

Е.В. Удут, В.В. Жданов, Л.А. Гурьянцева, Е.В. Симанина, А.М. Дыгай,  
Е.Д. Гольдберг

## МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЭРИТРОПОЭТИНА В УСЛОВИЯХ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ МИЕЛОСУПРЕССИИ

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

Изучены механизмы действия препаратов на основе естественного регулятора гемопоэза — эритропоэтина (ЭПО): рекормона, оригинального препарата сверхмалых доз антител к ЭПО (поэтам), таблетированной формы рекомбинантного человеческого ЭПО в условиях миелосупрессии, вызванной введением циклофосфана. Показано, что поэтам и таблетированный ЭПО обладают выраженным стимулирующим влиянием в отношении эритропоэза. Важнейшим эффектом поэтама является стимуляция процессов созревания гемопоэтических клеток, обусловленная изменениями структурно-функциональной организации костного мозга. Активация пролиферации эритрокариоцитов при действии таблеток ЭПО связана с усилением секреции гемопоэтических ростовых факторов прилипающими клетками костного мозга.

**Ключевые слова:** эритропоэз, рекормон, поэтам, таблетированный эритропоэтин

Известно, что одним из тяжелых осложнений токсической миелосупрессии, возникающей в условиях продолжительной химиотерапии, может быть развитие анемического синдрома различной степени выраженности. Применение фармакологических средств, используемых в настоящее время в качестве гемостимуляторов, ограничено в связи с возможностью развития целого ряда отрицательных побочных эффектов [1, 7, 8, 10]. Поэтому актуальной является проблема поиска и рационального применения новых препаратов, стимулирующих восстановление подавленного кроветворения, в частности — эритропоэза. Перспективным подходом в коррекции указанных нарушений считается использование препаратов естественного регулятора гемопоэза — эритропоэтина (ЭПО) [8, 9]. Наряду с хорошо известными инъекционными формами рекомбинантного ЭПО (рекормон, эплекс и др.) [1], существуют новые гемостимуляторы, оригинальный препарат сверхмалых доз антител к ЭПО (поэтам), созданный сотрудниками НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН совместно с НПФ «Материя Медика Холдинг» [7], таблетированная форма рекомбинантного человеческого ЭПО, разрабатываемая совместно с НИИ клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор».

В связи с этим целью настоящей работы явилось сравнительное исследование механизмов

стимулирующего влияния поэтама и таблетированного ЭПО на процессы регенерации костномозгового эритропоэза в условиях цитостатического воздействия.

### Методика исследования

Эксперименты выполнены на модели миелосупрессии, вызванной однократным внутривенным введением мышам линии СВА/СaLac циклофосфана (ЦФ) в максимально переносимой дозе (250 мг/кг). Животные 1 категории, конвенциональные линейные мыши, получены из питомника ГУ НИИФ ТНЦ СО РАМН. После введения цитостатика мыши опытных групп получали рег ос таблетки рекомбинантного человеческого эритропоэтина («Вектор», Новосибирск) по 10 ЕД действующего вещества на мышь (суммарная доза 50 ЕД на мышь), оригинальный препарат сверхмалых доз антител к эритропоэтину (НПФ «Материя Медика Холдинг», Москва) по 0,2 мл/мышь в течение 10 суток, препарат ЭПО Recormon (Швеция). Контрольным животным в аналогичных условиях вводили растворитель (дистиллированную воду) в эквивалентном объеме. На 3-12-е сутки после введения цитостатика определяли показатели периферической крови, костномозгового кроветворения [4], содержание эритроидных клеток-предшественников (КОЕ-Э) в костном мозге, их пролиферативную актив-

ность, интенсивность дифференцировки, структурно-функциональную организацию костного мозга [2], тестировали уровни эритропоэтической активности (ЭПА) в кондиционных средах от прилипающих и неприлипающих элементов гемопоэзиндуцирующего микроокружения и в сыворотке крови [2]. Обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента [5].

### Результаты исследования

Однократное введение циклофосфана в максимально переносимой дозе мышам линии СВА закономерно привело к развитию выраженной гипоплазии костномозгового кроветворения, в том числе глубокой депрессии эритроидного ростка костного мозга. Снижение количества эритрокариоцитов наблюдалось при этом на протяжении всего периода исследования с наиболее низким уровнем их содержания на 3, 4 сутки после введения цитостатика (5,64%, 7,62% от фона) (Рис. 1, В). Минимальное число КОЕ-Э обнаруживалось на 4-е сутки эксперимента (46,64% от фона) (Рис. 2, А). Изменения костномозгового эритропоэза привели к падению числа ретикулоцитов с 3 по 8 сутки в периферической крови (Рис. 1, А).

Введение препарата сравнения рекормона и таблетированного ЭПО приводило к достоверному повышению количества эритрокариоцитов и восстановлению величины данного показателя до исходного уровня к 4-м и 5-м суткам после введения ЦФ с существенным его превышением на 10-е, 12-е сутки опыта. В то же время у животных, получавших поэтам, указанные значения, хотя и с 5-х сут. эксперимента, значительно превышали таковые в контрольной группе, однако не превосходили исходные величины (до опыта) (Рис. 1, В). При активации эритропоэза в костном мозге происходило возрастание числа ретикулоцитов в периферической крови после введения рекормона, таблетированного ЭПО и поэтам по сравнению с контрольной группой на 4-6, 10, 12-е сут; 5-6-е и 8-12-е сут опыта соответственно (Рис. 1, А). Содержание эритроцитов в периферической крови у животных, получавших препараты, оказалось достоверно выше, чем у мышей на фоне введения растворителя, в срок на 6-е сут для поэтам и на 8-е сут для таблеток ЭПО (Рис. 1, Б). Изучение состояния в костном мозге пула коммитированных клеток-предшественников эритропоэза показало, что введение мышам как рекормона, так и таблеток ЭПО достоверно увеличивает выход эритроидных колоний по сравнению с животными, получавшими растворитель, с 3-х суток опыта, в то время как поэтам существенно повышает рост КОЕ-Э лишь на 12-е сут (Рис. 2, А). Таким образом, оба исследуемых препарата обладают

выраженным стимулирующим влиянием в отношении эритропоэза на модели миелосупрессии, вызванной введением циклофосфана. Причем эффект таблетированной формы ЭПО по динамике эритрокариоцитов и КОЕ-Э более схож с препаратом сравнения. Продемонстрированная гемостимулирующая активность послужила основанием для изучения механизмов действия препаратов.

Последующие эксперименты позволили установить, что в основе постцитостатической регенерации гемопоэза при применении таблетированного ЭПО и поэтам лежат различные механизмы. Так, достоверное возрастание пролиферативной активности прекурсоров эритропоэза

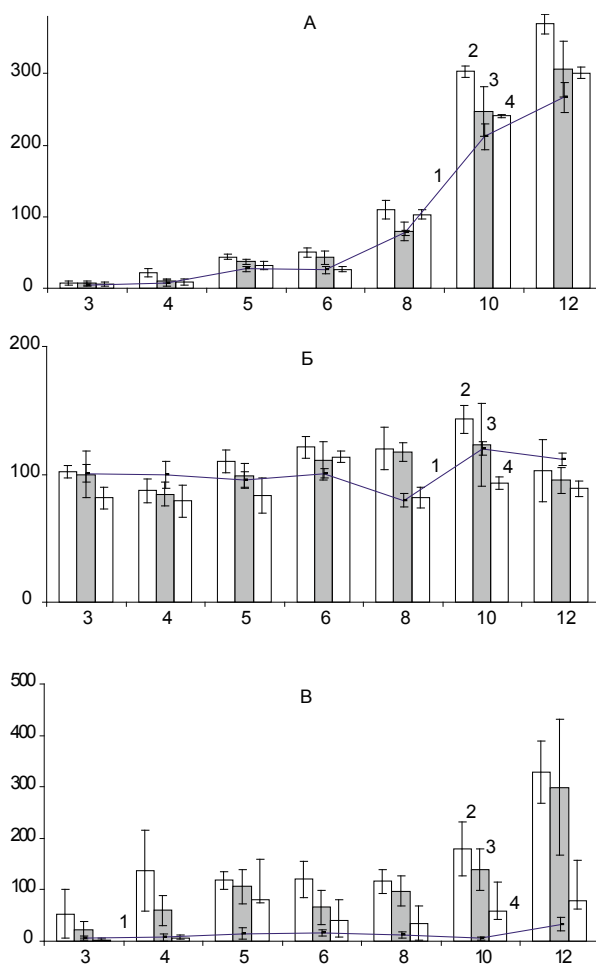


Рис. 1. Динамика содержания ретикулоцитов (А), эритроцитов (Б) в периферической крови, эритрокариоцитов (В) в костном мозге мышей линии СВА/СaLac, получавших циклофосфан в МПД (1), циклофосфан и рекормон (2), циклофосфан и таблетированную форму рекомбинантного человеческого ЭПО (3), циклофосфан и поэтам (4). По оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат — значения показателя (в % от исходного уровня); доверительные интервалы при P=0,05.

на фоне введения цитостатика у мышей, получавших таблетированный ЭПО, было выявлено на 3-6-е сутки эксперимента, а при приеме поэтам — на 3, 5-8-е сут (Рис. 2, Б). В то же время, усиление процессов дифференровки на 3 и 5 сут у мышей, получавших таблетированный ЭПО, хотя и не достигало фоновых значений, предшествовало увеличению клеточности морфологически дифференцируемых эритроидных элементов костного мозга и периферической крови с 4 сут, по сравнению с контрольной группой (Рис. 1, В). Индекс дифференровки в группе с введением поэтам достоверно превосходил контрольные значения на 5-10-е сут и показатели предыдущей опытной группы на 4-10-е сутки (Рис. 2, В). Таким

образом, можно сделать заключение о том, что как стимуляция пролиферативной активности, так и усиление дифференровки эритроидных предшественников играют важную роль в активизирующем влиянии исследуемых препаратов на процессы регенерации костномозгового эритропоэза. Причем таблетированный ЭПО стимулирует созревание эритроидных клеток значительно в меньшей степени, чем препарат сверхмалых доз антител к эритропоэтину, что и лежит в основе отсутствия при применении последнего выраженного накопления числа КОЕ-Э в костном мозге. Логично было предположить, что причиной выявленного феномена являются различия, возникающие в ответ на введение стимуляторов,

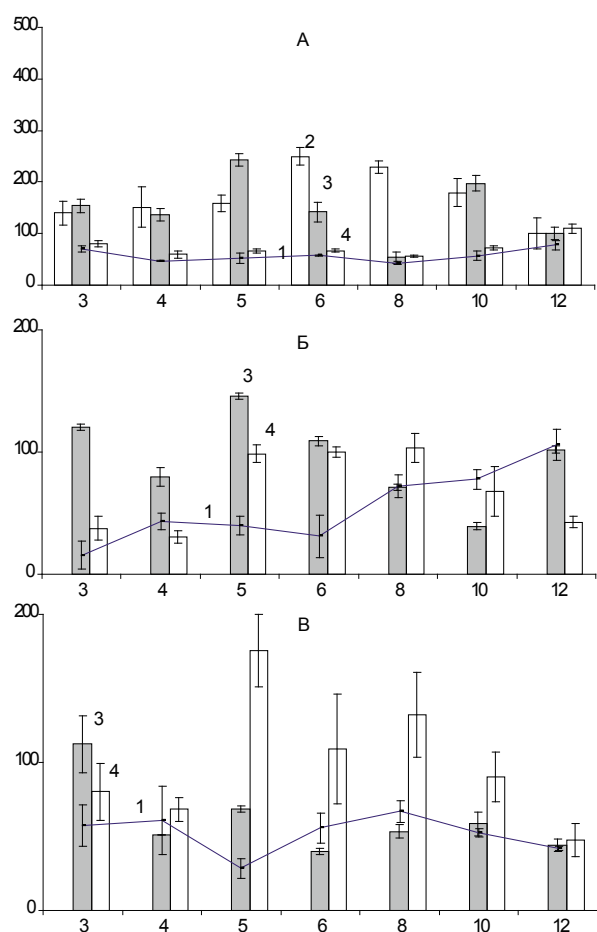


Рис. 2. Динамика содержания КОЕ-Э в костном мозге (А), изменение их пролиферативной активности (Б), динамика интенсивности созревания КОЕ-Э (В) у мышей линии СВА/СаLас, получавших циклофосфан в МПД (1), циклофосфан и рекомбинант (2), циклофосфан и таблетированную форму рекомбинантного человеческого ЭПО (3), циклофосфан и поэтам (4). По оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат — значения показателя (в % от исходного уровня); доверительные интервалы при  $P=0,05$ .

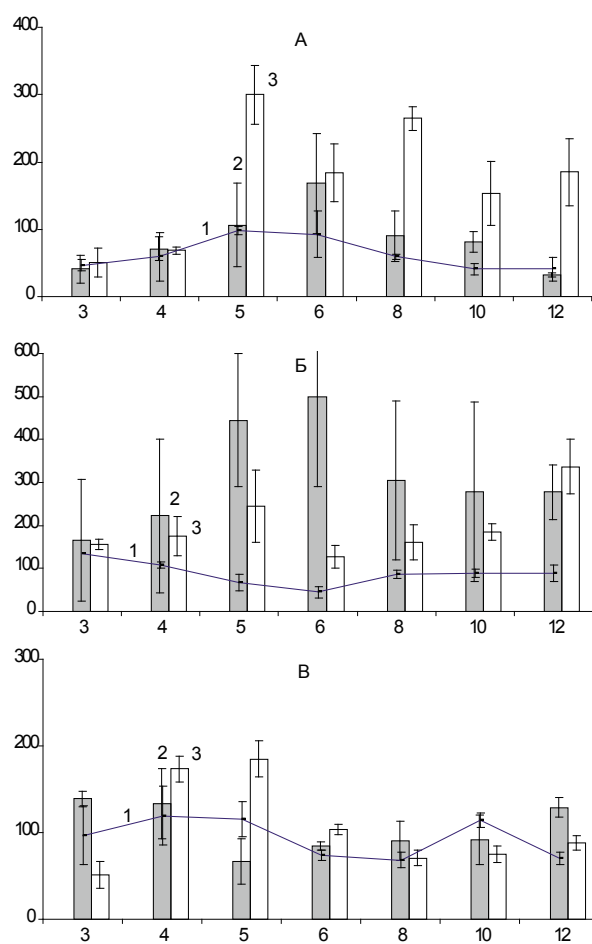


Рис. 3. Динамика содержания эритроидных гемопоэтических островков (А), изменение уровней эритропоэтической активности в супернатантах от адгезирующих миелокариоцитов костного мозга (Б) и сыворотке периферической крови (В) у мышей линии СВА/СаLас, получавших циклофосфан в МПД (1), циклофосфан и таблетированную форму рекомбинантного человеческого ЭПО (3), циклофосфан и поэтам (4). По оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат — значения показателя (в % от исходного уровня); доверительные интервалы при  $P=0,05$ .

со стороны структурно-функциональной организации костного мозга. Действительно, при анализе динамики гемопоэтических островков (ГО), в составе которых, как известно, протекают процессы трансформации кроветворных клеток от коммитированных до зрелых форм [3], у мышей опытных групп наблюдается достоверное возрастание эритроидных ГО лишь при использовании поэтама с 4-х по 12-е сут. (до 299% от исходного на 5 сут.) (Рис. 3, А).

С целью дальнейшего выяснения механизмов стимулирующего влияния исследуемых препаратов на процессы регенерации эритропоэза были исследованы уровни ЭПА в супернатантах костномозговых нуклеаров и сыворотке периферической крови. Результаты проведенных экспериментов показали, что оба исследуемых препарата не вызывают существенных изменений ЭПА в супернатантах от неприлипающих миелокариоцитов. Уровень ЭПА в супернатантах от адгезирующих нуклеаров превосходил значения контрольной группы для обоих препаратов на 5-12-е сут., максимально до 250% от исходного на 12-е сут. для поэтама и до 380 и 456% на 5-е, 6-е сут. для таблеток ЭПО (Рис. 3, Б). Сывороточная эритропоэтическая активность у экспериментальных животных превышала таковую в контрольной группе уже в ранние сроки эксперимента: на 3-и сутки опыта при введении таблетированного ЭПО (до 139%) и на 4-6-е сутки при использовании поэтама (максимально до 184% на 5-е сут) (Рис. 3, В).

Таким образом, таблетированный ЭПО и поэтам в условиях гипоплазии кроветворения, вызванной введением циклофосфана, оказывают стимулирующее влияние на процессы восстановления костномозгового эритропоэза. Важнейшим эффектом оригинального препарата сверхмалых доз антител к ЭПО является стимуляция процессов созревания гемопоэтических клеток, обусловленная изменениями структурно-функциональной организации костного мозга, возникающими в ответ на возрастание концентрации гуморальных факторов регуляции эритропоэза в супернатантах от прилипающих миелокариоцитов костного мозга и в сыворотке периферической крови. Активация пролиферации эритрокариоцитов при действии таблеток ЭПО связана преимущественно с усилением секреции гемопоэтических ростовых факторов адгезирующими элементами костного мозга.

## EFFECTS OF DIFFERENT ERYTHROPOIETIN PREPARATIONS AT CYTOSTATIC MYELOSUPPRESSION

E.V. Udut, V.V. Zhdanov, L.A. Gurjyantseva,  
E.V. Simanina, A.M. Dygai, E.D. Goldberg

It has been studied the effects of preparations on the basis of natural regulator of hematopoiesis — erythropoietin (EPO), such as: recormon, original preparation of ultralow doses of antibodies to erythropoietin (poetam), tablet form of recombinant human EPO at myelosuppression, caused by introduction of cyclophosphanum. It has been shown that poetam and tablet EPO have expressed stimulatory action on erythropoiesis. Stimulation of hemopoietic cell differentiation caused by changes in structural functional organization of a bone marrow is important effect of poetam. Activation of erythrokaryocyte proliferation under the action of tablet EPO is connected with increased secretion of hemopoietic growth factors caused by adhesive cells of a bone marrow.

### Литература

1. Венгеровский, А.И. Лекции по фармакологии для врачей и провизоров / А.И. Венгеровский. — Томск, 2001.
2. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. — Томск, 1992.
3. Гольдберг, Е.Д. Роль гемопоэзинулирующего микроокружения при цитостатических миелосупрессиях / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов. — Томск, 1999.
4. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М., 1987.
5. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М., 1973.
6. Фармакология сверхмалых доз антител к эндogenous регуляторам функций / О.И. Эпштейн, М.Б. Штарк, А.М. Дыгай и др. — М., 2005.
7. Jabs K. Recombinant human erythropoietin therapy in children on dialysis / K. Jabs, W.E. Harmon // Adv. Ren. Replace Ther. — 1996. — Vol. 3. — № 1. — P. 24-36.
8. Jelkmann W. Erythropoietin in the control of red cell production / W. Jelkmann, E. Metzen // Anat. Anz.. — 1996. — Vol. 178. — № 5. — P. 391-403.
9. Singbartl G. Adverse events of erythropoietin in long-term and in acute/short-term treatment / G. Singbartl // Clin. Investig. — 1994. — Vol. 72. — № (6 Suppl.). — P. 36-43.
10. The safety of treatment with recombinant human erythropoietin in clinical use: a review of controlled studies / B. Sowade, O. Sowade, J. Mocks et al. // Int. J. Mol. Med. — 1998. — Vol. 1. — № 2. — P. 303-314