

СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 С ЦИСТАМИНОМ И НАФАЗОЛИНОМ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ РАДИАЦИОННО- ТЕРМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ

*Иванченко А.В.^{1,2}, Карамуллин М.А.¹, Баширин В.А.¹, Драчев И.С.², Ремизов Д.В.²,
Тихомиров П.В.²*

*¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства
обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, 194044, г. Санкт-Петербург,
ул. Академика Лебедева, д. 6,
тел. 8 (812) 292-34-82*

*² ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург,
Россия,
195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4.*

Резюме. Целью работы явилось изучение особенностей применения интерлейкина-2 (ИЛ-2) совместно с радиопротекторами в условиях комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП). В работе использованы белые беспородные мыши-самцы, массой 18–20 г. Лабораторных животных подвергали общему относительно равномерному однократному облучению γ -квантами на установке ИГУР-1 (^{137}Cs) в дозе ЛД_{50/30} (мощность 0,998 Гр/мин). Сразу после облучения, животным наносили термический ожог. Моделирование термического компонента комбинированных повреждений осуществляли путем кратковременного воздействия на область спины животного сосуда с горячей водой (плюс 95 °С). В результате формировался ожог III-A степени и размером 10 % площади поверхности кожи. Экспериментальным животным вводили следующие препараты: нафазолин (внутрибрюшинно 5 мг/кг за 15 мин до облучения), цистамин (внутрибрюшинно 200 мг/кг за 30–40 мин до облучения), ИЛ-2 (подкожно 250 000 МЕ/кг за 24 ч или через 1 ч после облучения). Об эффективности препаратов судили по изменениям показателей, характеризующих тяжесть течения и исход КРТП, а также срокам окончательного заживления ожогов. В результате исследования показано, что введение ИЛ-2 через 1 ч после облучения повышает выживаемость животных с КРТП на 30 % при изолированном применении и на 40–50 % — при сочетанном применении с радиопротектором. Введение ИЛ-2 способствует сокращению сроков заживления ожогов при КРТП. В случае применения радиопротектора до облучения, а ИЛ-2 после нанесения ожогов срок заживления сокращался на 4–11 сут.

Ключевые слова: комбинированные радиационно-термические поражения, интерлейкин-2, нафазолин, цистамин, ионизирующее излучение, ожог

THE COMBINED APPLICATION OF INTERLEUKIN-2 WITH CYSTAMINE AND NAPHAZOLINE IN COMBINED RADIATION-THERMAL INJURY

Ivanchenko A.V.¹, Karamullin M.A.¹, Basharin V.A.¹, Drachev I.S.², Remizov D.V.², Tikhomirov P.V.²

¹ *Military Medical Academy. S.M. Kirov, St. Petersburg 194044, St. Petersburg, st.Akademica Lebedeva, 6., tel. 8 (812) 292-34-82*

² *Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military Medicine" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg 195043, St. Petersburg, st. Lesoparkovaya, 4.*

Abstract.

The purpose of this work was to study the effectiveness of the joint use of interleukin-2 with emergency antiradiation agents in conditions of combined radiation-thermal injury (CRTI). The work used white non-fertile male mice weighing 18–20 g. Laboratory animals were subjected to the general rather uniform single radiation in γ -quanta on IGUR-1 installation (137Cs) at the dose LD_{50/30} (0.998 Gr / min). Immediately after irradiation, the animals were subjected to a thermal burn. The thermal component of the lesions was simulated in accordance with the guidelines by short-term exposure of the back of animal water to 95°C temperature. Burn depth - to fascia *m. panniculus carnosus*, the burn area was 10% of the skin area.

The experimental animals were injected the following substance: naphazoline (intraperitoneally 5 mg / kg 15 mins before irradiation), cystamine (intraperitoneally 200 mg / kg 30-40 min before irradiation), IL-2 (subcutaneously 250,000 IU / kg 24 h or 1 h after irradiation). The effectiveness of drugs was judged by changes in indicators, characterizing the severity of the course and outcome of CRTI, as well as the timing of the final healing of burns. As a result of the study, it was shown that the introduction of IL-2 1 h after irradiation increases the survival rate of animals with CRTI by 30% when used alone and by 40–50% when combined with a radioprotective agent. Introduction of IL-2 helps to shorten the healing time of burns with CRTI. In the case of using a radioprotector before irradiation, and IL-2 after application of burns, the healing period was reduced by 4–11 days.

Keywords: combined radiation and thermal injury, interleukin-2, naphazoline, cystamine

Введение.

К настоящему времени разработан широкий спектр фармакологических средств и методов лечения комбинированных радиационно-термических поражений (КРТП). Вместе с тем, используемые лекарственные вещества не в полной мере соответствуют современным требованиям по безопасности и эффективности [1].

Механизм действия большинства известных противолучевых средств реализуются через клеточные и гуморальные факторы гемо- и иммунопоза. Их активация способствует восстановлению костномозгового кроветворения и иммуногенеза у пораженных [2–4], что в свою очередь приводит к повышению функциональной активности систем организма, определяющих характер течения и исход КРТП. Повышение неспецифической резистентности организма, в том числе и радиорезистентности [4, 5] является одним из путей целенаправленного воздействия на гемопоэз и систему иммунитета при профилактике и лечении многих патологических состояний [6–8].

Известно, что при значительном снижении количества циркулирующих иммунокомпетентных клеток крови в период разгара острой лучевой болезни, применение лекарственных средств на основе цитокинов способствует сохранению функционирования основных систем организма и ускорению процессов регенерации в самой системе кроветворения [9–11].

Цель исследования

Целью настоящей работы явилась оценка перспектив совместного применения интерлейкина-2 с радиопротекторами в условиях комбинированного радиационно-термического поражения.

Для решения этой цели было необходимо, во-первых, изучить влияния совместного применения ИЛ-2 с радиопротекторами на тяжесть течения и исход КРТП, а во-вторых, исследовать влияния совместного применения препаратов на репаративные процессы в ожоговой ране.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на белых беспородных мышах-самцах, массой 18–20 г, поступившие из ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» РАМН. Животных содержали на обычном пищевом рационе (полнорационный комбикорм, который соответствовал требованиям ГОСТ Р 50258-92) при свободном доступе к воде. В течение двух недель перед опытом животных выдерживали в карантине.

При работе с экспериментальными животными соблюдали требования приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей

лабораторной практики», «Этического кодекса» (1985), «Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации» (2000).

Лабораторных животных подвергали общему относительно равномерному однократному γ -облучению на установке ИГУР-1 (^{137}Cs) в среднелетальной дозе. Сразу после облучения, животным наносили термический ожог. Моделирование термического компонента КРТП осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями...» [7] путем воздействия на область спины животного в течение 5 с сосуда с горячей водой. Температура жидкости составляла 95 °С [12]. Глубина ожога – до фасции *m. panniculus carnosus*, площадь ожога – 10 % от площади поверхности кожи.

Экспериментальным животным вводили следующие препараты: радиопротектор из группы имидазолинов – нафазолин (Н) или аминотиолов – цистамин (Ц); цитокин – рекомбинантный интерлейкин-2 человека. Нафазолин вводили мышам внутривентрально в дозе 5 мг/кг за 15 мин до облучения. Цистамин – внутривентрально в дозе 200 мг/кг за 30–40 мин до облучения. ИЛ-2 человека – подкожно в дозе 250 000 МЕ/кг. Животным группы контроля вводили дистиллированную воду (ДВ).

Перечень экспериментальных групп, их условное обозначение и схемы применения препаратов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень экспериментальных групп, их условное обозначение и схемы применения интерлейкина-2 и радиопротекторов

Обозначение экспериментальных групп	Вводимые препараты, срок введения по отношению к поражению
Облучение	ДВ за 15 мин
Ожог	ДВ за 15 мин
КРТП	ДВ за 15 мин
Н + КРТП	Н за 15 мин
Ц + КРТП	Ц за 30 мин
ИЛ-2 + КРТП	ИЛ-2 за 24 ч
КРТП + ИЛ-2	ИЛ-2 через 1ч
ИЛ-2 + Ц + КРТП	ИЛ-2 за 24 ч; Ц за 30 мин
Ц + КРТП + ИЛ-2	Ц за 30 мин; ИЛ-2 через 1 ч
ИЛ-2 + Н + КРТП	ИЛ-2 за 24 ч; Н за 15 мин
Н + КРТП + ИЛ-2	Н за 15 мин; ИЛ-2 через 1 ч
Принятые сокращения: КРТП – комбинированное радиационно-термическое поражение, Н – нафазолин, Ц – цистамин, ИЛ-2 – интерлейкин-2, ДВ – дистиллированная вода.	

Об эффективности препаратов судили по изменениям показателей, характеризующих тяжесть течения и исход КРТП:

- выживаемости животных в опытных и контрольных группах (%);
- средней продолжительности жизни павших животных (СПЖ, сут).

Кроме того, в целях изучения влияния ИЛ-2 и радиопротекторов на процессы репаративной регенерации при КРТП, проводили оценку динамики уменьшения площади ожога и сроков окончательного заживления.

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами. Оценку статистической значимости различий между экспериментальными и опытными группами проводили с помощью непараметрических методов (U-критерий Манна-Уитни и критерий знаков). Достоверность различий значений показателя выживаемости между экспериментальными группами определяли при помощи непараметрического критерия Гехана-Вилкоксона. Различия считали достоверными при $P \leq 0,05$ [13].

Результаты исследования и обсуждение полученных результатов

На первом этапе работы было исследовано влияние совместного применения ИЛ-2 с радиопротекторами на тяжесть течения и исход КРТП. В контрольной группе «Облучение» воздействие гамма-излучения вызывало гибель $50 \pm 15,8\%$ животных, а СПЖ составляла $19 \pm 4,6$ сут. Нанесение ожога облучённым животным приводило к утяжелению поражения. В условиях моделирования КРТП летальность мышей возрастала по сравнению с таковой при изолированном поражении и составляла $80 \pm 12,6\%$ при СПЖ – $14,3 \pm 5,9$ сут, что свидетельствует об отягощении поражения за счет дополнительного термического компонента.

Профилактическое применение нафазолина и цистамина позволило существенно увеличить выживаемость животных в группах «Н + КРТП» (до $70 \pm 14,5\%$) и «Ц + КРТП» (до $60 \pm 15,5\%$), при этом не оказывало существенного влияния на СПЖ павших животных (рисунки 1, 3).

ИЛ-2 при профилактическом применении не оказывал существенного влияния на течение и исходы КРТП, способствуя увеличению выживаемости в группе «ИЛ-2 + КРТП» лишь на 10 % (рисунки 1, 3). В то же время, лечебное применение препарата было более эффективным, обеспечивая выживаемость в группе «КРТП + ИЛ-2» 50 % животных (рисунки 2, 4).

Применение ИЛ-2 совместно с радиопротекторами оказывало положительное влияние на исходы комбинированного радиационного поражения. Так, в группах с профилактическим введением цитокина «ИЛ-2 + Ц + КРТП» и «ИЛ-2 + Н + КРТП»

выживаемость составила 60 % (рисунки 1, 3). В случае лечебного применения ИЛ-2 на фоне введения цистамина (группа «Ц + КРТП + ИЛ-2») и нафазолина (группа «Н + КРТП + ИЛ-2») выживаемость экспериментальных животных была 60 % и 70 %, соответственно (рисунки 2, 4).

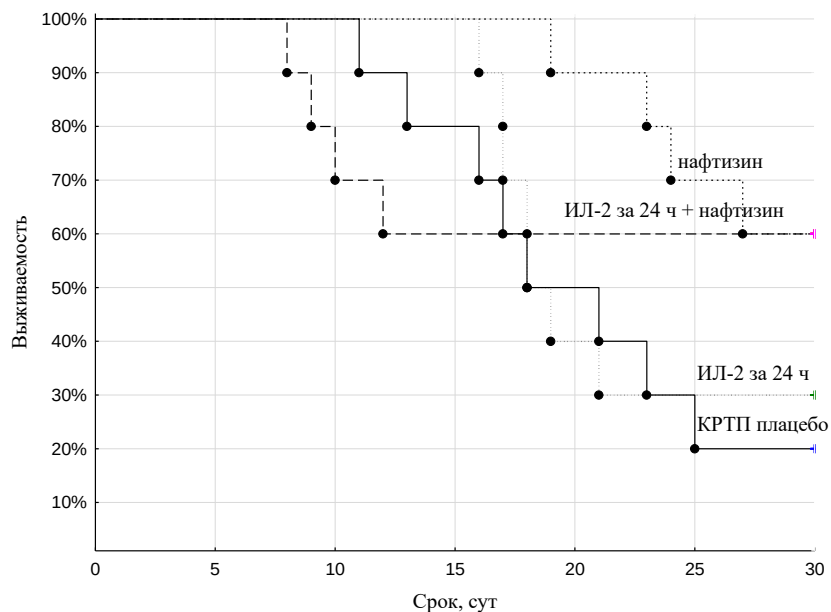


Рисунок 1 – Влияние профилактического введения ИЛ-2 на эффективность нафазолина при комбинированном радиационно-термическом поражении у мышей (n = 10 в каждой группе) по показателю выживаемости

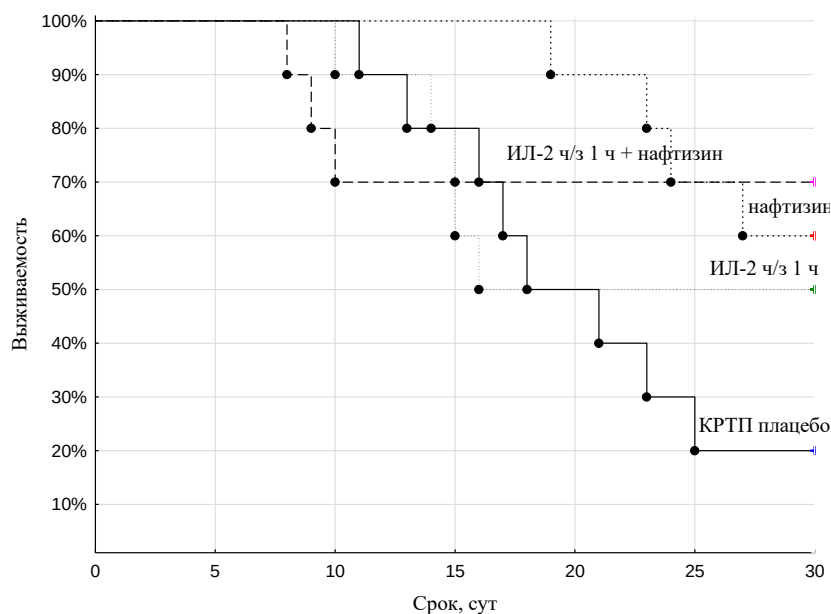


Рисунок 2 – Влияние «лечебного» введения ИЛ-2 на эффективность нафазолина при комбинированном радиационно-термическом поражении у мышей (n = 10 в каждой группе) по показателю выживаемости

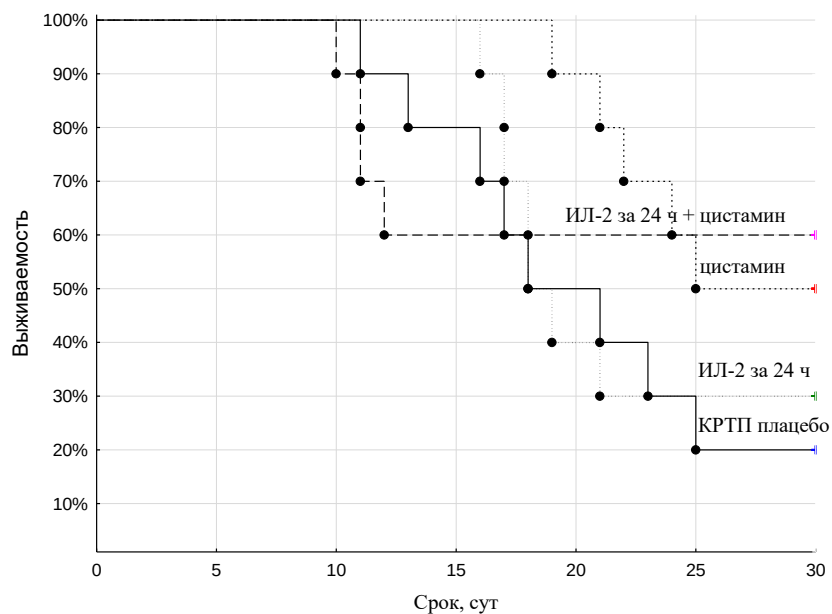


Рисунок 3 – Влияние профилактического введения ИЛ-2 на эффективность цистамина при комбинированном радиационно-термическом поражении у мышей (n = 10 в каждой группе) по показателю выживаемости

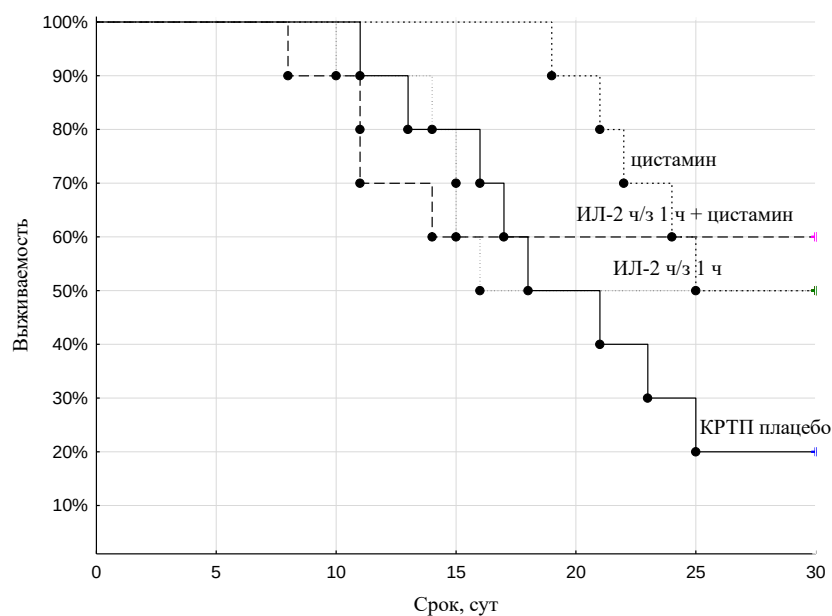


Рисунок 4 – Влияние «лечебного» введения ИЛ-2 на эффективность цистамина при комбинированном радиационно-термическом поражении у мышей (n = 10 в каждой группе) по показателю выживаемости

Полученные результаты применения ИЛ-2 в эксперименте на лабораторных животных демонстрируют перспективность изучения использования цитокина в комплексе лечебных мероприятий при оказании специализированной медицинской помощи

пораженным в случаях возникновения КРТП при аварийных ситуациях на радиационно-опасных объектах.

На следующем этапе работы было исследовано влияние совместного применения ИЛ-2 с радиопротектором на репаративные процессы в ожоговой ране при КРТП. Для этого осуществляли оценку динамики уменьшения площади ожога.

После нанесения мышам термического поражения, на первые сутки появлялись отек и эритема в месте действия термического фактора. В течение 1–2 суток наблюдали развитие участков некроза и формирование струпа правильной округлой формы. Струп выглядел как сухая, плотная, твердая корка коричневого или светло-коричневого цвета. Его границы отчетливо прослеживались уже с 4-х сут после нанесения ожога, а по краям появлялись признаками отторжения в виде шелушения и корочек. В экспериментальных группах площадь ожога изменялась не одинаково. Так, у мышей при нанесении ожога без облучения (экспериментальная группа «Ожог») образование рубцов начиналось на 4 сут раньше, чем в группе с КРТП (экспериментальная группа «КРТП»), при этом время окончательного заживления ожога составило $32 \pm 5,1$ сут. Воздействие гамма-излучения снижало скорость заживления ожога у животных с КРТП, время полного заживления было $52 \pm 7,8$ сут. В острый период радиационного поражения площадь ожога в опытной группе «КРТП» уменьшалась на 18 % медленнее, чем у необлученных мышей с изолированным поражением (экспериментальная группа «Ожог»).

Результаты проведенного исследования показали, что после нанесения мышам термического ожога кожи спины III-A степени как профилактическое, так и лечебное применение ИЛ-2 было эффективно. Площадь ожога в группе «ИЛ-2 + КРТП» уменьшалась на 7 % быстрее, чем в группе «КРТП». При введении цитокина после поражения (экспериментальная группа «КРТП + ИЛ-2») наблюдали заживление, происходившее на 14 % быстрее, чем в группе «КРТП», при этом, срок полного заживления ожога в группе был на 7 сут меньше ($39 \pm 5,7$ сут). Наиболее эффективным оказалось сочетанное применение ИЛ-2 с радиопротекторами, особенно в случае, когда цитокин вводили мышам по «лечебной» схеме – через 1 час после облучения и нанесения ожога (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние ИЛ-2 на эффективность радиопротекторов при комбинированном радиационно-термическом поражении у мышей (n = 10 в каждой группе) по показателю заживления ожога

Экспериментальная группа	Сроки полного заживления ожога, сут
Ожог	32 ± 5,1
КРТП	46 ± 4,8
Н + КРТП	41 ± 5,5
Ц + КРТП	44 ± 6,1
ИЛ-2 + КРТП	40 ± 6,8
КРТП + ИЛ-2	39 ± 5,7
ИЛ-2 + Ц + КРТП	42 ± 4,9
Ц + КРТП + ИЛ-2	38 ± 3,7
ИЛ-2 + Н + КРТП	40 ± 5,9
Н + КРТП + ИЛ-2	35 ± 1,5*
* — различия достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с группой «КРТП»	

Результаты проведенного исследования позволили сделать заключение о перспективности дальнейшего изучения ИЛ-2 в качестве средства медицинской противорадиационной защиты. Введение цитокина улучшало течение и исходы КРТП, а также сокращало сроки заживления ожогов. Дополнительной возможностью по повышению эффективности применения ИЛ-2 при КРТП является его совместное введение с радиопротекторами.

Выводы

1. Применение ИЛ-2 совместно с цистамином или нафазолином оказывало положительное влияние на исход КРТП. Однако, значимых принципиальных различий в радиозащитном действии в зависимости от схемы применения не выявлено.
2. Профилактическое введение ИЛ-2 за 24 ч до КРТП обеспечивало увеличение выживаемости 10 % животных по сравнению с контрольными значениями. Совместное применение ИЛ-2 с радиопротекторами приводило к росту этого показателя на 40 %, по сравнению с контролем.
3. Лечебное применение ИЛ-2 через 1 ч после КРТП способствовало увеличению выживаемости мышей на 30 % по сравнению с группой «КРТП 1». Включение в схему радиопротектора цистамина приводило к росту значения показателя на 40 %, а

нафазолина – на 50 % по сравнению с контролем.

4. Совместное применение ИЛ-2 с радиопротекторами оказывало положительное влияние на скорость репаративных процессов при КРТП. Наиболее эффективным оказалось лечебное применение ИЛ-2 совместно с нафазолином. Данная схема сокращала сроки окончательного заживления термических ожогов облученных мышей на 11 сут по сравнению с группой животных, не получавших препараты.

Таким образом, полученные в эксперименте результаты, демонстрирующие повышение выживаемости мелких лабораторных животных в исследованной модели КРТП и сокращение сроков заживления ожоговой раны при раннем применении препарата ИЛ-2 через 1 ч после комбинированного радиационно-термического воздействия в комплексе с предшествующим применением радиопротекторов, открывают перспективы изучения эффективности препаратов ИЛ-2 в схемах ранней патогенетической терапии КРТП в условиях комбинации с радиозащитными препаратами.

Список литературы

1. Легеза В.И. Комбинированные радиационные поражения и их компоненты // В.И. Легеза, А.Н. Гребенюк, В.В. Бояринцев. – СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2015. – 216 с.
2. Рождественский, Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств / Л.М. Рождественский // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53, вып. 5. – С. 513–520.
3. Рождественский, Л.М. О некоторых существенных вопросах построения теории радиопротекторного действия на организм / Л.М. Рождественский // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т. 34, вып. 1. – С. 121–133.
4. Арлащенко, Н.И. К вопросу о прогнозировании сдвигов в радиорезистентности животных под влиянием различных воздействий / Н.И. Арлащенко, Д.Я. Опарина // Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1981. – № 6. – С. 891–897.
5. Бойко, В.Н. Изучение противолучевой эффективности биологически активных препаратов при различных условиях облучения / В.Н. Бойко // Радиобиология. съезд, Киев, 20–25 сент., 1993 г.: Тез. докл. – Пушкино, 1993. – Т.1. – С. 123–124.
6. Симбирцев, А.С. Итерлейкин-1 и другие цитокины в лечении и профилактике радиационных поражений / А.С. Симбирцев // Материалы конф. «Медицинские аспекты радиационной и химической безопасности». – СПб., 2001. – С.436.
7. Легеза, В.И. Противолучевые свойства цитокинов / Н.Г. Чигарева, И.Ш. Галеев

// Материалы конф. «Медицинские аспекты радиационной и химической безопасности». – СПб., 2001. – С.440.

8. Рождественский, Л.М. Обоснование потенциальной роли интерлейкина-1 β как средства обеспечения экстренной терапевтической помощи при аварийных облучениях человека / Л.М. Рождественский // Материалы конф. «Медицинские аспекты радиационной и химической безопасности». – СПб., 2001. – С.446.

9. Рождественский, Л.М. Цитокины в аспекте патогенеза и терапии острого лучевого поражения / Л.М. Рождественский // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – Т. 37, вып. 4. – С.590–596.

10. Легеза, В.И. Новая классификация профилактических противолучевых средств / В.И. Легеза, В.Г. Владимиров // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1998. – Т.38, № 3 – С.416–425.

11. Васин М.В. Средства профилактики и лечения лучевых поражений. – М.: ВЦМК «Защита», 2001. – 312 с.

12. Методические указания по отбору лекарственных средств и разработке на их основе новых методов лечения комбинированных радиационных поражений – Москва–Обнинск. – 1991. – 14 с.

13. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВМедА. – 2002. – 266 с.

14. Palmer, J.L. Development of a combined radiation and burn injury model / J.L. Palmer, C.R. Deburghgraeve, M.D. Bird, M. Hauer–Kensen, E.J. Kovacs // J. Burn Care Res. – 2011. – № 32(2). – P. 317–323.

References

1. Legeza, V.I. Combined radiation lesions and their components//V.I. Legeza, A.N. Grebenyuk, V.V. Boyarintsev / St. Petersburg: FOLIANT Publishing House LLC, 2015: 216.

2. Rozhdestvensky, L.M. Topical questions of search and research of anti-radiation agents / L.M. Rozhdestvensky // Radiac. Biol. Radioecol. –2013; 53 (5): 513–520.

3. Rozhdestvensky, L.M. On some significant issues of constructing the theory of radio protective action on the body / L.M. Rozhdestvensky // Radiac. Biol. Radioecol. 1994; 34 (1): 121-133.

4. Arlashchenko, N.I. On the issue of predicting shifts in animal radio resistance under the influence of various influences / D.Ya. Oparina, D.Ya. Oparina // Izv. Academy of sciences of the Ser. Biol. 1981; 6: 891–897.

5. Boyko, V.N. Study of the anti-radiation effectiveness of biologically active drugs under various radiation conditions / V.N. Boyko // Radiobiol. Congress, Kiev, 20–25 Sep., 1993; 1: 123-124.
6. Simbirtsev, A.S. Interleukin-1 and other cytokines in the treatment and prevention of radiation lesions / A.S. Simbirtsev // Materials conf. "Medical aspects of radiation and chemical safety." – St. Petersburg. 2001: 436.
7. Legeza, V.I. Radioprotective properties of cytokines / N.G. Chigarev, I.S. Galeev // Materials conf. "Medical aspects of radiation and chemical safety." – St. Petersburg. 2001: 440.
8. Rozhdestvensky L.M. Rationale for the potential role of interleukin $l\beta$ as a means of providing emergency therapeutic care for human emergency radiation / L.M. Rozhdestvensky // Materials conf. "Medical aspects of radiation and chemical safety." – St. Petersburg. 2001: 446.
9. Rozhdestvensky, L.M. Cytokines in the aspect of pathogenesis and therapy of acute radiation lesion / L.M. Rozhdestvensky // Radiac. Biol. Radioecol. 1997; 37 (4): 590-596.
10. Legeza, V.I. New classification of prophylactic anti-radiation agents / V.I. Legeza, V.G. Vladimirov // Radiation. biol. Radioecol. 1998; 38 (3): 416–425.
11. Vasin M.V. Means for the prevention and treatment of radiation injuries. - М.: VTsMK "Zashchita", 2001: 312.
12. Guidelines for the selection of drugs and the development on their basis of new methods of treatment of combined radiation injuries – Moscow-Obninsk. – 1991: 14.
13. Yunkerov, V.I. Mathematical and statistical processing of medical research data / V.I. Yunkerov, S.G. Grigoriev. – SPb.: VMedA. – 2002: 266.
14. Palmer, J.L. Development of a combined radiation and burn injury model / J.L. Palmer, C.R. Deburghgraeve, M.D. Bird, M. Hauer-Kensen, E.J. Kovacs // J. Burn Care Res. 2011; 32 (2): 317–323.