

О.В. Кузьменко

Інститут медичної радіології
ім. С. П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків

Добові коливання мієлотоксичності циклофосфану

Circadian fluctuations of cyclophosphane
myelotoxicity

Цель работы: Экспериментальное обоснование наиболее толерантных режимов использования циклофосфана с учетом суточных ритмов ядерных клеток периферической крови.

Материалы и методы: Проведено две серии экспериментов на 40 белых беспородных крысах. Первая серия — изучение хронотоксического действия циклофосфана на лейкопоз на модели пролонгированной миелодепрессии в зависимости от времени суток его введения. Циклофосфан вводили на протяжении 4 дней в дозе 4 мг / 100 г массы тела в 12, 18, 24, 6 часов. Вторая серия — изучение (на протяжении 30 дней) степени миелодепрессии и темпов восстановления лейкопоза при введении циклофосфана однократно в дозе 16 мг/100 г массы тела в периоды минимальной и максимальной пролиферативной активности костного мозга.

Результаты: Показано хронотоксическое действие циклофосфана на лейкопоз крыс в зависимости от времени его введения. Лейкопения, полученная после введения циклофосфана, была менее выраженной на 3-и сутки при его введении в 18 ч, то есть в период минимальной пролиферативной активности костного мозга при стандартных условиях освещения. При увеличении почти в 4 раза дозы циклофосфана сохраняется толерантность лейкопоза при оптимальном времени его введения.

Выводы: Степень проявления токсичности циклофосфана на лейкопоз крыс изменяется в зависимости от времени суток его использования. Введение циклофосфана в вечернее время оказывает менее повреждающий эффект в отношении миелопоэза животных. Выбор оптимального времени введения циклофосфана позволяет увеличить его однократную дозу без повышения миєлотоксичного действия.

Ключевые слова: циклофосфан, циркадный ритм, миєлотоксичность.

Objective: To substantiate experimentally most tolerant regimens of cyclophosphane administration with consideration of circadian rhythms of peripheral blood nuclear cells.

Material and Methods: Two series of experiments were performed on 40 white mongrel rats. In the first series (the study of chronotoxic effect of cyclophosphane on leukoipoiesis on the model of prolonged myelodepression depending on the time of its administration), cyclophosphane was administered for 4 days at a dose of 4 mg per 100 g of the body mass at 12, 18, 24, and 6 o'clock. In the second series (30-day study) the degree of myelodepression and the rate of leukoipoiesis restoration at a single cyclophosphane administration at a dose of 16 mg per 100 g of the body mass in the periods of minimum and maximum proliferative activity of the bone marrow were studied.

Results: Chronotoxic effect of cyclophosphane on leukoipoiesis in rats depending on the time of administration was shown. Leukopenia observed after cyclophosphane administration was less marked on the 3rd day after the administration at 18 o'clock, that is in the period of minimum proliferative activity of the bone marrow at standard lightening. At 4-fold increase of cyclophosphane dose, leukoipoiesis tolerance is preserved at optimum time of its administration.

Conclusion: The influence of cyclophosphane toxicity on leukoipoiesis in rats changes depending on the time of the day. Administration of cyclophosphane at night produces less marked effect on myelopoiesis in the animals. The choice of optimum time of cyclophosphane administration allows to increase its single dose without increase of the myelotoxic activity.

Key words: cyclophosphane, circadian rhythm, myelotoxicity.

В останні три десятиріччя в усьому світі помітно зріс інтерес до вивчення ритмічної організації фізіологічних процесів організму як в умовах норми, так і патології.

Відомо, що при використанні цитостатичних хемопрепаратів головним лімітуючим фактором є ушкодження нормальних тканин і в першу чергу кісткового мозку [1, 2]. Пригнічення кісткомозкового кровотворення призводить до розвитку гемоцитопеній, які часто потребують перерви в лікуванні і зниження дози цитостатиків [3, 4]. А тому бажано визначити такий час введення цитостатичних хемопрепаратів, при якому їх токсична дія на мієлопоз буде мінімальною.

Відомо, що циркадна фаза проліферативної активності кісткового мозку відповідає добовому рівню ядерних елементів периферичної крові при стандартних умовах синхронізації (світловий режим), тобто циркадна ритмічність вмісту лейкоцитів, лімфоцитів та нейтрофілів є

маркером проліферативної активності клітин кісткового мозку [5].

Завданням нашої роботи стало експериментальне обґрунтування найбільш толерантних режимів використання циклофосфану з урахуванням добових ритмів ядерних клітин периферичної крові.

Методика дослідження

У весняний період проведено 2 серії експериментів на 40 безпородних білих щурах-самцях вагою 140–170 г. Тварини перебували в умовах стандартного світлового та харчового режимів.

У першу серію досліджень входило вивчення хронотоксичної дії на лейкопоз препарату «Циклофосфан» на моделі пролонгованої мієлодепресії залежно від часу його введення тваринам протягом доби.

Препарат на фізіологічному розчині вводили внутріочеревинно в дозі 4 мг/100 г маси тіла тварини протягом 4 днів о 12, 18, 24-й та 6-й год. ранку — на кожну експериментальну точку по 6 тварин. Перед застосуванням циклофосфану в усіх щурів було досліджено добові ритми ядерних клітин білої крові. Доза та схема використання препарату для одержання моделі пролонгованої лейкопенії встановлені на підставі попередніх досліджень [6].

Визначення токсичної дії залежно від часу введення циклофосфану проводили на 3, 5 та 7-му доби після останньої ін'єкції у кожній групі.

Друга серія експерименту була пов'язана з вивченням ступеня вираженості мієлодепресії та темпів відновлення лейкопоезу при введенні циклофосфану одноразово у дозі 16 мг/100 г маси тіла (сумарна загальна доза циклофосфану для отримання пролонгованої лейкопенії) залежно від часу його введення: о 9-й год. — 1-ша та о 21-й год. — 2-га група експериментальних тварин. Дослідження проведені на 1, 3, 5, 7, 12, 15, 21-й та 30-й дні спостереження.

Кров відбирали з хвостової вени, підраховували кількість лейкоцитів загальноприйнятим методом у камері Горяєва морфологічним методом та визначали формулу крові.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за методом t-критерію Стьюдента.

Крім цього, дані, що характеризують добові ритми, апроксимовані тригонометричним поліномом за допомогою спеціально розробленої комп'ютерної програми з метою мінімізувати суму квадратів відхилення, за Косінор-аналізом. Характеристика 24-годинного ритму була відображена месером (Ю) — середньою величиною погодженого ритму показників, що вивчаються; амплітудою (А) — половиною різниці між мінімумом і максимумом відповідної косинус-функції та акрофазою (Ф) — часом максимуму від 0 годин, як відбиття функції. Такий підхід дозволяє схарактеризувати ритмічність процесу і визначити його значущість. Ритм визнають значущим, якщо амплітуда коливань відрізняється від нуля.

Результати та їх обговорення

Проведено аналіз показників добових коливань вмісту лейкоцитів та відносної кількості лімфоцитів і нейтрофілів периферичної крові 40 інтактних безпорідних щурів-самців, результати якого наведені у табл. 1.

Виявилось, що загальна кількість лейкоцитів досягає максимуму протягом доби о 6-й год. із проміжком цього підняття від 18-ї до 6-ї години. Максимальний рівень відносного вмісту лімфоцитів у інтактних безпорідних щурів відмічено о 12-й год., з діапазоном коливань від 6-ї до і 8-ї год. Щодо відносної кількості нейтрофілів, то максимум цих клітин зареєстровано о 24-й год. з проміжком від 18-ї до 6-ї год.

Таким чином, вміст формених елементів периферичної крові щурів виявляє високовідтворювані коливання за 24-годиною шкалою. Акрофаза для лейкоцитів складала 2:27 з довірчою межею від 21:23—5:45; для відносного вмісту лімфоцитів — 11:27 і довірчою межею коливань 7:24—15:30. Акрофаза добового ритму відносної кількості нейтрофілів припадала на 23:31 із довірчою межею коливань 18:58—4:04.

Добові біологічні ритми — міцний модифікатор дії терапевтичних засобів, у тому числі лікарських препаратів і, зокрема, цитостатиків.

Таблиця 1. Добові коливання ядровмісних клітин крові щурів (n = 32)

Table 1. Circadian fluctuations of the nucleus-containing blood cells in rats (n = 32)

Час спостереження, година	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	Лімфоцити, %	Нейтрофіли, %
12-та	7,79 \pm 0,39	60,6 \pm 1,6	29,6 \pm 1,5
18-та	9,30 \pm 0,44*	52,6 \pm 2,0*	38,32 \pm 1,7*
24-та	11,23 \pm 0,46*	49,24 \pm 1,9*	40,03 \pm 1,7*
6-та	11,85 \pm 0,43*	52,81 \pm 1,7*	35,63 \pm 1,8*
12-та наступної доби	8,65 \pm 0,64	58,03 \pm 1,2	31,32 \pm 1,4
Акрофаза	2:27	11: 56	23:06
Довірчі межі акрофази	21:23 + 5:45	7:24 + 15:30	18:58 + 4:04
Мезор	10,04 \pm 0,43	53,82 \pm 1,8	35,81 \pm 1,6
Амплітуда коливань	2,13	5,7	5,35

Примітка. * — вірогідно відносно 12-ї години; p < 0,05.

Це свідчить, що доза, яка потребує адекватної реакції — сили впливу лікувального фактора — може змінюватися протягом доби.

Тому досліджено вплив часу введення циклофосфану на кількість клітин білої крові щурів у експериментальній моделі пролонгованої лейкопенії.

Оскільки у фізіологічних умовах рівень лейкоцитів, лімфоцитів та нейтрофілів пов'язаний з циркадними ритмами, зменшення кількості їх після дії циклофосфану відображували як відсоток відносно вихідного вмісту цих клітин на час забирання крові — о 12-й год.

У експериментальній моделі пролонгованої мієлодепресії досліджено вплив часу введення циклофосфану на кількість лейкоцитів та відносний вміст лімфоцитів і нейтрофілів щурів. Циклофосфан вводили у дозі 4 мг/100 г маси тіла тварини протягом 4 днів о 12-й (1-ша група), 18-й (2-га група), 24-й (3-тя група) та 6-й (4-та група) год. Оскільки показано, що у фізіологічних умовах кількість лейкоцитів, лімфоцитів та нейтрофілів пов'язана з циркадними ритмами, їх вміст після дії циклофосфану відбивали як відсоток до вихідного рівня на 12-ту год.

Зміна кількості лейкоцитів відносно відповідного часового контролю на 3-тю добу після останньої ін'єкції мала суттєві відмінності в усі терміни (рис. 1). Зменшення кількості лейкоцитів було найбільше вираженим у щурів, яким циклофосфан вводили о 12-й год., і менше вираженим у тих, що одержували його о 18-й год. Їх рівень складав 7,4 та 50,7 % відповідно.

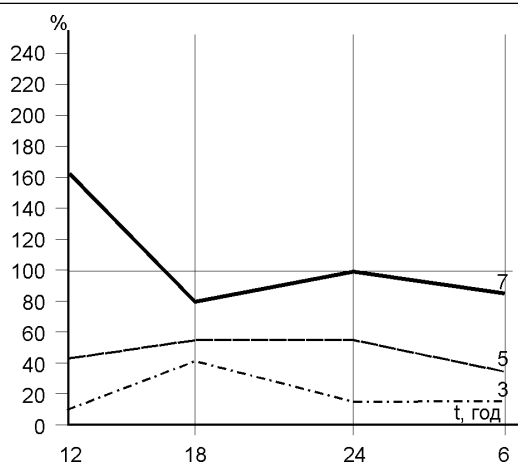


Рис. 1. Кількість лейкоцитів периферичної крові щурів на 3, 5, 7-му доби після введення циклофосфану в різний час. По осі абсцис — час доби, коли введено циклофосфан; по осі ординат — кількість загальних лейкоцитів (% до вихідного рівня)

Fig. 1. The amount of leukocytes in the peripheral blood of the rats on the 3rd, 5th and 7th days after cyclophosphane administration at various time. The axis of abscissas – time of cyclophosphane administration, the axis of ordinates – total amount of leukocytes (% of the initial level)

Дослідження вмісту лейкоцитів на 5-ту добу виявило майже в усіх тварин, незалежно від часу отримання циклофосфану, досягнення періоду напіввідновлення відносно вихідного рівня, найбільш виражене для 18-ї та 24-ї год. — 58,1 і 55,3 % відповідно. На 7-му добу у щурів, що отримали циклофосфан о 24-й год., вміст загальних лейкоцитів досягав вихідного рівня; о 18-й та 6-й — 82,5 і 85,2 % відповідно, а о 12-й — перевищував цей рівень майже у 2 рази.

Відносна кількість лімфоцитів периферичної крові щурів також була підпорядкована хронотоксичній дії циклофосфану. На 3-тю добу їх вміст (рис. 2) був найменшим при введенні препарату о 24-й, а найбільшим — о 6-й год. До 5-ї доби вміст лімфоцитів у відсотковому відношенні до вихідних даних майже однаковий незалежно від часу введення препарату, а на 7-му — найбільше його значення зареєстровано о 24-й год. Однак повного відновлення цієї популяції ядерних клітин периферичної крові на дані терміни дослідження не виявлено.

У той же час вміст нейтрофілів (рис. 3) на 3-й день спостереження майже не перевищував вихідний рівень при введенні циклофосфану о 12-й та 18-й год, а при застосуванні його о 24-й та 6-й год. складав 121,8 і 117,1 % від вихідного рівня відповідно. На 5-ту і 7-му добу спостерігалася стабілізація відносного вмісту нейтрофілів практично в усіх групах, за винятком щурів, які одержували циклофосфан о 12-й

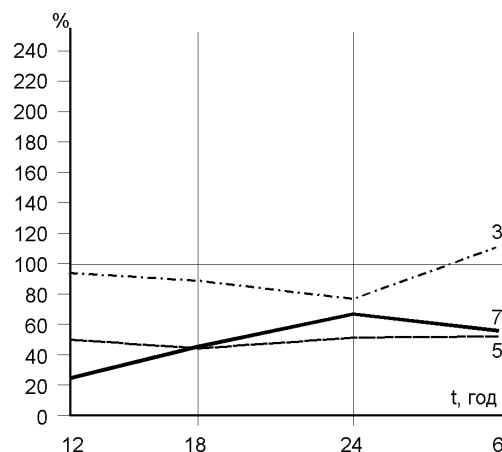


Рис. 2. Відносний вміст лейкоцитів периферичної крові щурів на 3, 5, 7-й дні після введення циклофосфану в різний час. По осі абсцис — час доби, коли введено циклофосфан; по осі ординат — кількість загальних лейкоцитів (% до вихідного рівня)

Fig. 2. Relative amount of leukocytes in the peripheral blood of the rats on the 3rd, 5th and 7th days after cyclophosphane administration at various time. The axis of abscissas – time of cyclophosphane administration, the axis of ordinates – total amount of leukocytes (% of the initial level)

год. У них вміст нейтрофілів майже у 3 рази перевищував вихідний рівень.

Таким чином, у результаті даного експерименту показано хронотоксичну дію циклофосфану до лейкопоезу щурів залежно від часу доби його застосування. Лейкопенія, одержана після введення циклофосфану, була менш вираженою на 3-тю добу при його застосуванні в ранньовечірній час (о 18-й год.), тобто у період мінімальної проліферативної активності кісткового мозку при стандартних умовах світлового режиму [7].

Згідно з результатами, отриманими нами, та на основі даних літератури при вивченні циркадних ритмів ядерних елементів периферичної крові щурів мінімальна проліферативна активність збігалася з максимальним рівнем вмісту нейтрофілів крові, межі довірчого інтервалу акрофази яких у наших дослідженнях припадали на 18:58–4:04.

У другій серії експериментальних досліджень протягом 30 днів вивчали ступінь вираженості мієлодепресії та темпів відновлення лейкопоезу при використанні одноразової ін'єкції циклофосфану у дозі 16 мг/100 г маси тварин у періоди максимальної та мінімальної проліферативної активностей кісткового мозку щурів, тобто у ранковий (о 9-й год. — 1 група) та вечірній (о 21-й год. — 2 група) час доби [8]. Забирання крові та аналіз її зразків в обох групах щурів проводили у вказані терміни дослідження о 9-й год.

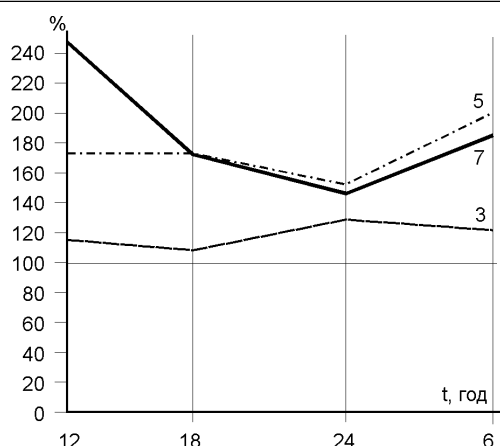


Рис. 3. Відносний вміст нейтрофілів периферичної крові щурів на 3, 5, 7-й дні після введення циклофосфану в різний час. По осі абсцис — час доби, коли введено циклофосфан; по осі ординат — кількість загальних лейкоцитів (% до вихідного рівня)

Fig. 3. Relative amount of neutrophils in the peripheral blood of the rats on the 3rd, 5th and 7th days after cyclophosphane administration at various time. The axis of abscissas - time of cyclophosphane administration, the axis of ordinates - total amount of leucocytes (% of the initial level)

Аналіз одержаних результатів (табл. 2) показав, що в щурів обох груп вміст лейкоцитів периферичної крові практично не відрізняється на 1-шу та 3-тю доби спостереження. Починаючи з 7-ї доби, загальна кількість лейкоцитів крові щурів, що отримали циклофосфан о 9-й год., вірогідно збільшується аж до 15-ї доби, після чого їх рівень знову знижується і до 30-ї доби складає лише 55 % від вихідного (рис. 4). У щурів 2-ї групи, що одержали циклофосфан о 21-й год., простежувалося поступове зростання кількості загальних лейкоцитів крові протягом усіх термінів дослідження, вірогідно відмінне від кількості загальних лейкоцитів у щурів 1-ї групи на дані терміни дослідження. Їх рівень складав на 30-ту добу 77 % від вихідного.

Таблиця 2. Показники білої крові щурів залежно від часу доби, коли введено циклофосфан
Table 2. Parameters of the white blood in rats depending on the time of cyclophosphane administration

Час дослідження	9-та година (n = 10)			21-ша година (n = 10)		
	Лейкоцити, × 10 ⁹ /л	Лімфоцити, %	Нейтрофіли, %	Лейкоцити × 10 ⁹ /л	Лімфоцити, %	Нейтрофіли, %
Вихідний рівень, доба	9,80 ± 8,82	61,7 ± 2,0	31,0 ± 1,5	9,97 ± 0,99	61,3 ± 2,0	27,9 ± 2,7
1-ша	2,45 ± 0,64	20,3 ± 0,9	68,5 ± 5,4	2,27 ± 0,14	40,7 ± 3,3*	49,7 ± 4,3*
5-та	1,95 ± 0,73	25,0 ± 2,1	69,0 ± 1,5	1,37 ± 0,28	50,0 ± 4,6*	44,7 ± 1,5*
7-ма	3,08 ± 0,6	31,0 ± 5,6	44,3 ± 8,4	1,65 ± 0,7	47,3 ± 5,8*	42,3 ± 4,7
12-та	13,0 ± 1,9	23,3 ± 3,2	67,0 ± 2,0	6,15 ± 1,3*	36,3 ± 7,4*	40,0 ± 1,4*
15-та	12,42 ± 2,4	22,7 ± 2,3	63,0 ± 2,1	7,60 ± 2,8	46,0 ± 1,5*	40,0 ± 1,7*
21-ша	4,83 ± 0,7	29,3 ± 2,3	45,3 ± 2,9	7,98 ± 0,48*	47,0 ± 4,1*	36,3 ± 3,5*
30-та	5,42 ± 0,14	41,0 ± 5,0	56,0 ± 7,6	7,75 ± 0,52*	55,3 ± 3,9*	33,0 ± 2,1*

Примітка. * — вірогідно відносно 9-ї год.; p < 0,05.

Що стосується відносної кількості лімфоцитів периферичної крові щурів обох груп, то можна зробити висновок, що при використанні циклофосфану о 21-й год. не спостерігається такого пригнічення їх вмісту, як о 9-й год. Майже на всі терміни спостереження вміст цих клітин у щурів 2-ї групи складав 60–80 % від вихідного рівня і досягав на 30-ту добу 90,2 % вихідних показників. У щурів 1-ї групи на цей час відносна кількість лімфоцитів крові становила 66,5 % від вихідної (рис. 5). Те ж саме мало місце і для нейтрофілів периферичної крові, відносна кількість яких у 2-ї групи щурів на 30-ту добу спостережень практично дорівнювала вихідним показникам, на відміну від тварин 1-ї групи (рис. 6).

Таким чином, застосування циклофосфану щурам у вечірні години, які відповідають максимальному вмісту кортикостероїдів і мінімальній проліферативній активності кісткового мозку тварин, виявляє менший ефект ураження відносно мієлопоезу експериментальних тварин порівняно з вранішнім часом.

Отримані дані підтверджують, з одного боку, що циклофосфан пригнічує переважно лімфопоез, а з іншого, що глюкокортикостероїди знижують токсичну дію антибластомних препаратів відносно гемопоезу [7].

Однак важливим висновком даної серії експериментальних досліджень є те, що при збільшенні майже у 4 рази дози циклофосфану зберігається толерантність лейкопоезу при оптимальному часі його застосування, хоч відомо, що найбільшу чутливість мієлопоезу мишей та щурів до циклофосфану визначено при дозі 5 мг/100 г маси тварин [8].

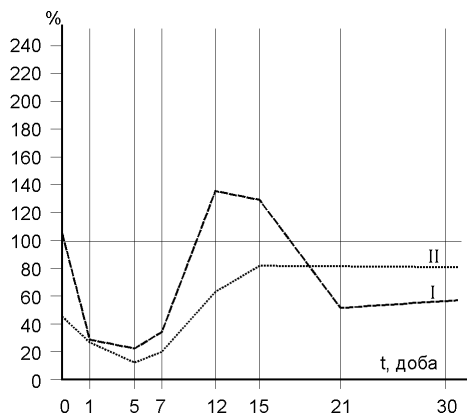


Рис. 4. Динаміка відновлення рівня лейкоцитів периферичної крові щурів. По осі абсцис — терміни спостереження; по осі ординат — кількість лейкоцитів (% до вихідного рівня). Одноразове введення циклофосфану у дозі 16 мг/100 г: I — о 9-й год, II — о 21-й

Fig. 4. Dynamics of peripheral blood leukocyte level restoration. The axis of abscissas - time of observation; the axis of ordinates - the number of leukocytes (% of the initial level). Single administration of cyclophosphane at a dose of 16 mg per 100 g of body mass, I - at 9 o'clock, II - at 21 o'clock

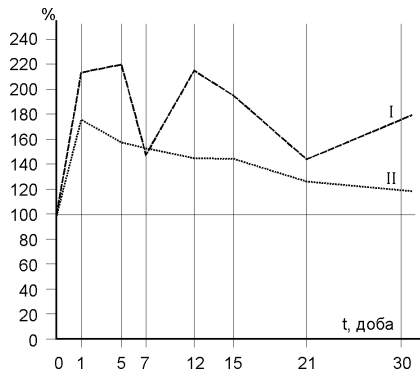


Рис. 6. Динаміка відновлення відносної кількості нейтрофілів периферичної крові щурів. По осі абсцис — терміни спостереження; по осі ординат — кількість лейкоцитів (% до вихідного рівня). Одноразове введення циклофосфану у дозі 16 мг/100 г: I — о 9-й год, II — о 21-й

Fig. 6. Dynamics of peripheral blood neutrophil restoration. The axis of abscissas - time of observation; the axis of ordinates - the number of leukocytes (% of the initial level). Single administration of cyclophosphane at a dose of 16 mg per 100 g of body mass, I - at 9 o'clock, II - at 21 o'clock

Це дає можливість твердити, що застосування антибластомних препаратів у хрономодульному режимі дозволяє не тільки визначити час їх найменшої токсичної дії відносно мієлопоезу, але й мати можливість інтенсифікувати цитостатичну терапію з використанням вищих доз хемопрепаратів з урахуванням механізму їх дії у фазах підвищеної резистентності нормальних тканин.

Висновки

1. Ступінь прояву токсичності циклофосфану до лейкопоезу щурів змінюється залежно від часу доби його використання.

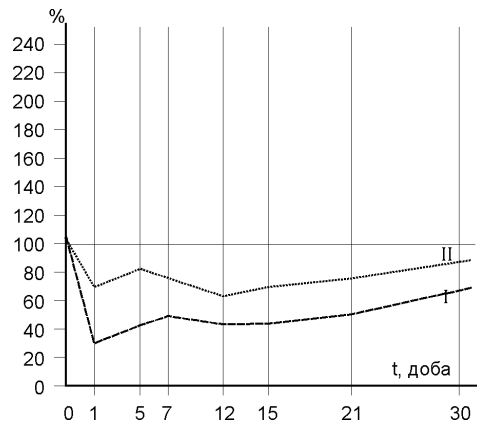


Рис. 5. Динаміка відновлення відносної кількості лейкоцитів периферичної крові щурів. По осі абсцис — терміни спостереження; по осі ординат — кількість лейкоцитів (% до вихідного рівня). Одноразове введення циклофосфану у дозі 16 мг/100 г: I — о 9 год, II — о 21-й

Fig. 5. Dynamics of restoration of the relative amount of peripheral blood leukocyte. The axis of abscissas - time of observation; the axis of ordinates - the number of leukocytes (% of the initial level). Single administration of cyclophosphane at a dose of 16 mg per 100 g of body mass, I - at 9 o'clock, II - at 21 o'clock

2. Застосування циклофосфану щурам у вечірні години дає менший ефект ураження відносно мієлопоезу тварин.

3. Вибір оптимального часу застосування циклофосфану дозволяє збільшити його одноразову дозу без підвищення мієлотоксичної дії.

Література

1. Москаленко И.П., Никифорова Н.А., Мартынюк Н.М., Ишханова М.А. и др. // Радиобиол. — 1988. — Т. XXVIII, вып. 2. — С. 240-244.
2. Гершанович М.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. — М.: Медицина, 1982. — 224 с.
3. Дыгай А.М., Жданов В.В., Любавина П.А. // Гематол. и трансфузиол. — 1995. — № 5. — С. 11-15.
4. Зидермане А.Л. Некоторые вопросы хронобиологии и хрономедицины. — Рига: Зинатне, 1988. — 214 с.
5. Новицкий В.В., Запужалова О.Б., Богданин И.Ф. и др. // Пат. физиол. и эксперим. терапия. — 1991. — № 3. — С. 12-14.
6. Огава М. // Гематол. и трансфузиол. — 1990. — № 2. — С. 24-30.
7. Хронобиология и хрономедицина / Под. ред. Ф.И. Комарова. — М.: Триада-Х, 2000. — 488 с.
8. Smaaland R., Laerum O.D., Sothorn R.P. et al. // Blood. — 1992. — Vol. 79. — P. 2281-2287.

Надходження до редакції 27.01.2004.

Прийнято 17.02.2004.

Адреса для листування:
Кузьменко Олена Вікторівна,
вул. Еллінська, 61, кв. 44, Харків, 61098, Україна