



УДК 615.03 + 616-006 + 577.175.6

## Динаміка змін гормональних показників оваріального резерву при серійному застосуванні циклофосфаміду в експерименті

В.А. ШАМРАЙ<sup>1,2</sup>, О.І. МІСЮРКО<sup>1,2</sup>, Д.І. ГРЕБЕНЮК<sup>1</sup>, І.В. ТАРАН<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

<sup>2</sup> Подільський регіональний центр онкології, Вінниця, Україна

E-mail: Doctor.Svo@gmail.com

**Резюме.** Метою дослідження було вивчити динаміку змін гормональних показників оваріального резерву при серійному застосуванні циклофосфаміду в експерименті. Досліди проводили на 45 статевозрілих самицях 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). Динаміка рівнів гормональних показників оваріального резерву при серійному введенні циклофосфаміду характеризувалася хвилеподібною динамікою із погіршенням показників безпосередньо після курсу хіміотерапії та частковим їх відновленням протягом періоду між суміжними курсами. Оваріотоксичність циклофосфаміду при серійному введенні в терапевтичних дозах в експерименті проявлялася достовірними змінами рівнів антимюллерового гормону, естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону вже після проведення першого курсу хіміотерапії.

**Ключові слова:** циклофосфамід, антимюллерів гормон, естрадіол, фолікулостимулюючий гормон, щури.

## Dynamics of changes in hormonal indicators of ovarian reserve in serial application of cyclophosphamide in the experiment

V.A. SHAMRAI<sup>1,2</sup>, O.I. MISIURKO<sup>1,2</sup>, D.I. GREBENIUK<sup>1</sup>, I.V. TARAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Vinnytsya, Ukraine

<sup>2</sup> Podillian Regional Oncology Center, Vinnytsya, Ukraine

**Abstract.** The aim of the study was to study the dynamics of changes in hormonal parameters of the ovarian reserve during serial use of cyclophosphamide in the experiment. The experiments were performed on 45 adult female white rats. Levels of antimullerian 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). The dynamics of ovarian reserve hormone levels during serial administration of cyclophosphamide was characterized by wavy dynamics with deterioration immediately after chemotherapy and partial recovery during the period between adjacent courses. Ovariotoxicity of cyclophosphamide when administered serially in therapeutic doses in the experiment was manifested by significant changes in the levels of antimullerian hormone, estradiol and follicle-stimulating hormone after the first course of chemotherapy.

**Key words:** cyclophosphamide, antimullerian hormone, estradiol, follicle-stimulating hormone, rats.

**Вступ.** Циклофосфамід є алкілюючим агентом, який вивчають з кінця 50-х років минулого століття та застосовують у клініці для лікування широкого спектру злоякісних новоутворень понад 50 років [1].

Токсичні ефекти даного препарату на організм зумовлені, з одного боку, пошкодженням ланцюгів ДНК метаболітами циклофосфаміду, а з іншого – руйнуванням клітин шляхом р53-опосередкованого апоптозу [2]. Токсична дія циклофосфаміду проявляється у вигляді кардіотоксичності [3], нейротоксичності [4], гематологічної токсичності [5], токсичного ураження шлунково-кишкового тракту [6] та ін.

Експериментальні дослідження репродуктивної токсичності циклофосфаміду, в переважній більшості, представлені роботами, які демонструють результати вивчення оваріальної токсичності препарату при однократному введенні *in vitro* [7,8] або *in vivo* [9,10]. Враховуючи, що більшість схем хіміотерапії із застосуванням даного препарату передбачають серійне його введення [11], цікавим, з наукової точки зору, є вивчення динаміки змін показників оваріального резерву протягом всього періоду введення препарату.

Згідно з чинними рекомендаціями гормональними маркерами оваріального резерву є антимюллерів гормон (АМН), естрадіол (Е2) та фолікулостимулюючий гормон (FSH) [12]. Рівні саме цих маркерів було вирішено вивчати у нашому дослідженні.

**Мета дослідження** – вивчити динаміку змін гормональних показників оваріального резерву при серійному застосуванні циклофосфаміду в експерименті.

**Матеріали й методи дослідження.** Експериментальне дослідження виконувалося на базі віварію Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Усі досліді виконували згідно з “Положенням про використання тварин в біомедичних дослідях” із дозволу комітету з біоетики та відповідно до положень Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту та Ради Європейського Союзу від 22 вересня 2010 р. “Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях”.

Досліді проводили на 45 статевозрілих самицях білих щурів масою 160–200 г (190,4±14,5 г) віком до 1 року, яких утримували 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 самиць щурів при серійному введенні циклофосфаміду, визначали рівні антимюллерового гормону, естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону.

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 Fu X.-Y. та співавт. [13].

Забір крові проводили шляхом черезшкірної пункції порожнини лівого плуночка під кетаміновим наркозом із розрахунку 0,22 мл кетаміну на 100 г 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).

Репті щурів проводили серійне введення циклофосфамід у дозі 83,7 мг/кг. Перерахунок людських доз препарату здійснювали за методикою, запропонованою Anroop V. Nair та Shery Jacob [14].

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 піддавалися обробці за допомогою пакету статистичних програм SPSS 20.0 for Windows. Достовірність відмінностей параметричних величин оцінювали із використанням *t*-критерію Стьюдента.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Динаміка змін основних статевих гормонів при застосуванні циклофосфаміду в експерименті наведена на рис. 1–3.

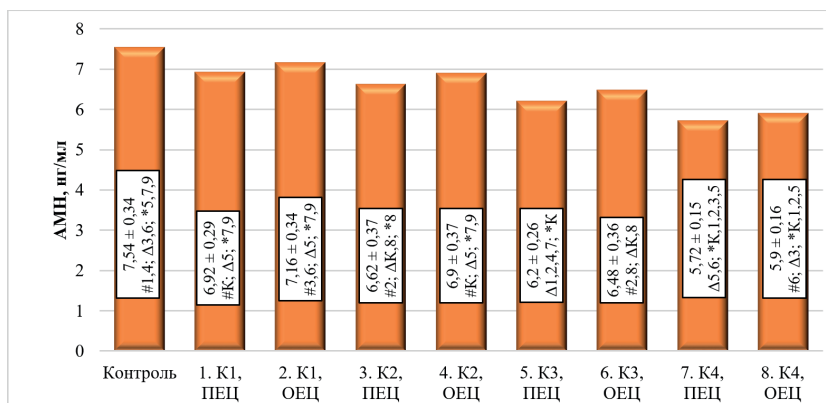


Рис. 1. Динаміка змін рівнів антимюллерового гормону при застосуванні циклофосфаміду в експерименті: K1–K4 – курси введення препарату; ПЕЦ – перший естральний цикл після відповідного курсу; ОЕЦ – останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом. Статистично достовірні різниці стосовно зазначених груп із відповідним номером: # –  $p < 0,05$ ; Δ –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,001$

Аналогічно до попередніх даних, динаміка змін рівнів антимюллерового гормону при застосуванні циклофосфаміду в експерименті характеризувалася прогресивним зниженням його рівнів протягом всього терміну дослідження. Також спостерігалися коливання значень у період між суміжними курсами введення препарату із зниженням їх при дослідженні під час першого естрального циклу після чергового курсу хіміотерапії та підвищенням під час останнього естрального циклу перед черговим введенням хіміопрепарату. Перші статистично достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ) від показників контрольної групи з'являються вже при дослідженні під час першого естрального циклу після першого курсу хіміотерапії. У наступній часовій точці спостерігається відновлення рівнів досліджуваного показника до значень, що статистично достовірно не відрізняються ( $p > 0,05$ ) від

контрольних. У всіх наступних часових точках відмінності від контрольних значень знову набували статистичної достовірності ( $p < 0,05$ ). При цьому, слід зазначити, що статистична достовірність відмінностей показників від контрольних значень характеризувалася прогресивним зростанням значущості із досягненням значень  $p < 0,01$  у шостій та  $p < 0,001$  – у п'ятій, сьомій і восьмій часових точках.

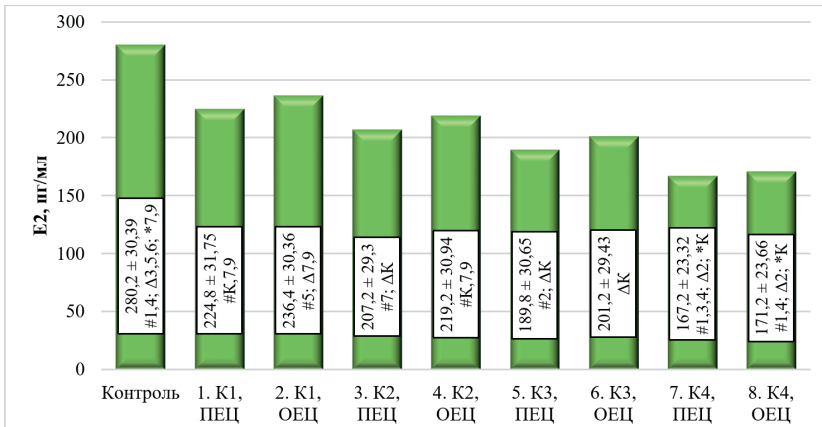


Рис. 2. Динаміка змін рівнів естрадіолу при застосуванні циклофосфаміду в експерименті:

K1–K4 – курси введення препарату; ПЕЦ – перший естральний цикл після відповідного курсу;

ОЕЦ – останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом. Статистично достовірні різниця стосовно зазначених груп із відповідним номером: # –  $p < 0,05$ ; Δ –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,001$

Загалом динаміка змін рівнів естрадіолу була подібною до динаміки змін рівнів антимюллерового гормону та характеризувалася прогресивним зниженням його рівнів протягом всього терміну дослідження із описаним раніше характерним коливанням рівнів досліджуваного показника між суміжними курсами введення препарату. Перші статистично достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ) від контрольних значень спостерігалися вже під час першого естрального циклу після першого курсу хіміотерапії. У наступній часовій точці відбулося відновлення рівнів естрадіолу до значень, що статистично достовірно не відрізняються ( $p > 0,05$ ) від контрольних. Надалі мало місце прогресування значущості статистичних відмінностей від контрольних значень у кожній наступній часовій точці із досягненням значень  $p < 0,001$  у сьомій та восьмій часових точках.

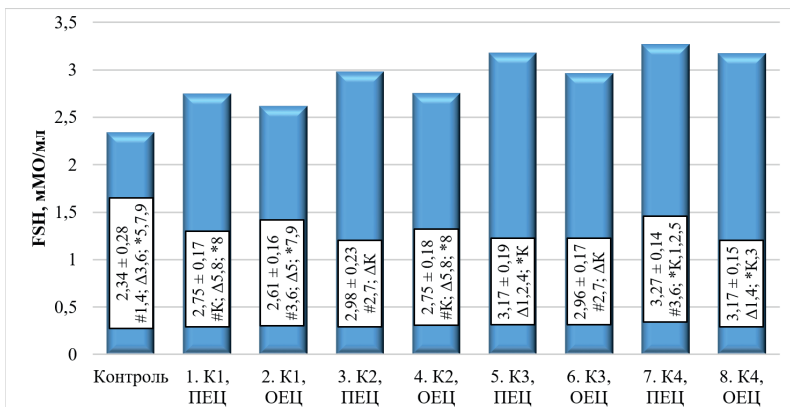


Рис. 3. Динаміка змін рівнів фолікулостимулюючого гормону при застосуванні циклофосфаміду в експерименті: K1–K4 – курси введення препарату; ПЕЦ – перший естральний цикл після відповідного курсу; ОЕЦ – останній естральний цикл після відповідного курсу та перед наступним курсом.

Статистично достовірні різниця стосовно зазначених груп із відповідним номером:

# –  $p < 0,05$ ; Δ –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,001$

Динаміка змін рівнів фолікулостимулюючого гормону мала схожу тенденцію до такої при дослідженні антимюллерового гормону із аналогічними статичними відмінностями від контрольної групи у кожній часовій точці, проте мала протилежну спрямованість. Так, перші статистично достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ) від контрольних значень з'являються вже при дослідженні під час першого естрального циклу після першого курсу хіміотерапії. У наступній часовій точці спостерігається відновлення рівнів досліджуваного показника до значень, що статистично достовірно не відрізняються ( $p > 0,05$ ) від контрольних. У всіх наступних часових точках відмінності від контрольних значень знову набували статистичної достовірності ( $p < 0,05$ ). При цьому, слід зазначити, що статистична достовірність відмінностей показників від контрольних значень характеризувалася прогресивним зростанням значущості із досягненням значень  $p < 0,01$  у третій і шостій та  $p < 0,001$  – у п'ятій, сьомій і восьмій часових точках.

Загалом, зміни гормонального статусу щурів при серійному застосуванні циклофосфаміду вказували на прогресивний розвиток оваріальної недостатності у піддослідних тварин. Отримані нами дані продемонстрували картину, яка, в цілому, збігається із результатами експериментальних досліджень оваріальної токсичності при однократному введенні даного препарату як *in vitro*, так і *in vivo* [7-10]. Водночас 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 циклофосфаміду [15].

### Висновки.

Динаміка рівнів гормональних показників оваріального резерву при серійному введенні циклофосфаміду характеризується хвилеподібною динамікою із погіршенням показників безпосередньо після курсу хіміотерапії та частковим їх відновленням протягом періоду між суміжними курсами.

Оваріотоксичність циклофосфаміду при серійному введенні в терапевтичних дозах в експерименті проявляється достовірними змінами рівнів антимюллерового гормону, естрадіолу та фолікулостимулюючого гормону вже після проведення першого курсу хіміотерапії.

*Рекомендовано до друку комісією з етики*

### ПОСИЛАННЯ

1. Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Oct;78(4):661–71. doi: 10.1007/s00280-016-3152-1. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27646791.
2. Voelcker G. The Mechanism of Action of Cyclophosphamide and Its Consequences for the Development of a New Generation of Oxazaphosphorine Cytostatics. *Sci. Pharm.* 2020;88:42. doi: 10.3390/scipharm88040042.
3. Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Ali SM, Ali J, Haque SE. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci.* 2019 Feb 1;218:112–31. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.018. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30552952.
4. Iqbal A, Syed MA, Najmi AK, Azam F, Barreto GE, Iqbal MK, Ali J, Haque SE. Nano-engineered nerolidol loaded lipid carrier delivery system attenuates cyclophosphamide neurotoxicity – Probable role of NLRP3 inflammasome and caspase-1. *Exp Neurol.* 2020;Dec;334:113464. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113464. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32941795.
5. Tran A, Bournerias F, Le Beller C, Mir O, Rey E, Pons G, Delahousse M, Tréluyer JM. Serious haematological toxicity of cyclophosphamide in relation to CYP2B6, GSTA1 and GSTP1 polymorphisms. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;Feb;65(2):279–80. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03020.x. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17875191; PMCID: PMC2291223.
6. Russo F, Linsalata M, Clemente C, D'Attoma B, Orlando A, Campanella G, Giotta F, Riezzo G. The effects of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC60) on the intestinal barrier function and gut peptides in breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer.* 2013; Feb 4;13:56. doi: 10.1186/1471-2407-13-56. PMID: 23379680; PMCID: PMC3575294.
7. Marcozzi S, Rossi V, Salvatore G, Di Rella F, De Felici M, Klingner FG. Distinct effects of epirubicin, cisplatin and cyclophosphamide on ovarian somatic cells of prepuberal ovaries.



Aging (Albany NY). 2019 Nov 11;11(22):10532–56. doi: 10.18632/aging.102476. Epub 2019 Nov 11. PMID: 31711044; PMCID: PMC6914390.

8. Hao X, Anastácio A, Viñals-Ribé L, Santamaria Lacuesta A, Diakaki C, Alonso de Mena S, Liu K, Rodriguez-Wallberg KA. Follicle Rescue From Prepubertal Ovaries After Recent Treatment With Cyclophosphamide-An Experimental Culture System Using Mice to Achieve Mature Oocytes for Fertility Preservation. *Front Oncol*. 2021;Sep24;11:682470. doi: 10.3389/fonc.2021.682470. PMID: 34631518; PMCID: PMC8497963.

9. Pascuali N, Scotti L, Di Pietro M, Oubiña G, Bas D, May M, Gómez Muñoz A, Cuasnicú PS, Cohen DJ, Tesone M, Abramovich D, Parborell F. Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2018 May 1;33(5):844–59. doi: 10.1093/humrep/dey045. PMID: 29534229.

10. Elkady MA, Shalaby S, Fathi F, El-Mandouh S. Effects of quercetin and rosuvastatin each alone or in combination on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in female albino mice. *Hum Exp Toxicol*. 2019 Nov;38(11):1283–95. doi: 10.1177/0960327119865588. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31370695.

11. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100A.) CYCLOPHOSPHAMIDE. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304336/>.

12. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org); Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020 Dec;114(6):1151–7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.09.134. PMID: 33280722.

13. Fu XY, Chen HH, Zhang N, Ding MX, Qiu YE, Pan XM, Fang YS, Lin YP, Zheng Q, Wang WQ. Effects of chronic unpredictable mild stress on ovarian reserve in female rats: Feasibility analysis of a rat model of premature ovarian failure. *Mol Med Rep*. 2018 Jul;18(1):532–40. doi: 10.3892/mmr.2018.8989. Epub 2018 May 8. PMID: 29749518.

14. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016 Mar;7(2):27–31. doi: 10.4103/0976-0105.177703. PMID: 27057123; PMCID: PMC4804402.

15. Lee EH, Han SE, Park MJ, Kim HJ, Kim HG, Kim CW, Joo BS, Lee KS. Establishment of Effective Mouse Model of Premature Ovarian Failure Considering Treatment Duration of Anticancer Drugs and Natural Recovery Time. *J Menopausal Med*. 2018 Dec;24(3):196–203. doi: 10.6118/jmm.2018.24.3.196. Epub 2018 Dec 31. PMID: 30671413; PMCID: PMC6336561.

Стаття надійшла до редакції 09.12.2021