

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЦИТОСТАТИКОВ И ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ

Сипров А.В.¹, Шубин Д.Ю.¹, Агеев В.П.¹, Гололобова И.А.¹, Акмаева И.А.¹, Хамидов Д.Х.¹, Шиндяйкина В.С.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: alek-s13@mail.ru

Проведен сравнительный анализ влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (25 и 50 мг/кг) в свободной и липосомальной форме на показатели сперматогенеза у крыс с карциномой Walker-256 на фоне цитостатической терапии комбинацией доксорубина (4 мг/кг) и циклофосфамида (45 мг/кг) в составе липосом. Экспериментальные исследования выполняли на 79 крысах-самцах Вистар с массой тела 120–230 г. Липосомальные цитостатики вводили однократно в хвостовую вену. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в свободной и липосомальной форме вводили в вену ежедневно, начиная с дня использования цитостатиков, в течение 5 дней. Показатели сперматогенеза оценивали в динамике на 3-и и 7-е сутки после введения липосомальных цитостатиков. Установлено, что липосомальная комбинация доксорубина и циклофосфамида обладает менее выраженным сперматогенез-супрессирующим действием по сравнению со свободной формой этих цитостатиков. Липосомальный этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозах 25 и 50 мг/кг эффективнее его свободной формы в этих же дозах корректирует показатели сперматогенеза (число ранних сперматид увеличивается в 2,5-2,9 раза, клеток Сертоли – в среднем на 90%) на 7-е сутки после введения липосомальных цитостатиков. Липосомальный этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозе 50 мг/кг уже на 3-и сутки после химиотерапии способствует росту числа ранних сперматид (на 41%), а к 7-м суткам – числа поздних сперматид (на 80%) и количества клеток Лейдига (в 2 раза) относительно введения только липосомальных цитостатиков.

Ключевые слова: липосомальная комбинация, доксорубин, циклофосфамид, этилметилгидроксипиридина сукцинат, сперматогенез, гонадотоксичность.

INFLUENCE OF THE COMBINED USE OF LIPOSOMAL FORMS OF CYTOSTATICS AND ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE ON INDICATORS OF SPERMATOGENESIS IN RATS WITH EXPERIMENTAL NEOPLASY

Siprova A.V.¹, Shubin D.Y.¹, Ageev V.P.¹, Gololobova I.A.¹, Akmaeva I.A.¹, Khamidov D.H.¹, Shindyaikina V.S.¹

¹N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: alek-s13@mail.ru

The comparative analysis of the effect of free and liposomal forms of ethylmethylhydroxypyridine succinate (25 and 50 mg/kg) on spermatogenesis indicators in rats with Walker-256 carcinoma was carried out at the use of doxorubicin (4 mg/kg) and cyclophosphamide (45 mg/kg) liposomal combination. Experimental studies were performed on 79 male Wistar rats weighing 120–230 g. Antitumor agents (doxorubicin and cyclophosphamide) as a part of liposomes were administered intravenously at once. Ethylmethylhydroxypyridine succinate in liposomal and free forms at doses of 25 and 50 mg/kg was administered intravenously daily from the beginning of the use of cytostatics for 5 days. To determine the state of spermatogenesis, the parameters of spermatogenesis were evaluated in dynamics on the 3rd and 7th days after chemotherapy. It was found that liposomal combination of doxorubicin and cyclophosphamide suppresses spermatogenesis less than the free form of these medications. Liposomal ethylmethylhydroxypyridine succinate in a dose of 25 and 50 mg/kg corrects spermatogenesis indicators more effectively than its free form at the day 7 after liposomal cytostatics administration (the number of early spermatids increases in 2.5-2.9 times, Sertoli cells – an average by 90%). Liposomal ethylmethylhydroxypyridine succinate in a dose of 50 mg/kg contributes the growth of a number of early spermatids (by 41%) at the day 3 after chemotherapy and a number of late spermatids (by 80%) and Leydig cells (in 2 times) at the day 7 comparatively with separate administration of liposomal cytostatics.

Keywords: liposomal combination, doxorubicin, cyclophosphamide, ethylmethylhydroxypyridine succinate, spermatogenesis, gonadotoxicity.

Известно, что больные, получавшие противоопухолевую терапию, часто сталкиваются с проблемами субфертильности, так как химиотерапия негативно влияет на процесс

сперматогенеза, качественный и количественный состав спермиев. Степень нарушения репродуктивной функции варьируется в широких пределах вплоть до бесплодия [1].

Гонадотоксичный эффект противоопухолевой терапии во многом обусловлен смещением равновесия в сторону оксидативного стресса и эндогенной интоксикации с накоплением активных форм кислорода и продуктов липопероксидации, которые пагубно действуют на чувствительные клетки и ткани, в том числе гонады [2-4]. Возникающие изменения последовательности нуклеотидов ДНК, нарушение структуры белков, их аминокислотного состава ведет к развитию мутаций и гибели части клеток [3; 5]. Для снижения системной токсичности используются липосомальные цитостатики, однако концентрация липосомального цитостатика в яичках может быть даже выше, чем свободного препарата [6]. В связи с этим изучение возможности нейтрализации побочных явлений химиотерапии, в том числе гонадотоксичности, с позиций мобилизации антиоксидантной защиты [7] представляется актуальным и обоснованным. В ранее проведенных исследованиях показана эффективность свободной формы этилметилгидроксипиридина сукцината в снижении гонадотоксичности антибластной терапии в эксперименте [8], однако нет данных о сравнительной эффективности его свободной и липосомальной формы.

Цель исследования. Сравнить эффективность свободного и липосомального этилметилгидроксипиридина сукцината в минимизации гонадотоксичного эффекта липосомальной комбинации цитостатиков (доксорубин и циклофосфамид) у крыс-самцов с карциномой Walker-256, анализируя изменения показателей сперматогенеза в динамике.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполняли на 79 крысах-самцах Wistar (120–230 г), находившихся на базе вивария ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» при естественном освещении со свободным доступом к корму и воде. Все действия с животными выполняли согласно правилам «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» (Guide for the care and use of laboratory animals) [9]. Клетки штамма карциномы Уокер-256 (10^6 клеток) инокулировали под кожу хвоста. Применяли официальные формы доксорубина гидрохлорида (Ebewe Pharma, Австрия) в дозе 4 мг/кг (в виде 0,04% раствора на изотоническом хлориде натрия), циклофосфамида (Baxter Oncology, Германия) в дозе 45 мг/кг (в виде 0,45% раствора), этилметилгидроксипиридина сукцината («Фармасофт», Россия) в дозах 25 и 50 мг/кг (в виде 5% раствора) в свободной и липосомальной формах. Липосомы получали через гидратацию липидной пленки с использованием роторного испарителя Heidolph (Германия) и экструдера LIPEX (Канада). Очищение липосом от невключившихся препаратов проводили под давлением инертного газа путем ультрафильтрации. Размер липосом оценивали с использованием анализатора размера наночастиц NANO-flex (США). Концентрацию препаратов в липосомах оценивали при помощи спектрофотометра Shimadzu

(Япония), которая составила для доксорубина и циклофосфида – 1,86 и 21 мг/мл, для этилметилгидроксипиридина сукцината – 25 и 50 мг/мл (для доз 25 и 50 мг/кг соответственно).

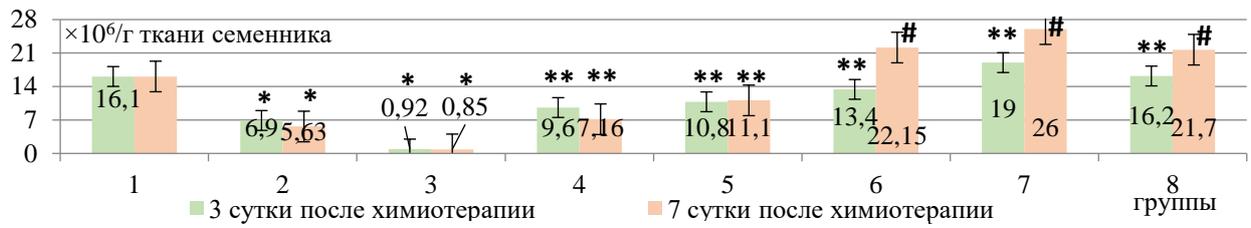
В ходе выполнения эксперимента животных рандомизировали на 8 групп, включавших по 7-12 самцов: 1-я группа – интактные крысы (И), 2-я – особи с перевитой карциномой Walker-256 (W) без лечения, 3-я – особи с W, получавшие растворы доксорубина (4 мг/кг) и циклофосфида (45 мг/кг) в латеральную хвостовую вену через катетер однократно на 11-е сутки после инокуляции штамма W (W+ДР+ЦФ), 4-я – особи с W, получавшие доксорубин (4 мг/кг) с циклофосфидом (45 мг/кг) в липосомах однократно внутривенно в аналогичные сроки после инокуляции штамма W (W+(ДР+ЦФ)л), 5-я – особи с W, получавшие липосомальные цитостатики и свободный этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭС) в дозе 25 мг/кг (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 25), 6-я – крысы с W, получавшие липосомальные цитостатики и свободный ЭС в дозе 50 мг/кг (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 50), 7-я – крысы с W, получавшие липосомальные цитостатики и липосомальный ЭС в дозе 25 мг/кг (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 25л), 8-я группа – крысы с W, получавшие липосомальные цитостатики и липосомальный ЭС в дозе 50 мг/кг (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 50л). Свободный и липосомальный ЭС в обеих дозах вводился в вену ежедневно в течение 5 суток с начала введения цитостатиков.

На 3-и и 7-е сутки после противоопухолевой терапии для 5–7 крыс из каждой группы завершали эксперимент путем дислокации шейных позвонков с последующим проведением микроскопического изучения (100×10) мазков клеточной суспензии тканей семенников после предшествующего окрашивания их по Романовскому - Гимзе [10]. Абсолютные значения сперматогенных эпителиальных клеток в 1 г ткани тестикул вычисляли путем математических пропорций с учетом абсолютного числа сперматозоидов, подсчет которых проводили в камере Горяева. Статистическую обработку результатов проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

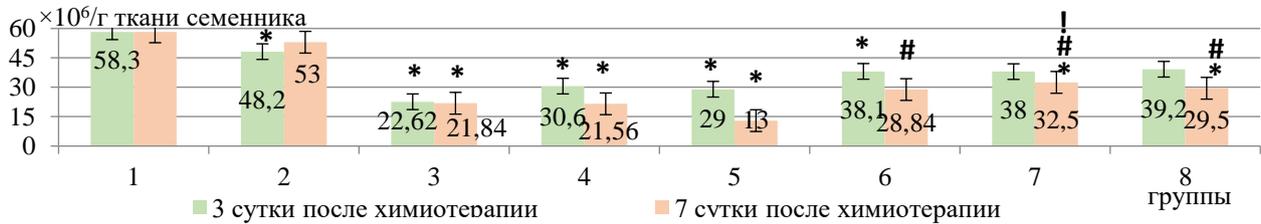
Результаты исследования и их обсуждение

На 3-и сутки после химиотерапии количество сперматогоний в группе с применением липосомальных доксорубина и циклофосфида (W+(ДР+ЦФ)л) относительно свободной формы данных препаратов (W+ДР+ЦФ) было выше в 10 раз ($p < 0,001$), не отличаясь от интактного показателя (рис. А). Уровень сперматогонийных клеток в группах, где использовался свободный и липосомальный ЭС, также не отличался от интактного показателя.

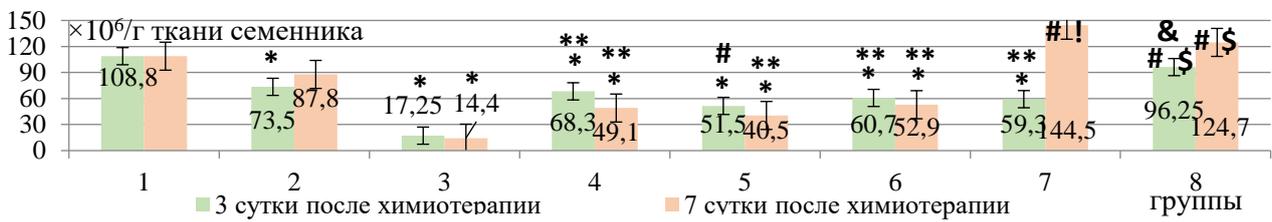
Число сперматоцитов при применении как свободных, так и липосомальных антибластомных агентов снижалось на 61% и 47,2% соответственно ($p < 0,01$) относительно интактных животных (рис. Б).



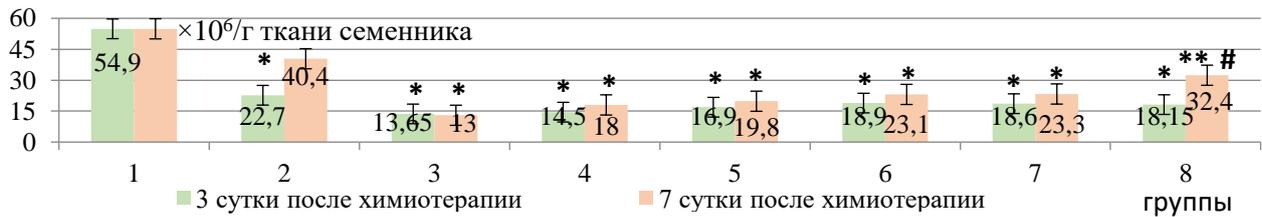
А. Сперматогонии



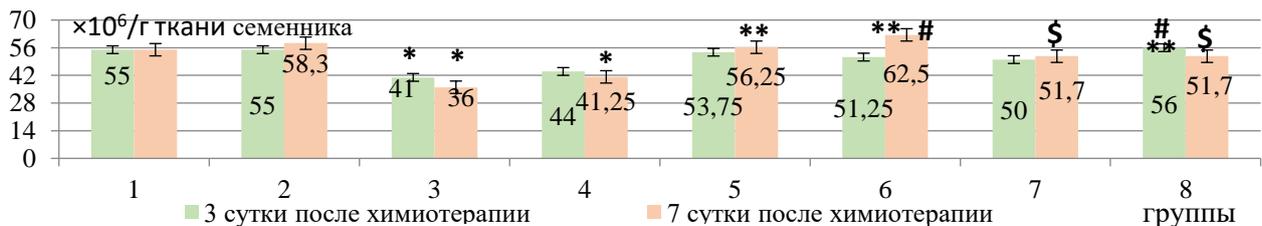
Б. Сперматоциты



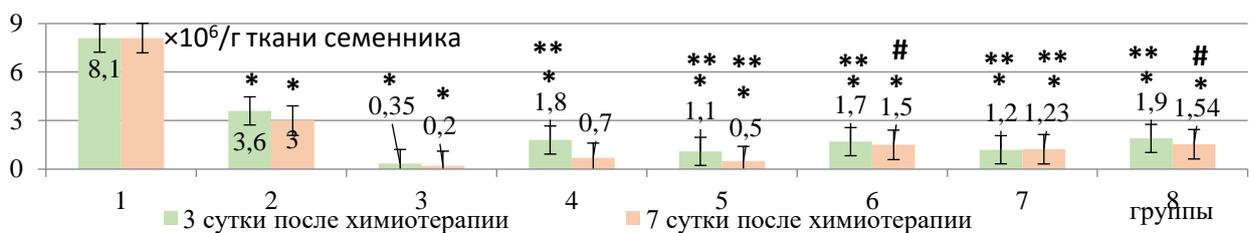
В. Ранние сперматиды



Г. Поздние сперматиды



Д. Сперматозоиды



Е. Клетки Лейдига

Количественные изменения клеточного состава сперматогенного эпителия (А-Е) у крыс с карциномой Walker-256 при введении липосомального этилметилгидроксипиридина сукцината в сочетании с липосомальными доксорубицином и циклофосфамидом

Примечание: * - различия достоверны ($p < 0,05$) относительно интактных крыс ($p < 0,05$); ** - относительно 3-й группы (W+ДР+ЦФ); # - относительно 4-й группы (W+(ДР+ЦФ)л); ! - относительно 5-й группы (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 25); \$ - относительно 6-й группы (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 50); & - относительно 7-й группы (W+(ДР+ЦФ)л+ЭС 25л).

Использование ЭС в свободной и липосомальной форме в исследуемых дозах не оказало значимого влияния на содержание сперматоцитов в сравнении с использованием только цитостатиков.

Количественный состав ранних сперматид снижался на 3-и сутки после введения ДР+ЦФ в свободной форме на 84% ($p < 0,001$) относительно интактных животных, а после использования липосомальных цитостатиков – на 37,2% ($p < 0,01$). На фоне липосомального ЭС в дозе 50 мг/кг число ранних сперматид превышало данный показатель при введении только липосомальных цитостатиков на 41% ($p < 0,01$, рис. В) и не отличалось от интактного параметра. Применение ЭС в липосомах в дозе 50 мг/кг в 1,6 раза эффективнее, чем его использование в «свободной» форме в той же дозе, и липосомального ЭС в дозе 25 мг/кг способствует сохранению числа ранних сперматид.

Число поздних сперматид на 3-и сутки после применения ДР+ЦФ как в свободной, так и в липосомальной форме снижалось на 75% и 73,6% соответственно относительно интактных животных. Дополнительное использование ЭС как в свободной, так и липосомальной формах в исследуемых дозах не приводило к коррекции числа поздних сперматид (рис. Г).

Количество сперматозоидов снижалось только при введении свободной формы цитостатиков – на 25,4% ($p < 0,05$, рис. Д). На фоне липосомального ЭС в дозе 50 мг/кг число сперматозоидов увеличивалось на 36,6% относительно группы со свободной формой цитостатиков и на 27,3% ($p < 0,05$) – относительно группы с липосомальными цитостатиками.

Численность клеток Сертоли не менялась ни в одной из экспериментальных групп.

ДР+ЦФ в свободной форме на 3-и сутки после их введения приводили к снижению числа клеток Лейдига на 95,7% относительно интактных животных ($p < 0,01$). На фоне введения липосомальных цитостатиков число клеток Лейдига снижалось в меньшей степени – на 77,8% относительно интактных крыс, что превышало данный показатель в группе со свободными цитостатиками в 5 раз ($p < 0,01$, рис. Е). При этом дополнительное использование ЭС как в свободной, так и липосомальной формах в исследуемых дозах не способствовало росту числа клеток Лейдига по сравнению с введением только липосомальных ДР+ЦФ.

Таким образом, коррекция показателей сперматогенеза в виде сохранения численности ранних сперматид и количества сперматозоидов на 3-и сутки после введения липосомальных цитостатиков отмечается только при использовании липосомального ЭС в дозе 50 мг/кг.

На 7-е сутки количество сперматогоний в группе с применением липосомальных ДР+ЦФ относительно их свободной формы было выше в 8,4 раза ($p < 0,001$, рис. А).

У животных, которым дополнительно вводился липосомальный ЭС в дозах 25 и 50 мг/кг, фиксировался рост числа сперматогоний в 3,6 и 3 раза ($p < 0,01$) соответственно относительно группы, где использовались только липосомальные цитостатики. Свободная форма ЭС проявила сопоставимый с липосомальной формой эффект лишь в дозе 50 мг/кг, способствуя росту числа сперматогоний также в 3 раза (рис. А).

Схожая динамика изменений отмечалась и в численности сперматоцитов: их количество снижалось на фоне липосомальных цитостатиков на 63% ($p < 0,01$) относительно интактных животных, а дополнительное введение ЭС в липосомах в дозах 25 и 50 мг/кг способствовало росту числа сперматоцитов на 50,7% и 37% соответственно относительно группы, где использовались только липосомальные цитостатики. Свободная форма ЭС проявила сопоставимый с липосомальной формой эффект лишь в дозе 50 мг/кг, на фоне которой число сперматоцитов возрастало на 32% ($p < 0,05$, рис. Б).

Количество ранних сперматид на 7-е сутки после введения липосомальных ДР+ЦФ было снижено на 55% ($p < 0,01$) относительно интактных животных, но превышало этот показатель при использовании свободных цитостатиков в 3,4 раза ($p < 0,01$). Применение липосомальной формы ЭС в дозе 25 мг/кг увеличивало число ранних сперматид в 2,9 раза, а в дозе 50 мг/кг – в 2,5 раза ($p < 0,01$, рис. В) относительно введения только липосомальных цитостатиков, восстанавливая, таким образом, численность ранних сперматид до интактного уровня.

Количество поздних сперматид при введении липосомальных ДР+ЦФ было снижено на 67% относительно интактных животных ($p < 0,05$), как и при использовании свободной формы цитостатиков (на 76%). Прирост численности поздних сперматид отмечался только на фоне дополнительного введения липосомального ЭС в дозе 50 мг/кг – на 80% по сравнению с использованием только липосомальных цитостатиков ($p < 0,05$).

Число сперматозоидов на 7-е сутки после введения липосомальных ДР+ЦФ снижалось на 25% относительно интактных крыс ($p < 0,05$), как и при использовании свободной формы цитостатиков. Увеличение количества сперматозоидов относительно липосомальных цитостатиков отмечалось на фоне свободной формы ЭС в дозе 50 мг/кг – на 51,5% ($p < 0,01$).

Несмотря на сохраняемую численность клеток Сертоли с тенденцией к ее уменьшению в группе с введением липосомальных цитостатиков, использование липосомального ЭС в обеих исследуемых дозах способствовало росту числа клеток Сертоли в среднем на 90% ($p < 0,05$) по сравнению с введением только липосомальных доксорубицина и циклофосфида.

Число клеток Лейдига на 7-е сутки после введения липосомальных цитостатиков было снижено на 91% относительно интактных животных, но превышало этот показатель в группе с использованием свободной формы цитостатиков в 3,5 раза ($p < 0,05$). Рост числа клеток

Лейдига отмечался на фоне ЭС в дозе 50 мг/кг, причем как в свободной, так и липосомальной форме – в 2 раза ($p < 0,05$) относительно введения только липосомальных цитостатиков.

Таким образом, использование липосомальной комбинации ДР+ЦФ к 7-м суткам после химиотерапии характеризуется большей численностью сперматогоний (в 8,4 раза) и ранних сперматид (в 3,4 раза), а также клеток Лейдига (в 3,5 раза) в тестикулярной ткани по сравнению с введением свободной формы цитостатиков, что свидетельствует о менее выраженном супрессивном влиянии липосомальной формы антибластомных агентов на процессы сперматогенеза. Свободный ЭС в дозе 50 мг/кг, в отличие от 25 мг/кг, оказывает значимое корректирующее влияние на цитологические показатели сперматогенеза на 7-е сутки после введения липосомальной комбинации ДР+ЦФ, способствуя нарастанию числа сперматогоний в 3 раза, сперматоцитов – на 33%, сперматозоидов – на 51,5% и клеток Лейдига – в 2 раза. Липосомальный ЭС в дозе 25 мг/кг сопоставимо с дозой 50 мг/кг способствует росту количества сперматогоний в тестикулярной ткани к 7-м суткам после введения липосомальных цитостатиков в среднем в 3,3 раза, сперматоцитов – на 44%, ранних сперматид – в 2,7 раза и клеток Сертоли – на 90%, однако уступает дозе 50 мг/кг в коррекции числа поздних сперматид и клеток Лейдига.

Заключение. Таким образом, липосомальный этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозах 25 и 50 мг/кг, в отличие от обычной формы в аналогичных дозах, способствует сохранению численности ранних сперматид, увеличивая их количество в тестикулярной ткани в 2,9 и 2,5 раза соответственно у крыс с карциномой Walker-256 на 7-е сутки после терапии липосомальными доксорубицином и циклофосфамидом. Липосомальный этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозе 25 мг/кг, в отличие от его свободной формы в этой же дозе, способствует росту числа сперматоцитов на 50,7% на 7-е сутки после введения липосомальных цитостатиков. При этом липосомальный этилметилгидроксипиридина сукцинат в обеих исследуемых дозах, в отличие от свободной формы, способствует росту числа клеток Сертоли в среднем на 90%. Однако наиболее эффективная картина в коррекции сперматогенеза после введения липосомальной комбинации доксорубицина и циклофосфамида отмечается на фоне липосомального этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 50 мг/кг: рост численности ранних сперматид (на 41% относительно введения только липосомальных цитостатиков) отмечается уже на 3-и сутки после химиотерапии, а на 7-е сутки – на 80% нарастает количество поздних сперматид и в 2 раза – клеток Лейдига.

Список литературы

1. Соловьева М.А., Сипров А.В., Агеев В.П., Шмырева Н.В., Макарова М.Ю., Вашуркина И.М., Шубин Д.Ю., Кечемайкина М.И. Влияние производных пиримидина и 3-гидроксипиридина в составе липосом на показатели эритроцитопоеза при использовании липосомальных доxorубина и циклофосфида у крыс со злокачественным опухолевым процессом // *Современные проблемы науки и образования*. 2021. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30594> (дата обращения: 08.07.2023).
2. Добровольская М.М., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Сытов А.В. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у онкологических больных // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021. Т. 66. № 7. С. 401-406.
3. Ujah G.A., Nna V.U., Suleiman J.B., Eleazu C., Rebene J.A., Imowo M.U., Obi E.O., Udechukwu C. Tert-butylhydroquinone attenuates doxorubicin-induced dysregulation of testicular cytoprotective and steroidogenic genes, and improves spermatogenesis in rats // *Sci Rep*. 2021. Vol. 11. no. 1. P. 5522. DOI: 10.1038/s41598-021-85026-7.
4. Насырова Е.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Антонеева И.И., Тузеева А.Ю., Михеенко А.А. Влияние цитостатиков, вводимых по схеме CAP, на редокс-зависимые процессы в плазме крови крыс с экспериментальным раком яичников // *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2015. № 1. С. 119-123.
5. Park H.-J., Kim J.-S., Lee R., Song H. Cisplatin Induces Apoptosis in Mouse Neonatal Testes Organ Culture // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. no. 21. P. 13360. DOI: 10.3390/ijms232113360.
6. Кулик Г.И., Пивнюк В.М., Носко М.М., Тодор И.Н., Чехун В.Ф. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину // *Онкология*. 2009. Т. 11. № 1. С. 76-80.
7. Лапин К.Н., Рыжков И.А., Захарова Н.М. Влияние циклофосфида на репродуктивную систему крыс-самцов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020. Т. 83. № 11. С. 16-19.
8. Сипров А.В., Сипрова М.В., Инчина В.И., Волкова Н.Д., Кузнецова В.А. Влияние ксимедона и мексидола в сочетании с антибластомными средствами на показатели сперматогенеза и функционального состояния сперматозоидов крыс с карциномой Walker-256. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021. Т. 171. № 4. С. 441-447.
9. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press, 2011. 246 p.

10. Иванов Ю.В. Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсико-гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. 1986. № 4. С. 52-55.