

Г. М. Шаяхметова

Порівняльна оцінка впливу протитуберкульозних лікарських засобів на експресію CYP2E1 і стан сперматогенного епітелію за умов введення щурам-самцям у двох комбінаціях, що містять етамбутол або стрептоміцин

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: протитуберкульозні засоби, CYP2E1, сім'яники

Погіршення епідемічної ситуації з туберкульозу в світі наприкінці минулого тисячоліття змусило ВООЗ у 1993 році оголосити туберкульоз глобальною небезпекою. В Україні за критеріями ВООЗ епідемія туберкульозу існує з 1995 року й відтоді продовжує поширюватись [1]. Загалом, усі пацієнти з країн, де з високою частотою виявляють стійкі форми *M. tuberculosis* отримують як первинну протитуберкульозну терапію комбінацію ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду разом з щонайменше одним додатковим препаратом (етамбутолом і/або стрептоміцином) [4]. Майже всі протитуберкульозні препарати першої лінії мають побічні ефекти, які розрізняються за ступенем тяжкості залежно від лікарського засобу та режиму. Крім того, усі схеми фармакотерапії для лікування активного туберкульозу включають комбінацію ліків, які, як правило, уводять протягом не менше ніж 6 місяців [3]. Механізми взаємодії застосовуваних протитуберкульозних лікарських засобів (ПТЛЗ) є досить складними. Важливо зазначити, що не останнє місце в структурі захворювання на туберкульоз займають діти та дорослі репродуктивного віку, але дані щодо наслідків дії ПТЛЗ, зокрема їхніх комбінацій, на чоловічі гонади мало досліджені. Раніше нами було встановлено індукцію тестикулярного цитохрому Р-450 2E1 (CYP2E1) і порушення морфофункціо-

нального стану сім'яників щурів за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду [4, 5].

Мета дослідження – порівняльна оцінка стану сперматогенного епітелію щурів і тестикулярної експресії гена CYP2E1 за сумісного введення ПТЛЗ у двох комбінаціях, що містять ізоніазид, піразинамід, рифампіцин, а також етамбутол або стрептоміцин (комбінація 1 і 2 відповідно).

Матеріали та методи. Для дослідження використовували щурів самців лінії Вістар (*Rattus norvegicus*) з початковою масою тіла 150–170 г, віком 10–12 тижнів, наданих ПП «Біомодельсервіс». Дослідження проводили відповідно до Закону про тварин (Наукові процедури) від 1986 року та відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та в інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986). План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ «ІФТ НАМН України» (№ 01/12/09), усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням з тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Щури-самці були розділені на 5 груп: 1 – контроль; 2 – етамбутол; 3 – стрептоміцин; 4 – комбінація 1 (етамбутол, рифампіцин, ізоніазид та піразинамід); 5 – комбінація 2 (стрептоміцин, рифампіцин, ізоніазид і піразинамід). ПТЛЗ вводили тваринам у дозовому режимі, який застосовується в клініці для короткотермінової терапії туберкульозу

[6]. Дози досліджуваних лікарських засобів були розраховані, виходячи з коефіцієнта видової чутливості (ізоніазид – 62 мг/кг; рифампіцин – 74,4 мг/кг; піразинамід – 217 мг/кг; етамбутол – 155 мг/кг; стрептоміцин – 14 мг/кг) [7]. Для введення кожного з препаратів, за виключенням стрептоміцину, готували суспензії на 1 % крохмальному гелі безпосередньо перед введенням тваринам. Суспензії ПТЛЗ вводили тваринам щоденно внутрішньошлунково. Стрептоміцин розчиняли в 0,5 % новокаїні та вводили щурам внутрішньом'язово. Субстанції етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину були надані ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна. Стрептоміцин (Streptomycin) – порошок для ін'єкцій був наданий корпорацією «Артеріум», Україна.

ПТЛЗ вводили щурам-самцям протягом 60 днів, оскільки цей термін охоплює повний період сперматогенезу з урахуванням дозрівання сперматозоїдів в епідидимісі та є загальноприйнятним у разі дослідження впливу хімічних речовин на чоловічі гонади [8].

У всіх випадках для оцінки морфологічних показників використовували правий сім'яник, фіксуючи його в розчині Буена з наступним промиванням 70 % етанолом з карбонатом літію, зневодненням в етанолі зростаючої концентрації та зануренням у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5–6 мкм фарбували гематоксиліном і еозином, вивчали та мікрофотографували за допомогою мікроскопа Olympus BX41 (200 x).

Кількість сперматозоїдів в епідидимальних суспензіях оцінювали, як описано К. С. Chitra з співавт., використовуючи камеру Горяєва та світловий мікроскоп (200 x) [9].

Виділення сумарної мРНК з сім'яників проводили з використанням TRI-Reagent виробництва Sigma, США та синтез кДНК – з використанням стандартного тест-набору фірми Fermentas, Германия за відповідними інструкціями. Експресію мРНК CYP2E1 у сім'яниках визначали методом ЗТ-ПЛР. Склад реакційної суміші для ПЛР, праймери специфічні для ПЛР ампліфікації гена CYP2E1 (форвард

5'-CTTCGGGCCAGTGTTCAC-3' і реверс 5'-CCCATATCTCAGAGTTGTGC-3'), а також протокол ампліфікації були обрані згідно з S. M. Lankford з співавт. [10]. Для внутрішнього контролю проводили ПЛР з праймерами β-актину, що має постійний рівень експресії: форвард 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'; реверс 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCT-3'. Усі використані праймери виробництва «Metabion», Германия. Для ампліфікації використовували термоциклер BioRad, США. Електрофорез продуктів ампліфікації (744 п. о. – CYP2E1 і 353 п. о. – β-актин) проводили в 2 % агарозному гелі, забарвлювали розчином бромового етидію (5 мкг/мл), візуалізували в УФ-світлі, фотографували за допомогою системи GelDoc, виробництва BioRAD, США, та аналізували, використовуючи програмне забезпечення Quantity One BioRad System (США).

Отримані дані представляли як середнє значення ± похибка середнього ($M \pm m$). Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента або однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$. Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) був використаний для оцінки взаємозв'язків між змінними.

У разі значень r близьких до нуля, вважали, що кореляція відсутня. Значення r від 0,1 до 0,3 (-0,1 і -0,3) вказували на слабку позитивну (негативну) кореляцію, значення - від 0,3 до 0,7 (-0,3 і -0,7) приймали за свідчення помірної позитивної (негативної) кореляції та значення – від 0,7 до 1,0 (-0,7 і -1,0) – сильної позитивної (негативної) кореляції. Щоб встановити, чи дійсно коефіцієнт кореляції відрізняється від нуля, і, отже, існує доведений зв'язок між двома змінними, використовували t-критерій.

Результати та їх обговорення. Більшість лікарських засобів є субстратами цитохрому Р-450, і це – важливий момент для розуміння механізму взаємодії ліків. Терапевтичні засоби можуть змінювати метаболізм інших препаратів, а також конкурувати за метаболізм

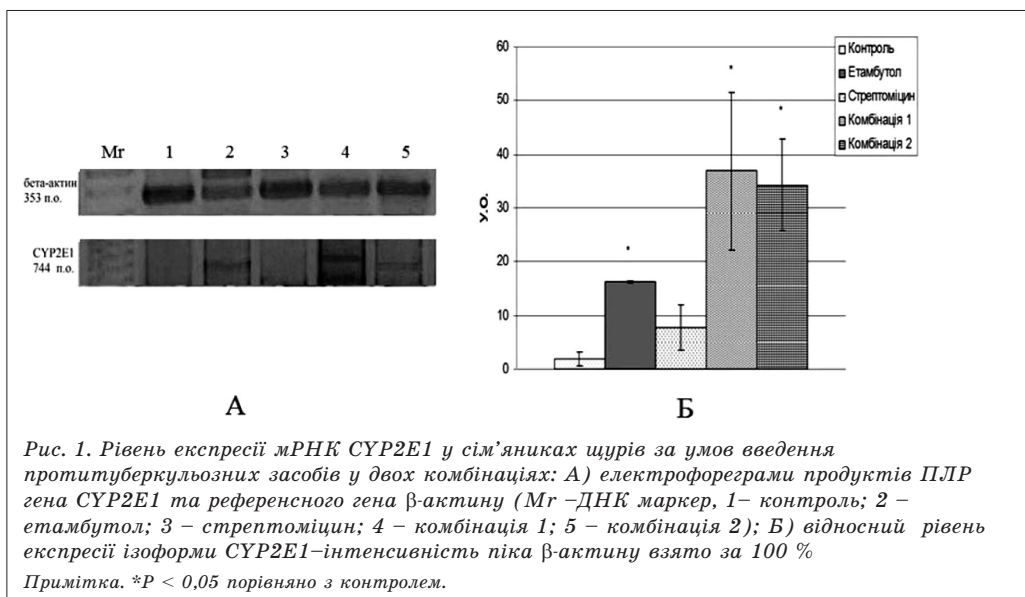
з субстратами відповідних ізоформ. Найчастіше зустрічаються: індукція ферментів цитохрому Р-450 одним лікарським засобом з наступним впливом на метаболізм іншого, що застосовується одночасно або пізніше; інгібування метаболізму лікарського засобу, яке може бути пов'язане з конкуренцією з іншим препаратом за одну й ту саму ізоформу цитохрому Р-450 [11]. Враховуючи наші попередні дані стосовно індукції СУР2Е1 у сім'яниках щурів і порушення процесів сперматогенезу за умов сумісного застосування етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду, було проведено порівняльне дослідження впливу на ці показники ПТЛЗ за введення в двох комбінаціях, в одній з яких етамбутол замінили на стрептоміцин [4, 5].

На рисунку 1 наведено дані дослідження експресії гена СУР2Е1 у гонадах щурів самців. Вони свідчать, що етамбутол, введений нарізно, викликав підвищення вмісту мРНК згаданої ізоформи у 8 разів порівняно з контролем, тоді як стрептоміцин не впливав на даний показник. Заміна етамбутолу на стрептоміцин за сумісного введення ПТЛЗ не позначилася значною мірою на ступені експресії мРНК СУР2Е1. Показано статистично значиме посилення експресії мРНК СУР2Е1 у тварин, яким вводили ПТЛЗ в обох комбінаціях. За введення комбінації 2 відзначалась тен-

денція до зниження експресії мРНК СУР2Е1 порівняно з комбінацією 1, але ці зміни не сягнули порога статистичної значимості. Можливо, що дія комбінацій ПТЛЗ стосовно СУР2Е1 реалізувалася переважно за рахунок наявності в них ізоніазиду [12].

Результати мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії показали, що комбінація 1 негативно впливала на нормоспермію в щурів. Виявлено зниження продукції статевих клітин сім'яниками відповідно на 68 % порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 2). За умов введення ПТЛЗ у комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, середня кількість сперматозоїдів не виходила за межі норми. Результати попарного кореляційного аналізу показали наявність сильної негативної кореляції між кількістю сперматозоїдів і рівнем експресії гена СУР2Е1 у гонадах щурів, які отримували комбінацію 1 ($r = -0,87$; $p = 0,001$).

Проведений кореляційний аналіз дозволяє припустити, що в основі негативної дії ПТЛЗ на гонади, так як і інших ксенобіотиків, що метаболізують у системі цитохрому Р-450, можуть лежати процеси, пов'язані зі змінами експресії СУР2Е1 безпосередньо в сім'яниках. Незважаючи на те, що дія може бути спрямованою на різні структури чоловічих репродуктивних органів, остаточна відповідь, як правило, є



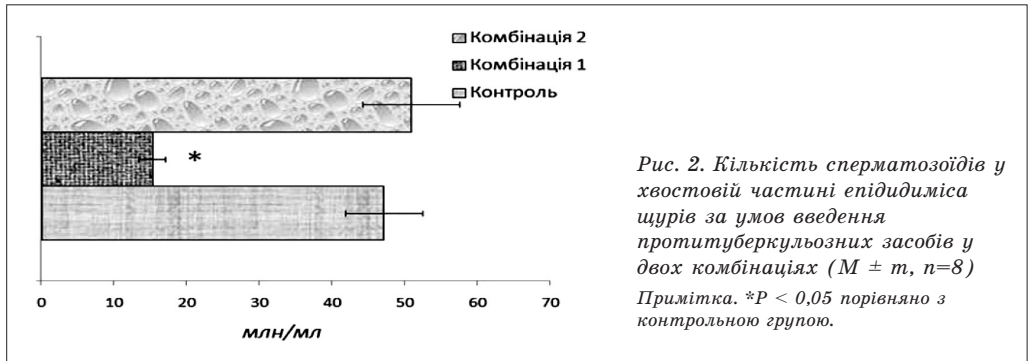


Рис. 2. Кількість сперматозоїдів у хвостовій частині епідидиміса щурів за умов введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях ($M \pm m$, $n=8$)
Примітка. * $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

неспецифічною, оскільки ушкодження одного з типів клітин тягне за собою каскад подій, які призводять до структурних змін та дисфункції інших частин системи. Слід зазначити, що залежний від СYP2E1 метаболізм лікарських засобів у чоловічих репродуктивних органах може супроводжуватись утворенням токсичних інтермедіатів, здатних взаємодіяти з життєво важливими структурами клітин, та гіперпродукцією АФК з наступним розвитком оксидативного стресу та субфертильності [13]. Це може призводити до оксидативного ураження клітин Лейдига, яке, у свою чергу, викликає зниження секреції тестостерону, спричиняючи порушення функції клітин Сертолі, негативно позначаючись на диференціації клітин сперматогенного епітелію [14].

І дійсно, на розтині в сім'яниках 50 % щурів, яким вводили комбінацію 1, зафіксовані морфологічні зміни сперматогенного епітелію. Зокрема, у однієї тварини зустрічалися поодинокі деструктивно змінені сім'яні каналці, й виявлялися вони серед каналців з нормальним сперматогенезом (рис. 3-А), а в іншого щура поруч з патологічно незміненими сім'яними каналцями знаходився великий пласт деформованих, здавлених і спустошених каналців. У просвіті деяких з них виявлялися гігантські чи багатоядерні статеві клітини (рис. 3-В).

Поява гігантських багатоядерних клітин у зоні сперматоцитів першого порядку може бути пов'язана з «повільними» дегенеративними процесами в тестикулах. У разі інтенсивного відмирання гермінативного епітелію апоптотичні клітини дуже швидко фагоцитуються оточуючими клітинами Сертолі, що при-

зводить до видалення «доказів» клітинної смерті [15]. Більше шансів спостерігати їх існує у випадку повільних, неспецифічних дегенеративних процесів суміжних гермінативних клітин з тієї самої когорти, що утворюють багатоядерний синтицій, який більш повільно фагоцитуються клітинами Сертолі. Утворення таких синтицій відбувається внаслідок розриву цитоскелетних волокон, що підтримують взаємозв'язані цитоплазматичні містки [15].

Слід відмітити, що деструктивно змінені каналці розміщувалися по периферії сім'яника у вигляді напівмісяця. В одній з тварин гермінативний епітелій в сім'янику був повністю некротизований. Зберігалася тільки власна оболонка сім'яних каналців, яка була розпушена й слабо фарбувалася еозином у блідо-рожевий колір (рис. 3-В).

Гістохімічна реакція на нуклеїнові кислоти в патологічно незмінених сім'яних каналцях не відрізнялась від такої в контролі. Що стосується деструктивно змінених каналців, то реакція на ДНК і РНК була слабкою чи негативною. У більшості дослідних тварин цієї групи активність СДГ і ЛДГ суттєво не відрізнялась від такої в контролі. Тільки в двох тварин з шести активність ферментів була осередковано зменшеною.

У сім'яниках щурів, яким вводили комбінацію 2, в основному не виявлялися деструктивні зміни в статевих клітинах. Сім'яні каналці мали характерну будову й не відрізнялися від таких у контролі. В інтерстиціальній тканині не спостерігалось збільшення кількості сполучнотканинних волокон і клітинних елементів. Не виявляли

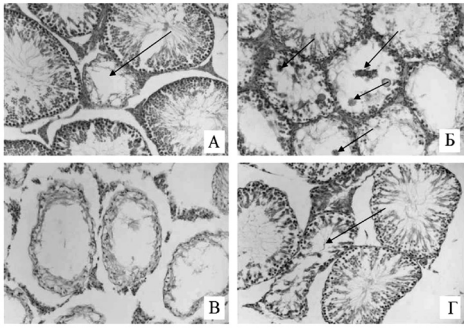


Рис. 3. Стан сперматогенного епітелію щурів Фарбування гематоксилином та еозином. Зб. х 200: А – осередкована деструкція сім'яного каналця щура після введення комбінації 1; Б – значна кількість дегенеративних, гігантських і багатоядерних клітин після введення комбінації 1; В – спустошення гермінативного епітелію та розпушення власної оболонки сім'яних каналців після введення комбінації 1; Г – деформація, дисконкомплексація та зменшення гермінативного епітелію в сім'яному каналці щура, якому вводили комбінацію 2.

також гемоциркуляторні порушення та запальну реакцію. Але слід відмітити, що в однієї тварини були виявлені поодинокі деформовані сім'яні каналці (рис. 3-Г). У таких каналцях спостерігали дисконкомплексацію сперматогенного епітелію та зменшення кількості статевих клітин.

Загалом, підсумовуючи дані гістологічних досліджень сім'яників, варто відзначити, що за умов введення щурам комбінації 2, де етамбутол було замінено на стрептоміцин, ступінь деструктивних змін у сперматогенному епітелію була меншою.

Висновки

1. Стрептоміцин за умов нарізного введення на відміну від етамбутолу не впливає на експресію мРНК CYP2E1 у сім'яниках щурів.
2. Заміна етамбутолу на стрептоміцин у комбінації ПТЛЗ не запобігає

повністю зростанню тестикулярної експресії гена CYP2E1, ймовірно, внаслідок наявності ізоніазиду.

3. За умов заміни етамбутолу на стрептоміцин у комбінації ПТЛЗ відбувається покращання морфологічного стану сім'яників.
4. CYP2E1 може бути залучений до неспецифічних патогенетичних механізмів розвитку чоловічої неплідності внаслідок порушення сперматогенезу. На користь цього свідчить висока негативна кореляція між рівнем експресії гена CYP2E1 у гонадах щурів і кількістю сперматозоїдів за введення комбінації 1.

Вдячність. Автор виражає вдячність А. В. Матвієнко та І. С. Блажчук за проведення гістоморфологічних досліджень сперматогенного епітелію та підрахунок сперматозоїдів.

1. Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України. 2015 рік; за ред. Шафранського В. В.; МОЗ України, ДУ «УІСД МОЗ України». – Київ, 2016. – 452 с.
2. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: updated meta-analysis / A.Y. Coban, A. Deveci, A. T. Sunter [et al.] // International journal of mycobacteriology. – 2014. – V. 3 (4). – P. 230–241.
3. Senousy B. E. Hepatotoxic effects of therapies for tuberculosis / B. E. Senousy, S. I. Belal, P. V. Draganov // Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. – 2010. – № 7. – P. 543–556.
4. Shayakhmetova G. M. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide / G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, V. M. Kovalenko // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V. 5, № 1. – P. 9–14.
5. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках щурів та стан їх сперматогенного епітелію / Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, А. В. Матвієнко, В. М. Коваленко // Одеський медичний журнал. – 2012. – № 4. – С. 11–14.
6. Jochi J. M. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics / J. M. Jochi // Lung India : Official Organ of Indian Chest Society. – 2011. – V. 28 (3). – P. 193–200.
7. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
8. Boekelheide K. Male reproductive toxicology / K. Boekelheide, R. Chapin // In Current Protocols in Toxicology, Maines MD eds, JohnWiley&Sonsl nc, NewYork, pp. 16.0.1–16.0.2, 2005.

9. Chitra K. C. Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study / K. C. Chitra, K. Ramachandra Rao, P. P. Mathur // Asian. J. Androl. – 2003. – № 5. – P. 203–208.
10. Lankford S. M. Cloning of canine cytochrome P450 2E1 cDNA: identification and characterization of two variant alleles / S. M. Lankford, S. A. Bai, J. A. Goldstein // Drug. Metab. Dispos. – 2000. – V. 28, № 8. – P. 981–986.
11. Падалко В. И. Клинические аспекты функционирования системы цитохрома P-450 микросом печени // В. И. Падалко, Т. В. Севастьянова // Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия «Медицина». – 2005. – № 11 (705). – С. 105–117.
12. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid / K. S. Park, D. H. Sohn, R. L. Veech, B. J. Song // Eur. J. Pharmacol. – 1993. – V. 248, № 1. – P. 7–14.
13. Lieber C. S. CYP2E1: From ASH to NASH / C. S. Lieber // Hepatology research. – 2004. – T. 28, № 1. – С. 1–11.
14. Bonde J. P. Occupational causes of male infertility / J. P. Bonde // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. – 2013. – V. 20, № 3. – P. 234–239.
15. Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity / L. L. Lanning, D. M. Creasy, R. E. Chapin [et al.] // Toxicologic Pathology. – 2002. – 30. – P. 507–520.

Г. М. Шаяхметова

Порівняльна оцінка впливу протитуберкульозних лікарських засобів на експресію CYP2E1 і стан сперматогенного епітелію за умов введення щурам-самцям у двох комбінаціях, що містять етамбутол або стрептоміцин

Мета дослідження – порівняльна оцінка стану сперматогенного епітелію щурів і тестикулярної експресії гена CYP2E1 за сумісного введення протитуберкульозних засобів у двох комбінаціях, що містять ізоніазид, піразинамід, рифампіцин, а також етамбутол або стрептоміцин (комбінація 1 і 2 відповідно).

Було виявлено, що стрептоміцин за окремого введення, на відміну від етамбутолу, не впливав на експресію мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів. Заміна етамбутолу на стрептоміцин у комбінації протитуберкульозних засобів не запобігала повністю підвищенню тестикулярної експресії гена CYP2E1, ймовірно, унаслідок наявності ізоніазиду. У той самий час заміна етамбутолу на стрептоміцин сприяла поліпшенню морфологічного стану сім'яників. Зокрема, результати мікроскопічного дослідження епідидимальної суспензії свідчать про зниження продукції сперматозоїдів сім'яниками на 68 % за введення комбінації 1 порівняно з тваринами контрольної групи і відсутність негативних змін за введення комбінації 2. Ми припускаємо, що CYP2E1 може брати участь у неспецифічних патогенетичних механізмах розвитку чоловічого безпліддя внаслідок порушення сперматогенезу в результаті підвищеного утворення активних форм кисню. Виявлено наявність сильної негативної кореляції між кількістю сперматозоїдів і рівнем експресії гена CYP2E1 у сім'яниках щурів, які отримували комбінацію 1 ($r = -0,87$; $P = 0,001$). У гонадах тварин даної групи також зафіксовані різні морфологічні зміни сперматогенного епітелію: структурно змінені сім'яні каналці, наявність гігантських багатоядерних клітин у зоні сперматоцитів першого порядку, некротизований сперматогенний епітелій. У сім'яниках щурів, яким вводили комбінацію 2, в основному, не відзначалося морфологічних аномалій.

Таким чином, за сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину заміна етамбутолу на стрептоміцин сприяла зменшенню побічної дії протитуберкульозних препаратів на сім'яники.

Ключові слова: протитуберкульозні засоби, CYP2E1, сім'яники

А. М. Шаяхметова

Сравнительная оценка влияния противотуберкулезных лекарственных средств на экспрессию CYP2E1 и состояние сперматогенного эпителия при введении крысам-самцам в двух комбинациях, содержащих этамбутол или стрептомицин

Цель исследования – сравнительная оценка состояния сперматогенного эпителия крыс и тестикулярной экспрессии гена CYP2E1 при совместном введении противотуберкулезных средств в двух комбинациях, содержащих изониазид, пиразинамид, рифампицин, а также этамбутол или стрептомицин (комбинация 1 и 2 соответственно).

Было обнаружено, что стрептомицин при отдельном введении, в отличие от этамбутола, не влиял на экспрессию мРНК CYP2E1 в семенниках крыс. Замена этамбутола стрептомицином в комбинации противотуберкулезных средств не предотвращала полностью повышение тестикулярной экспрессии гена CYP2E1, вероятно вследствие наличия изониазида. В то же время замена этамбутола стрептомицином способствовала улучшению морфологического состояния семенников. В частности, результаты микроскопического исследования эпидидимальной суспензии свидетельствуют о снижении продукции сперматозоидов семенниками на 68 % при введении комбинации 1 по сравнению с животными контрольной группы и отсутствием отрицательных изменений при

введении комбинации 2. Мы предполагаем, что CYP2E1 может участвовать в неспецифических патогенетических механизмах развития мужского бесплодия из-за нарушения сперматогенеза вследствие повышенного образования активных форм кислорода. Выявлено наличие сильной отрицательной корреляции между количеством сперматозоидов и уровнем экспрессии гена CYP2E1 в семенниках крыс, получавших комбинацию 1 ($r = -0,87$; $P = 0,001$). В гонадах животных данной группы зафиксированы различные морфологические изменения сперматогенного эпителия: деструктивно измененные семенные каналцы, наличие гигантских многоядерных клеток в зоне сперматоцитов первого порядка, некротизированный сперматогенный эпителий. В семенниках крыс, которым вводили комбинацию 2, в основном, не отмечалось морфологических аномалий.

Таким образом, при совместном введении этамбутола, изониазида, пиразинамида и рифампицина замена этамбутола на стрептомицин способствовала снижению побочного действия противотуберкулезных препаратов на семенники.

Ключевые слова: противотуберкулезные средства, CYP2E1, семенники

G. M. Shayakhmetova

Comparative evaluation of the effect of antituberculosis drugs on CYP2E1 expression and state of spermatogenic epithelium when administered to male rats in two combinations containing ethambutol or streptomycin

All patients in countries where resistant forms of *M. tuberculosis* are detecting with high frequency receive as primary anti-tuberculosis therapy combination of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide, with at least one additional drug (ethambutol and/or streptomycin). Almost all antituberculosis drugs of the first line have side effects that vary in severity depending on the drug and regimen. In addition, all regimens for active tuberculosis treatment include a combination of drugs that are usually administered for at least 6 months. Mechanisms of antituberculosis drugs interaction are rather complicated. In the structure of tuberculosis pathology children and adults of reproductive age occupy not the last place, but data on the effects of antituberculosis drugs (including their combinations) on male gonads are not sufficient.

The aim of the study was comparative evaluation of spermatogenic epithelium state and testicular expression of CYP2E1 gene in rats under administration of two antituberculosis drugs combinations containing isoniazid, pyrazinamide, rifampicin, and ethambutol or streptomycin (combination 1 and 2, respectively).

Antituberculosis drugs were given in DOTs (directly observed treatment, short-course) regimen at maximal doses used in clinic: ethambutol – 155 mg/kg b.w./day or streptomycin 14 mg/kg b.w./day, rifampicin – 74,4 mg/kg b.w./day, isoniazid – 62 mg/kg b.w./day, and pyrazinamide – 217 mg/kg b.w./day for 60 days (duration of spermatogenesis process and time of germ cell maturation in epididymis). Streptomycin was administered intramuscularly in 0,5 % novocaine solution. The other substances were suspended in 1 % starch gel and administered intragastrically by gavage, and in this case the coefficient for conversion of human doses to animal equivalent doses based on body surface area was taken into account. The control group received only starch gel in corresponding volumes.

It has been found that streptomycin, when administered alone, unlike ethambutol, did not affect the expression of CYP2E1 mRNA in rats' testes. The replacement of ethambutol by streptomycin in a combination of anti-tuberculosis drugs did not completely prevent increase in testicular expression of CYP2E1 gene, probably due to the presence of isoniazid. At the same time, the replacement of ethambutol by streptomycin helped to improve the morphofunctional state of testes. Particularly, results of epididymal suspension microscopic examination suggest reduction in sperm production by 68 % under administration of combination 1 as compared to animals of control group and no negative changes under administration of combination 2. We suggest that CYP2E1 may be involved in nonspecific pathogenetic mechanisms of male infertility development due to spermatogenesis disruption as a result of reactive oxygen species generation increase. The correlation analysis revealed a strong negative correlation between the number of spermatozoa and level of CYP2E1 gene expression in testes of rats receiving combination 1 ($r = -0,87$, $P = 0,001$). In gonads of these animals various morphological changes in spermatogenic epithelium are fixed: destructively altered seminiferous tubules, the presence of giant multinucleate cells in zone of primary spermatocytes, necrotized spermatogenic epithelium. In testes of majority rats treated with combination 2, no morphological abnormalities were observed. But it should be noted that in single rat' testes we detected deformed seminiferous tubules. There were a dislocation of spermatogenic epithelium and decrease in the number of germ cells.

Thus, the replacement of ethambutol by streptomycin under co-administration with ethambutol, isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in rats contributed to reduction in antituberculosis drugs' side effects on testes.

Key words: antituberculosis drugs, CYP2E1, testes

Надійшла: 8 травня 2018 р.

Контактна особа: Шаяхметова Г. М., кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник, відділ загальної токсикології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 67 949 45 30.
Електронна пошта: anna_shayakhmetova@yahoo.com