DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(4)-02

УДК: 615.03 + 616-006 + 577.175.6

ВПЛИВ СЕРІЙНОГО ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ НА РІВНІ ОСНОВНИХ ЖІНОЧИХ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Шамрай В. А.^{1,2}, Місюрко О. І.^{1,2}, Гребенюк Д. І.¹, Таран І. В.¹

¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018),

²Подільський регіональний центр онкології (Хмельницьке шосе, 84, м. Вінниця, Україна, 21000)

Відповідальний за листування:
e-mail: Doctor.Svo@gmail.com

Статтю отримано 28 вересня 2021 р.; прийнято до друку 29 жовтня 2021 р.

Анотація. У статті наведено результати експериментального вивчення динаміки змін основних жіночих статевих гормонів при серійному застосуванні доксорубіцину. Досліди виконували на 45 статевозрілих самках білих щурів. Вивчали рівні антимюллерового гормону, естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону. Загалом проводили 4 курси хіміотерапії з інтервалом 3 тижні. Після кожного курсу хіміотерапії двічі вивчали гормональний статус піддослідних тварин: під час першого проєструсу після проведеного курсу (для визначення гострої оваріальної токсичності введеного препарату) та під час останнього проєструсу перед черговим курсом хіміотерапії (для вивчення відновлення функції яєчників). Одержані дані піддавали обробці за допомогою пакету статистичних програм SPSS 20.0 for Windows. Динаміка рівнів основних жіночих статевих гормонів при серійному введенні доксорубіцину характеризується хвилюватою динамікою із погіршенням показників безпосередньо після курсу хіміотерапії та частковим їх відновленням протягом періоду між суміжними курсами. Оваріотоксичність доксорубіцину при серійному введенні в терапевтичних дозах в експерименті проявляється достовірними змінами рівнів основних жіночих статевих гормонів вже після проведення другого курсу хіміотерапії.

Ключові слова: доксорубіцин, антимюллерів гормон, естрадіол, фолікулостимулюючий гормон, щурі.

Вступ

Доксорубіцин відноситься до групи препаратів антрациклінового ряду та майже пів століття використовується у якості протипухлинного засобу [5].

Хоча застосування даного препарату продемонструвало чудові результати у лікуванні злоякісних пухлин, проте більш широкому його застосуванню перешкоджає його токсичність, яка клінічно проявляється симптоматикою ураження практично всіх систем та органів [12].

Механізм розвитку токсичності доксорубіцину є складним і до кінця не вивченим [13]. Основний механізм дії доксорубіцину включає здатність препарату вбудовуватися в пари основ ДНК, викликаючи розрив ланцюгів ДНК та пригнічуючи синтез ДНК і РНК. Доксорубіцин інгібує фермент топоізомеразу II, викликаючи пошкодження ДНК та індукцію апоптозу. У поєднанні із залізом доксорубіцин також викликає опосередковане вільними радикалами окисне пошкодження ДНК, що ще більше обмежує синтез ДНК.

Негативні наслідки застосування доксорубіцину проявляються порушеннями з боку серцево-судинної системи [17], шлунково-кишкового тракту [8, 9], сечовидільної системи [2, 9], нервової системи [1, 6], шкірних покривів [15], репродуктивної системи [4, 14, 16].

У науковій літературі зустрічаються експериментальні дослідження оваріальної токсичності доксорубіцину, які як правило, висвітлюють наслідки одноразового його введення в організм піддослідних тварин або в культуру ооцитів [3, 4, 14, 16]. Проте, як відомо, для лікування онкопатології різної локалізації доксорубіцин застосовується серійно [10].

Саме тому детального вивчення потребує серійне введення доксорубіцину та його вплив на гормональний фон і структуру яєчників.

Мета дослідження - дослідити динаміку змін основних жіночих статевих гормонів при серійному застосуванні доксорубіцину в експерименті.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження проводили на базі віварію Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова з дозволу комітету з біотеки.

Досліди проводили на 45 статевозрілих самках білих щурів масою 160-200 грам (191,6±15,8 грами) віком до 1 року, які знаходились на карантині щонайменше протягом одного тижня перед експериментом, за умов вільного доступу до води та їжі, при контрольованій температурі та 12-годинному циклі зміни темряви та світла.

Відповідно до мети дослідження, для вивчення змін гормонального статусу самок щурів при серійному введенні доксорубіцину, визначали рівні антимюллерового гормону (AMH), естрадіолу (E2) та фолікулостимулюючого гормону (FSH).

Для визначення референтних значень досліджуваних показників вивчали гормональний статус у 5 інтактних щурів.

Усі дослідження рівнів гормонів проводили у фазі проєструсу. Визначення фази менструального циклу проводили шляхом мікроскопії мазків із піхви піддослідних тварин відповідно до критеріїв, описаних X.-Y. Fu et al. (2018) [7].

Забір крові проводили шляхом черешкової пункції

порожнини лівого шлуночка під кетаміновим наркозом із розрахунку 0,22 мл кетаміну на 100 грам маси тіла піддослідної тварини. Рівні досліджуваних гормонів вивчали шляхом імуноферментного аналізу із використанням наборів Rat anti-Mullerian hormone (AMH) ELISA kit, Rat Estradiol (E2) ELISA Kit та Rat follicle-stimulating hormone (FSH) ELISA Kit (CUSABIO, Китай).

Решті щурів проводили серійне введення доксорубіцину у дозі 8,37 мг/кг. Перерахунок людських доз препарату здійснювали за методикою, запропонованою A. B. Nair та S. Jacob (2016) [11].

Загалом проводили 4 курси хіміотерапії з інтервалом 3 тижні. Після кожного курсу хіміотерапії двічі вивчали гормональний статус піддослідних тварин: під час першого проєструсу після проведеного курсу (для визначення гострої оваріальної токсичності введеного препарату) та під час останнього проєструсу перед черговим курсом хіміотерапії (для вивчення відновлення функції яєчників). Під час кожного вивчення рівнів гормонів з експерименту виводили по 5 щурів.

Одержані дані піддавали обробці за допомогою пакету статистичних програм SPSS 20.0 for Windows.

Результати. Обговорення

Динаміка змін основних статевих гормонів при застосуванні Доксорубіцину в експерименті наведена на рисунках 1-3.

Загалом динаміка змін рівнів антимюллерового гормону при застосуванні Доксорубіцину в експерименті характеризувалася прогресивним зниженням рівнів даного гормону протягом всього терміну дослідження.

Рис. 1. Динаміка змін рівнів антимюллерового гормону при застосуванні Доксорубіцину в експерименті

Примітки: K1-K4 - курси введення препарату. ПЕЦ - перший естральний цикл після відповідного курсу. ОЕЦ - останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом. Статистично достовірна різниця щодо зазначених груп із відповідним номером: # - $p < 0,05$; Δ - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$.

Рис. 2. Динаміка змін рівнів естрадіолу при застосуванні Доксорубіцину в експерименті.

Примітки: K1-K4 - курси введення препарату. ПЕЦ - перший естральний цикл після відповідного курсу. ОЕЦ - останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом. Статистично достовірна різниця відносно зазначених груп із відповідним номером: # - $p < 0,05$; Δ - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$.

Рис. 3. Динаміка змін рівнів фолікулостимулюючого гормону при застосуванні Доксорубіцину в експерименті.

Примітки: K1-K4 - курси введення препарату. ПЕЦ - перший естральний цикл після відповідного курсу. ОЕЦ - останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом. Статистично достовірна різниця щодо зазначених груп із відповідним номером: # - $p < 0,05$; Δ - $p < 0,01$; * - $p < 0,001$.

При цьому числові значення досліджуваного показника значно знижувалися під час першого естрального циклу після чергового курсу хіміотерапії та дещо підвищувалися при дослідженні під час останнього естрального циклу перед черговим введенням хіміопрепарату. Перші статистично достовірні відмінності ($p < 0,05$) від

показників контрольної групи з'являються при дослідженні під час першого естрального циклу після другого введення препарату. Проте, при дослідженні під час останнього естрального циклу перед третім курсом хіміотерапії, мало місце відновлення досліджуваного показника до значень, що статистично достовірно не відрізнялися ($p > 0,05$) від контрольних. У всіх наступних часових точках відмінності від контрольних значень знову були статистично достовірними ($p < 0,05$). При цьому, слід зазначити, що статистична достовірність відмінностей показників під час дослідження у останніх двох часових точках була більш значущою ($p < 0,01$).

Динаміка змін рівнів естрадіолу при застосуванні Доксорубіцину в експерименті була аналогічною до динаміки змін рівнів антимюллерового гормону. Так, мало місце прогресивне зниження показників протягом всього дослідження із наявністю характерного зниження їх значень під час першого естрального циклу після чергового курсу хіміотерапії та незначного підвищення під час останнього естрального циклу перед черговим введенням хіміопрепарату. Аналогічно, до даних, отриманих при дослідженні антимюллерового гормону, перші статистично достовірні відмінності ($p < 0,05$) від показників контрольної групи з'являються при дослідженні під час першого естрального циклу після другого введення препарату, а при дослідженні під час останнього естрального циклу перед третім курсом хіміотерапії, спостерігалось відновлення досліджуваного показника до значень, що статистично достовірно не відрізнялися ($p > 0,05$) від контрольних. Також у всіх наступних часових точках відмінності від контрольних значень знову ставали статистично достовірними ($p < 0,05$) із поступовим зростанням статистичної значущості до значень $p < 0,01$ у останніх двох часових точках.

Динаміка змін рівнів фолікулостимулюючого гормону мала тенденцію протилежну до такої при дослідженні інших двох гормонів, тобто характеризувалася прогресивним підвищенням рівнів досліджуваного показника протягом усього терміну дослідження. Перші статистично достовірні відмінності ($p < 0,05$) від показників контрольної групи з'являються при дослідженні під час пер-

шого естрального циклу після другого введення препарату із наступним частковим відновленням досліджуваного показника у наступній часовій точці до значень статистично недостовірно ($p > 0,05$) відмінних від контрольних. У всіх наступних часових точках відмінності від контрольних значень знову ставали статистично достовірними ($p < 0,05$) із поступовим зростанням статистичної значущості до значень $p < 0,01$ у останніх двох часових точках.

Загалом, зміни гормонального статусу щурів при серійному застосуванні доксорубіцину вказували на прогресивний розвиток оваріальної недостатності у піддослідних тварин. Отримані нами дані продемонстрували картину, яка, загалом, збігається із результатами експериментальних досліджень оваріальної токсичності при однократному введенні даного препарату як *in vitro*, так і *in vivo* [3, 4, 14, 16]. У той же час характерна динаміка змін гормонів із погіршенням показників безпосередньо після курсу хіміотерапії та частковим їх відновленням протягом періоду між суміжними курсами свідчать про, принаймні, часткову оборотність змін у яєчниках, спричинених введенням доксорубіцину [4].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Динаміка рівнів основних жіночих статевих гормонів при серійному введенні доксорубіцину характеризується хвилеподібною динамікою із погіршенням показників безпосередньо після курсу хіміотерапії та частковим їх відновленням протягом періоду між суміжними курсами.

2. Оваріотоксичність доксорубіцину при серійному введенні в терапевтичних дозах в експерименті проявляється достовірними змінами рівнів основних жіночих статевих гормонів вже після проведення другого курсу хіміотерапії.

У подальшому планується експериментальне вивчення динаміки змін основних жіночих статевих гормонів у віддаленому періоді після серійного введення доксорубіцину.

Список посилань - References

- [1] Alhowail, A. H., Bloemer, J., Majrashi, M., Pinky, P. D., Bhattacharya, S., Yongli, Z., ... & Suppiramaniam, V. (2019). Doxorubicin-induced neurotoxicity is associated with acute alterations in synaptic plasticity, apoptosis, and lipid peroxidation. *Toxicology mechanisms and methods*, 29(6), 457-466. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1600086>
- [2] Ayla, S., Seckin, I., Tanriverdi, G., Cengiz, M., Eser, M., Soner, B. C., & Oktem, G. (2011). Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *International journal of cell biology*, 2011, 390238. <https://doi.org/10.1155/2011/390238>
- [3] Aziz, A., Yu, X., Jiang, Q., Zhao, Y., Deng, S., Qin, K., ... & Liu, B. (2020). Doxorubicin-induced toxicity to 3D-cultured rat ovarian follicles on a microfluidic chip. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 62, 104677. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104677>
- [4] Ben-Aharon, I., Bar-Joseph, H., Tzarfaty, G., Kuchinsky, L., Rizel, S., Stemmer, S. M., & Shalgi, R. (2010). Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E, 8, 20. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-20>
- [5] Cassinelli, G. (2016). The roots of modern oncology: from discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use. *Tumori*, 2016(3), 226-235. <https://doi.org/10.5301/tj.5000507>
- [6] Du, J., Zhang, A., Li, J., Liu, X., Wu, S., Wang, B., ... & Jia, H. (2021). Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment: The Mechanistic Insights. *Frontiers in oncology*, 11, 673340. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.673340>
- [7] Fu, X. Y., Chen, H. H., Zhang, N., Ding, M. X., Qiu, Y. E., Pan, X. M., ... & Wang, W. Q. (2018). Effects of chronic unpredictable mild stress on ovarian reserve in female rats: Feasibility analysis of a rat model of premature ovarian failure. *Molecular*

- medicine reports, 18(1), 532-540. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8989>
- [8] Kaczmarek, A., Brinkman, B. M., Heyndrickx, L., Vandenaabeele, P., & Krysko, D. V. (2012). Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways. *The Journal of pathology*, 226(4), 598-608. <https://doi.org/10.1002/path.3009>
- [9] Kocahan, S., Dogan, Z., Erdemli, E., & Taskin, E. (2017). Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stress-induced Toxicity Associated With Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue. *Iranian journal of kidney diseases*, 11(2), 124-131.
- [10] Mancini, R., & Modlin, J. (2011). Chemotherapy Administration Sequence: A Review of the Literature and Creation of a Sequencing Chart. *J Hematol Oncol Pharm*, 1(1), 17-25.
- [11] Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 7(2), 27-31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- [12] Pugazhendhi, A., Edison, T., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life sciences*, 200, 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>
- [13] Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life sciences*, 278, 119527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- [14] Xiao, S., Zhang, J., Liu, M., Iwahata, H., Rogers, H. B., & Woodruff, T. K. (2017). Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 157(2), 320-329. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx047>
- [15] Yamada, Y., Kawaguchi, R., Ito, F., Iwai, K., Niino, E., Shigetomi, H., ... & Kobayashi, H. (2017). Skin-mucous membrane disorder and therapeutic effect of pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 43(7), 1194-1199. <https://doi.org/10.1111/jog.13334>
- [16] Zhang, T., He, W. H., Feng, L. L., & Huang, H. G. (2017). Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 86, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.012>
- [17] Zhao, L., & Zhang, B. (2017). Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Scientific reports*, 7, 44735. <https://doi.org/10.1038/srep44735>

THE EFFECT OF SERIAL ADMINISTRATION OF DOXORUBICIN AT THE LEVEL OF MAIN FEMALE SEX HORMONES IN THE EXPERIMENT

Shamrai V. A., Misiurko O. I., Grebeniuk D. I., Taran I. V.

Annotation. The article presents the results of an experimental study of the dynamics of changes in the main female sex hormones with serial use of doxorubicin. The experiments were performed on 45 adult female white rats. The levels of antimüllerian hormone, estradiol and follicle-stimulating hormone were studied. In total, 4 courses of chemotherapy were performed with an interval of 3 weeks. After each course of chemotherapy, the hormonal status of the experimental animals was studied twice: during the first proestrus after the course (to determine the acute ovarian toxicity of the drug) and during the last proestrus before the next course of chemotherapy (to study ovarian function restoration). The obtained data were processed using the statistical software package SPSS 20.0 for Windows. The dynamics of the levels of studied sex hormones with serial administration of doxorubicin is characterized by wavy dynamics with deterioration immediately after chemotherapy and partial recovery during the period between adjacent courses. Ovariotoxicity of doxorubicin when serial administration in therapeutic doses in the experiment is manifested by significant changes in the levels of major female sex hormones after the second course of chemotherapy.

Keywords: doxorubicin, antimüllerian hormone, estradiol, follicle-stimulating hormone, rats.