

Павлюковец А. Ю., Шейбак В. М., Жмакин А. И.

**ИММУНОСУПРЕССИЯ И МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ
В ТИМУСЕ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ
ЦИКЛОФОСФАМИДА**

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Циклофосфамид представляет собой пролекарство, требующее для превращения в активный 4-гидроксициклофосфамид окисления в печени системой CYP450 микросом. Вслед за этим происходит спонтанное обратимое образование альдофосфамида в крови, а затем реакция с образованием фосфорамидиприта — активной алкилирующей формы препарата. Помимо клеток печени, эта реакция протекает в клетках крови и клетках

опухоли. Метаболиты циклофосфамида (акролеин) обладают способностью вступать в реакции с транспортными, мембранными и цитоплазматическими белками, что изменяет активность мембранных транспортеров, вызывая более широкие изменения в метаболизме отдельных клеток и тканей, модулируя доступность нутриентов и энергетических субстратов [1]. Кроме того, повреждающее действие циклофосфамида реализуется путем инициации оксидативного стресса, вызывающего нарушение структуры ДНК [2]. Характерной реакцией на введение циклофосфамида является атрофия тимуса вследствие апоптоза тимоцитов. Изменения в клетках после введения циклофосфамида — главным образом окислительный стресс и повреждение генетического аппарата — должны приводить к изменению трансляции и тем самым — к изменению структуры фонда свободных аминокислот в клетках и тканях [3].

Целью исследования явилось изучение фагоцитарной активности нейтрофилов, структуры клеточного фонда аминокислот и гистологического строения тимуса после курсового введения циклофосфамида и динамика изменений данных показателей на протяжении 8 суток после его отмены.

Материалы и методы

В работе использованы 28 крыс-самцов массой 110–120 г. Циклофосфамид вводили в общей дозе 160 мг/кг массы (по 40 мг/кг массы 4 раза с интервалом 48 ч внутрибрюшинно). Крыс декапитировали через 24 ч после последнего введения препарата, а также на 14-е и 18-е сутки эксперимента. Для исследования брали кровь и ткань тимуса. Определение свободных аминокислот в ткани тимуса производили методом обращеннофазной ВЭЖХ, с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой, с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Кусочки органов для морфологического исследования фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином. В крови крыс было подсчитано общее количество лейкоцитов (в камере Горяева), подсчет лейкоцитарной формулы проводили в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что после курсового введения циклофосфамида через 24 ч общее количество лейкоцитов в крови животных снижается на 79 %, а в последующем после отмены цитостатика увеличивается, и на 8-е сутки регистрируется снижение количества лейкоцитов на 41 %. При этом наблюдалось перераспределение соотношений разных классов лейкоцитов в лейкоцитарной формуле. Так, если через 24ч после последнего введения цитостатика было увеличено относительное количество сегментоядерных нейтрофилов (в 2,3 раза), эозинофилов (в 3,2 раза) и снижено на 36 % количество лимфоцитов, то на 4-е сутки относительное количество сегментоядерных нейтрофилов еще больше увеличивалось (в 2,7 раза), сохранялось

снижение количества эозинофилов (на 50 %) и лимфоцитов (на 47 %). Несмотря на то, что на 8-е сутки общее количество лейкоцитов было существенно выше, сохранялись изменения в лейкоцитарной формуле: повышалось относительное количество сегментоядерных нейтрофилов (в 3,2 раза), уменьшалось количество лимфоцитов (на 57 %) и практически исчезали эозинофилы. Курсовое введение циклофосфамида изменяло функциональную активность нейтрофилов. В частности, через 24 ч фагоцитарный индекс снижался на 29 %. Однако следует отметить, что в последующем фагоцитарная активность быстро нормализовалась.

В ткани тимуса под действием циклофосфамида развивался выраженный метаболический дисбаланс. Так, через 24 ч после последнего введения циклофосфамида было снижено общее количество свободных аминокислот и их производных (с 37117 ± 831 до 27790 ± 824 нмоль/г, $p < 0,05$), сумма протеиногенных аминокислот (с 22874 ± 668 до 16983 ± 528 нмоль/г, $p < 0,05$), общее количество заменимых (с 20727 ± 651 до 14544 ± 404 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот (с 4373 ± 118 до 3520 ± 306 нмоль/г, $p < 0,05$), общее содержание производных аминокислот (с 14258 ± 229 до 10837 ± 835 нмоль/г, $p < 0,05$), сумма серосодержащих аминокислот (с 11498 ± 211 до 9180 ± 822 нмоль/г, $p < 0,05$). На 4-е сутки в ткани тимуса животных, получавших циклофосфамид, сохранялось снижение общего количества свободных аминокислот и их производных (23491 ± 2059 нмоль/г, $p < 0,05$), общее содержание протеиногенных аминокислот (14332 ± 1416 нмоль/г, $p < 0,05$), заменимых (12414 ± 1234 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот ($3038,7 \pm 326,18$ нмоль/г, $p < 0,05$), сумма производных аминокислот (с 14258 ± 229 до 9181 ± 782 нмоль/г, $p < 0,05$) и серосодержащих аминокислот (7741 ± 5711 нмоль/г, $p < 0,05$). На 8-е сутки после отмены цитостатика в ткани тимуса продолжало оставаться сниженным общее количество свободных аминокислот и их производных (29360 ± 1520 нмоль/г, $p < 0,05$), общее содержание протеиногенных аминокислот (17026 ± 1024 нмоль/г, $p < 0,05$), заменимых (15032 ± 1062 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот (3240 ± 140 нмоль/г, $p < 0,05$), суммы производных аминокислот (12355 ± 872 нмоль/г, $p < 0,05$). Следует отметить, что введение циклофосфамида существенно повышало в ткани тимуса концентрацию триптофана во все изучаемые сроки (в 1,5 раза), ключевой аминокислоты, контролирующей пролиферативные процессы клеток иммунной системы, вероятно, вследствие ингибирования ключевого фермента его метаболизма в клетках иммунной системы — индолциклооксигеназы.

Одновременно в тимусе животных, которым вводили циклофосфамид, наблюдалась дезорганизация структуры, отсутствовала четкая граница между корковым и мозговым веществом. Во все изучаемые сроки после отмены цитостатика сохранялось увеличенным число макрофагов, размер

ретикулярных клеток. Через 24 ч после последнего введения циклофосфамида отмечали инверсию окрашивания коркового и мозгового вещества за счет большего уменьшения плотности лимфоцитов в корковом веществе. На 4-е и 8-е сутки после отмены циклофосфамида плотность лимфоцитов в корковом и мозговом веществе становится практически одинаковой, что приводит к отсутствию видимой границы. На протяжении всего периода эксперимента в ткани тимуса регистрируются лимфоциты с гиперконденсированным хроматином (возможно, это апоптотические тельца).

Выводы

Таким образом, введение циклофосфамида снижает общее количество лейкоцитов в крови и изменяет соотношение различных классов лейкоцитов в лейкоцитарной формуле, сохраняющееся на протяжении 8 суток. Однако фагоцитарная активность, сниженная после введения цитостатика, восстанавливалась уже на 4-е сутки после его отмены. В ткани тимуса введение циклофосфамида приводило к метаболическому (аминокислотному) дисбалансу и структурной дезорганизации ткани, сохраняющейся на протяжении 8 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide* / Y. Motoyoshi [et al.] // *Oncol Rep.* 2006. Vol. 16, № 1. P. 141–146.
2. *Cyclophosphamide induced apoptosis in COV434 human granulose cells involves oxidative stress and glutathione depletion* / M. Tsai-Turton [et al.] // *Toxicol. Sci.* 2007. Vol. 98. P. 216–230.
3. *Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus* / S. M. Singh [et al.] // *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2007. Vol. 29. P. 17–30.

Pauliukovets A. Y., Sheibak V. M., Zhmakin A. I.

Immunosuppression and amino acid metabolism in the thymus after a course administration of cyclophosphamide

Administration of cyclophosphamide to rats reduces the total number of leukocytes in the blood and alters the balance of the different classes of leukocytes in the leukocyte formula. Administration of cyclophosphamide led to amino acid imbalance (reduction in the content of free amino acids) and the structural disorganization of tissue keeping 8 days in the thymus tissue.