотены.

Показатели эмбриональной смертности достоверно повышались, по сравнению с контролем, у самок всех опытных групп при скрещивании как в ранние, так и в отдаленные сроки. Они были значительно выше при воздействии на преовуляторные фолликулы, особенно при введении карбоплатина. Очевидно, что стимуляция фолликулогенеза, выявленная в первые дни опыта при введении этого препарата, не является в данном случае положительным моментом. Следует отметить, что снижение генеративной функции как в ранние, так и в отдаленные сроки после введения препаратов могут быть, безусловно, следствием повреждающего действия препаратов не только на половые железы, но и на другие органы репродуктивной системы и материнский организм в целом.

Обобщая данные об отдаленных эффектах препаратов на женскую репродуктивную систему (табл. 2), можно заключить, что через 3 и 6 мес. после введения как комплексных соединений платины, так и антрациклиновых антибиотиков отмечается истощение резервных возможностей яичников, угнетение воспроизводящей функции, более выраженное на фоне введения антрациклиновых антибиотиков.

Несомненный интерес представляло выяснение вопроса о реализации отдаленных гонадотоксических эффектов препаратов в постнатальном периоде, тем более что данные литературы свидетельствуют о далеко не единичных случаях рождения детей у пациентов, находящихся в длительной полной ремиссии после цитостатического лечения [9]. Следует сказать, что однозначный ответ на этот вопрос, судя по данным литературы, получен для пациентов, перенесших цитостатическую химиотерапию в детском возрасте [11]. Клинические данные о состоянии потомства родителей, один из которых получал цитостатические препараты в репродуктивном возрасте, достаточно противоречивы [9, 13].

В настоящее время мутагенное действие цитостатических препаратов на половые клетки интенсивно изучается с помощью генетических, цитогенетических методов исследования [10]. Показано, что часть генетически поврежденных клеток элиминируются или вызывают появление нежизнеспособных зигот, другие мутагенные эффекты могут реализоваться в постнатальном развитии у потомства.

При изучении состояния потомства крыс линии Вистар (самцов и самок), которое было получено при скрещивании в отдаленные сроки после введения противоопухолевых препаратов, было обследовано около 6 тыс. плодов и новорожденных. Состояние потомства изучалось по критериям оценок, используемых при исследовании репродуктивной токсичности лекарственных веществ. Установлено, что в потомстве как самок, так и самцов опытных групп увеличено количество плодов с патологическими изменениями внутренних органов,

торможением процессов оссификации, задержкой физического развития. Кроме того, было выявлено 4 случая уродств (один плод с мозговой грыжей, два – с аплазией конечности и один – с одной головой и двумя туловищами). Они были обнаружены на фоне введения всех препаратов, за исключением карбоплатина. Остальные изменения наблюдались при всех видах цитостатических воздействий, но степень их проявления оказалась разной. Более выраженные нарушения, в большинстве случаев, обнаружены в потомстве самок опытных групп. Положительным моментом явился тот факт, что с увеличением срока скрещивания после цитостатического воздействия жизнеспособность потомства возрастала.

Интегральный анализ результатов собственных исследований и данных литературы свидетельствует о том, что характер отдаленных гонадотоксических эффектов на мужскую репродуктивную систему зависит от принадлежности препарата к определенной группе химических соединений; отдаленные эффекты действия препаратов на женскую репродуктивную систему сходны. Потомство животных, получавших препараты разных групп, характеризуется, в основном, однотипными нарушениями. Степень их проявления зависит от пола родителя, получавшего препарат, и от срока скрещивания после цитостатического воздействия.

В настоящее время ведется интенсивный поиск путей снижения гонадотоксических эффектов цитостатической химиотерапии [8]. На основании результатов проведенных экспериментальных исследований можно заключить, что стимуляция сперматогенеза и применение овариопротекторов наиболее актуальна при использовании цитостатических препаратов, обладающих избирательным повреждающим действием на сперматогонию и примордиальные фолликулы. С целью уменьшения потенциальных клеток-мишеней в яичниках во время цитостатической химиотерапии (при терапии гемобластоза) в настоящее время уже используются эстроген-гестогенные препараты [8].

С учетом того, что в отдаленные сроки после цитостатических воздействий наблюдается недостаточность и других систем организма [4], имеющих важное значение для развития плода с целью снижения токсического действия на женскую репродуктивную систему, необходима, очевидно, не только защита гаметогенеза, но и охрана внутриутробного развития. С этой целью был использован модификатор биологических реакций противоопухолевых препаратов, обладающий антиоксидантными свойствами, – экстракт шлемника байкальского. При совместном применении его с карбоплатином наблюда-

лись более низкие показатели эмбриональной гибели и высокий индекс выживаемости потомства ($p < 0,05$).

Полученные в эксперименте результаты исследований гонадотоксических эффектов противоопухолевых препаратов в значительной степени могут быть экстраполированы на человека, хотя трудности при этом имеются. Многоплодность экспериментальных животных делает такой показатель, как частичная эмбриональная гибель, не вполне адекватным. В связи с этим у человека, по-видимому, при цитостатических воздействиях должны наблюдаться более высокая, чем в эксперименте, эмбриональная гибель (происходящая при еще не диагностируемой беременности) и выявляться меньше грубых нарушений у потомства.

LONG-TERM EFFECTS OF CYTOSTATIC TOXIC ACTION ON REPRODUCTIVE SYSTEM

E.D. Goldberg, T.G. Borovskaya

Under the study of morphological and functional states of reproductive system in rats of Wistar line against a background of platincontaining drugs and anticycline antibiotics administration it has been established that the character of distant gonadotoxic effects on male reproductive system depends on drug belonging to definite chemical compounds group. The long-term effects of preparations on female reproductive system are similar. The animals posterity received different groups drugs mainly have similar disturbances. Their development degree depends on parents sex, received preparation and the period of interbreeding after cytostatic exposure.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Е.А. Действие доксорубина на дыхание митохондрий семенников крыс в опытах *in vitro* / Е.А. Андреева, В.А. Хазанов // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. Томск, 1997. Т. 9. С. 10–11.
2. Введение в химиотерапию злокачественных опухолей / М.Л. Гершанович, В.А. Филлов, М.А. Акимов, А.А. Акимов. СПб., 1999. 143 с.
3. Влияние метотрексата на фолликулярный аппарат яичника / Г.А. Савицкий, Р.Д. Иванова, А.И. Никитин, М.П. Николайчук // Вопр. Онкологии. 1977. Т. 23. № 3. С. 84–86.
4. Гольдберг Е.Д. Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови / Е.Д. Гольдберг, В.В. Новицкий. Томск, 1988. 240 с.
5. Ландер Е.П. Влияние Тио-Тэф на яичники / Е.П. Ландер // Журн. общей биол. 1968. № 1. С. 121–125.

Таблица 1

Отдаленные эффекты токсического действия противоопухолевых препаратов на репродуктивную систему крыс-самок

Группа	Препарат	Морфологическое состояние яичников	Генеративная функция яичников		Причины отдаленных эффектов	
			Индекс беременности	Эмбриональная смертность		
Комплексные соединения платины	Платидиам	Снижение количества структурно-функциональных элементов	Норма	Повышена	Токсическое действие на многослойные и примордиальные фолликулы и на материнский организм в целом	
	Карбоплатин					
Антрациклиновые антибиотики	Доксорубин		Снижен			
	Фарморубин					

6. Противоопухолевая химиотерапия / Под ред. Н.И. Переводчиковой. М., 1993. 224 с.
7. Саноцкий И.Ф. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм / И.Ф. Саноцкий, В.Н. Фоменко. М., 1979. 231 с.
8. Шилин Д.Е. Использование овариопротекторов при цитостатической терапии у пациенток репродуктивного возраста / Д.Е. Шилин, Е.В. Игнашина // Пробл. эндокринол. 1999. Т. 45. № 6. С. 36–42.
9. Children fathered by men treated for testicular cancer conceived before, during and after chemotherapy – examinations for evidence of congenital malformations, malignancies and immunological defects / M. Babosa, M. Baky, S. Gundy et al. // Acta paediat. hung. 1992. Vol. 32. № 1. P. 11–30.
10. Female-specific dominant lethal effects in mice / M. Katoh, K. Cain, L. Yugles et al. // Mutat. Res. 1990. Vol. 230. № 2. P. 205–217.
11. Genetic dislase in offspring of long-term survivors of childhood and adcolescent cancer / J. Byrne, S. Rasmussen, S. Steinhorm et al. // Amer. J. Hum. Genet. 1998. Vol. 62. № 1. C. 45–52.
12. Ovarian toxicity of cyclophosphamide a lone and in combination with ovarian irradiation in the rat / E. Jarrell, E. Young Loi, R. Barr et al. // Cancer research. 1987. № 9. P. 2340–2343.
13. Retsas S. Fertility after prolonged chemotherapy for metastatic malignat disease / S. Retsas, H. Mackenzei, A. Mohith. // Lancet. 1996. № 9002. P. 687.
14. Sexual functioning and head and neck cancer / K. Siston Amy, A. List Marsy, Robert Schieser et al. // J. Phychosoc. Oncol. 1997. Vol. 15. № 3–4. P. 107–122.