

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ВЛИЯНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА РАЗВИТИЕ БЛЕОМИЦИНОВОГО ФИБРОЗА ЛЁГКИХ

Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева, Е. С. Хмелевская, Л. А. Ермолаева, О. В. Першина, Н. Н. Ермакова, И. Э. Степанова, А. М. Резцова, В. А. Крупин, В. Е. Гольдберг, Д. В. Рейхарт, А. М. Дыгай¹

Изучено влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) на развитие блеомицинового фиброза лёгких. Установлено, что Г-КСФ усиливает инфильтрацию интерстиция альвеол и альвеолярных ходов воспалительными клетками (лимфоциты, нейтрофилы, плазматические клетки) и разрастание соединительной ткани в лёгких в условиях интратрахеального введения блеомицина. Одновременно с провоспалительным и профибротическим действием Г-КСФ повышал содержание клеток гранулоцитарного ростка кроветворения в костном мозге и периферической крови, что было связано со стимуляцией костномозговых коммитированных клеток-предшественников гранулоцитопоэза.

Ключевые слова: блеомицин, лёгочная токсичность, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарные клетки-предшественники

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухольевый антибиотик блеомицин нашел широкое применение в терапии герминогенных опухолей, лимфом, плоскоклеточных карцином головы и шеи [6]. Однако использование блеомицина ограничивает лёгочная токсичность: препарат снижает диффузионную способность лёгких, вызывает развитие пневмонита, прогрессирующего до фиброза [3]. Известно, что пожилой возраст, наличие почечной недостаточности, одновременное облучение грудной клетки или проведение кислородотерапии повышают вероятность поражения лёгких. Кроме того, существуют сведения, что гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) способен усиливать побочное действие блеомицина [7]. Однако клиницисты, как правило, не связывают лёгочные осложнения у пациентов с применением препаратов Г-КСФ [8].

В связи с изложенным целью настоящего исследования явилось изучение влияния гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на развитие фиброза лёгких.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 110 2 – 2,5-месячных мышках-самцах линии C57BL/6. Животные 1-й категории, конвенциональные линейные мыши получены из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИ фармакологии СО РАМН

¹ Лаборатория патологической физиологии и экспериментальной терапии (руководитель — акад. РАМН А. М. Дыгай), НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, Томск, пр. Ленина, 3.

(сертификат имеется). Использование животных в экспериментах обосновано и согласовано с Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИ фармакологии СО РАМН.

Фиброз лёгкого моделировали однократным интратрахеальным введением 80 мкг блеомицина (“Блеомицетин”, ОАО “Лэнсфарм”, Россия) в 30 мкл физиологического раствора. Животным первой группы в аналогичных условиях подкожно вводили 200 мкл физиологического раствора (блеомициновый контроль). Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (“Sigma”, США) вводили подкожно через 3 дня после операции в течение последующих 5 дней в дозе 250 мкг/кг/день в 200 мкл физиологического раствора. В качестве фона использовали интактных животных (интактный контроль).

На 7, 14, 21, 28, 40, 60-е сутки после введения блеомицина стандартными гематологическими методами в периферической крови определяли общее количество лейкоцитов и абсолютное содержание их отдельных форм. После этого мышей умерщвляли передозировкой CO₂ и изучали морфологическую картину лёгких, клеточность костного мозга, содержание морфологически распознаваемых клеточных элементов гранулоцитарного и лимфоидного ростков кроветворения [1]. Для гистологического исследования кусочки легких фиксировали в 10 % формалине. По стандартной гистологической методике выполняли проводку материала, заливали объекты исследования в парафиновые блоки, с которых делали гистологические срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону на соединительную ткань [4]. С помощью компьютерного гра-

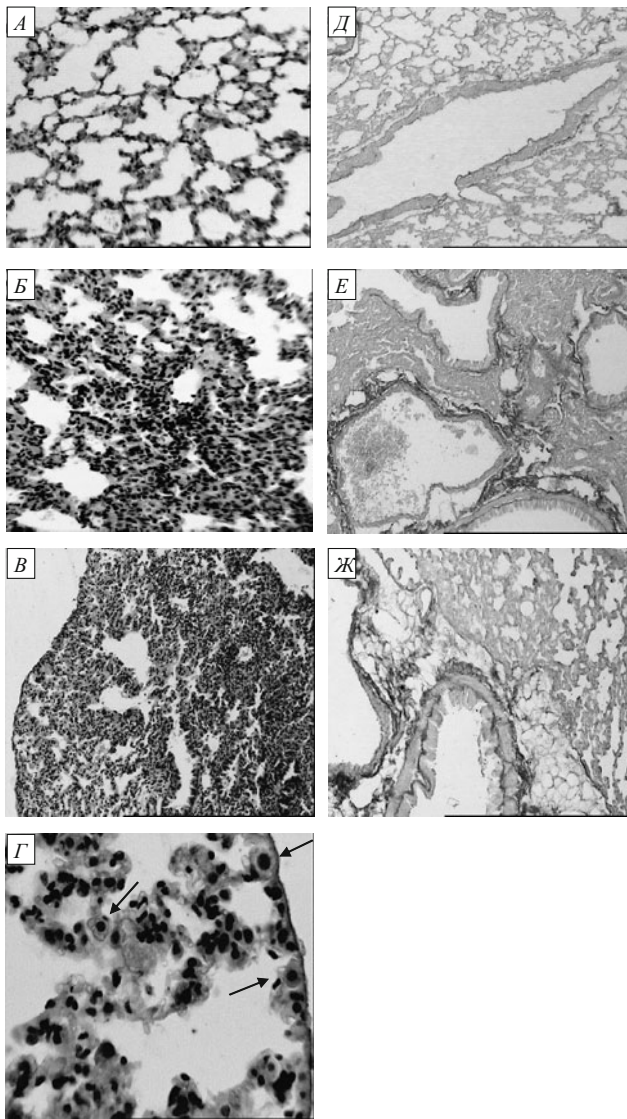


Рис. 1. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 после интратрахеального введения блеомицина и применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

А, Д — легкие контрольной мыши; В, Е — легкие мыши, получавшей блеомицин; В, Г, Ж — легкие мыши, получавшей гранулоцитарный колониестимулирующий фактор на фоне моделирования фиброза легких. А, Б, В — окраска гематоксилином и эозином. $\times 300$. Г — окраска гематоксилином и эозином. $\times 600$, стрелочками показаны макрофаги в просвете альвеол, Д, Е, Ж — окраска пикрофуксином по Ван-Гизону.

фического анализа на стандартной площади гистологического среза измеряли площадь коллагеновых волокон в ткани лёгкого. Затем вычисляли долю этих показателей от стандартной площади среза.

Культуральными методами изучали способность нуклеаров неприлипающей фракции костного мозга образовывать гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные (КОЕ-ГЭММ), гранулоцитарные (КОЕ-Г) колонии. В культуре нуклеаров прилипающей фракции костного мозга исследовали интенсивность роста фибробластных колоний (КОЕ-Ф) [1, 2]. Методом лимитирующих разведений в костном

мозге определяли количество полипотентных кроветворных предшественников, дающих в культуре рост колоний, состоящих из недифференцированных гемопоэтических клеток (КОЕ-Н) [2].

Математическую обработку результатов производили с применением стандартных методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента или непараметрического U-критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интратрахеальное введение блеомицина приводило к развитию токсического альвеолита и фиброза интерстициальной ткани. Так, в утолщенных межальвеолярных перегородках обнаруживались спавшиеся капилляры и расширенные венулы, при этом отмечалась массивная инфильтрация ткани лёгкого лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами и плазматическими клетками (рис. 1). Воспалительный процесс в лёгких сопровождался повышением содержания лимфоцитов (3, 14-е сутки) в периферической крови, количества нейтрофильных гранулоцитов (3, 7, 14, 21, 25-е сутки) — в костном мозге (рис. 2). Кроме того, блеомицин вызывал увеличение количества полипотентных (3, 14-е сутки), гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных (3-и сутки) и гранулоцитарных (3, 7, 14, 21-е сутки) клеток-предшественников в костном мозге (рис. 3).

Начиная с 7-х суток исследования, имело место разрастание соединительной ткани в лёгких, при этом гиперпродукция коллагеновых волокон регистрировалась вплоть до окончания наблюдения — 60-е сутки (таблица). На 40-е сутки картина пневмофиброза была наиболее выраженной. По нашим данным в условиях блеомициновой модели фиброза лёгкого интенсивность роста фибробластных колоний из костномозговых нуклеаров адгезирующей фракции существенно превосходила интактные значения (7-е сутки) (рис. 3).

Содержание соединительной ткани (% от площади ткани) в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях интратрахеального введения блеомицина и применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на фоне моделирования фиброза лёгких ($M \pm m$)

Сроки исследования, сут	Блеомицин	Блеомицин + гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
	Интактный контроль $1,03 \pm 0,20$	
7	$2,18 \pm 0,03^*$	$2,91 \pm 0,05^* \&$
14	$2,54 \pm 0,18^*$	$3,41 \pm 0,08^* \&$
21	$2,67 \pm 0,23^*$	$3,50 \pm 0,14^* \&$
28	$2,46 \pm 0,24^*$	$3,92 \pm 0,63^* \&$
40	$3,58 \pm 0,3^*$	$3,46 \pm 0,26^*$
60	$2,78 \pm 0,25^*$	$3,59 \pm 0,53^*$

* — $\leq 0,05$ — от интактного контроля; & — от блеомицинового контроля.

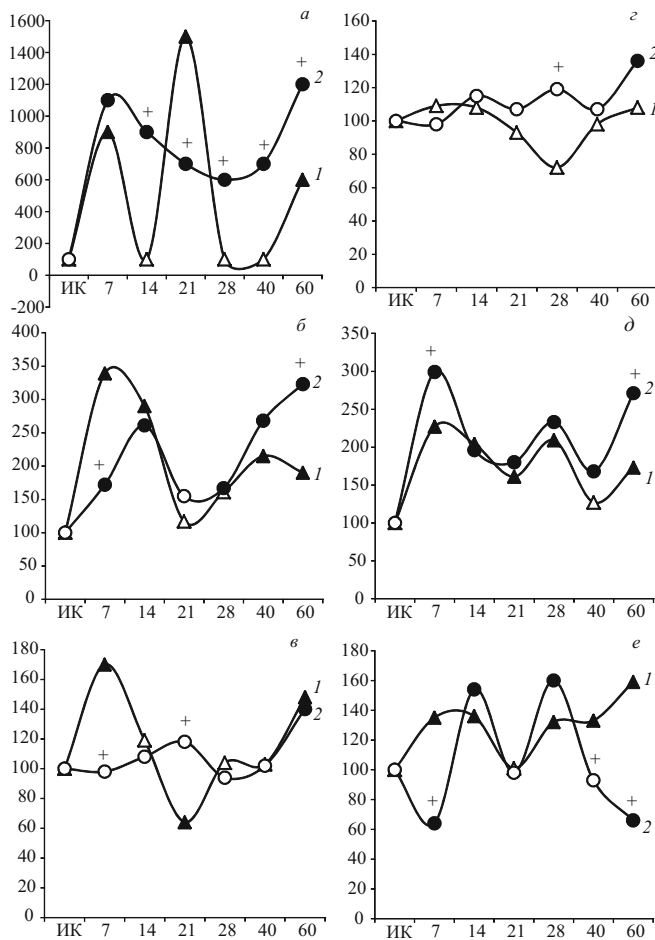


Рис. 2. Содержание палочкоядерных (а) и сегментоядерных (б) нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов (в) в периферической крови, незрелых (с) и зрелых (д) нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов (е) в костном мозге мышей линии C57BL/6 на фоне интратрахеального введения блеомицина (1) и применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (2).

По оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат содержание клеток в % от интактного контроля. Исследуемые группы: 1 — блеомициновый контроль, 2 — применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на фоне интратрахеального введения блеомицина. Закрашенными символами обозначена достоверность различия показателя от его значений в интактном контроле при $p < 0,05$; + — достоверность различия показателя после цитостатического воздействия на фоне введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (2) с таковым в той же модели с физиологическим раствором (1) при

По всей видимости, активация стромальных клеток-предшественников при инсталляции цитостатика носила системный характер.

Таким образом, интратрахеальное введение блеомицина приводит к развитию пневмофиброза, при этом в патологический процесс вовлекаются не только кроветворные предшественники (стволовые и коммитированные), но и клетки мезенхимопоэза.

По существующим представлениям Г-КСФ является линейно-рестриктированным регулятором продукции нейтрофилов и мощным стимулятором терминальной стадии их развития [5]. В наших экспериментах показано, что курсовое введение Г-КСФ усиливает

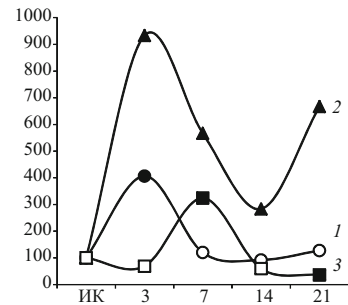


Рис. 3. Содержание КОЕ-ГЭММ (1), КОЕ-Г (2) и КОЕ-Ф (3) в культуре клеток костного мозга мышей линии C57BL/6 на фоне интратрахеального введения блеомицина.

По оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат содержание клеток в % от интактного контроля. Исследуемая группа — блеомициновый контроль. Закрашенным символом обозначена достоверность различия показателя от его значений в интактном контроле при $p < 0,05$.

ло инфильтрацию интерстиция альвеол и альвеолярных ходов воспалительными клетками (преимущественно нейтрофилами), рис. 1. В стенках альвеол животных, получавших ростовой фактор, регистрировалось большее венозное полнокровие по отношению к блеомициновому контролю и кровоизлияния (7, 14-е сутки). Скорость разрастания соединительной ткани в легких под влияние Г-КСФ превышала активность процесса у мышей, получавших один блеомицин (7, 14, 21, 28-е сутки), таблица.

Одновременно с активацией воспалительных процессов и разрастания соединительной ткани в лёгких под влиянием ростового фактора наблюдалось повышение содержания палочкоядерных (14, 28, 40, 60-е сутки) и сегментоядерных (60-е сутки) нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови, незрелых (28-е сутки) и зрелых (7, 60-е сутки) нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге (рис. 2). В то же время количество лимфоцитов в костном мозге (7, 40, 60-е сутки) и периферической крови (7-е сутки) в опытной группе снижалось.

Изучение колониеобразования из коммитированных предшественников при курсовом введении Г-КСФ позволило выявить увеличение интенсивности роста КОЕ-Г на 7-е сутки наблюдения с $5,67 \pm 0,84 \cdot 10^5$ клеток в блеомициновом контроле до $10,12 \pm 1,58 \cdot 10^5$ клеток ($p < 0,05$) в опыте при $1,00 \pm 0,26 \cdot 10^5$ клеток у интактных животных. При этом активность выхода КОЕ-Ф в культуре адгезирующих миелокариоцитов не изменялась. Вероятно, механизмом провоспалительного действия цитокина является стимуляция предшественников гранулоцитопоэза. Как известно Г-КСФ в условиях цитостатической миелосупрессии стимулирует дифференцировку полипотентных кроветворных предшественников в направлении предшественников грануломоноцитопоэза [2]. Подобное развитие событий не исключается и при инсталляции блеомицина.

Итак, Г-КСФ, оказывая стимулирующее действие на гранулоцитарный росток кроветворения, усугубляет течение воспалительной реакции и развитие фиброза лёгких в условиях введения блеомицина. Уменьшение количества лимфоидных элементов в костном мозге и крови на фоне усиления инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов лимфоцитами даёт основание говорить о возможной стимуляции цитокином миграции воспалительных клеток в лёгкие. В связи с этим препараты Г-КСФ следует применять с осторожностью при проведении химиотерапии блеомицином.

ВЫВОДЫ

1. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор усиливает токсическое действие блеомицина на лёгкие: воспаление, разрастание соединительной ткани.

2. В основе профибротического действия колониестимулирующего фактора в условиях введения блеомицина лежит его способность стимулировать комми-

тированные клетки-предшественники гранулоцитопоза и их дифференцировку в зрелые гранулоциты с усилением процессов миграции последних в ткань лёгкого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов, *Методы культуры ткани в гематологии*, Изд-во ТГУ, Томск (1992).
2. А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, О. В. Першина и др., *Бюл. эксперим. биол.*, **148**(4), 400 – 404 (2010).
3. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 15-е изд., Новая волна, Москва (2006).
4. Г. А. Меркулов, *Курс патогистологической техники*, Медицина, СПб (1969).
5. *Руководство по гематологии*, А. И. Воробьева (ред.), Москва (2002).
6. *Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний*, Н. И. Переводчиковой (ред.), Москва (2005).
7. K. I. K. Lei, W. T. Leung, P. J. Johnson, *Br. J. Cancer*, **70**, 1009 – 1013 (1994).
8. G. Rossi, A. Donisi, S. Casari, et al., *Haematologica*, **83**, 317 – 322 (1998).

Поступила 12.09.11

EFFECTS OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR ON EXPERIMENTAL BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS

E. G. Skurikhin, T. V. Andreeva, E. S. Khmelevskaya, L. A. Ermolaeva, O. V. Pershina, N. N. Ermakova, I. E. Stepanova, A. M. Reztsova, V. A. Krupin, V. E. Goldberg, D. V. Reichart, and A. M. Dygai

Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

The influence of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been studied on a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. It is established that G-CSF significantly increases infiltration of alveolar and alveolar duct interstitium by inflammation cells (lymphocytes, neutrophils, plasmocytes) and increases collagen deposition in lung under conditions of bleomycin introduction. Simultaneously with profibrotic and anti-inflammation effects, G-CSF increased the content of granulocyte cells in the bone marrow and peripheral blood, which was related to the stimulation of committed granulocyte precursors in the bone marrow.

Key words: Bleomycin, pulmonary fibrosis, pulmonary toxicity, granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte precursors