

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АГОНИСТА
ТРОМБОПОЭТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ПРИ
КОСТНОМЗГОВОМ СИНДРОМЕ ЛУЧЕВОЙ ЭТИОЛОГИИ**

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 опытах на собаках, подвергнутых общему относительно равномерному гамма облучению в минимальных абсолютно смертельных дозах, установлено, что совместное курсовое применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора филграстима с элтромбопагом – агонистом тромбопоэтиновых рецепторов, способствует увеличению выживаемости, средней продолжительности жизни, а также более быстрому восстановлению мегакариоцитарного ростка гемопоэза по сравнению с изолированным применением филграстима.

Ключевые слова: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, элтромбопаг, цитокины, острая лучевая болезнь, терапия лучевых поражений

**EXPERIMENTAL STUDYING OF INFLUENCE OF TPO RECEPTOR AGONIST ON
HAEMOSTIMULATING PROPERTIES OF GRANULOCYTE- COLONY-STIMULATING
FACTOR AT THE MARROWY SYNDROME OF THE RADIAL ETIOLOGY**

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

Military Medical Academy named after SM Kirov Defense Ministry

Summary: In experiences on the dogs subjected general uniform scale to the irradiating in minimum absolutely lethal doses, it is positioned that joint course application granulocytic colony stimulated factor of filgrastim with eltrombopag -the TPO receptor agonist, promotes augmentation of survival rate, centre lifetime in comparison with the isolated application of filgrastim and to faster restoration megakaryocyte a hemogenesis sprout.

Keywords: granulocyte- colony-stimulating factor, eltrombopag, cytokine, acute radiation syndrome, therapy of radiation injuries

Введение. В различных сферах жизнедеятельности человека все большее распространение получают источники ионизирующих излучений, в связи с чем повышается вероятность несчастных случаев и аварийных ситуаций, которые будут сопровождаться избыточным облучением населения. Известно, что одной из наиболее радиочувствительных систем организма является система кроветворения. После летального облучения радиационно-индуцированная миелодепрессия приводит

к прогрессирующей нейтропении и тромбоцитопении, которые через 14-28 дней становятся причиной смерти от инфекционных и геморрагических осложнений [1].

Наиболее целесообразным подходом к лечению тяжелого постлучевого костномозгового синдрома является гемостимулирующая терапия, возможности которой существенно расширились с появлением принципиально новых фармакологических средств — гемопоэтических ростовых факторов (ГРФ), относящихся к классу цитокинов — полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия. [2].

В настоящее время в онкологии и гематологии все шире применяются такие ГРФ как филграстим, пегфилграстим, ленограстим и др., являющиеся рекомбинантными препаратами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Лекарственные средства этого ряда характеризуются стимулирующим влиянием на гранулоцитопоз, что используется при лечении миелодепрессий токсической и лучевой этиологии у онкологических больных. В отечественной литературе имеются лишь отрывочные сведения об эффективности клинического применения препаратов этого ряда при радиационных поражениях [3].

Другой ГРФ - рекомбинантный человеческий тромбопоэтин (ТПО), стимулирует мегакариоцитарный росток кроветворения и находит свое применение у онко- и гематологических пациентов, страдающих выраженной тромбоцитопенией. Важным обстоятельством является способность ТПО значительно увеличивать эффективность других ГРФ, в частности, Г-КСФ [4].

В эксперименте отмечены выраженные противолучевые свойства ТПО при введении в самые ранние сроки после острых радиационных поражений, в том числе и в комбинации с Г-КСФ [5]. Однако развитие периферических тромбозов, веноокклюзионных состояний, которые может индуцировать применение рекомбинантного человеческого тромбопоэтина, определяет необходимость поиска других стимуляторов мегакариоцитопоза.

В последнее время появилась новая перспективная группа препаратов – ТПО миметиков, являющихся непептидными агонистами ТПО рецепторов, представленными такими средствами как ромиспластин (амджек) и элтромбопаг (револейд). Механизм их действия реализуется через трансмембранный домен ТПО рецептора с активизацией другого пути транскрипции сигнала, нежели у нативного тромбопоэтина [6]. Отсутствие исследований, посвященных вопросу совместного использования Г-КСФ и агониста ТПО рецепторов и определили актуальность выполнения данной экспериментальной работы.

Цель работы: исследование возможности повышения противолучевой эффективности гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при сочетании последнего с элтромбопагом в ранней патогенетической терапии костномозгового синдрома.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 26 беспородных собаках массой 25 – 30 кг. Животных подвергали общему относительно равномерному гамма-облучению на установке ИГУР-1 при мощности дозы 1,02 Гр/мин.

Течение и исходы радиационного поражения оценивали по 45-ти сут выживаемости лабораторных животных и величине средней продолжительности жизни (СПЖ) животных. Лабораторные методы исследования выполнялись в соответствии со стандартными методиками и

заклучались в определении общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов тромбоцитов и эритроцитов в периферической крови у собак; общего количества миело- и мегакариоцитов в костном мозге.

Препарат Г-КСФ филграстим (торговое наименование «Лейкостим», производство ЗАО «Биокад» Россия) вводили подкожно в дозе 10 мкг/кг/сут. Введение препарата начинали через 1 ч после облучения и продолжали на протяжении 10 сут с интервалом между инъекциями 24 ч [7]. Животным группы контроля подкожно вводили 5 % раствор декстрозы в те же сроки, что и филграстим. Одновременно собакам всех групп проводилась антибиотикотерапия цефтриаксоном, который вводили животным внутримышечно в дозе 1 г 2 раза в сутки, начиная с 7 сут после облучения в течение 15 сут.

Элтромбопаг (торговое наименование – «Револейд» - производитель ГлаксоСмитКляйн, Великобритания) вводили перорально в таблетках по 25 мг 1 раз в сутки через 24 ч после облучения. Терапию препаратом продолжали в течение 7 дней.

Статистическую обработку данных экспериментальных и клинических исследований проводили общепринятыми методами с расчетом среднего значения, ошибки средней и среднего квадратического отклонения, с использованием в зависимости от объема выборки и распределения t-критерия Стьюдента или критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Данные во всех таблицах представлены в виде $X \pm m_x$. [8].

Результаты и их обсуждение. Курсовое применение Г-КСФ повышало выживаемость собак (таблица 1), облученных в минимальной абсолютно смертельной дозе, до 40% (СПЖ павших животных при этом возрастала в 1,8 раза). Включение в схему лечения элтромбопага (ЭТП) способствовало существенному увеличению противолучевых свойств Г-КСФ: выживаемость возрастала до 83%, а СПЖ почти в 2,5 раза по сравнению с контролем. Таким образом, под влиянием ЭТП выживаемость животных, леченых Г-КСФ возрастала в два раза, а СПЖ - почти на 30%.

Таблица 1 – Выживаемость и СПЖ собак, облученных в дозе 3,5 Гр при изолированном назначении Г-КСФ и его сочетании с ЭТП ($X \pm m_x$)

Условия эксперимента	n	Выживаемость	СПЖ, сут	
		абс	%	
Облучение (контроль)	10	0	0 +10	16 ± 1
Г-КСФ	10	4	40 ± 16,3	28 ± 5*
Г-КСФ+ЭТП	6	5	83±16,8	33±9*
*- p<0,05 по сравнению с контролем				

Как изолированное применение Г-КСФ, так и сочетанное использование Г-КСФ и ЭТП в равной степени улучшало картину белой крови у облученных собак (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние Г-КСФ и ЭТП на изменения морфологического состава периферической крови собак, облученных в дозе 3,5 Гр ($X \pm m_x$)

Показатель	Условия эксперимента	n	Количество клеток, $\times 10^{9-12}/л$				
			До облучения	после облучения, сут			
				3	10	15	20
Лейкоциты	Облучение (контроль)	10	13,7 ± 1,4	8,9 ± 0,7	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,3
	Г-КСФ	10	14,5 ± 1,4	13,6 ± 1,3 ¹	4,1 ± 0,8 ¹	2,3 ± 0,3 ¹	2,6 ± 0,8 ¹
	Г-КСФ +ЭТП	6	10,3 ± 1,4	9,8 ± 1,4	3,6 ± 0,6 ¹	2,1 ± 0,4 ¹	2,4 ± 0,6 ¹
Нейтрофилы	Облучение (контроль)	10	9,0 ± 0,7	5,2 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	Г-КСФ	10	10,2 ± 3,0	8,5 ± 1,3 ¹	2,5 ± 0,5 ¹	1,7 ± 0,2 ¹	1,9 ± 0,2 ¹
	Г-КСФ +ЭТП	6	9,5 ± 1,8	7,4 ± 1,4 ¹	2,7 ± 0,6 ¹	1,8 ± 0,1 ¹	1,7 ± 0,3 ¹
Лимфоциты	Облучение (контроль)	10	4,3 ± 0,6	3,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	Г-КСФ	10	3,5 ± 0,4	4,5 ± 0,3 ¹	1,0 ± 0,2 ¹	0,6 ± 0,1 ¹	1,1 ± 0,2 ¹
	Г-КСФ +ЭТП	6	2,9 ± 0,6	3,1 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1 ¹	0,7 ± 0,3 ¹
Эритроциты	Облучение (контроль)	10	8,3 ± 0,3	7,3 ± 0,3	6,4 ± 0,4	6,2 ± 0,8	5,9 ± 0,4
	Г-КСФ	10	8,0 ± 0,4	8,1 ± 0,5	6,9 ± 0,3	6,1 ± 0,5	6,0 ± 0,3
	Г-КСФ +ЭТП	6	7,9 ± 0,3	7,1 ± 0,5	6,0 ± 0,2	5,9 ± 0,5	5,6 ± 0,4
Тромбоциты	Облучение (контроль)	10	253 ± 15	190 ± 13	24 ± 3	13 ± 3	7 ± 2
	Г-КСФ	10	249 ± 31	195 ± 12	25 ± 5	15 ± 2	6 ± 2
	Г-КСФ +ЭТП	6	220 ± 19	224 ± 25	44 ± 8 ^{1,2}	32 ± 8 ^{1,2}	20 ± 5 ^{1,2}
¹ - p < 0,05 по сравнению с контролем ; ² - p < 0,05 по сравнению с Г-КСФ							

За период наблюдения достоверных отличий между опытными группами по влиянию на динамику количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и эритроцитов обнаружено не было. В то же время у животных в группе «Г-КСФ+ЭТП», начиная с 10 сут после облучения уровень тромбоцитов статистически значимо превышал аналогичные значения у контрольных животных и группы с изолированным применением Г-КСФ. К 15 сут после облучения собак количество тромбоцитов в группе «Г-КСФ+ЭТП» в 2 раза превышало среднее число тромбоцитов в контрольной группе и в группе Г-КСФ, а к 20 сут после облучения - уже в 3 раза.

Исследование влияния изучаемых препаратов на клеточный состав костного мозга собак показало, что как изолированное, так и применение его в сочетании с ЭТП оказывало выраженное влияние на количество миелокарицитов в костном мозге у облученных животных. По выраженности

стимулирующего воздействия сочетанное использование этих препаратов не имело статистически значимых отличий от изолированного введения Г-КСФ (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние Г-КСФ на количество миелокариоцитов и мегакариоцитов в костном мозге собак, облученных в дозе 3,5 Гр ($X \pm m_x$, $n=10$)

Показатель	Условия эксперимента	n	Количество клеток, $n \times 10^9/л$				
			До облучения	после облучения, сут			
				3	10	15	20
Миелокариоциты	Облучение (контроль)	10	217,5±22,4	9,1±1,3	3,9±0,5	2,0±0,4	17,8±16,5
	Г-КСФ	10	230,2±28,5	13,5±1,6*	7,1±1,9*	8,5±1,5*	60,0±18,2*
	Г-КСФ + ЭТП	6	188±18,4	12,1±2,5*	5,7±0,8*	8,8±1,1*	56 ±11,8*
Мегакариоциты	Облучение (контроль)	10	0,03±0,009	0,002±0,002	0+10	0+10	0+10
	Г-КСФ	10	0,052±0,012	0,004±0,002	0+10	0+10	0+10
	Г-КСФ + ЭТП	6	0,06±0,008	0,01±0,004	0,002±0,001	0+6	0,03±0,004
*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем							

Иная картина имела место во влиянии на динамику количества мегакариоцитов в костном мозге облученных собак. Так, если у животных группы контроля и в группе, подвергавшейся терапии Г-КСФ, отмечалось резкое падение числа клеток с 3 сут наблюдения, то в группе, где осуществлялось комплексное лечение с применением ЭТП, уровень мегакариоцитов в костном мозге животных в эти сроки превышал аналогичные показатели в других группах в 2,5 раза. Сочетанное использование Г-КСФ и элтромбопага характеризовалось положительным влиянием на количество миелокариоцитов в костном мозге у облученных животных.

Таким образом, добавление в схему комплексной терапии костномозгового синдрома элтромбопага существенно повышало выживаемость животных, оказывало позитивное влияние на динамику количества тромбоцитов в периферической крови и мегакариоцитов в костном мозге облученных собак.

В свете полученных данных можно с полным основанием предполагать, что увеличение выживаемости облученных собак, леченых Г-КСФ, под влиянием элтромбопага обусловлено положительным влиянием последнего на мегакариопоэз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dainiak N. First Global Consensus for Evidence-Based Management of the Hematopoietic Syndrome Resulting From Exposure to Ionizing Radiation / N. Dainiak, R.N. Gent, C. Zhanat et al. // *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*. – 2011. - № 10. – P. 1-11.
2. Heslet L. Acute radiation syndrome (ARS) – treatment of the reduced host defense / L. Heslet, C. Bay, S. Nepper-Christensen et al. // *International Journal of General Medicine*. – 2012. – Vol. 5. – P. 105-115.
3. Гребенюк А.Н., Зацепин В.В., Назаров В.Б., Власенко Т.Н. Современные возможности медикаментозной профилактики и ранней терапии радиационных поражений // *Воен.-мед. журн.* - 2011. - Т. 332, № 2. - С. 13-17.
4. DiCarlo A. L., Poncz M., Cassatt D. R. et al. Medical Countermeasures for Platelet Regeneration after Radiation Exposure. // *Radiation Research*. -2011.- Vol. 176 №1.- P.e0001-e0015.
5. Neelis K.J., Dubbelman Y.D., Qingliang L. et al. Simultaneous administration of TPO and G-CSF after cytoreductive treatment of rhesus monkeys prevents thrombocytopenia, accelerates platelet and reconstitution, alleviates neutropenia, and promotes the recovery of immature bone marrow cells // *Exp. Hematol.* - 1997. - Vol. 25. - P. 1084-1093.
6. Satiamitra M., Lombardini E., Graves J. et al. A TPO receptor agonist, ALXN4100TPO, mitigates radiation-induced lethality and stimulates hematopoiesis in 2F1mice // *Radiat. Res.* 2011, Vol. 175, P. 746-758.
7. 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.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica – М.: МедиаСфера.- 2002.- 312 С.