

**ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β НА ПРОТИВОЛУЧЕВУЮ АКТИВНОСТЬ
ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Салухов В.В., Легеза В.И., Першко В.А.

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

тел.: (812) -542-47-01 e-mail: kuperit@mail.ru

Резюме: В эксперименте на крысах проведено сравнительное исследование противолучевой эффективности курсового лечения филграстима и применения интерлейкина-1 β (в условиях профилактического введения) при костномозговом синдроме острых радиационных поражений. Установлено, что терапия Г-КСФ при профилактическом применении интерлейкина-1 β является более эффективной, чем изолированное применение этих препаратов, способствует существенному увеличению выживаемости, ускорению восстановления миелоидного ростка костного мозга и клеток периферической крови – лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов.

Ключевые слова: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, интерлейкин-1 β , цитокины, острая лучевая болезнь, терапия лучевых поражений

**INFLUENCE OF INTERLEUKIN-1 β ON RADIODEFENCE EFFICIENCY OF
GRANULOCYTE- COLONY-STIMULATING FACTOR IN EXPERIMENT**

Salukhov V.V., Legeza V.I., Pershko V.A.

Military Medical Academy named after SM Kirov Defense Ministry

Summary: Relative research is conducted in experiment on rats противолучевой efficacy of course treatment filgrastim and applications interlejkina-1 β (in the conditions of preventive and medical introduction) at a marrowy syndrome of sharp radiating lesions. It is positioned that therapy G-CSF at preventive application interleukin-1 β is more effective, than isolated and joint application of these drugs, promotes essential augmentation of survival rate, restoration acceleration myeloid a sprout of a marrow and cages of peripheric blood - leucocytes, neutrophils, lymphocytes.

Keywords: granulocyte- colony-stimulating factor, interleukin-1 β , cytokine, acute radiation syndrome, therapy of radiation injuries

Введение. Стремительное распространение технологий использования «мирного атома», широкое внедрение их во все сферы деятельности человека (промышленное производство, энергетика, наука, медицина и др.) приводит к неуклонному повышению вероятности возникновения радиационных аварий и инцидентов с облучением человека. Одним из важнейших патогенетических звеньев, определяющих клиническую картину и исход острого радиационного воздействия, является поражение системы кроветворения [1]. В основе возникновения постлучевой миелодепрессии лежит «прямое» уничтожение «стволовых» и родоначальных клеточных элементов, ограничение их последующей пролиферации и снижение жизнеспособности зрелых гематоцитов. Современной стратегией лечения костномозгового синдрома является применение гемостимулирующей терапии цитокинами, которые выраженно уменьшают степень и продолжительность постлучевой миелодепрессии [2]. К настоящему времени в России только один препарат, относящийся к группе цитокинов - беталейкин (рекомбинантный человеческий интерлейкин-1 β), включен в схему лечения миелодепрессий лучевой этиологии у человека [3].

В то же время в онкологии и гематологии все шире применяются препараты Г-КСФ, являющиеся стимуляторами гранулоцитопоэза при миелодепрессиях токсической и лучевой этиологии. К наиболее известным лекарственным средствам данной группы относится филграстим - рекомбинантный негликозилированный человеческий Г-КСФ. В отечественной литературе имеются лишь отрывочные сведения об эффективности клинического применения этого препарата при радиационных поражениях человека, а также недостаточно изучен вопрос сочетанного применения Г-КСФ и препарата цитокинового ряда с доказанными противолучевыми свойствами - интерлейкина-1 β , что и определило актуальность настоящего исследования [4, 5, 6, 7].

Цель исследования: Изучение возможности повышения противолучевой эффективности Г-КСФ при сочетании последнего с интерлейкином-1 β в условиях его профилактического введения на экспериментальной модели костномозговой формы острого радиационного поражения

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 350 белых беспородных крысах-самцах массой тела 180 – 200 г. Животных подвергали общему относительно равномерному гамма-облучению на установке ИГУР1 при мощности дозы 1,02 Гр/мин.

Течение и исходы радиационного поражения оценивали по 30-ти сут выживаемости лабораторных животных и величине средней продолжительности жизни (СПЖ). Лабораторные методы исследования выполнялись в соответствии со стандартными методиками и заключались в определении общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов; общего количества миело- и мегакариоцитов и содержания ядродержащих клеток в костном мозге у крыс.

Препарат Г-КСФ филграстим (торговое наименование «Лейкостим», производство ЗАО «Биокад» Россия) крысам вводили подкожно в дозе 200 мкг/кг. Введение препарата начинали через 12 ч после облучения и продолжали на протяжении 7 сут с интервалом между инъекциями 12 ч.. Животным группы контроля подкожно вводили 5 % раствор декстрозы в те же сроки, что и филграстим.

Интерлейкин-1 β (торговое наименование «Беталейкин, производство ГНЦ – НИИ особо чистых биопрепаратов Россия) вводили крысам внутривентрально в дозе 1 мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора однократно за 24 ч до облучения. Выбор срока и дозы введения ИЛ-1 β основан на рекомендациях производителя и данных литературы о том, что максимальный радиозащитный эффект развивается при введении препарата за 24 ч до облучения. Контролем по отношению к «Беталейкину» являлась группа животных, получавших внутривентрально 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида за 24 ч до радиационного воздействия [10, 11].

Статистическую обработку данных экспериментальных и клинических исследований проводили общепринятыми методами с расчетом среднего значения, ошибки средней и среднего квадратического отклонения. Данные во всех таблицах представлены в виде $X \pm m_x$. В случае значительного объема выборки и близкого к нормальному распределению вариант, оценку различий средних значений проводили параметрическими методами с использованием t-критерия Стьюдента. Оценку различий данных, полученных при анализе выборок малого объема ($n < 10$), проводили непараметрическими методами с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [12].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в случае изолированного применения Г-КСФ увеличивал выживаемость крыс, облученных в дозе 7,8 Гр (СД_{95-100/30}) на 34%, а интерлейкин-1 β – на 42% по сравнению с соответствующим контролем (таблица 1). Эстафетное применение двух препаратов способствовало увеличению выживаемости животных до 75 %. Особый интерес представляло изучение комплексного применения цитокинов на гематологические сдвиги у облученных крыс.

Таблица 1 – Влияние изолированного и сочетанного применения ИЛ-1 β и Г-КСФ на течение и исходы острых радиационных поражений у крыс, облученных в дозе 7,8 Гр ($X \pm m_x$, $n=24$ в каждой группе)

Условия эксперимента	Значение показателя		
	Выживаемость		
	абс. ед	%	
Облучение (контроль)	2	8 $\pm$ 6 СПЖ, сут	12 $\pm$ 7
ИЛ-1 β	12	50 $\pm$ 10*	18 $\pm$ 7*
Г-КСФ	10	42 $\pm$ 10*	17 $\pm$ 9*
Г-КСФ+ ИЛ-1 β	18	75 $\pm$ 9*	24 $\pm$ 8*
*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем			

Как видно из таблицы 2, оба исследованных препарата способствовали ускорению процессов восстановления числа лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови крыс, а также ослабляли выраженность лейко-, лимфо-, нейтропении.

Таблица 2 – Влияние изолированного и сочетанного применения ИЛ-1 β и Г-КСФ на содержание лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови крыс, облученных в дозе 7,8 Гр ($X \pm m_x$, n=24 в каждой группе)

Показатель	Условия эксперимента	Количество клеток, $n \times 10^9/\text{л}$			
			после облучения, сут		
			3	10	15
Лейкоциты	Облучение (контроль)	До облучения	$0,75 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$
	ИЛ-1 β		$2,2 \pm 0,8^1$	$2,3 \pm 0,2^1$	$2,91 \pm 0,3^1$
	Г-КСФ		$1,7 \pm 0,1^1$	$1,5 \pm 0,1^1$	$3,6 \pm 0,15^1$
	ИЛ-1 β + Г-КСФ	$14,6 \pm 1,3$	$3,11 \pm 0,9^{1,2,3}$	$4,43 \pm 0,9^{1,2,3}$	$6,9 \pm 0,7^{1,2,3}$
Нейтрофилы	Облучение (контроль)		$0,04 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$
	ИЛ-1 β		$0,5 \pm 0,05^{1,3}$	$1,0 \pm 0,04^1$	$1,26 \pm 0,3^1$
	Г-КСФ		$0,09 \pm 0,01^1$	$0,9 \pm 0,09^1$	$1,3 \pm 0,15^1$
	ИЛ-1 β + Г-КСФ	$2,46 \pm 0,15$	$0,93 \pm 0,02^{1,2,3}$	$1,74 \pm 0,2^{1,2,3}$	$2,91 \pm 0,2^{1,2,3}$
Лимфоциты	Облучение (контроль)		$0,1 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
	ИЛ-1 β		$0,24 \pm 0,1^1$	$0,42 \pm 0,5^1$	$1,55 \pm 0,7^1$
	Г-КСФ		$0,3 \pm 0,1^1$	$0,6 \pm 0,1^1$	$2,0 \pm 0,3^1$
	ИЛ-1 β + Г-КСФ	$11,4 \pm 0,6$	$0,77 \pm 0,09^{1,2,3}$	$2,24 \pm 0,7^{1,2,3}$	$5,27 \pm 0,9^{1,2,3}$
¹ - $p < 0,05$ по сравнению с контролем					
² - $p < 0,05$ по сравнению с ИЛ-1 β					
³ - $p < 0,05$ по сравнению с Г-КСФ					

В наибольшей степени этот эффект отмечен при эстафетном применении цитокинов: количество лейкоцитов в период максимальной нейтро- и лимфопении у животных, леченых комбинацией «ИЛ-1 β + Г-КСФ», было в 3 раза более высоким, чем при раздельном применении препаратов. Более быстрыми темпами в этой группе происходило восстановление клеток белого ростка периферической крови: к 15 сут после облучения количество лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в 2-3 раза превышало аналогичные показатели при раздельном применении Г-КСФ или ИЛ-1 β .

Следует отметить, что влияние ИЛ-1 β на уровень гранулоцитов при изолированном применении было более выраженным, чем воздействие Г-КСФ в первые сутки после облучения. Так, количество нейтрофилов к 3 сут было достоверно выше в условиях профилактического назначения ИЛ-1 β в сравнении с группой животных, леченых Г-КСФ. Это отличие нивелировалось к 10 сут, а к 15 сут наблюдалась обратная тенденция: курсовой прием Г-КСФ определял более

высокие показатели лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов, чем профилактическое введение ИЛ-1 β .

Как видно из таблицы 3, сочетанное применение Г-КСФ и ИЛ-1 β способствовало более существенному ускорению восстановления клеточности костного мозга у облученных животных.

Таблица 3 – Влияние изолированного и сочетанного применения ИЛ-1 β и Г-КСФ на количество миелокариоцитов и мегакариоцитов в костном мозге крыс, облученных в дозе 7,8 Гр ($\bar{X} \pm m_x$, n=24 в каждой группе)

Показатель	Условия эксперимента	Количество клеток, $n \times 10^9/\text{л}$			
			после облучения, сут		
			3	10	15
Миелокариоциты	Облучение (контроль)	до облучения	$10,5 \pm 1,0$	$22 \pm 1,7$	$32 \pm 2,2$
	ИЛ-1 β		$24,9 \pm 1,2^1$	$58 \pm 2,1^1$	$64,9 \pm 1,9^1$
	Г-КСФ		$24,5 \pm 1,8^1$	$53,5 \pm 1,8^1$	$65 \pm 1,7^1$
	ИЛ-1 β +Г-КСФ	$116 \pm 1,8$	$44,08 \pm 2,9^{1,2,3}$	$69,6 \pm 2,4^{1,2,3}$	$96,28 \pm 2,6^{1,2,3}$
Мегакариоциты	Облучение (контроль)		$0,005 \pm 0,0001$	0	0
	ИЛ-1 β		$0,015 \pm 0,0001$	0	$0,003 \pm 0,0003$
	Г-КСФ	$0,1 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,0001$	0	0
	ИЛ-1 β +Г-КСФ		$0,012 \pm 0,0003$	0	0
¹ - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ² - $p < 0,05$ по сравнению с ИЛ-1 β ; ³ - $p < 0,05$ по сравнению с Г-КСФ					

Даже в условиях изолированного применения цитокинов, количество миелокариоцитов в постлучевом периоде было более высоким, чем в группе контроля, однако при применении комбинации «ИЛ-1 β + Г-КСФ» этот эффект был более выражен – количество миелокариоцитов в течение всего периода наблюдения было в 1,5 раза более высоким, чем при изолированном применении каждого из препаратов.

При подсчете мегакариоцитов в костном мозге изучаемых групп отмечалось резкое снижение их количества через 3 сут после облучения, а с 10 сут мегакариоциты в костном мозге

не определялись. Подобной динамикой характеризовались все исследованные группы, однако при изолированном профилактическом введении интерлейкина-1 β через 15 сут после облучения наметились признаки восстановления мегакариоцитарного ростка кроветворения (количество мегакариоцитов к этому сроку повысилось до 20% от исходного значения).

Таким образом, эстафетное профилактическое введение интерлейкина-1 β и курсовое лечебное применение Г-КСФ в значительно большей степени, чем изолированное применение Г-КСФ увеличивает выживаемость и среднюю продолжительность жизни крыс, облученных в дозе СД_{95-100/30}, снижает выраженность падения числа лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, способствует более быстрому восстановлению количества миелокариоцитов в костном мозге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халимов, Ю.Ш. Современные возможности оказания терапевтической помощи при возникновении массовых санитарных потерь радиационного профиля / Ю.Ш. Халимов, А.Н. Гребенюк, М.А. Карамуллин, С.Ю. Матвеев, А.Н. Власенко // Военно-медицинский журнал. – 2012. – Т. 333, № 2. – С. 24-32.
2. Легеза, В.И. Цитокины как средства ранней патогенетической терапии радиационных поражений. Эффективность и механизм действия / В.И. Легеза, Н.Г. Чigareва, Ю.А. Абдуль, И.Ш. Галеев // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2000. - Т. 40, № 4. - С. 420-424.
3. Гребенюк, А.Н. Противолучевые свойства интерлейкина-1 / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза. – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2012.- 216с.
4. Васин, М.В. Противолучевые лекарственные средства / М.В. Васин. - М.: ГИУВ МО РФ, 2010.- 180 с.
5. Casparetto C. Effects of interleukin-1 on hematopoietic progenitor. Evidence of stimulatory and inhibitory activities in a primate model / C. Casparetto, J. Laver, M. Abdoud // Blood. - 1989. - Vol. 74, № 2. - P. 547-550.
6. Fliedner, T.M. Manual on the Acute Radiation Syndrome / T.M. Fliedner, I. Friesecke, K. Beyrer et al. // Medical Management of Radiation Accidents: Management of the Acute Radiation Syndrome. – 2001. - P. 1-66.
7. Moore, M.A. Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: In vivo stimulation of stem-cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice / M.A. Moore, D.J. Warren // Cell Biology. – 1987. – Vol. 84. – P. 7134-7138.
8. Waselenko, J.K. Medical Management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group / J.K. Waselenko, T.J. MacVittie, W.F. Blakely et al. // Clinical Guidelines. – 2004. – Vol. 140, № 12. – P. 1037-1053.
9. Рождественский, Л.М. Применение рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β (Беталейкина) для экстренной терапии острой лучевой болезни тяжелой степени у собак / Л.М.

Рождественский, Э.П. Коровкина, Ю.Б. Дешевой // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48, № 2. – С. 185-194.

10. Цитокины. Экспериментальное и клиническое изучение в качестве средств терапии радиационных поражений: Метод. указания / ФУ «Мед- биоэкстрем» МЗ РФ, ГВМУ МО РФ. - М., 2001. - 16 с.

11. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. – СПб: Фолиант, 2011. – 480 с.

12. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica – М.: МедиаСфера.- 2002.- 312 С.