

Р.Ю. Сапожников¹, Ю.Ш. Халимов¹, В.И. Легеза¹,
Р.И. Литвиненко¹, И.С. Драчев²,
С.Ю. Краев², А.С. Симбирцев³

Влияние рекомбинантного флагеллина на систему кроветворения у крыс при остром радиационном поражении

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург

³Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Резюме. В опыте на облученных крысах в динамике изучено влияние профилактического и терапевтического введения рекомбинантного флагеллина на течение и исходы острого радиационного поражения, а также показатели периферической крови. Установлено, что противолучевая активность рекомбинантного флагеллина наиболее эффективно проявляется при профилактическом его введении за 15–30 мин до облучения. Так, при облучении крыс в дозе 6 Гр выживаемость животных контрольной группы к 30-м суткам составила $50 \pm 14\%$, а величина средней продолжительности жизни 23 ± 3 сут. В случае профилактического введения рекомбинантного флагеллина в дозе 100 мкг/кг выживаемость облученных крыс увеличивалась на 33%, а величина средней продолжительности жизни на 5 сут и составила 83 ± 11 и 28 ± 2 сут соответственно. Введение рекомбинантного флагеллина в дозировках 1 и 10 мкг/кг оказалось малоэффективным. При введении рекомбинантного флагеллина после облучения, радиозащитного действия препарата выявить не удалось. Для выяснения механизмов действия рекомбинантного флагеллина исследовано его влияние на показатели периферической крови облученных животных. У животных контрольной группы, облученных в дозе 6 Гр, в периферической крови отмечалась выраженная лейкопения. К 3-м суткам после облучения отмечалось снижение уровня лейкоцитов до $5,1 \times 10^9/\text{л}$. По мере развития гематологического синдрома острого радиационного поражения, лейкопения прогрессировала и к 9-м суткам уровень лейкоцитов составил $3,2 \times 10^9/\text{л}$. На 14-е сутки отмечалось постепенное восстановление пула лейкоцитов, при котором отмечалось увеличение показателя почти в 2 раза по сравнению с 9-ми сутками, что составило $7 \times 10^9/\text{л}$. Восстановление уровня лейкоцитов до референтных значений регистрировали к 25-м суткам, когда их уровень составил $31 \times 10^9/\text{л}$. Все это свидетельствует о том, что введение рекомбинантного флагеллина до облучения в дозировке 100 мкг/кг, оказывает защитное действие на кроветворные клетки и клетки костного мозга облученных крыс в дозе 6 Гр. Полученные результаты подтверждают данные литературы о перспективности проведения дальнейших исследований, направленных на разработку флагеллинсодержащих средств химической защиты от лучевого поражения.

Ключевые слова: рекомбинантный флагеллин, лейкопения, радиозащитная эффективность, острое радиационное поражение, гамма-излучение, выживаемость, профилактическое и терапевтическое введение флагеллинсодержащих средств.

Введение. Широкое использование источников ионизирующих излучений в различных областях жизнедеятельности человека создаёт высокие риски возникновения чрезвычайных ситуаций и поражения людей радиацией. Проблема разработки медицинских средств противорадиационной защиты в таких ситуациях приобретает всё большую актуальность [3]. Кроме того, в связи с расширением применения лучевой терапии в лечении онкологических больных актуальной остаётся проблема защиты тканей, находящихся в зоне лучевого воздействия [6]. Известно значительное число соединений, проявляющих противолучевую активность [2, 3]: средства профилактики радиационных поражений (цистамин, нафизин, препарат «Б-190»), средства стимуляции радиорезистентности организма (рибоксин, дезоксинат, поливитаминные и витаминно-аминокислотные

комплексы), средства ранней и экстренной терапии радиационных поражений (беталейкин), средства профилактики и купирования первичной реакции на облучение (латран), средства лечения острого костномозгового синдрома (амбен, серотонина адипинат, лейкостим, молграммастим) и др. Но большинство радиопротекторов оказывают эффективное действие лишь при их применении в субтоксических дозах [2], что существенно затрудняет их применение.

Сейчас в области радиационной фармакологии значительно возрос интерес к препаратам природного происхождения, одним из которых является белок филаментов бактерий – флагеллин, мощный активатор врождённого и адаптивного иммунитета. Флагеллин является единственным известным естественным лигандом толл-подобных рецепторов 5 типа (*toll-like receptor* – TLR-5), локализованных

на поверхности многих клеток иммунной системы (дендритных, макрофагов, нейтрофилов, Т-клеток) и разных типов эпителиальных клеток [1, 8, 9, 11]. По данным зарубежной и отечественной литературы, имеется множество сообщений о высокой радио-защитной эффективности как полноразмерного белка флагеллина, так и его deletированных форм – рекомбинантного флагеллина (рФЛ) [1, 4]. Одним из перспективных направлений является разработка новых фармакологических средств противорадиационной защиты на основе флагеллина и его производных форм [7, 8, 10, 11].

Цель исследования. В экспериментах на облученных крысах изучить в динамике влияние рФЛ на течение и исходы острого радиационного поражения (ОРП), а также показатели периферической крови.

Материалы и методы. Исследование радио-защитного действия рФЛ проводили в опытах *in vivo* на 84 крысах – самцах массой тела 200–240 г, полученных из питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово» (пос. Рапполово Ленинградской обл.). После поступления из питомника животные в течение 14 сут содержались в карантине, затем были рандомизированы по группам, включающим 12 особей, и до окончания опыта находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Кормление животных проводилось 1 раз в сут в первой половине дня без ограничения доступа к воде. Все манипуляции осуществлялись с соблюдением правил биоэтики при работе с лабораторными животными [5]. Для моделирования ОРП лабораторных животных подвергали однократному относительно равномерному гамма-облучению на установке «ИГУР-1» в дозе 6 Гр, что соответствовало летальной дозе 50% животных за 30-суточный период наблюдения (ЛД_{50/30}). Оценивали течение и исходы ОРП по влиянию на 30-суточную выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) облученных крыс. Для оценки влияния рФЛ на гемопоз облученных животных на 3-и, 9-е, 14-е и 25-е сут после облучения у животных из хвостовой вены забирали периферическую кровь. Общелинейский анализ периферической крови проводили на гемоанализаторе «Abacus Junior». В работе использовали рФЛ, синтезированный с использованием гена *FliC*, кодирующего разновидность флагеллина бактерий *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, синтезированный в Государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов [4]. Рекомбинантный флагеллин вводили подкожно, в утренние часы, за 15–30 мин до и 15–30 мин после облучения лабораторных животных.

Полученные данные подвергали статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Достоверность различий средних значений показателей выживаемости оценивали с использованием точного метода Фишера,

показателей средней продолжительности жизни погибших от облучения животных – по непараметрическому логранк-критерию, количество лейкоцитов периферической крови – с помощью U-критерия Манна – Уитни.

Таблица 1

Влияние профилактического введения рФЛ на течение и исходы ОРП у крыс облученных в дозе 6 Гр

Группа	Доза препарата, мкг/кг	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Контрольная	–	50±14	23±3
Получавшая рФЛ	1	50±14	23±3
	10	42±14	21±3
	100	83±11*	28±2

Примечание: * – различия по сравнению с контрольной группой, $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выявлено, что профилактическое введение рФЛ улучшает течение и исходы ОРП крыс. Так, при облучении крыс в дозе 6 Гр выживаемость животных контрольной группы к 30-м суткам составила 50±14%, а величина СПЖ – 23±3 сут. В случае профилактического введения рФЛ в дозе 100 мкг/кг выживаемость облученных крыс увеличилась на 33%, а величина СПЖ на 5 сут и составила 83±11% и 28±2 сут соответственно. Введение рФЛ в дозировках 1 и 10 мкг/кг оказалось малоэффективным (табл. 1).

При введении рФЛ после облучения, радио-защитного действия препарата выявить не удалось. Так, в случае введения рФЛ в дозе 1 мкг/кг после облучения выживаемость составила 17±11%, а СПЖ составила 16±2 сут. Увеличение вводимой после облучения дозы рФЛ приводило к незначительному повышению выживаемости и СПЖ крыс. При введении рФЛ в дозе 10 и 100 мкг/кг выживаемость составила 33±14 и 50±14%, а СПЖ 21±2 и 22±3 сут соответственно (табл. 2).

Для изучения механизмов действия рФЛ исследовано его влияние на показатели периферической крови облученных животных. У животных контрольной группы, облученных в дозе 6 Гр, в периферической крови отмечалась выраженная лейкопения. К 3-м сут после облучения отмечалось снижение уровня лейкоцитов до $5,1 \times 10^9/\text{л}$. По мере развития гематологического синдрома ОРП, лейкопения прогрессировала и к 9-м сут уровень лейкоцитов составил $3,2 \times 10^9/\text{л}$. На 14-е сут отмечалось постепенное восстановление пула лейкоцитов, при котором отмечалось увеличение показателя почти в 2 раза по сравнению с 9-ми сут, что составило $7 \times 10^9/\text{л}$. Восстановление уровня лейкоцитов до референтных значений регистрировали к 25-м сут, когда их уровень составил $31 \times 10^9/\text{л}$.

Несколько иная картина наблюдалась при оценке показателей периферической крови у крыс, которым

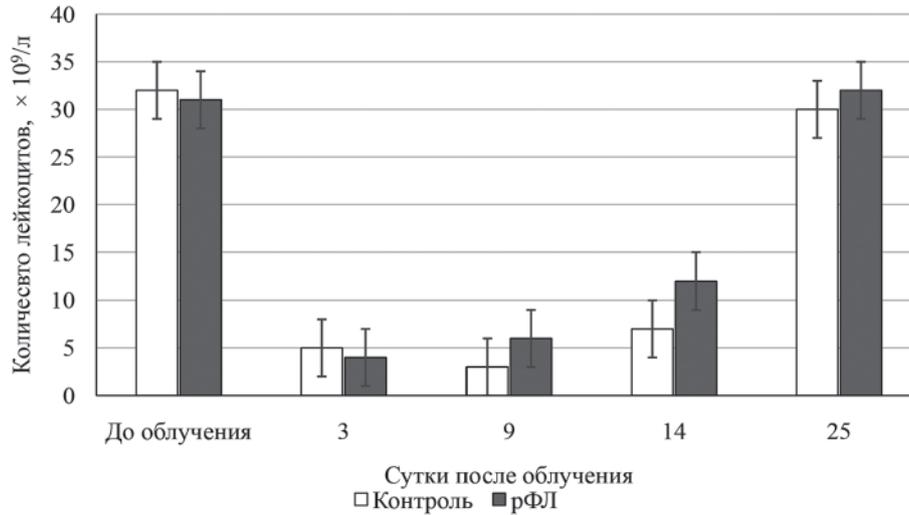


Рис. Уровень лейкоцитов в периферической крови крыс при профилактическом введении рФЛ в дозе 100 мкг/кг в разные сроки острого радиационного поражения

вводили рФЛ в дозе 100 мкг/кг до облучения. В этой группе животных, к 9-м сут после облучения уровень лейкоцитов составил $5,3 \times 10^9/\text{л}$, что на 40% больше по сравнению с группой контроля. К 14-м сут зафиксировано увеличение уровня лейкоцитов на 33% по сравнению с контрольной группой, что составило $10,5 \times 10^9/\text{л}$. К 25-м сут в исследуемой группе отмечалась нормализация показателя до референтных значений, составившая $30,9 \times 10^9/\text{л}$, что существенно не отличалось от значения показателя в контрольной группе (рис.).

Все это свидетельствует о том, что введение рФЛ до облучения в дозе 100 мкг/кг оказывает защитное действие на кроветворные клетки и клетки костного мозга облученных крыс в дозе 6 Гр. Таким образом рФЛ оказывает выраженное радиозащитное действие у облученных крыс в условиях его профилактического применения в субтоксических дозах.

Полученные результаты подтверждают данные литературы о перспективности проведения дальнейших исследований, направленных на разработку флагеллинсодержащих средств химической защиты от лучевого поражения.

Выводы

1. Рекомбинантный флагеллин оказывает выраженное радиозащитное действие при его введении лабораторным животным в дозе 100 мкг/кг подкожно за 15–30 мин до гамма-облучения в дозе 6 Гр. За 30-суточный период наблюдения рФЛ увеличивает выживаемость до 83% лабораторных животных при 50% гибели животных в контрольной группе.

2. Введение рФЛ в дозе 1, 10, 100 мкг/кг подкожно, через 15–30 мин после облучения в дозе 6 Гр не оказывает радиозащитного эффекта. Применение рФЛ в дозе 1 и 10 мкг/кг усугубляет течение и исходы острого радиационного поражения. Так, в случае введения

рФЛ в дозе 1 мкг/кг после облучения выживаемость составляет $17 \pm 11\%$, что на 33% ниже, чем в группе контроля.

3. Профилактическое введение рФЛ в дозе 100 мкг/кг подкожно за 15–30 мин до облучения в дозе 6 Гр оказывает выраженное радиозащитное действие на кроветворные клетки и клетки костного мозга. Дозы рекомбинантного флагеллина ниже 100 мкг/кг при введении как до, так и после облучения не оказывают влияния на систему кроветворения облученных крыс в дозе 6 Гр.

Литература

1. Аль-Шехадат, Р.И. Получение и изучение свойств рекомбинантного бактериального флагеллина / Р.И. Аль-Шехадат [и др.] // Хим. и биол. безопас. – 2012. – Спец. вып. – С. 109–116.
2. Васин, М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии / М.В. Васин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 459–467.
3. Владимиров, В.Г. О некоторых итогах и перспективах развития профилактической радиационной фармакологии / В.Г. Владимиров, И.И. Красильников // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 44–50.
4. Гребенюк, А.Н. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности / А.Н. Гребенюк [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № 3 (43). – С. 75–80.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, – 2012. – 48 с.
6. Иванов, В.К. Радиационные риски медицинского облучения / В.К. Иванов, А.Ф. Цыб, Ф.А. Метлер // Радиация и риск. – 2011. – Т. 20, № 2. – С. 17–29.
7. Рождественский, Л.М. Проблемные вопросы разработки противолучевых средств / Л.М. Рождественский // Радиационная биол. Радиоэкол. – 2019. – Т. 59, № 2. – С. 117–126.

8. Burdelya, L.G. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models / L.G. Burdelya [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320, № 5873. – P. 226–230.
9. Chen, H. Activation of Toll-like receptors by intestinal microflora reduces radiation-induced DNA damage in mice / H. Chen [et al.] // Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. – 2014. – Vol. 774. – P. 22–28.
10. Honko, A.N. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity / A.N. Honko, S.B. Mizel // Immunol. Res. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 83–101.
11. Li, W. CBLB502, an agonist of Toll-like receptor 5, has antioxidant and scavenging free radicals activities in vitro / W. Li [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – Vol. 82. – P. 97–103.

R.Yu. Sapozhnikov, Yu.Sh. Khalimov, V.I. Legeza, R.I. Litvinenko, I.S. Drachev, S.Yu. Kraev, A.S. Simbirtsev

The effect of recombinant flagellin on the hematopoietic system in rats with acute radiation damage

Abstract. *In an experiment on irradiated rats, the effect of prophylactic and therapeutic administration of recombinant flagellin on the course and outcomes of acute radiation damage, as well as peripheral blood parameters, was studied in dynamics. It has been established that the anti-radiation activity of recombinant flagellin is most effective when prophylactically administered 15-30 minutes before irradiation. Thus, when rats were irradiated at a dose of 6 Gy, the survival rate of animals in the control group by the 30th day was $50 \pm 14\%$, and the average life expectancy was 23 ± 3 days. In the case of prophylactic administration of recombinant flagellin at a dose of $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, the survival of irradiated rats increased by 33%, and the average life expectancy by 5 days was 83 ± 11 and 28 ± 2 days, respectively. The introduction of recombinant flagellin in dosages of 1 and $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ was not very effective. With the introduction of recombinant flagellin after irradiation, the radioprotective effect of the drug could not be detected. To elucidate the mechanisms of action of recombinant flagellin, its effect on the peripheral blood indices of irradiated animals was studied. In animals of the control group irradiated at a dose of 6 Gy, pronounced leukopenia was observed in the peripheral blood. By 3 days after irradiation, a decrease in the level of leukocytes to $5,1 \times 10^9/\text{L}$ was noted. As the hematological syndrome of acute radiation damage developed, leukopenia progressed and by 9 days the leukocyte level was $3,2 \times 10^9/\text{L}$. On the 14th day, a gradual recovery of the leukocyte pool was noted, in which an increase of almost 2 times was noted compared with 9 days, which amounted to $7 \times 10^9/\text{L}$. The recovery of leukocyte levels to reference values was recorded by 25 days, when their level was $31 \times 10^9/\text{L}$. All this suggests that the introduction of recombinant flagellin before irradiation at a dose of $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ has a protective effect on hematopoietic and bone marrow cells of irradiated rats at a dose of 6 Gy. The results confirm the literature on the prospects of further research aimed at the development of flagellin-containing chemical protection against radiation damage.*

Key words: *recombinant flagellin, leukopenia, radioprotective efficacy, acute radiation damage, gamma radiation, survival, prophylactic and therapeutic administration of flagellin-containing agents.*