

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616-03:615:599.323.4:57.084.1:539.1.047

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛГРАМОСТИМА
ПРИ ОСТРОМ РАДИАЦИОННОМ ПОРАЖЕНИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© 2023 г. А. Ю. Кондаков^{1,*}, И. С. Драчёв¹, Д. В. Ремизов¹, М. А. Карамуллин¹,
П. В. Тихомиров¹, Е. Б. Супрунова¹, Е. А. Якунчикова¹, О. А. Данилова¹

¹Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: alex_kondakov@list.ru

Поступила в редакцию 23.11.2022 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Цель исследования – изучение специфической активности препарата молграмостим (неостим®) в условиях общего однократного γ -облучения. Оценка противолучевой эффективности проводили, изучая 30-суточную выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) облученных (в дозах 4, 5, 6, 7, 8 Гр) мышей, а также динамику показателей периферической крови, экстрамедуллярного и костномозгового кроветворения. Установлено, что 14-кратное (с интервалом через 12 ч) подкожное введение препарата молграмостим в дозе 5 мкг/кг мышам после облучения в среднелетальной дозе (6 Гр) оказывает выраженное противолучевое действие. Значение фактора изменения дозы (ФИД) при введении препарата в оптимальной дозе составляет 1.16. Применение молграмостима увеличивает выживаемость мышей на 30%, способствует более раннему, по сравнению с облученными животными контрольной группы, восстановлению содержания форменных элементов периферической крови (к 10-м суткам число лейкоцитов было больше на 50%, а количество лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов – на 10%, чем у животных, не получавших препарат), а также увеличению числа эндогенных КОЕ на 30% по сравнению с контролем и количества миелокариоцитов костного мозга в среднем в 1.2 раза.

Ключевые слова: гемопоэз, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ионизирующее излучение, острое радиационное поражение, фактор изменения дозы, эндогенное колониобразование

DOI: 10.31857/S0869803123030098, **EDN:** XZLRWD

Широкое применение источников ионизирующих излучений в промышленности, науке и медицине повышает вероятность возникновения у персонала острого радиационного поражения (ОРП) различной степени тяжести. Для лечения патологических состояний, сопровождающих реализацию эффектов радиационного воздействия, к настоящему времени разработан, апробирован и применяется широкий перечень средств противолучевой терапии различного механизма действия. Наряду с разработкой новых перспективных направлений создания лекарственных препаратов для профилактики и терапии ОРП, интенсивно ведутся работы по оценке возможных направлений совершенствования и развития средств противорадиационной защиты [1–5].

По существующим представлениям патогенетические механизмы действия большинства известных средств раннего лечения ОРП реализуются

через клеточные и гуморальные факторы гемо- и иммунопоэза, активация которых способствует восстановлению костномозгового кроветворения и иммуногенеза, т.е. повышению функциональной активности систем организма, определяющих характер течения и исход радиационного поражения [6–8].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) – гликопротеин, который регулирует пополнение пула нейтрофилов, а продуцируется активированными макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами [9]. Цитокин оказывает стимулирующее действие на пролиферацию кроветворных клеток, созревание моноцитов/макрофагов, кроме того, препятствует радиационно-индуцированному апоптозу. Помимо своей эффективности в системе кроветворения, Г-КСФ также влияет на функционирование других систем в организме млекопитающих, таких

как сердечно-сосудистая или нервная [9]. Как свидетельствуют данные литературы, за прошедшие годы проведен анализ радиомодифицирующего действия Г-КСФ при его введении в широком диапазоне доз в условиях однократного и/или многократного применения как до, так и после радиационного воздействия. Наибольшее число публикаций посвящено колониестимулирующим факторам при многократном курсовом введении. Среди наиболее ранних исследований по оценке радиопротекторных свойств Г-КСФ и рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) при однократном применении следует отметить работу R. Neta и соавт. (1988). В данном исследовании снижения частоты летальных исходов у подопытных облученных животных, которым однократно вводили Г-КСФ и ГМ-КСФ, выявлено не было [10]. В последующем, K.G. Waddick и соавт. (1990, 1991) провели изучение радиомодифицирующих свойств Г-КСФ при введении данного препарата в широком диапазоне доз и при различных вариантах профилактического применения рекомбинантного Г-КСФ человека [11, 12].

Целью настоящей работы стало изучение специфической активности препарата молграмостим (неостим®) в условиях общего однократного γ -облучения. Исследование выполнено в ГНИИИ ВМ МО РФ в соответствии с контрактом и техническим заданием с ООО “Нуклеон”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В работе использовали нелинейных мышей – самцов массой 18–20 г, полученных из ФГУП “Питомник лабораторных животных “Рапполово” НИЦ “Курчатовский институт” (Ленинградская обл.). Животных содержали в условиях вивария не более чем по 10 мышей в клетке. Кормление животных осуществляли 1 раз в сутки с 10.00 до 13.00 ч, доступ животных к стандартному гранулированному полнорационному корму и воде не ограничивали (режим питания – *ad libitum*). Перед проведением эксперимента животные находились под наблюдением не менее 14 сут. После окончания карантина мышей распределяли на группы (по 10 животных) методом рандомизации, больных и ослабленных животных в эксперимент не брали. При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов: Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”, “Этический кодекс” (1985 г.), Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации (2000 г.), рекомендации Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (FELASA) [13].

Моделирование острого радиационного поражения осуществляли в соответствии с Методическими указаниями по экспериментальному и клиническому изучению средств терапии радиационных поражений и медико-биологическими требованиями к этим средствам [14].

Животных подвергали воздействию внешнего острого однократного двустороннего бокового облучения на установке “ИГУР-1” (^{137}Cs) в различном диапазоне доз (4–8 Гр), при мощности дозы 0.998 Гр/мин с фокусным расстоянием 1 м. Распределение поглощенной дозы в теле животного определяли фантомно-дозиметрическим методом. В различных точках фантома результаты измерений по данным дозиметрии различаются не более чем на 10%. Для контроля поглощенной дозы применяли дозиметр ИД-11. Сертификат калибровки поля излучения – RU 01 № 210/168-2020 от 06.07.2020 г., выданный ФГУП “ВНИИМ им. Д.И. Менделеева”. Контрольных и подопытных животных облучали одновременно в утренние часы, помещая их в алюминиевые пеналы (по 24 мыши), при этом каждая особь находилась в индивидуальном отсеке. В случае меньшего количества облучаемых животных пустые ячейки пеналов заполняли парафиновыми фантомами.

В работе использовали препарат молграмостим (неостим®), лиофилизат для приготовления раствора ГМ-КСФ для внутривенного и подкожного введения, 150 мкг (1.67×10^6 МЕ), производитель Сямэнь Амойтоп Биотех Ко. Лтд (НР Китай), поставщик ПАО “Фармсинтез” (Россия). Мышам опытных групп сразу после облучения подкожно в холку в объеме 0.1 мл вводили препарат в различных дозах (1; 2.5; 5 и 10 мкг/кг) в течение 7 сут с интервалом между введениями 12 ч (14 инъекций) согласно инструкции по применению препарата. Животным контрольной группы в те же сроки и в том же объеме вводили 0.9%-ный раствор натрия хлорида.

Специфическую активность препарата молграмостим оценивали по влиянию на выживаемость и СПЖ павших животных. Динамику показателей периферической крови регистрировали с помощью автоматического анализатора Abacus Junior (Австрия) на 3-, 10-, 14-е и 2-е сутки. Кровь из хвостовой вены в количестве 0.2–0.3 мл отбирали в пробирку с ЭДТА-К3 (ООО “МиниМед”). Определение гематологических показателей осуществляли непосредственно после взятия крови.

Влияние молграмостима на костномозговое кроветворение оценивали путем определения числа миелокариоцитов в костном мозге на 9-е сутки после облучения. Костный мозг извлекали из бедренной кости предварительно декапитированных животных. Готовили суспензию клеток, смешивая в пробирке 0.02 мл пунктата с 0.4 мл

Таблица 1. Влияние молграмостима на течение и исходы острого радиационного поражения ($n = 10$, $M \pm m$)
Table 1. Molgramostim effect on the acute radiation injury's course and outcome ($n = 10$, $M \pm m$)

Экспериментальная группа	Доза облучения, Гр	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Контроль	4	100 – 10	>30
	5	80 ± 13	16 ± 3
	6	50 ± 16	14 ± 3
	7	10 ± 9	12 ± 2
	8	0 + 10	7 ± 1
Молграмостим 1 мкг/кг	5	90 ± 9	21 ± 1
	6	70 ± 14	19 ± 2
Молграмостим 2.5 мкг/кг	5	90 ± 9	18 ± 1
	6	70 ± 14	16 ± 3
Молграмостим 5 мкг/кг	4	100–10	>30
	5	90 ± 9	29 ± 1
	6	80 ± 13*	14 ± 2
	7	40 ± 15*	11 ± 2
	8	0 + 10	8 ± 1
Молграмостим 10 мкг/кг	4	100–10	>30
	5	90 ± 9	22 ± 1
	6	40 ± 15	19 ± 3
	7	20 ± 13	13 ± 3
	8	0 + 10	9 ± 3

* Различия достоверны ($p \leq 0.05$) по сравнению с соответствующим показателем группы контроль.

3%-ного раствора ледяной уксусной кислоты. Количество миелокариоцитов определяли под микроскопом в камере Горяева [15, 16].

Для определения колониеобразующей способности стволовых кроветворных клеток костного мозга использовали методику эндогенного колониеобразования. На 9-е сутки после облучения мышей выделяли селезенки, взвешивали, фиксировали в жидкости Буэна и регистрировали число колониеобразующих единиц (КОЕ) [17, 18].

Полученные данные подвергали математической обработке общепринятыми методами вариационной статистики [19, 20]. Достоверность различий при сравнении независимых групп оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Величину ФИД рассчитывали графическим методом путем построения и сравнения прямых регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Радиационное поражение мышей в дозе 4 Гр не вызывало гибели животных. Облучение в диапазоне доз от 5 до 8 Гр характеризовалось развитием ОРП различной степени тяжести от легкой до крайне тяжелой. Наиболее легкое течение лучевого поражения наблюдали при облучении мыш-

шей в дозе 5 Гр. В этом случае выживаемость составляла 80 ± 13%, при величине СПЖ 16 ± 3 сут. Облучение мышей в дозе 6 Гр характеризовалось развитием ОРП средней степени тяжести. Выживаемость мышей снижалась до 50 ± 16%, а величина СПЖ до 14 ± 3 сут. Тяжелую степень лучевого поражения наблюдали после облучения животных в дозе 7 Гр. В этом случае наблюдали гибель практически всех облученных животных. Выживаемость составляла 10 ± 9%, а СПЖ – 12 ± 2 сут. Облучение в дозе 8 Гр приводило к развитию ОРП крайне тяжелой степени. Все животные к окончанию опыта погибли, при этом величина СПЖ составляла 7 ± 1 сут (табл. 1).

Применение молграмостима в дозах 1 и 2.5 мкг/кг существенным образом не влияло на течение и исходы ОРП у мышей. Лечебную эффективность препарат начинал оказывать при введении в дозе 5 мкг/кг. Так, введение ГМ-КСФ мышам, облученным в дозе 6 Гр, способствовало предотвращению их гибели. Увеличение дозы облучения приводило к снижению эффективности препарата. Молграмостим в дозе 5 мкг/кг оказался малоэффективным при введении после облучения в дозах 7 и 8 Гр, т.е. в случае лечения ОРП тяжелой и крайне тяжелой степени. Дальнейшее увеличение дозы препарата до 10 мкг/кг не приводило к усилению эффекта. Значения выживаемости

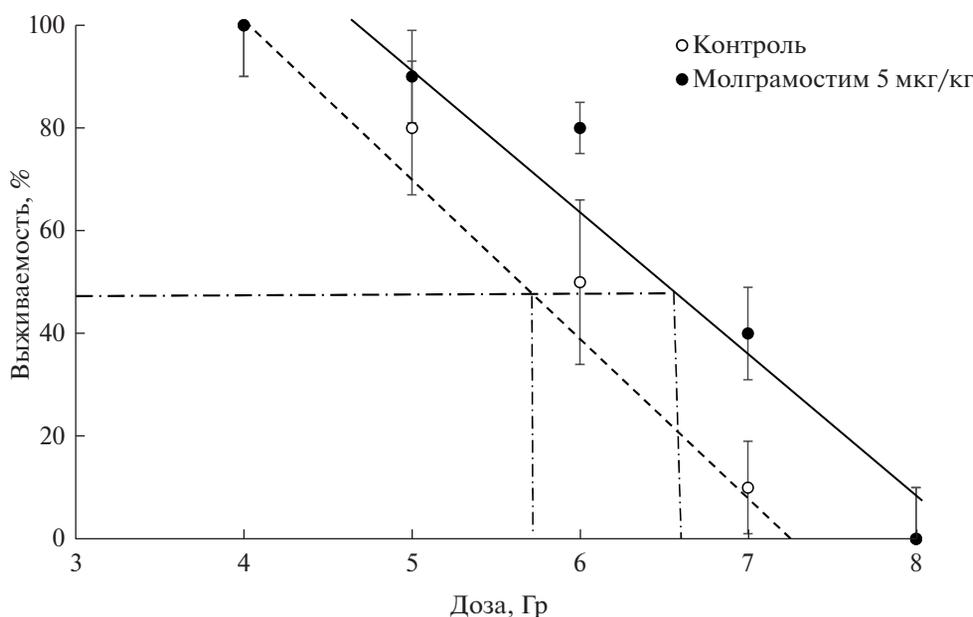


Рис. 1. Влияние молграмостима на выживаемость мышей, облученных в различных дозах ($n = 10$, $M \pm m$).
Fig. 1. Molgramostim effect on the survival rate of mice exposed to different doses ($n = 10$, $M \pm m$).

мости и СПЖ облученных животных при введении препарата в этой дозе существенно не отличались от соответствующих показателей контрольной группы, а гибель мышей происходила на фоне истощения животных. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что оптимальной оказалась доза молграмостима — 5 мкг/кг, которая обеспечивала выживаемость 80% экспериментальных мышей, облученных в среднелетальной дозе.

Одним из интегральных показателей эффективности противолучевых средств является величина ФИД. Это значение рассчитывается как отношение LD_{50} облучения с применением лекарственного средства к LD_{50} при изолированном воздействии. На основании данных, приведенных в табл. 1, методом пробит-анализа были рассчитаны величины доз облучения, приводящие к гибели 50% животных без введения препарата и при его использовании. У животных контрольной группы расчетная величина LD_{50} составляет 5.83 ± 1.04 Гр. Введение препарата ГМ-КСФ в дозе 5 мкг/кг увеличивает данный показатель до 6.79 ± 1.05 Гр. Таким образом, значение ФИД препарата ГМ-КСФ при введении в оптимальной дозе в опытах на мышах составляет $6.79/5.83 \approx 1.16$ (рис. 1).

Так как наибольшая противолучевая эффективность молграмостима была отмечена при облучении в диапазоне среднелетальных доз, дальнейшее изучение механизмов и особенностей специфического действия препарата проводили в дозе 6 Гр. При изучении численного состава пе-

риферической крови установлено, что облучение мышей в дозе 6 Гр сопровождалось выраженным снижением количества форменных элементов. Как видно из табл. 2, уменьшение количества лейкоцитов и лимфоцитов у облученных мышей происходило уже к 3-м суткам и продолжалось вплоть до 10 сут (в среднем на 87% от фоновых значений). Та же тенденция наблюдалась и при подсчете эритроцитов, однако снижение их количества носило более мягкий характер. Так, в первые 10 сут количество эритроцитов было снижено в среднем на 29% от значений, зарегистрированных у животных до облучения. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, после радиационного воздействия в дозе 6 Гр у мышей уменьшалось и количество тромбоцитов. В первую неделю после поражения их было в среднем на 17% меньше, чем до облучения.

Начиная с 14-х суток отмечали снижение уровня цитопении, вызванной облучением. Так, количество лейкоцитов и лимфоцитов у облученных мышей увеличивалось в 2 раза, эритроцитов — в 1.2 раза, тромбоцитов — 1.1 раза, в сравнении с показателями, зарегистрированными у облученных животных на 3-и сутки. К 21-м суткам происходило дальнейшее восстановление клеточного состава периферической крови, приближаясь к фоновым значениям.

При введении экспериментальным животным препарата ГМ-КСФ количество форменных элементов периферической крови оставалось сниженным в течение первых 3 сут после облучения. Однако уже к 10-м суткам число лейкоцитов

Таблица 2. Влияние применения молграмостима в дозе 5 мкг/кг в течение 7 сут после острого γ -облучения (6 Гр) на динамику показателей периферической крови мышей ($n = 10$, $M \pm m$)
Table 2. Molgramostim effect at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 7 days after acute γ irradiation (6 Gy) on the dynamics of peripheral blood parameters in mice ($n = 10$, $M \pm m$)

Экспериментальная группа	Значение показателя ($M \pm m$)				
	до облучения	3 сут	10 сут	14 сут	21 сут
	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$				
Контроль	21.9 \pm 2.5	2.5 \pm 0.4*	3.0 \pm 0.4*	6.2 \pm 0.2*	17.1 \pm 0.7
Молграмостим		2.5 \pm 0.4*	4.6 \pm 0.7*	8.3 \pm 1.1*	20.1 \pm 1.4
	Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$				
Контроль	15 \pm 2.1	1.8 \pm 0.3*	1.9 \pm 0.3*	4.2 \pm 0.2*	11.8 \pm 1.1
Молграмостим		1.7 \pm 0.3*	2.1 \pm 0.3*	4.6 \pm 0.6*	13.6 \pm 1.1
	Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$				
Контроль	7.3 \pm 0.3	5.2 \pm 0.4*	5.1 \pm 0.4*	6.1 \pm 0.9	7.4 \pm 0.6
Молграмостим		5.3 \pm 0.4*	5.6 \pm 0.3*	6.0 \pm 0.2*	6.6 \pm 0.2
	Гемоглобин, г/л				
Контроль	144.5 \pm 5.7	104.7 \pm 12.1*	107.3 \pm 12.3*	111 \pm 12.9*	105.1 \pm 12.2*
Молграмостим		106.3 \pm 12.8*	120.6 \pm 9.9	130.9 \pm 5.6	137.5 \pm 2.2#
	Гематокрит, %				
Контроль	37 \pm 1.0	28.8 \pm 2.7*	28.1 \pm 2.7*	29.8 \pm 2.9*	31 \pm 1.0*
Молграмостим		28.4 \pm 3.6*	31.7 \pm 1.5*	33.7 \pm 1.1*	35.7 \pm 1.2#
	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$				
Контроль	333.5 \pm 21.3	273.6 \pm 17.3	277.7 \pm 17.4	298.9 \pm 25.8	325.8 \pm 22.1
Молграмостим		280 \pm 21.1	305.2 \pm 20.0	329 \pm 12.5	347.7 \pm 7.7
	Тромбокрит, %				
Контроль	6.9 \pm 0.5	5.9 \pm 0.3	5.9 \pm 0.3	5.4 \pm 0.4*	5.9 \pm 0.3
Молграмостим		5.5 \pm 0.5	6 \pm 0.4	6.4 \pm 0.3	6.6 \pm 0.3
	Гетерогенность тромбоцитов, %				
Контроль	35.5 \pm 1	31 \pm 1.2*	30.6 \pm 1.1*	30.8 \pm 1.4*	32.5 \pm 1.3
Молграмостим		30.9 \pm 1.4*	32.5 \pm 1.5	32.5 \pm 0.8*	35.2 \pm 0.7

* Различия достоверны ($p \leq 0.05$) по сравнению со значениями до облучения;

различия достоверны ($p \leq 0.05$) по сравнению с контрольной группой.

было в 1.5 раза выше, а количество лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов увеличивалось в среднем в 1.1 раза, в сравнении с показателями, зарегистрированными у облученных мышей, не получавших препарат. К 14-м суткам численность клеточного состава периферической крови мышей продолжала увеличиваться и к 21-м суткам исследования значения соответствовали фоновым показателям (табл. 2).

Таким образом, установлено, что введение молграмостима мышам, облученным в дозе 6 Гр, способствует более раннему восстановлению количества форменных элементов периферической крови, по сравнению с животными контрольной группы. Так, начало нормализации содержания форменных элементов периферической крови контрольной группе начиналось на 14-е сутки,

тогда как у животных при введении ГМ-КСФ — на 10-е сутки.

С целью выяснения особенностей механизма специфической активности препарата исследовали влияние молграмостима на показатели экстрамедуллярного и костномозгового кроветворения у облученных животных.

Установлено, что масса селезенки облученных в дозе 6 Гр (“Контроль”) мышей к 10-м суткам уменьшилась в 3 раза по сравнению с группой без радиационного воздействия (“Биоконтроль”). Применение ГМ-КСФ способствовало менее выраженому снижению веса лимфоидного органа (в 2.3 раза, с 162.5 \pm 18.3 мг до 71.1 \pm 8.4 мг). Кроме того, масса селезенки животных, получавших препарат, была в 1.3 раза выше этого показателя в контрольной группе (табл. 3).

Таблица 3. Влияние применения молграмостима в дозе 5 мкг/кг в течение 7 сут после острого γ -облучения (6 Гр) на динамику показателей экстрамедуллярного кроветворения у мышей ($n = 10$, $M \pm m$)

Table 3. Molgramostim effect at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 7 days after acute γ irradiation (6 Gy) on the dynamics of extramedullary hematopoiesis in mice ($n = 10$, $M \pm m$)

Экспериментальная группа	Значение показателя ($M \pm m$)	
	масса селезенки, мг	количество КОЕ, абс. ед.
Биоконтроль	162.5 \pm 18.3	—
Контроль	53.9 \pm 7.2*	5 \pm 1.7
Молграмостим	71.1 \pm 8.4*	7 \pm 1.4

* Различия достоверны ($p \leq 0.05$) по сравнению со значениями до облучения.

Радиозащитный эффект проявляется, в том числе, и в сохранении репродуктивных функций клеток. Одним из показателей репродуктивной активности стволовых кроветворных клеток считается количество эндогенных КОЕ. Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют, что острое радиационное воздействие вызывает гибель стволовых кроветворных клеток и, как следствие, низкое образование КОЕ. У мышей контрольной группы этот показатель составлял 5 ± 1.7 . Применение ГМ-КСФ способствовало увеличению количества эндогенных КОЕ у облученных мышей до 7 ± 1.4 .

При оценке влияния применения ГМ-КСФ на клеточный состав костного мозга облученных мышей установлено, что в ранний период ОРП препарат не оказывает существенного влияния на количество ядросодержащих клеток костного мозга, однако к 21-м суткам значение этого показателя повышалось (табл. 4).

Установлено, что воздействие ионизирующего излучения приводит к значительному снижению количества ядросодержащих клеток костного мозга на протяжении всего срока исследования.

Таблица 4. Влияние применения молграмостима в дозе 5 мкг/кг в течение 7 сут после острого γ -облучения (6 Гр) на динамику показателей костномозгового кроветворения у мышей ($n = 10$, $M \pm m$)

Table 4. Molgramostim effect at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 7 days after acute γ irradiation (6 Gy) on the dynamics of bone marrow hematopoiesis in mice ($n = 10$, $M \pm m$)

Экспериментальная группа	Количество миелокариоцитов ($M \pm m$), $\times 10^6$ на бедро				
	до облучения	после облучения, сут			
		3	10	14	21
Контроль	9.7 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1*	1.9 \pm 0.7*	3.7 \pm 0.7*	6.9 \pm 0.8*
Молграмостим		0.5 \pm 0.1*	2.7 \pm 1.5*	4.1 \pm 0.6*	8.1 \pm 0.9

* Различия достоверны ($p \leq 0.05$) по сравнению со значениями до облучения.

Максимальное снижение показателя было зарегистрировано на 3-и сутки после облучения, количество клеток было в 24 раза ниже, чем у интактных животных ($0.4 \pm 0.1 \times 10^6$ клеток на бедро). В дальнейшие сроки исследования количество миелокариоцитов у облученных мышей постепенно увеличивалось, и к 10-м суткам их число достигало $1.9 \pm 0.7 \times 10^6$, а к 14-м суткам — $3.7 \pm 0.7 \times 10^6$. Однако на 21-е сутки количество ядросодержащих клеток костного мозга оставалось в 1.4 раза ниже, чем у необлученных животных.

Применение ГМ-КСФ способствовало замедлению процессов пострадиационного опустошения костного мозга. К 3-м суткам количество клеток костного мозга было в 1.2 раза выше по сравнению с группой контроль. В последующие сроки у облученных животных под влиянием препарата значение показателя нарастало. Так, к 10-м суткам после облучения число миелокариоцитов увеличилось в 1.4 раза ($2.7 \pm 1.5 \times 10^6$), а на 14-е сутки — в 1.1 раза ($4.1 \pm 0.6 \times 10^6$) по сравнению с данными, полученными у контрольных животных. На 21-е сутки после облучения количество миелокариоцитов костного мозга в группе, получавшей ГМ-КСФ, было в 1.2 раза выше, чем в контроле и составило $8.1 \pm 0.9 \times 10^6$ клеток на бедро, что соответствовало значениям, зарегистрированным до облучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в работе результаты согласуются с имеющимися в литературе сведениями о том, что одним из наиболее перспективных направлений повышения эффективности борьбы с миелодепрессией лучевой этиологии является раннее применение цитокинов, обладающих гематостимулирующим действием, в том числе колоние-стимулирующие факторы, механизм действия которых направлен на стимуляцию восстановления костномозгового кроветворения, преимущественно за счет регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и созревания миелоидных

предшественников нейтрофильных гранулоцитов [8, 21–24].

Подавление функциональной активности системы кроветворения является одним из важнейших звеньев патогенеза лучевого поражения организма и в значительной степени определяющим характер его течения и исход [25, 26].

Как показали проведенные исследования, введение молграмостима в дозах 1 и 2.5 мкг/кг облученным в среднелетальной дозе мышам не оказывало влияние на течение и исходы ОРП. Однако применение препарата в дозе 5 мкг/кг способствовало предотвращению гибели 80% животных с лучевым поражением средней степени тяжести. Увеличение дозы ГМ-КСФ до 10 мкг/кг не оказывало ожидаемого положительного результата и было менее эффективным.

Важно отметить, что введение молграмостима оказывало стимулирующее влияние на регенераторные процессы в кроветворных органах облученных мышей и способствовало ускоренному (в среднем на 4 сут), по сравнению с животными контрольной группы, восстановлению содержания форменных элементов периферической крови. Под влиянием ГМ-КСФ происходило увеличение массы селезенки (в 1.3 раза), усиление репродуктивной активности стволовых кроветворных клеток, учитываемых в количестве эндогенных КОЕ (в 1.4 раза) у лабораторных животных. Кроме того, применение молграмостима способствовало замедлению процессов пострадиационного опустошения костного мозга. В течение всего срока исследования количество миелокарицитов костного мозга в группе облученных животных, получавших препарат, было в среднем в 1.2 раза выше, чем в контроле. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о противолучевых свойствах колониестимулирующих факторов [27–30].

ВЫВОДЫ

1. При облучении мышей в среднелетальной дозе (6 Гр) наиболее оптимальной для терапии ОРП является доза молграмостима – 5 мкг/кг, которая обеспечивает выживаемость животных $80 \pm 13\%$. Значение ФИД препарата при введении в оптимальной дозе составляет 1.16.

2. Введение молграмостима (5 мкг/кг) облученным в дозе 6 Гр мышам способствует более раннему, по сравнению с облученными животными контрольной группы, восстановлению содержания форменных элементов периферической крови (к 10-м суткам число лейкоцитов было больше на 50%, а количество лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов – на 10%, чем у животных, не получавших препарат).

3. Применение молграмостима (5 мкг/кг) у облученных в дозе 6 Гр мышей способствует увеличению количества эндогенных КОЕ на 30% по сравнению с контролем (5 ± 1.7 абс. ед. до 7 ± 1.4 абс. ед. соответственно). При этом в течение всего срока исследования количество миелокарицитов костного мозга в группе облученных животных, получавших препарат, было в среднем в 1.2 раза выше, чем в контроле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Васин М.В.* Противолучевые лекарственные средства. М., 2010. 180 с. [*Vasin M.V.* Protivoluchevye lekarstvennyye sredstva. M., 2010. 180 p. In Russ.]
2. *Гладких В.Д., Баландин Н.В., Башарин В.А. и др.* Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиационных поражений. М.: Комментарий, 2017. 304 с. [*Gladkikh V.D., Balandin N.V., Basharin V.A. et al.* Sostoyaniye i perspektivy razvitiya sredstv profilaktiki i lecheniya radiacionnyh porazhenij. M.: Kommentarij, 2017. 304 p. (In Russ.)]
3. *Гребенюк А.Н., Гладких В.Д.* Современное состояние и перспективы разработки лекарственных средств для профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 132–149. [*Grebenyuk A.N., Gladkikh V.D.* Modern condition and prospects for development of medicines for prevention and early treatment of radiation injures // Radiation Biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 2. P. 132–149. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0869803119020085>
4. *Симбирцев А.С., Кетлинский С.А.* Перспективы использования цитокинов и индукторов синтеза цитокинов в качестве радиозащитных препаратов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 170–176. [*Simbirtsev A.S., Kellinsky S.A.* Perspectives for cytokines and cytokine synthesis inducers as radioprotectors // Radiation Biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 2. P. 170–176. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0869803119020164>
5. *Рождественский Л.М.* Проблема разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 3. С. 279–290. [*Rozhdestvensky L.M.* Difficulties in radiation counter measure preparations development in russia in crisis period: actual approaches searching // Radiation Biology. Radioecology. 2020. V. 60. № 3. P. 279–290. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S086980312003011X>
6. *Владимиров В.Г., Красильников И.И.* Фармакологические механизмы радиозащитного эффекта в условиях целостного организма и перспективы изыскания радиопротекторов // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. № 1. С. 121–133. [*Vladimirov V.G., Krasil'nikov I.I.* Farmakologicheskie mexanizmy radiozashchitnogo ehffekta v usloviyakh tselostnogo organizma i perspektivy izyskaniya radioprotectorov // Radiation Biology. Radioecology. 1994. V. 34. № 1. P. 121–133. (In Russ.)]
7. *Гребенюк А.Н., Легеза В.И.* Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб.: Фолиант, 2012. 216 с.

- [*Grebenyuk A.N., Legeza V.I.* Protivoluchevye svoystva interleukina 1. SPb.: Foliant, 2012. 216 p. (In Russ.)]
8. *Легеца В.И., Чигарева Н.Г., Абдуль Ю.А. и др.* Цитокины как средства ранней патогенетической терапии радиационных поражений. Эффективность и механизм действия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. № 4. С. 420–424. [*Legeza V.I., Chigareva N.G., Abdul Yu.A. et al.* Cytokines as remedies for early pathogenetic therapy of radiation damage efficiency and mechanism // Radiation Biology. Radioecology. 2000. V. 40. № 4. P. 420–424. (In Russ.)]
 9. *Hofer M., Pospisil M., Komárková D. et al.* Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute radiation syndrome: a concise review // *Molecules*. 2014. V. 19. № 4. P. 4770–4778. <https://doi.org/10.3390/molecules19044770>
 10. *Neta R., Oppenheim J.J., Douches S.D.* Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha, granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *J. Immunol.* 1988. V. 140. P. 108–111.
 11. *Uckun F.M., Souza L., Waddick K.G. et al.* In vivo radioprotective effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in lethally irradiated mice // *Blood*. 1990. V. 75. P. 638–645.
 12. *Waddick K.G., Song C.W., Souza L. et al.* Comparative analysis of the in vivo radioprotective effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), recombinant granulocyte-macrophage CSF, and their combination // *Blood*. 1991. V. 77. № 11. P. 2364–2371.
 13. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях // Rus-LASA, НП “Объединение специалистов по работе с лабораторными животными”, рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы. СПб., 2012. 48 с. [Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo parlamenta i soveta evropejskogo soyuza po ohrane zhiivotnyh, ispol'zuemyh v nauchnyh celyah // Rus LASA, NP “Ob'edinenie specialistov po rabote s laboratorny'mi zhiivotny'mi”, rabochaya gruppa po perevodam i izdaniyu tematicheskoy literatury. SPb., 2012. 48 p. (In Russ.)]
 14. Методические указания по экспериментальному и клиническому изучению средств терапии радиационных поражений и медико-биологические требования к этим средствам. Москва: Б.и., 1978. 48 с. [Metodicheskie ukazaniya po eksperimental'nomu i klinicheskomu izucheniyu sredstv terapii radiatsionnykh porazhenii i mediko-biologicheskie trebovaniya k etim sredstvam. Moskva: B.i., 1978. 48 p. (In Russ.)]
 15. *Неменова Ю.М.* Методы лабораторных клинических исследований. М.: Медицина, 1972. 265 с. [*Nemenova Yu.M.* Metody laboratornyh klinicheskikh issledovaniy. M.: Medicina, 1972. 265 p. (In Russ.)]
 16. *Till J.E., McCulloch E.A.* A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // *Radiat. Res.* 1961. V. 14. P. 213–222. <https://doi.org/10.2307/3570892>
 17. Методические рекомендации по вопросам определения численности кровяных клеток колониеобразующих единиц (КОЕ) с помощью тестов экзогенных и эндогенных селезеночных колоний. Обнинск, 1975. 11 с. [Metodicheskie rekomendacii po voprosam opredeleniya chislennosti krovetvornyh kolonieobrazuyushchih edinic (KOE) s pomosh'yu testov e'kzogennyh i e'ndogennyh selezenochnyh kolonij. Obninsk, 1975. 11 p. (In Russ.)]
 18. *Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Бутомо Н.В. и др.* Практикум по военной токсикологии, радиобиологии и медицинской защите / Под ред. А.Н. Гребенюка. СПб.: Фолиант, 2013. 294 с. [*Grebenyuk A.N., Basharin V.A., Butomo N.V. et al.* Praktikum po toksikologii i medicinskoj zashhit / Pod red. A.N. Grebenyuka. Sankt-Peterburg: Foliant, 2013. 294 p. (In Russ.)]
 19. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с. [*Glantz S.* Primer of biostatistics. McGraw-Hill, 1994. 459 p. (In Russ.)]
 20. *Зубов Н.Н., Умаров С.З., Бунин С.А.* Математические методы и модели в фармацевтической науке и практике: руководство для провизоров и руководителей фармацевтических предприятий (организаций). СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. 249 с. [*Zubov N.N., Umarov S.Z., Bunin S.A.* Matematicheskie metody i modeli v farmacevticheskoy nauke i praktike: rukovodstvo dlya provizorov i rukovoditelej farmacevticheskikh predpriyatij (organizacij). SPb.: Izd-vo Politehn. un-ta, 2008. 249 p. (In Russ.)]
 21. *Баранов А.Е., Рождественский Л.М.* Аналитический обзор схем лечения острой лучевой болезни, используемых в эксперименте и клинике // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 3. С. 287–302. [*Baranov A.E., Rozhdestvensky L.M.* The analytical review of schemes of the acute radiation disease treatment used in experiment and in clinic // Radiation Biology. Radioecology. 2008. V. 48. № 3. P. 287–302. (In Russ.)]
 22. *Рождественский Л.М., Щёголева Р.А., Дешевой Ю.Б. и др.* Сравнительная оценка лечебной эффективности разных препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в опытах на облученных мышах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 5. С. 503–509. [*Rozhdestvensky L.M., Schegoleva R.A., Deshevoj Yu.B. et al.* Comparison of different G-CSF treatment effectiveness in experiments on irradiated mice // Radiation Biology. Radioecology. 2012. V. 52. № 5. P. 503–509. (In Russ.)]
 23. *Dainiak N., Gent R.N., Carr Z. et al.* First global consensus for evidence-based management of the hematopoietic syndrome resulting from exposure to ionizing radiation // *Disaster Med. Public Health Prep.* 2011. V. 5. № 3. P. 202–212.
 24. *Hérodin F., Grenier N., Drouet M.* Revisiting therapeutic strategies in radiation casualties // *Exp. Hematol.* 2007. V. 35. P. 28–33.
 25. *Груздев Г.П., Чистопольский А.С., Суворова Л.А.* Радиочувствительность и пострadiационная кинетика мегакариоцитарного ростка костного мозга // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 2. С. 250–263. [*Gruzdev G.P., Chistopol'skij A.S., Suvorova L.A.* Radiosensitivity and postradiation kinetics of megakaryocyte spring of bone marrow (analysis of

- chernobyl disaster consequences) // Radiation Biology. Radioecology. 1996. V. 36. № 2. P. 250–263. (In Russ.)]
26. Рождественский Л.М. Постлучевая репарация стволовых кроветворных клеток в общерадиобиологическом, клиническом, экспериментальном и методическом аспектах // Радиационная биология. Радиационная экология. 1994. Т. 34. № 4–5. С. 520–536. [Rozhdestvensky L.M. Postradiation repair of hemopoietic stem cells in radiobiological clinical experimental and methodical aspect // Radiation Biology. Radioecology. 1994. V. 34. № 4–5. P. 520–536. (In Russ.)]
27. Легеца В.И., Попов А.В., Салухов В.В. и др. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор лейкоцитим – средство патогенетической терапии постлучевого костномозгового синдрома // Вестн. Рос. Воен.-мед. академии. 2010. № 2 (30). С. 135–139. [Legeza V.I., Popov A.V., Saluhov V.V. et al. Granulocyte colony-stimulating factor leukostim as remedy of early pathogenic therapy of the radiation-induced hemato-
- poietic syndrome // Vestnik Ros. Voen.-med. akademii. 2010. № 2 (30). P. 135–139. (In Russ.)]
28. Fushiki M., Ono K., Sasai K. et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on granulocytopenia in mice induced by irradiation // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1990. V. 18. № 2. P. 353–357.
29. Hofer M., Pospisil M., Netkova J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor and drugs elevating extracellular adenosine act additively to enhance the hemopoietic spleen colony formation in irradiated mice // Physiol. Res. 1999. V. 48. № 1. P. 37–42.
30. Patchen M.L., MacVittie T.J., Solberg B.D. et al. Therapeutic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor accelerates hemopoietic regeneration and enhances survival in a murine model of radiation-induced myelosuppression // Int. J. Cell Cloning. 1990. V. 8. № 2. P. 107–122.

Molgramostim Efficiency Trial in Acute Radiation Damage (Experimental Study)

A. Yu. Kondakov^{a,#}, I. S. Drachyov^a, D. V. Remizov^a, M. A. Karamullin^a, P. V. Tihomirov^a,
E. B. Suprunova^a, E. A. Yakunchikova^a, and O. A. Danilova^a

^aState Scientific Research Test Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation,
Saint Petersburg, Russia

[#]E-mail: alex_kondakov@list.ru

The purpose of the study was to study the specific activity of the drug molgramostim (Neostim®) under conditions of a single general γ -irradiation. Evaluation of the anti-radiation efficacy of the conducted studies, studying the 30-day survival rate and life expectancy of irradiated (at doses of 4, 5, 6, 7, 8 Gy) mice, as well as the dynamics of peripheral blood, extramedullary and bone marrow hematopoiesis. It has been established that 14-fold (with an interval of 12 hours) subcutaneous administration of the drug molgramostim at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to mice after irradiation at an average lethal dose (6 Gy) has a pronounced anti-radiation effect. The value of the dose change factor when the drug is administered at the optimal dose is 1.16. The use of molgramostim increases the survival rate of mice by 30%, contributes to an earlier, compared with irradiated animals of the control group, restoration of the content of peripheral blood cells (by day 10, the number of leukocytes was 50% more, and the number of lymphocytes, erythrocytes and platelets – by 10% than in animals that did not receive the drug), as well as an increase in the number of endogenous CFU by 30% compared with the control and the number of bone marrow myelokaryocytes by an average of 1.2 times.

Keywords: hematopoiesis, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, ionizing radiation, acute radiation injury, dose modification factor, endogenous colony formation