

К ВОПРОСУ О МИЕЛОПРОТЕКТОРНОМ ЭФФЕКТЕ ЛЕЙКОСТИМА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛУЧЕВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КРОВЕТВОРНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Моисеева И. Я., Ионичева Л. В., Родина О. П., Никишин С. А., Ионова С. А., Киселева Д. Д.

ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, Россия (440026, г. Пенза, ул. Красная, 40)

Изучено влияние на миелопоэз филграстима (лейкостим, ЗАО "Биокад", Россия) в дозе 16 мкг/кг при однократном подкожном введении через 1 ч после облучения в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома у кроликов. Забор костного мозга для исследования проводили пунктированием подвздошной кости животных до начала эксперимента, на 3, 7, 10, 14, 21, 28 сутки опыта. Показано, что лейкостим обеспечивал высокий уровень защиты пролиферирующих кроветворных предшественников в ранние сроки после лучевого воздействия, что выражалось в предупреждении пострадиационного дефицита клеток, составляющих нейтрофильный, моноцитарный, лимфоцитарный ростки кроветворения, протективные свойства исследуемого препарата в отношении эритрокариоцитарного и мегакариоцитарного рядов были выражены в значительно меньшей степени.

Ключевые слова: лейкостим, костный мозг, пострадиационная динамика, кролики.

ABOUT MYELOPROTECTIVE EFFECT OF LEUCOSTIM IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL RADIATION DAMAGES OF HEMATOPOIETIC BONE MARROW

Moiseeva I. Y., Ionicheva L. V., Rodina O. P., Nikishin S. A., Ionova S. A., Kiseleva D. D.

Penza State University

The influence on myelopoiesis of filgrastim (Leukostim, "Biocad" Inc., Russia) in a dose of 16mg per kg with a single subcutaneous injection at 1 h after irradiation in experimental post-radiation bone marrow syndrome of rabbits has been investigated. The intake of bone marrow for research was carried out by puncture of the animals ilium before the experiment and at 3, 7, 10, 14, 21, 28 experiment days. It is shown that Leukostim provided a high level of protection of proliferating hematopoietic precursors in the early period after radiation exposure, which was reflected in the prevention of post-radiation deficiency of cells composing neutrophil, monocyte, lymphocyte bloodshoots; the protective properties of investigated drug in relation to erythrocytic and megakaryocytic lines were not expressed substantially.

Key words: leucostim, bone marrow, post-radiation dynamics, rabbits.

Введение

Использование современной интенсивной радио- и химиотерапии в лечении онкологических заболеваний требует применения препаратов сопровождения для улучшения их переносимости, профилактики развития побочных эффектов, в том числе угнетения костномозгового кроветворения [1–4]. Токсическое воздействие противоопухолевой терапии на костный мозг, вызывающее подавление его кроветворной функции, является одним из наиболее значимых; уменьшение числа нейтрофильных лейкоцитов нередко ведет к развитию тяжелых инфекций, что может оказаться критическим в плане невозможности продолжения лечения [2,3]. Перспективными миелопротекторами являются лекарственные средства, созданные на основе эндогенных регуляторов гемопоэза. Использование отечественного препарата лейкостима в терапии ряда онкологических новообразований является экономически более выгодным в связи с меньшей себестоимостью лечения, по сравнению с импортными аналогами [1].

Цель исследования: изучить миелопротекторную эффективность лейкостима при экспериментальной лучевой супрессии гемопоэза.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено в лаборатории кафедры общей и клинической фармакологии Медицинского института Пензенского государственного университета. Эксперименты были выполнены на 30 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,5–3,0 кг. Животных содержали на стандартном пищевом рационе вивария со свободным доступом к воде. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETSN 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.) и были одобрены локальным этическим комитетом.

С учетом цели исследования было сформировано 3 группы животных. Группа №1 (n=10) являлась интактной. Животные групп №2 (n=10), №3 (n=10) подвергались однократному воздействию ионизирующей радиации. Для моделирования лучевого повреждения проводилось облучение с помощью аппарата АГАТ-«С» разовой очаговой дозой 5 Гр, расстояние от источника ионизации до ионизируемой поверхности составляло 90 см, процентная доза равнялась 94 %, а максимальная доза облучения составила 5,31 Гр. Животным группы № 3 вводили препарат филграстим (лейкостим, ЗАО "Биокад", Россия) в дозе 16 мкг/кг однократно подкожно через 1 ч после облучения. Для исследования костного мозга проводили пункцию подвздошной кости под местным обезболиванием раствором новокаина 2 % – 2,0 мл при помощи асептической аспирации иглой Кассирского и шприцом (обезвоженными) до начала эксперимента, на 3, 7, 10, 14, 21, 28 сутки. Из части полученного пунктата готовили мазки, другую – разводили для подсчета миелокариоцитов и мегакариоцитов. Производили цитологический анализ мазков пунктата. Статистическую обработку результатов экспериментального исследования проводили с помощью пакета статистических программ: русифицированная версия программы STATISTICA 6.0 (StatSoft – Russia, 1999), BIOSTAT (S. A.Glantz, McGrawHill, перевод на русский язык – «Практика, 1998). Определялись основные статистические характеристики: среднее, стандартное квадратическое отклонение. Достоверность различий рассчитана с помощью Т-критерия Стьюдента в случае равенства дисперсий, его модификации (Т-критерий с отдельными оценками дисперсий) в случае неравенства дисперсий и с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

Результаты исследования и их обсуждение

В костном мозге животных на фоне лейкостима абсолютное количество миелокариоцитов возросло с $16,01 \pm 2,96 \times 10^9/\text{л}$ до $27,50 \pm 5,24 \times 10^9/\text{л}$ и оставалось выше

такового в группе интактных животных в течение 3-х недель наблюдения, а на 28-е сутки не отличалось от значения показателя в группе интактных животных (табл. 1). Классической пострadiационной динамики с опустошением кроветворной ткани после лучевого повреждения, транзиторным подъемом за счет задействования сохраненных очагов кроветворения, не наблюдалось.

Таблица 1

Пострадиационная динамика абсолютного количества клеток костного мозга кроликов на фоне лейкостима, М (s)

Сутки Показатель	3-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Миелокариоциты $\times 10^9/\text{л}$	16,00 (3,41)	19,50 (3,41)	11,50(4,83)	10,20 (2,34)	12,40(2,80)	11,50(2,19)	19,20(2,76)
	1,70 (0,29)*	2,50 (0,34)*	2,00 (0,44)*	3,00 (0,43)*	4,50 (0,63)*	8,400 (12,63)	26,00 (5,20)*
	27,50 (5,24)*#	22,50 (4,85)*#	17,50 (3,96) *#	17,60 (3,98)*#	18,00(3,92)*#	18,50 (3,74)*#	19,00(4,05)#
Мегакариоциты $\times 10^3/\text{л}$	133,77 (22,03)	200,00 (34,63)	120,00 (16,12)	102,00(22,45)	150,00(23,50)	115,00 (14,21)	174,00(20,46)
	32,10 (5,88)*	25,00 (4,98)*	27,78 (4,80)*	35,00 (4,68)*	45,89 (6,18)*	842,36 (103,59)*	495,67 (64,90)*
	69,31 (12,18)*#	68,75 (12,10)*#	75,00 (14,16)*#	62,55 (13,90)*#	50,00(9,70)*	75,0 (16,95)*#	81,25 (16,35) *#
Митоз $\times 10^9/\text{л}$	0,112 (0,021)	0,098 (0,022)	0,115 (0,027)	0,112 (0,022)	0,112 (0,019)	0,115 (0,011)	0,154(0,013)
	0,017 (0,011)*	0,025 (0,011)*	0,044 (0,009)*	0,060 (0,078)*	0,090 (0,01)	1,978 (0,443)*	0,390 (0,066)*
	0,302 (0,068)*#	0,180 (0,032)*#	0,175 (0,035)*#	0,210(0,045)*#	0,252 (0,042)*#	0,296 (0,062)*#	0,342 (0,059)*#
Бластные клетки $\times 10^9/\text{л}$	0,595 (0,021)	0,623 (0,018)	0,432 (0,013)	0,558 (0,075)	0,481 (0,040)	0,581 (0,067)	0,612 (0,080)
	0,120 (0,016)*	0,180 (0,015)*	0,150 (0,024)*	0,250(0,067)*	0,385 (0,058)	6,640 (1,500)*	0,720 (0,111)
	0,988 (0,201)*#	0,774 (0,126)*#	0,722 (0,130)*#	0,763 (0,110)*#	0,762 (0,190)*#	0,756 (0,150)*#	0,712 (0,142)*#
	1,299 (0,163)*#	1,345 (0,203)*#	0,969 (0,127)*#	0,775 (0,112)*#	1,033 (0,202)*#	1,065 (0,220)*#	1,068(0,205)#
Палочкоядерные нейтрофилы $\times 10^9/\text{л}$	0,999 (0,120)	1,560 (0,074)	0,920 (0,112)	0,714 (0,165)	0,868(0,128)	0,920 (0,114)	1,536 (0,186)
	0,090 (0,012)*	0,130 (0,034)*	0,109 (0,018)*	0,194(0,028)*	0,231(0,041)*	4,501 (0,720)*	0,753(0,089)*
	2,212 (0,386)*#	2,219 (0,356)*#	1,647 (0,290)*#	1,319 (0,278)*#	1,758 (0,327)*#	1,818 (1,340)*#	1,880 (0,408)*#
Сегментоядерные нейтрофилы $\times 10^9/\text{л}$	1,419 (0,250)	2,535 (0,220)	1,380 (0,220)	1,428 (0,209)	1,488 (0,210)	1,495 (0,214)	2,304 (0,224)
	0,190 (0,023)*	0,150 (0,034)	0,043 (0,006)*	0,094(0,012)*	0,134(0,024)*	2,380 (0,41)*	3,095(0,540)*
	3,141 (0,609)*#	3,251 (0,695)*#	2,341 (0,417)#	1,873 (0,313)#	2,497 (1,380)*#	2,583 (0,375)*#	2,520(0,590)#
Лимфоциты $\times 10^9/\text{л}$	3,746 (0,790)	4,290 (0,760)	2,415 (0,615)	2,346 (0,614)	2,976 (0,679)	2,530 (0,860)	4,224(0,750)
	0,470 (0,085)*	0,740 (0,078)*	0,537 (0,072)*	0,569 (0,102)*	1,220 (0,104)*	29,815 (3,070)*	9,553 (1,659)*
	8,728 (1,513)*#	4,899 (0,815)#	3,409 (0,738)*#	5,244 (0,941) *#	4,196 (0,098)*#	3,621 (0,767)*#	4,083 (0,782)#

Примечание:

обычный шрифт – группа интактных животных;

жирный шрифт – опытная группа (облучение с введением лейкостима);

различия статистически значимы относительно: * – $p_1 < 0,05$ – интактной группы;

– $p_2 < 0,05$ – группы с облучением без лекарственной коррекции.

Численность мегакариоцитов на фоне лейкостимана на протяжении периода исследования статистически значимо сократилась в среднем в 2–3 раза, однако удерживалась статистически выше контрольных цифр в первые 10 дней опыта ($p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$), восстановления мегакариоцитарного роста не наблюдалось. В контрольной группе двухнедельный дефицит мегакариоцитов был более глубоким, затем следовало резкое увеличение абсолютного количества мегакариоцитов.

Пострадиационного снижения митотической активности миелокариоцитов на фоне лейкостима не наблюдалось в течение всего эксперимента. Абсолютное количество митотически делящихся предшественников на протяжении всего опыта статистически значимо превышало значение показателя у интактных животных: 3-и сутки опыта – в 2,7 раза, в дальнейшем до конца эксперимента находилось в пределах от $0,175 \pm 0,035 \times 10^9/\text{л}$ до $0,342 \pm 0,059 \times 10^9/\text{л}$. ($p_1 < 0,05$). В контрольной группе животных после лучевого повреждения отмечалось длительное и глубокое торможение митотической активности миелокариоцитов с абортным подъемом показателя на 21-е сутки эксперимента.

Абсолютное содержание бластных клеток на фоне лейкостима также на протяжении всего периода исследования статистически значимо превышало значение показателя в группе интактных животных ($p_1 < 0,05$) с максимальным подъемом в 1,7 раза на 3-и сутки опыта. В группе контроля отмечался продолжительный период послелучевого дефицита бластных клеток в сочетании с резким повышением их количества на 21-е сутки эксперимента.

Абсолютное количество костномозговых палочкоядерных нейтрофилов на фоне лейкостима статистически значимо превышало значения показателя в группе интактных животных на протяжении всего эксперимента в 1,4–2,2 раза, сегментоядерных нейтрофилов – в 1,3 – 1,7 раза. В группе контроля отмечался глубокий и продолжительный (до 3-х недель) период послелучевого дефицита зрелых гранулоцитов.

В лимфоцитарном ряду на 3-е сутки после облучения абсолютное количество клеток превышало значение показателя в группе интактных животных в 2,3 раза, затем уровень клеток постепенно снижался, однако статистическая значимость различий сохранялась 21-х суток включительно ($p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$).

Выводы

1. Лейкостим проявил миелопротекторное действие в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома у кроликов.
2. Лейкостим предупреждал развитие в костном мозге экспериментальных животных пострадиационного дефицита клеток нейтрофильного, моноцитарного, лимфоцитарного рядов, в меньшей степени был эффективен в отношении эритрокариоцитарного и мегакариоцитарного рядов.

Список литературы

1. Воробьев А. И. Результаты клинического исследования рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора — лейкостима // Эффективная фармакотерапия в гематологии, онкологии и радиологии. – 2006. - № 2. - с. 30 - 35.
2. Гершанович М. А. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. – М.: Медицина, 1982. – 224 с.
3. Легеза В. И. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор лейкостим – средство патогенетической терапии постлучевого костномозгового синдрома // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2010. – № 2. – Прил. 3. – С. 135–139.
4. Моисеева И. Я. Изучение гематопротекторной эффективности дикарбамина в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – № 1. – С. 81-84.
5. Небольсин В. Е. Механизмы протективного действия “Дикарбамина” в отношении системы крови при цитостатическом воздействии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. – № 9. – С. 312-316.

Рецензенты:

Инчина Вера Ивановна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», г. Саранск.

Микуляк Надежда Ивановна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой «Физиология человека» ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», г. Пенза.