Оригинальная статья
УДК 616.155.3-007.1-615.076.9
https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-01-01

Характеристика модели циклофосфамидиндуцированной иммуносупрессии у мышей линии Balb/c

Н.Л. Полюга[1*], К.Л. Крышень[1], Я.Г. Муразов[1], Е.И. Трофимец[1], Я.А. Гущин[1], П.П. Бельтюков[2], Н.В. Скворцов[2]

[1] АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Россия
[2] Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России, Ленинградская обл., Россия

** E-mail: polyuga.nl@doclinika.ru*

Резюме. Химиотерапия (ХТ) остается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. Однако применение ряда химиотерапевтических агентов ассоциировано с развитием значимых побочных эффектов, связанных с цитотоксическим действием препаратов на клетки иммунной системы. Для профилактики жизнеугрожающих состояний, связанных с иммуносупрессивным действием ХТ, предложен ряд средств сопроводительной и поддерживающей терапии. Предпринимаются многочисленные попытки поиска иммуномодулирующих агентов, способных снизить выраженность иммунотоксических эффектов ХТ у онкологических больных. Для доклинической оценки фармакологической активности данных препаратов используются подходы, моделирующие состояния, наблюдаемые в клинической практике. Цель работы — охарактеризовать модель иммуносупрессии у мышей линии Balb/c, индуцированной высокой дозой циклофосфамида. Исследование выполнено на мышах-самцах линии Balb/c в возрасте 5–7 нед. Сформировано 2 группы животных: 1-я (контрольная) группа (n=21) получала носитель — 0,9% раствор натрия хлорида, внутрибрюшинно, однократно; 2-я (экспериментальная) группа (n=21) — циклофосфамид, доза 150 мг/кг, внутрибрюшинно, однократно. После введения циклофосфамида по 7 животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 5, 11 и 18-й день. На некропсии осуществляли забор и взвешивание тимуса и селезенки для оценки массовых коэффициентов и гистологического анализа. Во время эвтаназии у мышей отбирали кровь для подсчета общего количества лимфоцитов, анализа их субпопуляционного состава с помощью проточной цитометрии и определения уровня IgG методом иммуноферментного анализа. Однократное введение циклофосфамида в высокой дозе приводило не только к дистрофическим изменениям тимуса и селезенки, а также к транзиторным, при этом изменялись изученные показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета животных, включая динамику общего количества лимфоцитов, их субпопуляционный состав (Т- и В-лимфоциты, CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты), уровень IgG. Максимальные изменения параметров регистрировали на 5-й день исследования с постепенным восстановлением к 18-му. Предложенная модель циклофосфамидиндуцированной иммуносупрессии может применяться в доклинических исследованиях эффективности перспективных средств профилактики и лечения иммунодефицитных состояний различного генеза.

Ключевые слова: циклофосфамид, иммунодефицит, мыши Balb/c, В-лимфоциты, Т-лимфоциты

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Полюга Н.Л., Крышень К.Л., Муразов Я.Г., Трофимец Е.И., Гущин Я.А., Бельтюков П.П., Скворцов Н.В. Характеристика модели циклофосфамидиндуцированной иммуносупрессии у мышей линии Balb/c. Лабораторные животные для научных исследований. 2023; 1. 4–13. https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-01-01.

© Полюга Н.Л., Крышень К.Л., Муразов Я.Г., Трофимец Е.И., Гущин Я.А., Бельтюков П.П., Скворцов Н.В., 2022

Original article

Characteristics of the cyclophosphamide-induced immunosuppression model in Balb/c mice

N.L. Polyuga[1*], K.L. Kryshen[1], Ya.G. Murazov[1], E.I. Trofimets[1], Ya.A. Guschin[1], P.P. Beltyukov[2], N.V. Skovrtsov[2]

[1] Research and manufacturing company "Home of Pharmacy", Leningrad oblast, Russia
[2] Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad oblast, Russia

**E-mail: polyuga.nl@doclinika.ru*

Abstract. Chemotherapy (CT) remains one of the main treatment options of malignant neoplasms. However, the use of some chemotherapeutic agents is associated with the development of significant side effects related to the cell toxic effects of drugs on immune cells. For the prevention of life-threatening conditions associated with the immunosuppressive effect of CT, a number of accompanying and maintenance therapies have been proposed. Numerous attempts are being made to search for immunomodulatory agents that can reduce the severity of immunotoxic adverse effects of CT in patients with cancer. For the non-clinical evaluation of the pharmacological activity of these agents, several methods are used to simulate conditions observed in clinical practice. The aim of the present study is to characterize the model of immunosuppression in Balb/c mice induced by a high dose of cyclophosphamide. The study was carried out on Balb/c male mice aged 5–7 weeks. The animals were divided in two groups: 1) control group (*n*=21) — vehicle, normal saline, single intraperitoneal (ip) injection; 2) experimental group (*n*=21) — cyclophosphamide, 150 mg/kg, single ip injection. After administration of cyclophosphamide, the animals were sacrificed on day 5, 11 and 18 for 7 animals at each time point. On necropsy, the thymus and spleen were harvested and weighed to assess mass coefficients and histological analysis. During euthanasia, blood samples were taken to count the total number of lymphocytes, analyze their subpopulation by flow cytometry, and determine the IgG level by enzyme immunoassay. The single administration of high-dose cyclophosphamide caused dystrophic changes in the thymus and spleen, as well as temporary changes in the parameters of cellular and humoral immunity of animals, including the dynamics of changes in the total number of lymphocytes, their subpopulation composition (T- and B-lymphocytes, CD4+ and CD8+ T-lymphocytes), the IgG level. The maximum changes in investigated parameters were recorded on day 5 with a gradual recovery by the day 18. The proposed model of cyclophosphamide-mediated immunosuppression can be used in non-clinical studies on the effectiveness of promising drugs in the prevention and treatment of various types of immunodeficiency disorders.

Keywords: cyclophosphamide, immunodeficiency, Balb/c mice, B-lymphocytes, T-lymphocytes

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

For citation: Polyuga N.L., Kryshen K.L., Murazov Ya.G., Trofimets E.I., Guschin Ya.A., Beltyukov P.P., Skovrtsov N.V. Characteristics of the cyclophosphamide-induced immunosuppression model in Balb/c mice. Laboratory Animals for Science. 2023; 1. 4–13. https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-01-01.

Введение

В мире и в Российской Федерации наблюдается неуклонный рост заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований (ЗНО), в том числе среди трудоспособного населения [1, 2]. Несмотря на значительный успех, достигнутый в области разработки и внедрения новых опций лекарственного лечения ЗНО (таргетная, иммунотерапия), химиотерапия (ХТ) и по сей день остается важной составляющей терапии (лечения) рака [3]. Циклофосфамид является алкилирующим агентом, производным азотистого иприта и уже более 60 лет применяется в лечении солидных опухолей и лимфопролиферативных заболеваний. Помимо антимитотической и антипролиферативной активности, в высоких дозах циклофосфамид дает выраженный иммуносупрессивный эффект. Следует отметить, что влияние циклофосфамида на иммунную систему многообразно и зависит от вводимой дозы препарата (рис. 1).

Введение циклофосфамида в высоких дозах приводит к неспецифическому снижению количества Т-клеток. Однако в низких дозах циклофосфамид оказывает действие на различные субпопуляции Т-лимфоцитов: происходит избирательное снижение количества регуляторных Т-клеток (Трег) и ингибирование их супрессивной функции; переключение секреции цитокинов с Тх2 на Тх1; повышение количества и активности Тх17-клеток памяти и цитотоксических CD8+ Т-клеток.

Наличие у данного препарата иммуносупрессивных эффектов обусловило его применение в клинике для лечения аутоиммунных заболеваний и хронической реакции трансплантат против хозяина у реципиентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [4]. Следует отметить, что иммуносупрессия является не только значимым нежелательным явлением, которое развивается на фоне ХТ (в том числе циклофосфамидом), она также может воз-

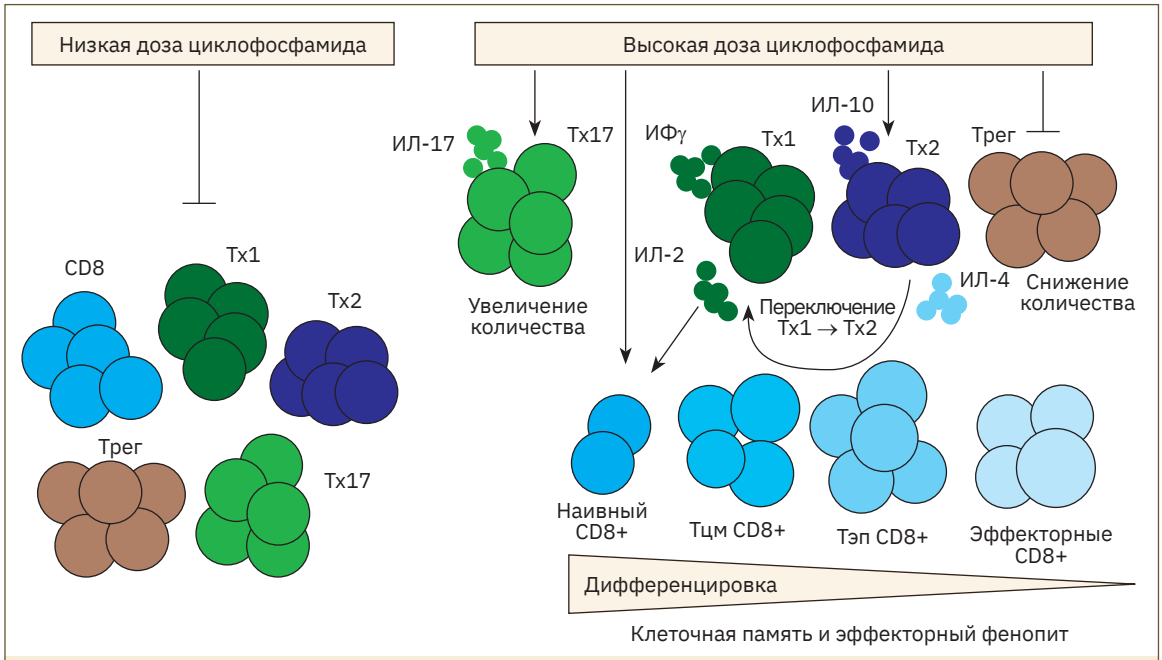

Рис. 1. *Иммуномодулирующее действие циклофосфамида на Т-клеточный иммунитет [4]: ИЛ — интерлейкин; ИФγ — интерферон гамма; Трег — регуляторные Т-клетки; Тх — Т-хелперы; Тцм — Т-клетки центральной памяти; Тэп — эффекторные Т-клетки памяти. По Abu Eid R. и соавт. [4] с изменениями*

никать при инфекционных заболеваниях, например, при коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Установлено, что общее количество Т-клеток, CD4+ и CD8+ Т-клеток было резко снижено у пациентов с COVID-19, особенно у лиц, нуждающихся в интенсивной терапии [5].

Основным видом токсичности, лимитирующим применение циклофосфамида, является угнетение гемопоэза. На фоне терапии циклофосфамидом наблюдается снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов с последующим относительно быстрым их восстановлением [6]. Иммунодефицитные состояния, вызванные циклофосфамидом, повышают частоту вторичных инфекций и смертность онкологических больных, что также ограничивает применение этого препарата в онкологической практике. В последние годы предпринимаются многочисленные попытки создания иммуномодулирующих агентов синтетического и природного происхождения, которые способны снизить выраженность гематологических побочных эффектов цитостатиков и оказывать благоприятное действие на иммунитет пациентов, получающих ХТ. Для поиска таких средств широко используется модель фармакологически индуцированной иммуносупрессии циклофосфамидом у мышей [7–11]. Данная модель также применяется при изучении противоопухолевых средств в случае трансплантации животным ксенографтов опухолей человека как альтернатива иммунодефицитным мышам, которые требуют особых условий содержания, дорого стоят и демонстрируют высокую смертность [12]. Иммуносупрессия, вызванная введением циклофосфамида, применяется при экспериментальном моделировании грибковых инфекций у мышей для ослабления иммунного ответа к возбудителям человеческих микозов, вызванных грибами рода *Candida* [13].

Несмотря на большое число публикаций, посвященных фармакологической индукции иммуносупрессии циклофосфамидом, в настоящее время отсутствует единый протокол для воспроизведения этой модели. Доза введения циклофосфамида значимо различается и составляет от 50 до 200 мг/кг. Кроме того, используются различные пути введения индуктора патологии — внутрибрюшинный, подкожный и внутривенный, схема введения может быть последовательной или интервальной, а кратность его введения — однократной или многократной.

Цель работы — характеристика модели иммуносупрессии у мышей линии Balb/c, вызванной однократным внутрибрюшинным введением раствора циклофосфамида в дозе 150 мг/кг, с оценкой показателей выраженности иммунотоксических эффектов в отношении иммунокомпетентных органов и субпопуляционного состава лимфоцитов крови животных.

Материал и методы

Животные

В исследовании использовали самцов мышей линии Balb/c в возрасте 5–7 нед (2 группы по 21 животному; *n*=42). Проведение эксперимента было одобрено биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Всех животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных,

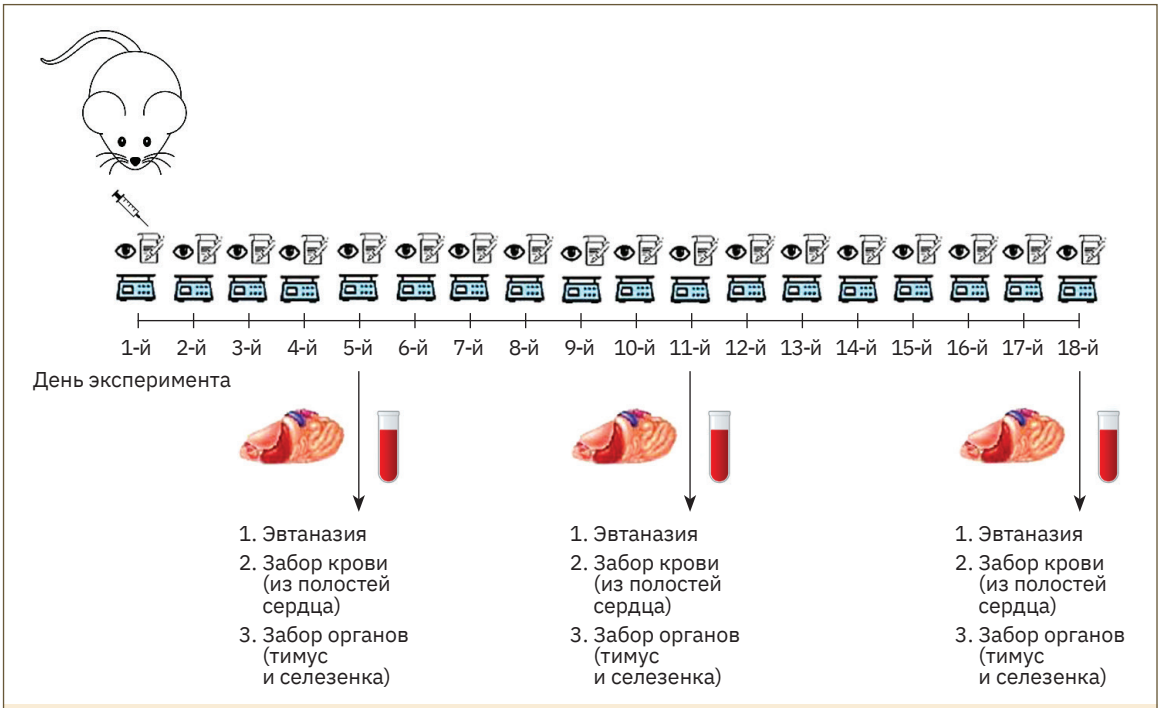

Рис. 2. *Дизайн эксперимента*

используемых в научных целях[1] и Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных[2]. Световой режим составлял 12 ч день и 12 ч темноты. Мыши получали полнорационный гранулированный комбикорм и питьевую воду *ad libitum*. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках по 7 особей.

Дизайн эксперимента

Индукцию иммуносупрессии у животных во 2-й (экспериментальной) группе выполняли путем внутрибрюшинного введения циклофосфамида (Sigma-Aldrich, США, серия MKCL254, CAS-Номер: 6055-19-2) на 1-й день эксперимента в дозе 150 мг/кг и объеме 20 мл/кг. Контрольной, 1-й группе животных вводили носитель (0,9% раствор натрия хлорида) в аналогичном объеме.

Ежедневно проводили клиническое наблюдение и оценку динамики массы тела животных. По окончании эксперимента по 7 мышей из каждой группы подвергали эвтаназии путем постепенного наполнения камеры CO_2 с последующим обескровливанием полостей сердца на 5, 11 и 18-й дни эксперимента.

При проведении эвтаназии у животных отбирали кровь из полостей сердца в 3 пробирки ЭДТА-К3 (Improve, Китай) объемом 0,2 мл для дальнейшей оценки общего количества лимфоцитов, анализа их субпопуляционного состава и определения уровня IgG. После эвтаназии у животных осуществляли отбор и взвешивание тимуса и селезенки для оценки массовых коэффициентов и гистологического анализа. Дизайн эксперимента представлен на рис. 2.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови проводили с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) и коммерчески доступного набора антител к CD19 (кат. номер №B324740, серия 115546), CD8 (кат. номер №B312598, серия 100722), CD3 (кат. номер №B321239, серия 100236), CD45 (кат. номер №B324364, серия 103116), CD4 (кат. номер №B336799, серия 100540) компании Biolegend (США). В образцах крови определяли следующие субпопуляции клеток: В- и Т-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-хелперы.

В образцах цельной крови регистрировали абсолютные значения количества лимфоцитов с помощью гематологического анализатора MYTHIC 18 (Orphee, Швейцария). Концентрацию IgG в плазме крови мышей определяли методом ИФА с помощью коммерчески доступного набора (MyBioSource, США, серия 25).

Тимус и селезенку фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч, после чего по общепринятой методике заливали в парафин [14]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином [15]. Анализ гистологических препаратов проводили при помощи светооптиче-

[1] Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях / пер. с англ. Под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой. Санкт-Петербург, 2012. 48 с. [Direktiva 2010/63/EU Yevropeyskogo Parlamenta i Soveta Yevropeyskogo Soyuza po okhrane zhivotnykh, ispol'zuyemykh v nauchnykh tselyakh / transl. from English. Ed. M.S. Krasilshchikova, I.V. Belozertseva. St. Petersburg, 2012. 48 p. (In Russ.)].

[2] Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е издание / пер. с англ. Под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. Москва: ИРБИС, 2017. 336 с. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispolsovaniyu laboratornykh zhivotnykh. Vos'moe izdanie / transl. from English. Ed. I.V. Belozercevoi, D.V. Blinova, M.S. Krasil'shikovoi. Moskva: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].

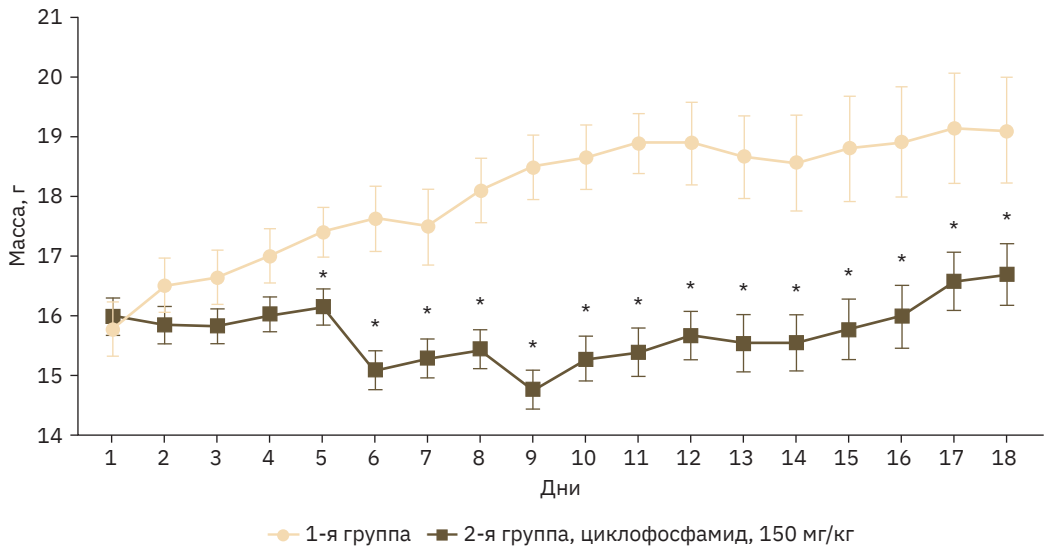

Рис. 3. *Динамика массы тела животных, M±SEM: * — t-тест, различия с контрольной группой статистически значимы, p<0,05*

ского микроскопа Accu-Scope 3000 SERIES (США) при увеличении 40, 100, 400 и 1000. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TOUPCAM UCMOS05100KPA (Китай) и программного обеспечения ToupView 3.7.7892 (Hangzhou ToupTek Photonics Co., Ltd., Китай).

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism, версия 9 (GraphPad, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и графиков квантиль-квантиль (QQ plot). Данные, имеющие нормальное распределение, представлены как *M±SEM*, где *M* — среднее арифметическое; *SEM* — стандартная ошибка среднего. В случае ненормального распределения результаты представлены в виде Me (Q1;Q3), где Me — медиана; Q1;Q3 — межквартильный размах. В зависимости от типа распределения данных применяли параметрические (*t*-критерий для парных сравнений) и непараметрические методы (критерий Манна–Уитни). Все критерии были двусторонними. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

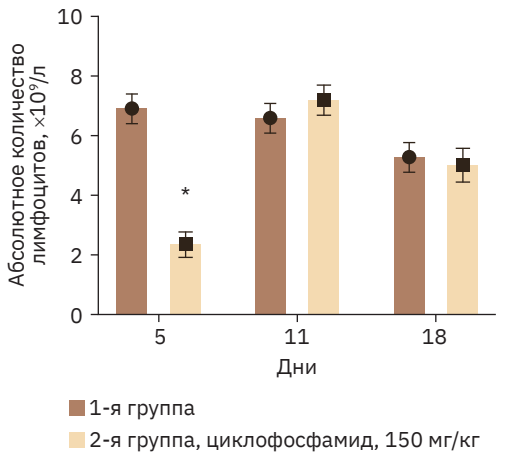

Рис. 4. *Абсолютное количество лимфоцитов, M±SEM: * — t-тест, различия с контрольной группой статистически значимы, p<0,05*

Результаты и обсуждение

Масса тела является интегральным показателем оценки общетоксического действия циклофосфамида. Начиная с 5-го дня эксперимента и вплоть до последней эвтаназии наблюдались статистически значимые различия в массе тела животных экспериментальной и контрольной групп (рис. 3). С 9-го дня эксперимента масса тела животных экспериментальной группы постепенно увеличивалась, что свидетельствовало о восстановлении функций физиологических систем и органов животных.

Известно, что помимо клинического применения циклофосфамид широко используется в экспериментальных исследованиях для индукции иммунодефицита у животных [11]. В проведенном исследовании наблюдали уменьшение абсолютного количества лимфоцитов на 5-й день с последующим увеличением к 11-му и повторным незначительным снижением к 18-му дню эксперимента (рис. 4).

Аналогично, в работе X.-H. Huyan и соавт. [16] у мышей, получавших циклофосфамид внутрибрюшинно в дозе 100–200 мг/кг, абсолютное количество лимфоцитов снижалось уже на 1-й день эксперимента и достигало минимума на 4-й, затем восстановилось на 10-й день и снова снижалось на 17-й.

Циклофосфамид оказывал действие на относительное содержание В-лимфоцитов (статистически значимое уменьшение на 5-й день эксперимента и тенденция к увеличению на 18-й), Т-лимфоцитов (увеличение доли, но без достижения статистической значимости на 5-й день и последующая тенденция к уменьшению на 11-й и 18-й дни эксперимента), CD4+ Т-хелперов (уве-

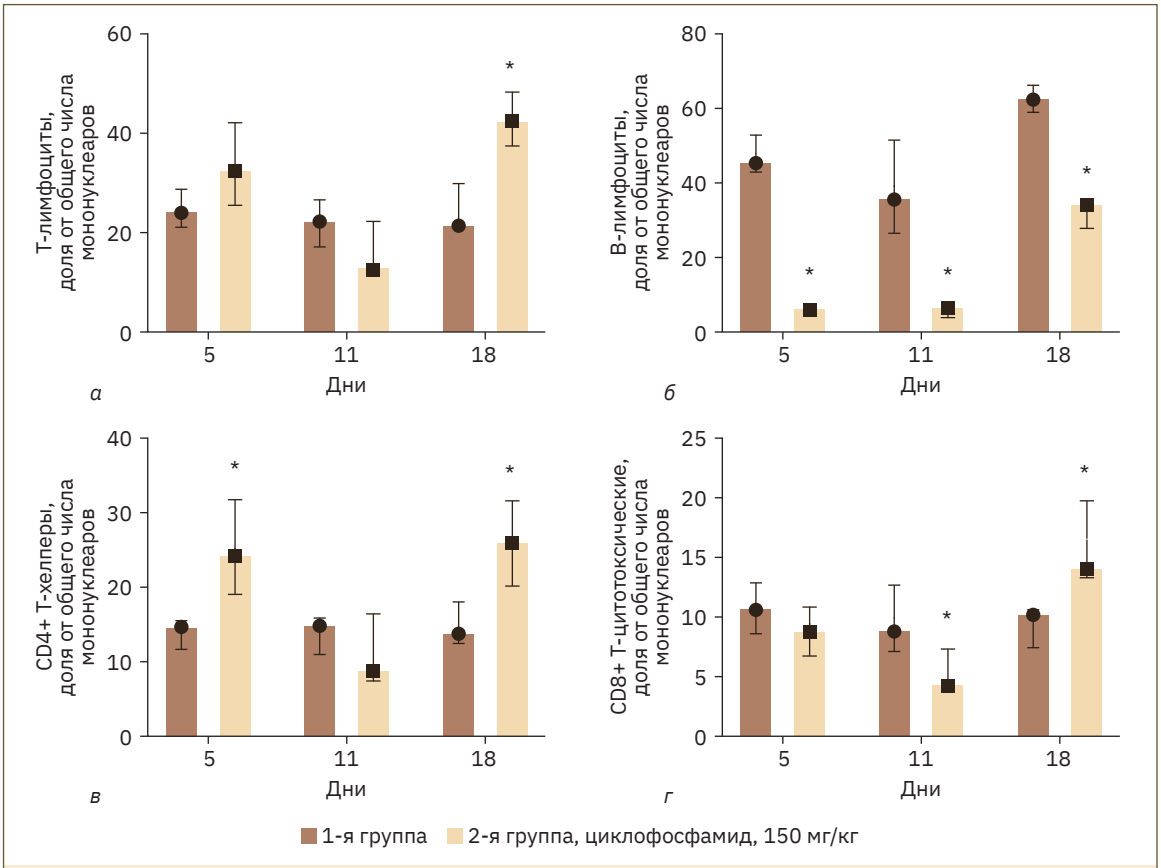

Рис. 5. *Субпопуляционный состав лимфоцитов животных: а — Т-лимфоциты; б — В-лимфоциты; в — CD4+ Т-хелперы; г — CD8+ Т-цитотоксические, доля от общего числа одиночных мононуклеаров, Me (Q1;Q3); * — критерий Манна–Уитни, различия с контрольной группой статистически значимы, p<0,05*

личение на 5-й день эксперимента, уменьшение на 11-й и повторное увеличение к 18-му дню эксперимента), наивных CD8+ Т-цитотоксических клеток (постепенное уменьшение к 11-му дню и увеличение на 18-й день эксперимента) (рис. 5).

В проведенном исследовании наиболее выраженный супрессорный эффект циклофосфамид оказал на В-лимфоциты, снижая их относительное содержание на 5-й и 11-й дни на 87% и 83% соответственно. И.Ф. Суфияров и соавт. [17] на модели циклофосфамидиндуцированной иммуносупрессии в разных дозах у мышей также установили, что циклофосфамид оказывает выраженное иммуносупрессивное действие с угнетением различных субпопуляций лимфоцитов в зависимости от дозы. Так, в малых дозах существенно снижались субпопуляции Т-лимфоцитов, а в больших дозах — преимущественно субпопуляции В-лимфоцитов.

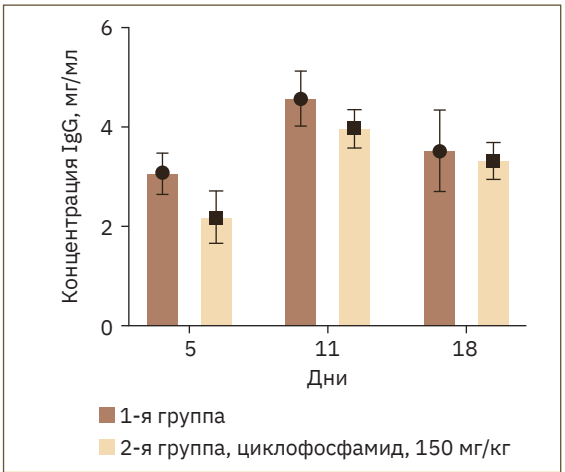

Рис. 6. *Концентрация IgG в плазме крови животных, M±SEM*

По сравнению с контрольной группой, в экспериментальной у животных наблюдался тренд к снижению концентрации специфических IgG на 29% на 5-й день эксперимента (рис. 6). На 11-й и 18-й дни эксперимента концентрация IgG восстанавливалась и коррелировала с восстановлением общего количества лимфоцитов и доли В-лимфоцитов, в частности (по результатам оценки субпопуляционного состава, см. рис. 4 и рис. 5).

При сравнении массовых коэффициентов тимуса установлено статистически значимое снижение данного показателя в экспериментальной группе животных, получавших циклофосфамид, на 5-й день эксперимента на 33% (рис. 7*а*) в сравнении с контрольной группой. На 11-й и 18-й дни различия с контрольной группой были статистически незначимы. Подобную динамику наблюдали и в работе A. Miyauchi и соавт. [18] на циклофосфамидиндуцированной модели иммуносупрессии у мышей Balb/c в дозе 200 мг/кг. У животных регистрировали статистически значимое сниже-

ние массового коэффициента тимуса на 2-й день, а уже к 7–14-му дню отмечали его восстановление.

Гистологический анализ тимуса животных после введения циклофосфамида в дозе 150 мг/кг на 5-й день исследования выявил преобладание коркового вещества, что свидетельствует о снижении количества Т-клеток в мозговом веществе. К 11-му дню отмечали значительную атрофию тимуса с нарушением архитектоники органа — присутствие дистрофичных и разрушенных клеток, наличие нейтрофильных гранулоцитов, замещение жировой тканью функциональных структур органа. К 18-му дню исследования наблюдали регенерацию ткани тимуса. У большинства животных практически полностью восстанавливалась тканевая структура. В работе A. Miyauchi и соавт. [18] изучали методом проточной цитометрии клеточный состав тимоцитов. На 2-й день исследования наблюдали значительное снижение (более чем в 2 раза) уровня CD4+CD8+ клеток и увеличение популяций CD4+ (Т-хелперов), CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов с постепенным восстановлением субпопуляционного состава к 14-му дню.

У животных, получавших циклофосфамид и подвергнутых эвтаназии на 5-й день, отмечалось статистически значимое снижение массового коэффициента селезенки на 40%, а на 11-й и 18-й дни, напротив, наблюдалось статистически значимое увеличение этого показателя по сравнению с контрольной группой (рис. 7*б*).

Аналогичную динамику изменения массового коэффициента селезенки наблюдали в работе Y. Wang и соавт. [19] при внутрибрюшинном введении циклофосфамида в дозе 300 мг/кг мышам линии Balb/c: на 3-й день отмечали снижение массовых коэффициентов, а к 7-му дню — увеличение. Авторы объясняют это как следствие развития компенсаторного экстрамедуллярного кроветворения, которое может играть существенную роль в восстановлении иммунитета после химиотерапии. С помощью метода проточной цитометрии авторы показали увеличение доли CD34+, CD117+ клеток-предшественников. В работе Z. Zhang и соавт. [20] статистически значимое снижение массового коэффициента селезенки наблюдали в течение 5 дней, на 7-й день после внутрибрюшинного введения циклофосфамида в дозе 40 мг/кг.

При гистопатологическом анализе ткани селезенки животных, получавших циклофосфамид в дозе 150 мг/кг, установили обеднение клеточного состава на 5-й день эксперимента (рис. 8*а*) и наличие участков экстрамедуллярного кроветворения на 11-й и 18-й дни (рис. 8*в*).

Таким образом, циклофосфамидиндуцированная иммуносупрессия у мышей характеризовалась снижением массы тела на протяжении всего эксперимента, тенденцией к снижению концентрации общего уровня IgG в плазме крови, достигающей максимума на 5-й день развития патологии, значительным снижением общего количества лим-

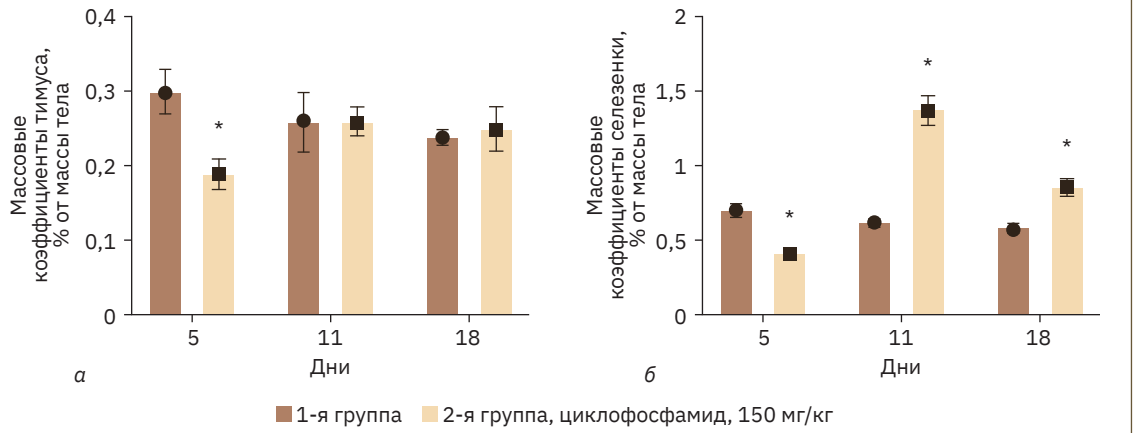

Рис. 7. *Массовые коэффициенты органов животных, M±SEM:*
*а — тимус; б — селезенка; * — t-тест, различия с контрольной группой статистически значимы, p<0,05*

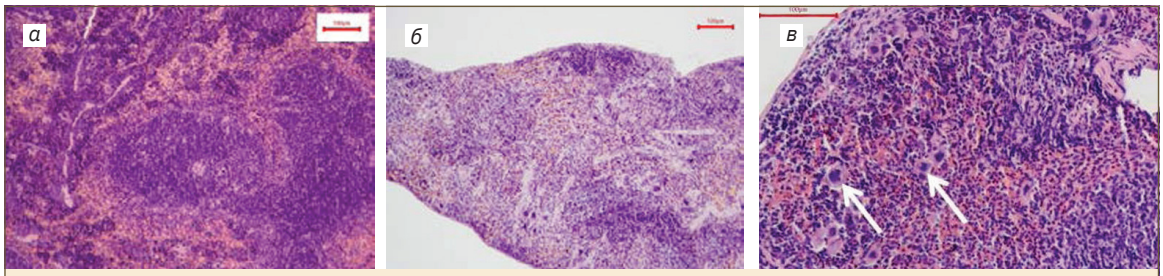

Рис. 8. *Репрезентативные фотографии микроскопической структуры селезенки мышей; окраска гематоксилином и эозином: а — вариант нормы (×100); б — циклофосфамид, 150 мг/кг, 5-й день, снижение клеточности (×100); в — циклофосфамид, 150 мг/кг, 11-й день (×100); стрелки — участки кроветворения (мегакариоциты)*

фоцитов на 5-й день с последующим постепенным восстановлением к 18-му дню, изменением субпопуляционного состава лимфоцитов крови в большей степени за счет снижения доли В-лимфоцитов на 5-й и 11-й дни, а также выраженным повреждением иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки) на 5-й день эксперимента. Наиболее яркие признаки иммуносупрессии на фоне однократного внутрибрюшинного введения циклофосфамида в дозе 150 мг/кг наблюдали на 5-й день эксперимента с последующим постепенным восстановлением иммунной системы к 18-му дню.

Заключение

Проведенное исследование дополняет сведения о модели иммуносупрессии у мышей линии Balb/c, индуцированной однократным внутрибрюшинным введением высокой дозы (150 мг/кг) циклофосфамида. Введение циклофосфамида привело к обратимым изменениям изученных показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета: общего числа лейкоцитов, субпопуляций лимфоцитов (Т- и В-лимфоцитов, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов), уровня IgG, дистрофических изменений тимуса и селезенки. Наиболее выраженные изменения указанных показателей регистрировали на 5-й день с постепенным восстановлением к 18-му дню после введения циклофосфамида. Снижение массового коэффициента селезенки было отмечено на 5-й день эксперимента с последующим его восстановлением к 11-му и 18-му дню. Наблюдаемые изменения селезенки свидетельствуют о развитии компенсаторного экстрамедуллярного кроветворения, что связано с восстановлением иммунитета. Предложенная модель циклофосфамидиндуцированной иммуносупрессии может применяться в доклинических исследованиях эффективности перспективных средств профилактики и лечения иммунодефицитных состояний различного генеза.

Список источников

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Zlokachestvennye novoobrazovanija v Rossii v 2020 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Moskva: MNIOI im. P.A. Herzen — branch FGBI "NERC" Ministry of health of Russia, 2021. (In Russ.)].
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021. Vol. 71. P. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Anand U., Dey A., Chandel AKS et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. Genes and Diseases. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.007.
4. Abu Eid R., Razavi GSE, Mkrtichyan M., Janik J., Khleif SN. Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed // Cancer Immunol Res. 2016. Vol. 4. P. 377–382. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0048.
5. Diao B., Wang C., Tan Y. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) // Front Immunol. 2020. Vol. 11. P. 827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
6. Feng L., Huang Q., Huang Z. et al. Optimized Animal Model of Cyclophosphamide-induced Bone Marrow Suppression // Basic Clin. Pharmacol Toxicol. 2016. Vol. 119. P. 428–435. DOI: 10.1111/bcpt.12600.
7. Wang S., Huang S., Ye Q. et al. Prevention of Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice with the Antimicrobial Peptide Sublancin // J. Immunol Res. 2018. Vol. 2018. P. 4353580. DOI: 10.1155/2018/4353580.
8. Yan H., Lu J., Wang J. et al. Prevention of Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice With Traditional Chinese Medicine Xuanfei Baidu Decoction // Front Pharmacol. 2021. Vol. 12. P. 730567. DOI: 10.3389/fphar.2021.730567.
9. Zhou X., Dong Q., Kan X. et al. Immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from Lonicera japonica in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide // PLoS One. 2018. Vol. 13. P. e0204152. DOI: 10.1371/journal.pone.0204152.
10. Yu J., Cong L., Wang C. et al. Immunomodulatory effect of Schisandra polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice // Exp. Ther. Med. 2018. Vol. 15. P. 4755–4762. DOI: 10.3892/etm.2018.6073.
11. Włodarczyk M., Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M. et al. Effect of Cyclophosphamide Treatment on Central and Effector Memory T Cells in Mice // Int. J. Toxicol. 2018. Vol. 37. P. 373–382. DOI: 10.1177/1091581818780128.
12. Jivrajani M., Shaikh MV., Shrivastava N., Nivsarkar M. An improved and versatile immunosuppression protocol for the development of tumor xenograft in mice // Anticancer Res. 2014. Vol. 34. P. 7177–7183.
13. Боровкова К.Е., Макарова М.Н., Никифорова Л.Р., Салмова Ю.В. Модели грибковых инфекций на животных // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. №3. DOI: 10.29296/2618723X-2021-03-05. [Borovkova K.E., Makarova M.N., Nikiforova L.R., Salmova J.V. Animal models of fungal infections // Laboratory Animals for Science. 2021. N. 3. (In Russ.)].
14. Гущин Я.А., Мужикян А.А. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. №3. С. 88–95. [Gushchin Ya., Muzhikyan A. Effect of Fixing Liquids on Microscopic Structure of Small Laboratory Animals // Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii=International Bulletin of Veterinary Medicine. 2014. N. 3. P. 88–95. (In Russ.)].
15. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гущин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. №2. С. 103–109. [Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushhin Ya.A. Osobennosti gistologicheskoy obrabotki organov i tkaney laboratornyh zhivotnyh // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii. 2014. N. 2. P. 103–109. (In Russ.)].
16. Huyan X-H, Lin Y-P, Gao T, Chen R-Y, Fan Y-M. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice // Int. Immunopharmacol. 2011. Vol. 11. P. 1293–1297. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.04.011.

17. Суфияров И.Ф., Латыпов Р.З., Сибиряк С.В., Шафиков Р.М. Влияние иммуносупрессии индуцированной циклофосфамидом на развитие послеоперационных брюшинных спаек // Медицинский вестник Башкортостана. Россия, Уфа: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2009. №4. С. 64–67. [Sufiyarov I.F., Latypov R.Z., Sibiryak S.V., Shafikov R.M. Vliyanie immunosupressii inducirovannoj ciklofosfamidom na razvitie posleoperacionny'x bryushinny'x spaek // Medicinskij vestnik Bashkortostana. Rossiya, Ufa: Federal'noe gosudarstvennoe byudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj medicinskij universitet" Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii. 2009. N. 4. P. 64–67. (In Russ.)].
18. Miyauchi A., Hiramine C., Tanaka S., Hojo K. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice: flow cytofluorometry analysis // Tohoku J. Exp. Med. 1990. Vol. 162. P. 147–167. DOI: 10.1620/tjem.162.147.
19. Wang Y., Meng Q., Qiao H., Jiang H., Sun X. Role of the spleen in cyclophosphamide-induced hematosuppression and extramedullary hematopoiesis in mice // Arch. Med. Res. 2009. Vol. 40. P. 249–255. DOI: 10.1016/j.arcmed.2009.04.003.
20. Zhang Z., Pan T., Liu C. et al. Cyclophosphamide induced physiological and biochemical changes in mice with an emphasis on sensitivity analysis // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021. Vol. 211. P. 111889. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111889.

Информация об авторах

Н.Л. Полюга[1], научный сотрудник отдела специфической токсикологии и микробиологии, polyuga.nl@doclinika.ru, https://orcid.org/0000-0002-8569-0535

К.Л. Крышень[1], кандидат биологических наук, руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии, https://orcid.org/0000-0003-1451-7716

Я.Г. Муразов[1], кандидат биологических наук, заместитель руководителя отдела специфической токсикологии и микробиологии, https://orcid.org/0000-0002-6573-3112

Е.И. Трофимец[1], заместитель руководителя отдела специфической токсикологии и микробиологии, https://orcid.org/0000-0003-3246-6457

Я.А. Гущин[1], руководитель отдела лабораторной диагностики, https://orcid.org/0000-0002-7656-991X

П.П. Бельтюков[2], кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии, https://orcid.org/0000-0003-4050-6172

Н.В. Скворцов[2], научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии, https://orcid.org/0000-0002-7953-7630

[1] АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволжский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245;

[2] Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93.

Information about the authors

N.L. Polyuga[1], Research Fellow, department of specific toxicology and microbiology, polyuga.nl@doclinika.ru, https://orcid.org/0000-0002-8569-0535

K.L. Kryshen[1], PhD, Head of the department of specific toxicology and microbiology, https://orcid.org/0000-0003-1451-7716

Ya.G. Murazov[1], PhD, Deputy head of the department of specific toxicology and microbiology, https://orcid.org/0000-0002-6573-3112

E.I. Trofimets[1], Deputy head of the department of specific toxicology and microbiology, https://orcid.org/0000-0003-3246-6457

Ya.A. Guschin[1], Head of the laboratory diagnostics department, https://orcid.org/0000-0002-7656-991X

P.P. Beltyukov[2], PhD, Associate professor, Leading researcher, laboratory of molecular toxicology and experimental therapy, https://orcid.org/0000-0003-4050-6172

N.V. Skovrtsov[2], Research Fellow, laboratory of molecular toxicology and experimental therapy, https://orcid.org/0000-0002-7953-7630

[1] Research and manufacturing company "Home of Pharmacy", 188663, Russia, Leningrad oblast, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Zavodskaya st. 3–245;

[2] Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, 188663, Russia, Leningrad oblast, Vsevolozhsky district, Kuzmolovsky settlement, Kapitolovo station, build. 93.

Вклад авторов в написание статьи

Н.Л. Полюга — концепция и дизайн, сбор и систематизация материала, написание текста статьи.

К.Л. Крышень — критический пересмотр, утверждение окончательного текста рукописи.

Я.Г. Муразов — статистический анализ, написание текста статьи.

Е.И. Трофимец — сбор и систематизация материала, работа с источниками литературы.

Я.А. Гущин — подготовка и гистологический анализ некропсийного материала.

П.П. Бельтюков — выполнение анализа методом проточной цитометрии.

Н.В. Скворцов — выполнение анализа методом проточной цитометрии.

Authors contribution

N.L. Polyuga — concept and design, data collection and systematization, writing the manuscript.

K.L. Kryshen — critical revision, approval of the final text of the manuscript.

Ya.G. Murazov — statistical analysis, writing the manuscript.

E.I. Trofimets — data collection and systematization, work with literary sources.

Ya.A. Guschin — processing and histopathological examination of necropsy material.

P.P. Beltyukov — analysis by flow cytometry.

N.V. Skovrtsov — analysis by flow cytometry.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Дата поступления рукописи в редакцию: 05.12.2022

Дата рецензии статьи: 19.01.2023

Дата принятия статьи к публикации: 23.01.2023

Received: 05.12.2022

Reviewed: 19.01.2023

Accepted for publication: 23.01.2023