

Для цитирования: Боровская Т.Г., Вычужанина А.В., Щемерова Ю.А., Ксенева С.И., Фомина Т.И., Бохан Е.А., Гольдберг В.Е. Отдаленные последствия цитостатических воздействий на зародышевые клетки тестикулярной ткани (экспериментальное исследование). Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(4): 74–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-4-74-83

For citation: Borovskaya T.G., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Yu.A., Kseneva S.I., Fomina T.I., Bokhan E.A., Goldberg V.E. Long-term effects of cytostatic agents on germ cells of testicular tissue (experimental study). Siberian Journal of Oncology. 2023; 22(4): 74–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-4-74-83

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ТКАНИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Т.Г. Боровская¹, А.В. Вычужанина¹, Ю.А. Щемерова¹, С.И. Ксенева¹, Т.И. Фомина¹, Е.А. Бохан¹, В.Е. Гольдберг²

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

Россия, 634009, г. Томск, пр. Ленина 3. E-mail: repropharm@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

Цитостатические препараты широко используются сегодня не только в онкологической клинике, но и при терапии аутоиммунных воспалительных заболеваний. Благоприятный прогноз заболевания, наличие способности к воспроизводящей функции, молодой возраст и отсутствие детей служат побудительным моментом для принятия решения о необходимости деторождения. Опасение вызывает тот факт, что мутагенные эффекты химиотерапии в зародышевых клетках, способность вызывать в них эпигенетические изменения могут иметь фенотипические проявления у потомства. Доказано, что при зачатии в ранние сроки после лечения (воздействие на зрелые и дифференцирующиеся половые клетки) риск появления неполноценного потомства высок. Данные о состоянии потомства пациентов при зачатии в отдаленные сроки после лечения (воздействия на стволовые сперматогенные клетки) противоречивы. **Целью исследования** явилась оценка состояния потомства крыс-самцов, получавших цитостатические препараты разных групп, при скрещивании в сроки, соответствующие проявлению воздействия на стволовые сперматогониальные клетки (ССК). **Материал и методы.** Эксперименты проведены на аутобредных крысах-самцах Вистар (n=140), в возрасте 2,5 мес, 70 из которых составили группу интактных животных. Оценивалось состояние потомства (в постнатальном периоде развития) интактных крыс-самок и самцов, получавших этопозид, иринотекан, цисплатин, карбоплатин, метотрексат, фарморубин, паклитаксел за 3 и 6 мес до скрещивания. **Результаты.** Установлено, что потомство крыс-самцов, получавших цитостатические препараты, оказалось жизнеспособным. В 2 (0,24 %) случаях выявлены грубые внешние аномалии развития. У части потомства наблюдалось замедление физического развития, снижение скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов, способности к обучению. Наиболее токсичными оказались этопозид и паклитаксел. **Выводы.** Потомство животных, получавших цитостатические препараты в сроки, соответствующие воздействию на ССК, относится к группе риска. Степень выраженности отдаленных последствий существенно варьирует и зависит от вида цитостатического воздействия. К числу наиболее часто выявляемых отклонений у потомства относится снижение способности к обучению. Судя по срокам зачатия после цитостатического воздействия, существенное увеличение периода времени после введения препарата до скрещивания не всегда является оправданным.

Ключевые слова: цитостатические препараты, генотоксичность, стволовые сперматогониальные клетки, потомство.

LONG-TERM EFFECTS OF CYTOSTATIC AGENTS ON GERM CELLS OF TESTICULAR TISSUE (EXPERIMENTAL STUDY)

T.G. Borovskaya¹, A.V. Vychuzhanina¹, Yu.A. Shchemerova¹, S.I. Kseneva¹,
T.I. Fomina¹, E.A. Bokhan¹, V.E. Goldberg²

E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
3, Lenin Ave., 634009, Tomsk, Russia. E-mail: repropharm@yandex.ru¹
Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²
5, Kooperativny St., 634009, Tomsk, Russia²

Abstract

Currently, cytostatic drugs are widely used not only in cancer treatment, but also in the treatment of autoimmune inflammatory diseases. A favorable prognosis of the disease, ability to reproduce, young age and the absence of children serve as an incentive to decide on the need for childbearing. There is concern, that the mutagenic effects of chemotherapy in germ cells, the ability to induce epigenetic changes in them, may have phenotypic manifestations in offspring. Conception in the early stages after treatment (impact on mature and differentiating germ cells) has been proven to increase the risk of defective offspring. Data on the health of the offspring of patients conceived in the long term after treatment (impact on stem spermatogenic cells) are contradictory. **The aim of the study** was to assess long-term toxic effects of cytostatic drugs in the male rat offspring copulated in terms corresponding to the effect on stem spermatogonial cells (SSCs). **Material and Methods.** The experiments were carried out on autobred male Wistar rats (n=140), aged 2.5 months, 70 of which made up the group of intact animals. The effect of cytostatic drugs (etoposide, irinotecan, cisplatin, carboplatin, methotrexate, farmorubicin, and paclitaxel) injected 3 and 6 months before mating was assessed on the offspring of intact female and male rats. **Results.** The male rat offspring treated with cytostatic drugs was found to be viable. Gross external developmental anomalies were detected in 2 cases. In several offspring, a slowdown in physical development, decrease in the rate of formation of sensory-motor reflexes and learning ability were observed. The most toxic drugs were etoposide and paclitaxel. **Conclusion.** The offspring of rats treated with cytostatic drugs in terms corresponding to the effect on the SSCs is at risk. The degree of severity of long-term effects varies significantly and depends on the type of the drugs used. A decrease in the ability to learn is the most frequently detected abnormalities in offspring. Judging by the timing of conception after cytostatic exposure, a significant increase in the period of time after the administration of the drug before mating is not always justified.

Key words: cytotoxic drugs, genotoxicity, spermatogonial stem cells, offspring.

Цитостатические препараты, первые разработки которых относятся к середине прошлого века, принимают большинство пациентов онкологических клиник [1, 2]. Позднее у ряда из этих препаратов наряду с противоопухолевыми выявлены еще и противовоспалительные свойства, что нашло широкое применение в терапии аутоиммунных воспалительных заболеваний [3]. В настоящее время опубликованы клинические обзоры, посвященные оценке влияния цитостатических препаратов на потомство [4, 5]. Прогноз при ряде онкологических заболеваний существенно улучшился, что позволяет ориентироваться не только на выживаемость, но и на качество жизни пациентов [6]. Эффективное использование цитостатиков в ревматологической практике послужило еще одним фактором для изучения репродуктивной токсичности и влияния этих препаратов на потомство [7].

Известно, что в силу низкой избирательности цитостатические препараты угнетают сперматогенез, что может лишить мужчин возможности иметь

потомство. Однако далеко не все из них вызывают необратимую инфертильность [8, 9]. Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что воспроизводящая способность восстанавливается в 75 % [10]. Улучшение прогноза заболевания, молодой возраст, отсутствие детей служат побудительным моментом для принятия решения о планировании деторождения [11]. Сохранение способности к зачатию – необходимое, но не достаточное условие для реализации детородной функции. Не менее важным является генетическая и эпигенетическая полноценность гамет [12]. Цитостатики в силу механизма их действия заведомо генотоксичны. Несмотря на то, что структурные изменения ДНК сперматозоидов могут репарироваться ооцитом после оплодотворения [13], часть из них сохраняется и может вызвать негативные последствия для потомства [14]. Цитостатические воздействия вызывают не только структурные повреждения ДНК, но и приводят к эпимутациям в зародышевых клетках, прежде всего, к aberrантным схемам

метиляции ДНК. Большая часть метилированных ДНК при оплодотворении нивелируется, но оставшиеся могут передаваться следующему поколению и инициировать в дальнейшем эпигенетически трансгенерационные заболевания [15, 16]. Эпигенетические изменения, переносимые оплодотворяющим сперматозоидом, важны для множества физиологических и патологических процессов, которые оказывают влияние на потомство на протяжении всей жизни [17].

Обеспокоенность по поводу потенциальной возможности передачи повреждения зародышевой линии тестикулярной ткани потомству инициировала проведение крупномасштабных клинических исследований, направленных на изучение состояния потомства мужчин, перенесших цитостатическое воздействие [4, 5]. Авторы, акцентируя свое внимание на фенотипических проявлениях мутагенных эффектов, описывают случаи мертворождения, внешних аномалий развития. Результаты этих исследований носят противоречивый характер. Часть авторов не обнаруживает увеличения риска генетических аномалий, перинатальной смерти, низкой массы тела, другие настаивают на обратном [4, 5, 11]. Противоречивость информации связывают с тем, что исследуемые выборки нельзя считать репрезентативными. Пациенты получают разные схемы химиотерапии, существенно варьирует продолжительность лечения, решение о деторождении принимается в различные сроки после приема препаратов. В ряде случаев химиотерапия сочетается с лучевыми воздействиями [5, 11]. В экспериментальных исследованиях выявлены нежелательные последствия для потомства при зачатии в ранние сроки после введения препаратов. Эти сроки соответствуют проявлению воздействия на зрелые и созревающие мужские половые клетки [18]. В связи с этим деторождение не рекомендуется планировать в течение 3 мес после химиотерапии. Этот срок определяется продолжительностью цикла сперматогенеза. В литературе отсутствует информация о том периоде времени, при котором повреждающих эффектов на зародышевые клетки не выявляется [5, 7, 11]. Между тем решение о деторождении принимается чаще всего пациентами, находящимися в состоянии длительной полной ремиссии, т. е. в отдаленные сроки после химиотерапии [11, 18]. С учетом длительности отдельных стадий сперматогенеза это соответствует проявлению воздействия на стволовые сперматогониальные клетки (ССК) [18]. Для прогнозирования состояния потомства в таких случаях важной является информация о наличии генетической и эпигенетической целостности стволовых сперматогониальных клеток [19]. Известно, что чувствительность ССК к генотоксикантам ниже, чем у соматических клеток, т. к. они обладают более надежной системой репарации ДНК [20]. Однако и они не являются полностью защищенными от мутагенных воздействий. Более

того, установлено, что мутации, возникающие в ССК, могут закрепляться в популяции стволовых клеток, с течением времени выявляться в сперматозоидах и передаваться потомству [20]. Показано, что ССК могут характеризоваться геномной нестабильностью [21]. Исследованиями последних лет установлено также, что ССК чувствительны к факторам, оказывающим влияние на эпигеном [12, 22]. Риск последствий цитостатической химиотерапии для потомства при воздействии на ССК является малоизученным, а оценка противоречивой [5, 11, 18]. В то же время потребность в информации такого плана возрастает [1]. Сегодня обоснована актуальность изучения индивидуальных особенностей, состояния потомства после воздействия на гоноциты конкретного препарата [23].

Целью исследования явилась оценка постнатального развития потомства крыс-самцов, получавших цитостатические препараты разных групп, при скрещивании с интактными самками в сроки, соответствующие проявлению воздействия на ССК.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 140 крысах-самцах сток Вистар (возраст – 2,5 мес), 70 из которых составили контрольную группу интактных животных. Все животные получены из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томск. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Крысы до и в период эксперимента находились в виварии при $t_{\text{возд.}} = 20 \pm 22^\circ\text{C}$, влажности – не более 50%; объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10; в световом режиме день-ночь; в стандартных пластиковых клетках (не более 5 особей в каждой) с мелкой древесной стружкой; на стандартном рационе – гранулированный корм ПК121-10 (ГОСТ Р50258-92).

Животным экспериментальных групп (n=10 в каждой) вводили однократно внутривенно в максимально переносимой дозе препараты: Вепезид (этопозид, Teva, Израиль), Иринотекан (Кампто, Rhone-Poulens, Великобритания), Карбоплатин (кемокарб, «Дабур Индия Лтд», Индия), Паклитаксел (митотакс, Dr. Reddy's, Индия), Платидиам («Lachema», Чехия), Фарморубицин (Farmitalia, Carlo Erba), Метотрексат МТХ (Ebeve Pharma, Австрия). Одной их групп животных вводили Метотрексат МТХ (Ebeve Pharma, Австрия) подкожно, четырехкратно, с недельными интервалами в дозе 1 мг/кг. Выбор дозы и режима введения этого лекарственного средства обусловлен тем, что в клинической практике он наиболее часто используется курсами в низких дозах.

Животные скрещивались с интактными крысами-самками через 3 и 6 мес после их введения

(сроки, соответствующие проявлению последствий воздействия на ССК). Спаривание регистрировали с помощью вагинальных мазков. На 18-й день беременности крыс-самок рассаживали по одной в клетки для подготовки к родам. Регистрировали день родов, число крысят в помете, проводили макроскопический осмотр родившихся крысят. На 25–30-й день жизни от крысят убивали матерей. При изучении состояния потомства в постнатальном периоде использовались тесты и системы, рекомендованные центром экспертизы средств медицинского применения [24]. В первый день жизни определяли массу тела крысят, на 4, 7, 14 и 21-й дни – индекс выживаемости. В течение 2 мес следили за физическим развитием потомства (определяли сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезания резцов, открытия глаз, опускания семенников, открытия влагалища). На 5-й, 60-й дни жизни оценивали функциональное состояние центральной нервной системы по тестам «избегание обрыва», «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

У интактных крыс-самок, скрещенных с самцами, получавшими различные виды цитостатического воздействия, рождение потомства наблюдалось почти во всех случаях. Исключение составили крысы-самки, ссаженные с животными, получавшими антрациклиновый антибиотик за 3 мес до зачатия. При макроскопическом осмотре потомства ($n=1640$) было выявлено 2 особи с грубыми внешними аномалиями развития. Так, у одной из них (самка – потомство крыс-самцов, получавших П) наблюдалась аплазия хвостового отдела. В потомстве крыс-самцов, получавших Ф, у одного животного обнаружена мозговая грыжа. Родившиеся животные контрольных и экспериментальных групп не отличались друг от друга по индексам выживаемости (табл. 1). Масса тела при рождении почти во всех группах животных оказалась сходной. Исключение составило потомство животных, получавших Пл. Этот показатель у крысят-самцов этой группы превосходил контрольные значения на 40 % ($p \leq 0,05$), у крысят-самок – на 55 % ($p \leq 0,05$). Задержка физического развития была выявлена в 2 группах – в потомстве крыс-самцов, которым вводили П (первая группа) и М (вторая группа). У 68 и 95,8 % (срок скрещивания 3 и 6 мес) крысят

Таблица/Table

Оценка состояния потомства интактных крыс-самок и крыс-самцов, скрещенных через 3 и 6 мес после введения цитостатических препаратов, в постнатальном периоде развития

Assessment of the state of the offspring of intact female and male rats copulated 3 and 6 months after the administration of cytostatic drugs in the postnatal period of development

| Показатели/ Parameters | Э/Е | | И/И | | М/М | | П/П | | К/С | | Пл/Pl | | Ф, 6 мес/ F, 6 mth |
|--|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | 3 мес/ 3 mth | 6 мес/ 6 mth | |
| | Внешние аномалии развития/ External anomalies of development | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | |
| Масса тела крысят при рождении/ Body weight of rat pups at birth | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – |
| Индекс выживаемости/ Survival index | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Физическое развитие/ Physical development | – | – | – | – | + | – | + | + | – | – | – | – | – |
| Мышечный тонус/ Muscle tone | – | + | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | + |
| Тест «избегание обрыва»/ Break avoidance test | – | + | – | – | + | – | – | + | – | + | – | – | – |
| Способность к обучению (тест УРПИ)/ Ability to learn (CRPI test) | + | + | – | + | – | + | – | – | – | – | + | – | + |
| Адаптивное поведение (тест Хандерсон)/ Adaptive behavior (Hunderson test) | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | + |

Примечания: Э – этопозид; И – иринотекан; М – метотрексат; П – паклитаксел; К – карбоплатин; Пл – платидиам; Ф – фарморубицин; + нарушение в проявлении показателя жизнедеятельности; – отсутствие нарушения в проявлении показателя жизнедеятельности.

Notes: E – etoposide; I – irinotecan; M – methotrexate; P – paclitaxel; C – carboplatin; Pl – platiidiam; F – farmorubicin; + violation in the manifestation of a vital sign; – no violation in the manifestation of vital signs.

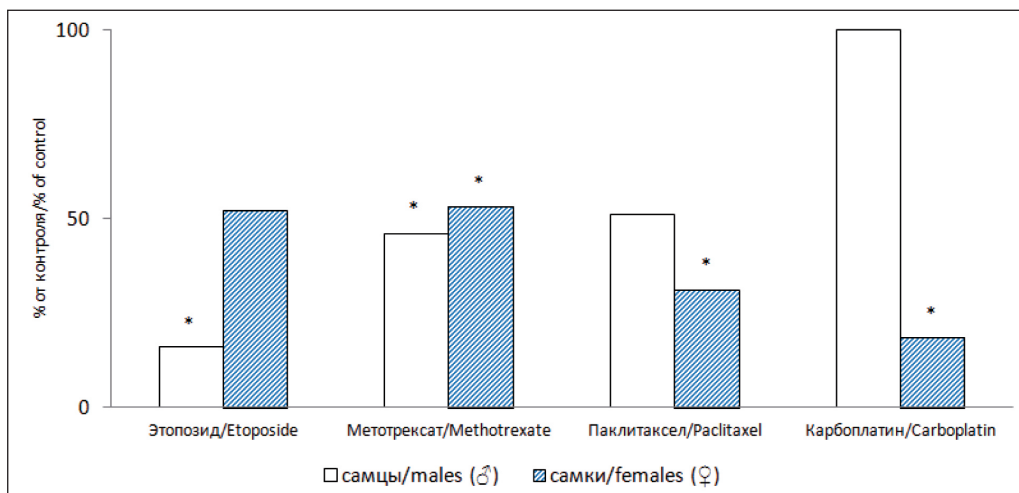


Рис. 1. Количество животных, «избегающих обрыва», в потомстве крыс-самцов, получавших различные виды цитостатического воздействия за 3 и 6 мес до скрещивания. Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем
 Fig. 1. The number of animals «avoiding the cliff» in the offspring of male rats that received various types of cytostatic treatment 3 and 6 months before mating. Note: * – $p \leq 0.05$ compared to control

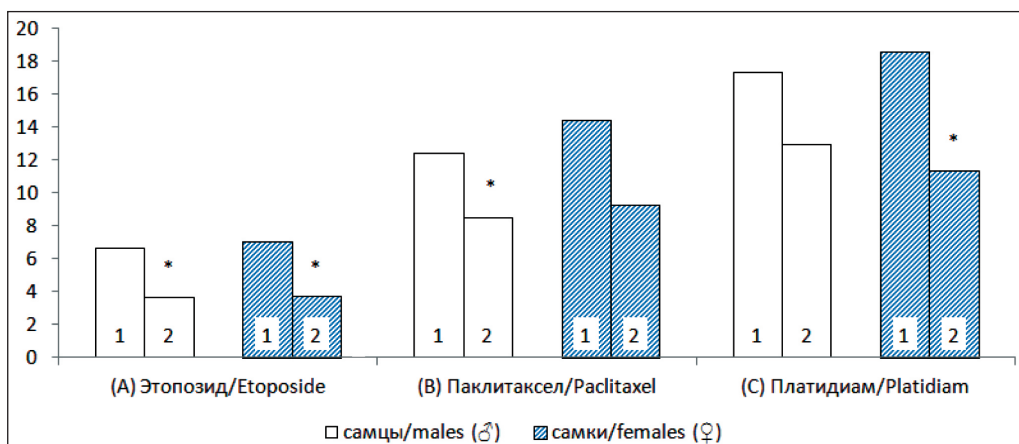


Рис. 2. Способность крысят удерживаться на горизонтальной веревочке (потомство крыс-самцов, получавших цитостатические препараты). Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем; 1 – контрольная группа; 2 – опытная группа; А – потомство самцов, получавших этопозид за 6 мес до скрещивания, тестирование на 5-й день жизни; В – потомство самцов, получавших паклитаксел за 6 мес до скрещивания, тестирование на 5-й день жизни; С – потомство самцов, получавших платидиам за 6 мес до скрещивания, тестирование на 15-й день жизни.
 По оси ординат указано количество животных, способных избежать обрыв (% от контроля)
 Fig. 2. The ability of rat pups to stay on a horizontal string (offspring of male rats treated with cytostatic drugs). Note: * – $p \leq 0,05$ compared to control; 1 – control group; 2 – experience group; A – offspring of males treated with etoposide 6 months before mating, testing on the 5th day of life; B – offspring of males treated with paclitaxel 6 months before mating, testing on the 5th day of life; C – offspring of males treated with platidium 6 months before mating, testing on the 15th day of life.
 The y-axis indicates the number of animals able to avoid the cliff (% of control)

первой группы отмечались более поздние сроки прорезывания резцов (на 1–2 дня; $p \leq 0,05$). В потомстве второй группы на 3-й день жизни отлипание ушной раковины выявлялось у 57 % животных (в контроле – у 100 %, $p \leq 0,05$), открытие глаз – на 14-й день жизни у 33 % (в контроле – у 100 %; $p \leq 0,05$).
 При оценке состояния соматосенсорной системы установлено, что количество крыс в потомстве животных экспериментальных групп, обладающих способностью «избегать обрыва», оказалось статистически значимо сниженным по сравнению с таковым в контроле (рис. 1). Этот эффект выявлялся в потомстве животных, получавших Э, М, П, К. Следует отметить, что наибольшее количество

крыс со сниженной скоростью созревания соматосенсорной системы выявлялось в потомстве крыс-самцов, получавших Э. При изучении скорости становления двигательной активности в тесте «мышечная сила» установлено, что все животные потомства контрольных и экспериментальных групп обладали способностью удерживаться на горизонтальной веревочке передними лапами. Однако часть крысят (самцов, самок) в экспериментальных группах (потомство животных, получавших Э, П и Пл) удерживались на горизонтальной веревочке в течение более короткого периода времени, чем в контроле (рис. 2). Время удерживания существенно сокращалось (в 1,6–1,8 раза; $p \leq 0,05$).

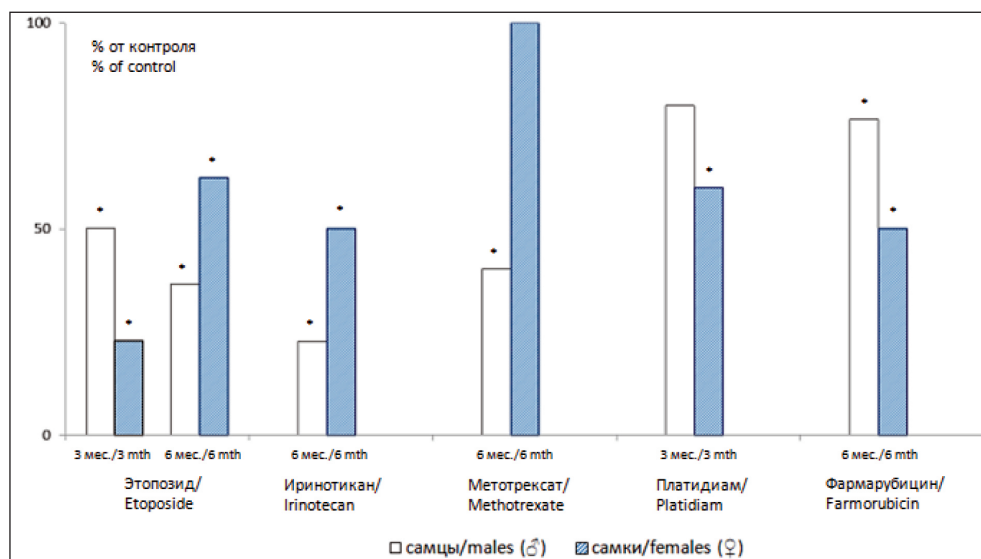


Рис. 3. Количество животных (в процентах от контроля), избегающих темный отсек камеры на 2-й день опыта (потомства крыс-самцов, получавших цитостатические препараты за 3 и 6 мес до скрещивания).

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 3. The number of animals (as a percentage of control) avoiding the dark compartment of the chamber on the 2nd day of the experiment (offspring of male rats treated with cytotoxic drugs 3 and 6 months before mating).

Note: * – $p \leq 0,05$ compared to control

На рис. 3 представлены результаты оценки поведения животных в тесте УРПИ. Установлено, что количество крысят (самцов, самок), избегающих темный отсек камеры, на 2-й день опыта в экспериментальных группах (потомство крыс-самцов, получавших Э, И, М, П, Ф) оказалось сниженным по сравнению с таковым в контроле. Угнетение выработки УРПИ чаще всего (у 80 % животных) наблюдалось в потомстве крыс-самцов, получавших ингибиторы топоизомеразной активности (этопозид, иринотекан). Следует отметить, что этот эффект выявлялся при скрещивании через 3 и 6 мес после цитостатического воздействия.

Обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что способностью к деторождению обладали почти все животные экспериментальных групп. Отсутствие потомства у крыс-самцов, получавших фарморубицин за 3 мес до спаривания, является, по-видимому, следствием временной сниженной способности к зачатию, а не пре- и постимплантационных потерь. В пользу этого свидетельствует тот факт, что у самцов данной группы в этот период исследования выявлялась олиго- и астеноспермия [8].

Анализируя данные по макрокопическому осмотру плодов, следует отметить, что частота возникновения грубых внешних аномалий развития у интактных крыс (судя по данным литературы) составляет 0,06 % [25]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что в потомстве крыс, получавших исследуемые препараты, этот показатель оказался повышенным и составил 0,24 %. Данные клинических наблюдений свидетельствуют о возрастании (на 17 %) риска серьезных врожден-

ных аномалий у потомства мужчин спустя 2 года после начала лечения [5]. Выявленная при макрокопическом осмотре у одного животного аплазия хвостового отдела может быть результатом повышенного апоптоза в хвостовой почке, который является генетически контролируемым процессом [26]. Появление мозговой грыжи является, по-видимому, следствием гипоксически-ишемической энцефалопатии [27]. Последняя могла быть инициирована наследственным нарушением обмена веществ [28].

Авторами клинических наблюдений состояния потомства мужчин, имеющих в анамнезе онкологическую патологию и перенесших цитостатическое лечение, не обнаружено изменения массы тела потомства при рождении и задержки физического развития [5]. В данном экспериментальном исследовании в отдельных группах наблюдалось рождение животных с отмеченными отклонениями. Так, в потомстве крыс-самцов, получавших Пд, выявлялись крысы с повышенной массой тела при рождении. Нельзя исключить, что введение цитостатического препарата (платидиама) на стадии прогенеза оказало влияние на экспрессируемый по отцовской линии инсулиноподобный фактор роста-2, который имеет решающее значение для внутриутробного роста грызунов [29]. Задержка физического развития, выявленная в потомстве экспериментальных групп, оказалась достаточно редким нарушением

В настоящем исследовании проведена оценка состояния процессов развития центральной нервной системы (ЦНС) у потомства экспериментальных групп. Следует отметить, что до недавнего времени подробное исследование состояния потомства при воздействии повреждающих факторов на

стадии прогенеза не проводилось. Оценивались в основном фенотипические проявления мутагенных эффектов (наличие уродств, выживаемость, физическое развитие). Выявленная в последние годы способность средств цитостатической терапии инициировать эпимутации вызвала необходимость более подробного изучения состояния потомства. Учитывая то, что эпигенетические механизмы имеют фундаментальное значение для развития и функционирования ЦНС [30–32], оценка ее состояния у потомства, проведенная в данном экспериментальном исследовании, является вполне обоснованной. С этой целью использовались тесты «избегания обрыва», «мышечная сила», УРПИ. Судя по результатам этих тестов, снижение скорости формирования соматосенсорной системы, двигательной активности, способности к обучению в потомстве животных экспериментальных групп выявляется с достаточно высокой частотой. Следует отметить, что торможение формирования рефлекса «избегание обрыва», снижение способности к обучению описаны другими авторами в потомстве крыс-самцов, которым вводили такие цитостатические препараты, как циклофосфамид, прокарбазин, митомицин С [31]. Авторами этих исследований проводилось полногеномное секвенирование (RNA-seq) зародышевых клеток, которое показало, что у потомства крыс-самцов, получавших эти соединения, наблюдаются изменения экспрессии большого количества генов в нейронах головного мозга [31]. При этом отмечалось угнетение активности холин-ацетилтрансферазы гиппокампа, играющей важную роль в формировании когнитивных функций. Влияние эпигенетических изменений в зародышевых клетках на потомство является предметом пристального внимания исследователей [17]. Доказано, что они вносят определенный вклад в этиологию нарушений эмбрионального развития. [16]. Интегральная оценка всех исследуемых в данной работе показателей позволяет однозначно заключить, что риск появления у потомства отклонений в постнатальном развитии экспериментальных животных при воздействии цитостатических средств на стволовые сперматогониальные клетки повышен. Анализ данных, представленных в таблице, показывает, что степень его выраженности зависит от вида цитостатического воздействия. Из числа использованных в данной работе препаратов наиболее токсичными оказались ингибитор топоизомеразы 2 и таксансодержащее соединение. В потомстве

интактных самок и самцов, получавших их, отклонения от нормальных значений выявлялись по большинству показателей. Можно с определенной степенью достоверности сказать, что токсичность исследуемых лекарственных средств убывает в следующем порядке: паклитаксел → этопозид → метотрексат → фарморубин → карбоплатин → иринотекан. Следует отметить, что далеко не во всех случаях увеличение периода времени после лечения является оправданным для зачатия. Проведенные экспериментальные исследования позволяют утверждать, что к числу наиболее вероятных отдаленных последствий цитостатического воздействия на мужские зародышевые клетки можно отнести нарушения в состоянии ЦНС, обуславливающие снижение у потомства способности к обучению. Данные литературы свидетельствуют о том, что проводится активный поиск препаратов, снижающих уровень мутагенного воздействия на мужские половые клетки, которые в момент цитостатического воздействия находились на стадии ССК [33]. Показана также возможность модулировать эпигеном сперматозоидов [34].

Вопрос об экстраполяции данных, полученных в экспериментальных исследованиях, на человека поднимается многими исследователями, поскольку трудности в этом, безусловно, существуют. Они связаны с рядом факторов и, в первую очередь, с многоплодной беременностью у грызунов, наличием у человека эволюционно сформированной повышенной устойчивости генетического материала к токсическим воздействиям, особенностью механизмов генетической репарации [35]. В связи с этим нельзя исключить, что нарушения в постнатальном развитии у человека могут встречаться с более низкой частотой, чем в популяции животных.

Заключение

Потомство животных, получавших цитостатические препараты в сроки, соответствующие воздействию на ССК, относится к группе риска. Степень выраженности отдаленных последствий существенно варьирует и зависит от вида цитостатического воздействия. Высокая степень риска выявляется в потомстве животных, получавших этопозид и паклитаксел. К числу наиболее часто выявляемых отклонений у потомства относится снижение способности к обучению. Судя по срокам зачатия после цитостатического воздействия, увеличение периода времени после введения препаратов до скрещивания не всегда является оправданным.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Patel B.V., Hoialing J.M. Impact of chemotherapy on subsequent generations. *Urol Oncol.* 2020 Jan; 38(1): 10–3. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.02.011.
2. Tremblay A., Beaud H., Delbès G. Effets transgénérationnels des chimiothérapies: l'exposition du père influence-t-elle la santé des générations futures? [Transgenerational impact of chemotherapy: Would the father exposure impact the health of future progeny?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol.* 2017; 45(11): 609–18. French. doi: 10.1016/j.gofs.2017.09.004.

3. Taylor P.C., Balsa Criado A., Mongey A.B., Avouac J., Marotte H., Mueller R.B. How to Get the Most from Methotrexate (MTX) Treatment for Your Rheumatoid Arthritis Patient?—MTX in the Treat-to-Target Strategy. *J Clin Med.* 2019; 8(4): 515. doi: 10.3390/jcm8040515.
4. Seppänen V.I., Artama M.S., Malila N.K., Pitkaniemi J.M., Rantanen M.E., Ritvanen A.K., Madanat-Harjuoja L.M. Risk for congenital anomalies in offspring of childhood, adolescent and young adult cancer survivors. *Int J Cancer.* 2016; 139(8): 1721–30. doi: 10.1002/ijc.30226.

5. Ståhl O., Boyd H.A., Giwercman A., Lindholm M., Jensen A., Kjær S.K., Anderson H., Cavallin-Ståhl E., Rylander L. Risk of birth abnormalities in the offspring of men with a history of cancer: a cohort study using Danish and Swedish national registries. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103(5): 398–406. doi: 10.1093/jnci/djq550.
6. Parekh N.V., Lundy S.D., Vij S.C. Fertility considerations in men with testicular cancer. *Transl Androl Urol.* 2020; 9(s1): 14–23. doi: 10.21037/tau.2019.08.08.
7. Gutierrez J.C., Hwang K. The toxicity of methotrexate in male fertility and paternal teratogenicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017; 13(1): 51–8. doi: 10.1080/17425255.2017.1230198.
8. Боровская Т.Г., Гольдберг В.Е., Полуэктова М.Е., Щемерова Ю.А., Вычужанина А.В., Григорьева В.А., Коллантай О.В., Камалова С.И. Экспериментальная оценка отдаленных последствий токсического действия цитостатических препаратов на мужскую репродуктивную функцию. *Сибирский онкологический журнал.* 2020; 19(1): 64–72. [Borovskaya T.G., Goldberg V.E., Poluektova M.E., Shchemerova Yu.A., Vyuchanina A.V., Grigoryeva V.A., Kollantai O.V., Kamalova S.I. Experimental assessment of long-term effects of the toxic effect of cytostatic drugs on male reproductive function. *Siberian Journal of Oncology.* 2020; 19(1): 64–72. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-1-64-72.
9. Delessard M., Saulnier J., Rives A., Dumont L., Rondanino C., Rives N. Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(4): 1454. doi: 10.3390/ijms21041454.
10. Okada K., Fujisawa M. Recovery of Spermatogenesis Following Cancer Treatment with Cytotoxic Chemotherapy and Radiotherapy. *World J Mens Health.* 2019; 37(2): 166–74. doi: 10.5534/wjmh.180043.
11. Paoli D., Pallotti F., Lenzi A., Lombardo F. Fatherhood and Sperm DNA Damage in Testicular Cancer Patients. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9: 506. doi: 10.3389/fendo.2018.00506.
12. Ben Maamar M., Nilsson E.E., Skinner M.K. Epigenetic transgenerational inheritance, gametogenesis and germline development. *Biol Reprod.* 2021; 105(3): 570–92. doi: 10.1093/biolre/iaob085.
13. Gavrilouk D., Aitken R.J. Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 868: 23–47. doi: 10.1007/978-3-319-18881-2_2.
14. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. 2-й том. М., 2009. 456 с. [Palteev M.A. Biology of stem cells and cell technologies. 2 vol. Moscow, 2009. 456 p. (in Russian)].
15. Robinson N., Casement J., Gunter M.J., Huybrechts I., Agudo A., Barranco M.R., Eichelmann F., Johnson T., Kaaks R., Pala V., Panico S., Sandanger T.M., Schulte M.B., Travis R.C., Rosario Tumino R., Vineis P., Weiderpass E., Skinner R., Sharp L., McKay J.A., Strathdee G. Anti-cancer therapy is associated with long-term epigenomic changes in childhood cancer survivors. *Br J Cancer.* 2022; 127: 288–300. doi: 10.1038/s41416-022-01792-9.
16. Лебедев И.Н. Эпигенетические аспекты нарушений эмбрионального развития человека. Экологическая генетика. 2011; 9(3): 15–9. [Lebedev I.N. Epigenetic aspects of violations of human embryonic development. *Ecological Genetics.* 2011; 9(3): 15–9. (in Russian)]. doi: 10.17816/ecogen9315-19.
17. Tesarik J. Paternal Effects on Embryonic Fetal and Offspring Health: The Role of Epigenetics in the ICSI and ROSI Era. *Innovations in Assisted Reproduction Technology.* 2019. 248 p.
18. Meistrich M.L. Risks of genetic damage in offspring conceived using spermatozoa produced during chemotherapy or radiotherapy. *Andrology.* 2020; 8(3): 545–58. doi: 10.1111/andr.12740.
19. Sakashita A., Yeh Y.V., Namekawa S.H., Lin S.P. Epigenomic and single-cell profiling of human spermatogonial stem cells. *Stem Cell Investig.* 2018; 5: 11. doi: 10.21037/sci.2018.04.04.
20. Yamada M., Cai W., Martin L.A., N'Tumba-Byn T., Seandel M. Functional robustness of adult spermatogonial stem cells after induction of hyperactive Hras. *PLoS Genet.* 2019; 15(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1008139.
21. Полянская Г.Г. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология.* 2014; 56(10): 697–707. [Polyanskaya G.G. The problem of genome instability in cultured human stem cells. *Cytology.* 2014; 56(10): 697–707. (in Russian)].
22. Shnorhavorian M., Schwartz S.M., Stansfeld B., Sadler-Riggelman I., Beck D., Skinner M.K. Differential DNA Methylation Regions in Adult Human Sperm following Adolescent Chemotherapy: Potential for Epigenetic Inheritance. *PLoS One.* 2017; 12(2). doi: 10.1371/journal.pone.0170085.
23. Thompson R.P., Beck D., Nilsson E., Maamar M.B., Shnorhavorian M., Skinner M.K. Examination of generational impacts of adolescent chemotherapy: Ifosfamide and potential for epigenetic transgenerational inheritance. *2022; 25(12): 105570.* doi: 10.1016/j.isci.2022.105570.
24. 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., Smolnikova N.M., Skosyreva A.M., Shrede O.V., Gus'kova T.A., Verstakova O.L., Syubaev R.D. Guidelines for the study of reproductive toxicity of drugs. *Preclinical Drug Research Guide.* Moscow, 2013. P. 80–93. (in Russian)].
25. Ema M., Endoh K., Fukushima R., et al. Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. *Congenital Anomalies.* 2014; 54(3): 150–61. doi: 10.1111/cga.12050.
26. Nakajima M., Usami M., Nakazawa K., Arishima K., Yamamoto M. Developmental toxicity of indium: embryotoxicity and teratogenicity in experimental animals. *Congenit Anom (Kyoto).* 2008; 48(4): 145–50. doi: 10.1111/j.1741-4520.2008.00197.x.
27. Soliman Y., Yusuf K., Blayney M., El Shahed A.I., Belik J. Neonatal coning secondary to hypoxic ischaemic encephalopathy: A case study and literature review. *Paediatr Child Health.* 2019; 26(2): 67–9. doi: 10.1093/pch/pxz138.
28. Zahid M., Khan A.H., Yunus Z.M., Chen B.C., Steinmann B., Johannes H., Afroz B. Inherited metabolic disorders presenting as hypoxic ischaemic encephalopathy: A case series of patients presenting at a tertiary care hospital in Pakistan. *J Pak Med Assoc.* 2019; 69(3): 432–6.
29. Demetriou C., Abu-Amero S., Thomas A.C., Ishida M., Aggarwal R., Al-Olabi L., Leon L.J., Stafford J.L., Syngelaki A., Peebles D., Nicolaidis K.H., Regan L., Stanier P., Moore G.E. Paternally Expressed, Imprinted Insulin-Like Growth Factor-2 in Chorionic Villi Correlates Significantly with Birth Weight. *Plos one.* 2014; 9(1): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085454>.
30. Coppède F., Cereda C., Lintas C., Stoccoro A. Editorial: Epigenetics of Neurodevelopmental, Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders. *Front Mol Neurosci.* 2022; 15. doi: 10.3389/fnmol.2022.948827.
31. Kovalchuk A., Ihnytskyi Y., Woycicki R., Rodriguez-Juarez R., Metz G.A.S., Kovalchuk O. Adverse effects of paternal chemotherapy exposure on the progeny brain: intergenerational chemobrain. *Oncotarget.* 2018; 9(11): 10069–82. doi: 10.18632/oncotarget.24311.
32. Cabellos R. Chapter 22 – Epigenetics and Pharmacoeugenetics of Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacoeugenetics.* 2019; 10: 609–709. doi: 10.1016/B978-0-12-813939-4.00022-X.
33. Боровская Т.Г., Вычужанина А.В., Григорьева В.А., Коллантай О.В., Гольдберг В.Е., Дыгай А.М. Оценка влияния n-Тирозола на уровень ДНК-повреждений в тесте ДНК-комет *in vivo*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020; 169(2): 193–6. [Borovskaya T.G., Vyuchanina A.V., Grigoryeva V.A., Kollantai O.V., Goldberg V.E., Dygai A.M. Evaluation of the effect of n-Tyrosol on the level of DNA damage in the DNA comet test *in vivo*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2020; 169(2): 193–6. (in Russian)]. <http://http://iramn.ru/journals/bbm/2020/2/4779/>.
34. Choucair F., Saliba E., Jaoude I.A., Hazzouri M. Antioxidants modulation of sperm genome and epigenome damage: Fact or fad? Converging evidence from animal and human studies. *Middle East Fertility Society J.* 2018; 23(2): 85–90. doi: 10.1016/j.mefs.2018.01.006.
35. Соснина С.Ф., Сокольников М.Э. Наследуемые эффекты у потомков, связанные с вредным воздействием на родителей (Обзор литературы). *Радиационная гигиена.* 2019; 12(3): 84–95. [Sosnina S.F., Sokolnikov M.E. Heritable effects in offspring associated with harmful exposure to parents (Literature review). *Radiation Hygiene.* 2019; 12(3): 84–95. (in Russian)]. doi: 10.21514/1998-426X-2019-12-3-84-95.

Поступила/Received 30.12.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 14.06.2023

Принята к публикации/Accepted 05.07.2023

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.

Вычужанина 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.

Ксенева Светлана Игоревна, доктор медицинских наук, главный врач клиники, научный сотрудник лаборатории физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, 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-2325-2017. ORCID: 0000-0002-5448-3752.

Фомина Татьяна Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лекарственной токсикологии, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). Researcher ID (WOS): J-3824-2017. ORCID: 0000-0002-9863-9464. Author ID (Scopus): 7004276582.

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.

Гольдберг Виктор Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, 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.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

Вычужанина Анна Владимировна: сбор, статистический анализ и интерпретация данных, написание статьи, оформление окончательного варианта статьи.

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

Ксенева Светлана Игоревна: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Фомина Татьяна Ивановна: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

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

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

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

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

Anna V. Vychuzhanina, PhD, Senior Research, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, 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, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): D-1212-2018. Author ID (Scopus): 9842887800.

Svetlana I. Kseneva, MD, DSc, Chief Physician of the Clinic, Researcher of the Laboratory of Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): J-2325-2017. ORCID: 0000-0002-5448-3752.

Tatyana I. Fomina, MD, PhD, Senior Researcher in Drug Toxicology, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): J-3824-2017. ORCID: 0000-0002-9863-9464. Author ID (Scopus): 7004276582.

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

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tatyana G. Borovskaya: study conception, data interpretation, drafting of the manuscript, approval of the published version of the manuscript.

Anna V. Vychuzhanina: data collection and interpretation, statistical analysis drafting of the manuscript, preparation of the final version of the manuscript.

Yuliya A. Shchemerova: data collection and interpretation, statistical analysis drafting of the manuscript, preparation of the final version of the manuscript.

Svetlana I. Kseneva: critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Tatyana I. Fomina: supervision, critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Elena A. Bokhan: data collection, drafting of the manuscript.

Viktor E. Goldberg: critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.