

Е.В. Мурзина¹, Г.А. Софронов^{1,2}, Н.В. Аксенова¹,
О.М. Веселова¹, А.Н. Гребенюк¹,
И.В. Духовлинов^{2,3}, А.И. Орлов²

Экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина

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

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

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

Резюме. Изучено влияние профилактического и терапевтического введения отечественного рекомбинантного флагеллина на показатели выживаемости белых беспородных мышей-самцов, подвергнутых воздействию летальных доз рентгеновского излучения ($SD_{60-100/30}$). Установлено, что из всех изученных схем введения рекомбинантного флагеллина ($\pm 15-30$ мин, ± 2 ч, ± 24 ч к радиационному воздействию) наиболее эффективно противолучевая активность препарата проявлялась в условиях его профилактического введения за 15–30 мин до облучения. Однократное внутрибрюшинное введение в дозе 1 мг/кг повышало выживаемость мышей, облучённых в дозах 7,5 и 8,5 Гр на 37 и 80% соответственно ($p < 0,05$). При этом расчётное значение $SD_{50/30}$ возрастало с $7,04 \pm 0,01$ Гр (95% ДИ: 6,99; 7,10) у мышей, подвергнутых радиационному воздействию без применения флагеллина, до $11,7 \pm 0,28$ Гр (95% ДИ: 9,43; 14,1). 30-суточная выживаемость мышей, облучённых в дозе 8 Гр, при введении препарата в дозе 1 мг/кг за 15–30 мин до лучевого воздействия возросла до 53%, в дозе 2 мг/кг – до 87% ($p < 0,01$); в контрольной группе выжило 20% животных. Выявлено значимое модифицирующее влияние флагеллина в условиях профилактического введения в короткие сроки до облучения на динамику радиационно-индуцированной потери массы тела мышей и на силу корреляционной связи между степенью снижения массы тела облучённых мышей и их продолжительностью жизни (коэффициент корреляции Спирмена составил $-0,055$; в контрольных группах $-0,94$, $p < 0,001$). Также было показано, что внутрибрюшинное введение рекомбинантного флагеллина в дозе 2 мг/кг хорошо переносится мышами, не оказывает выраженного побочного действия и не ухудшает общего состояния животных. Полученные результаты подтверждают перспективность проведения дальнейших исследований, направленных на разработку флагеллиносодержащих средств химической защиты от лучевого поражения.

Ключевые слова: рекомбинантный флагеллин, радиозащитная эффективность, рентгеновское излучение, мыши, выживаемость, профилактическое введение, терапевтическое введение.

Введение. Проблема разработки новых высокоэффективных медицинских средств противорадиационной защиты за 75-летний период, прошедший со времени установления феномена химической защиты от лучевого поражения, не только не утратила своей актуальности, но в современном мире стоит наиболее остро. Широкое использование источников ионизирующих излучений во всех сферах деятельности человека – в производстве, энергетике, медицине, научных исследованиях, Вооружённых силах – неминуемо сопровождается возрастанием риска радиационных аварий. Произошедшие на рубеже XX–XXI вв. ядерные инциденты, крупнейшими из которых с максимальным 7-м уровнем по Международной шкале ядерных событий были аварии на Чернобыльской атомной электростанции (АЭС) в Советском Союзе 26 апреля 1986 г. и на АЭС Фукусима-1 (Япония) 11 марта 2011 г., свидетельствуют о потенциальной опасности, связанной с эксплуатацией объектов ядерно-энергетического комплекса [1, 13].

Серьёзные опасения вызывает существующая угроза применения ядерного оружия в вооружённых конфликтах или в террористических целях, послед-

ствия чего, как показали ядерные бомбардировки японских городов Хиросима и Нагасаки в 1945 г., могут быть катастрофическими. Расширение использования ионизирующей радиации в лечебных и диагностических целях создаёт сложную проблему обеспечения радиационной безопасности больных и персонала, в частности – защиты нормальных тканей при проведении лучевой терапии онкологических больных, поскольку нередко прогноз и качество жизни пациентов определяется течением пострадиационных осложнений [7, 18].

Вместе с тем в настоящее время использование практически всех известных радиопротекторов достаточно ограничено, что определяется соотношением эффективности и переносимости, не отвечающим современным требованиям к соединениям данного класса. Большинство современных радиопротекторов не могут применяться многократно, поскольку оказывают защитное действие лишь при введении в организм в субтоксических дозах 5. Исследования противолучевых свойств различных химических веществ активно ведутся в передовых странах мира. По данным V.K. Singh et al. [19], лишь за период времени

с 2014 по 2015 г. в качестве средств с противолучевой активностью (радиопротекторов, радиомитигаторов и радиомодификаторов) запатентовано 47 соединений, большинство из которых является разработками американских исследователей.

В последнее десятилетие в области радиационной фармакологии значительно возрастает интерес к препаратам природного происхождения, одним из которых является белок филаментов бактерий – флагеллин, мощный активатор врождённого и адаптивного иммунитета [8]. Флагеллин является единственным известным естественным лигандом толл-подобных рецепторов 5 (TLR5), локализованных на поверхности многих клеток иммунной системы (дендритных, макрофагов, нейтрофилов, Т-клеток) и разных типов эпителиальных клеток [14]. Компанией «Cleveland BioLabs» (Соединённые Штаты Америки) разработан препарат CBLB502 (коммерческое название «Entolimod»), представляющий собой фармакологически оптимизированное делетированное производное флагеллина разновидности FliC *Salmonella enteric serovar Dublin*. В экспериментах на мышах и приматах установлено, что энтолимода существенно повышает выживаемость животных, облучённых летальными дозами ионизирующего излучения, проявляя при этом свойства и радиопротектора, и радиомитигатора [9, 16]. Экспериментально показано, что введение энтолимода способствует снижению тяжести побочных эффектов лучевой терапии, не влияя при этом на радиочувствительность клеток опухолей. В частности, установлено подавляющее действие препарата на развитие радиационно-индуцированных пневмонии и фиброза лёгочной ткани, повреждённых кожных покровов и слизистых оболочек при локальном воздействии ионизирующего излучения [21, 23, 25]. Предварительные результаты I фазы клинических испытаний энтолимода показали хорошую переносимость здоровыми добровольцами системного введения препарата и отсутствие выраженного побочного действия.

В России в Санкт-Петербургском государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов (Гос. НИИ ОЧБ) разработана технологическая платформа, позволяющая синтезировать высокоочищенные препараты рекомбинантного флагеллина как полноразмерного белка, так и его делетированных производных, однако детального изучения противолучевой активности данных соединений не проводилось [2, 4].

Цель исследования. Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности отечественного рекомбинантного флагеллина (рФЛ) в интересах разработки и создания нового эффективного и безопасного медикаментозного средства химической противорадиационной защиты.

Материалы и методы. Исследование радиозащитного действия рФЛ проводили в опытах *in vivo* на 450 беспородных мышах – самцах массой тела 20–22 г, выращенных в питомнике лабораторных

животных «Рапполово». После поступления из питомника животные в течение 14 дней содержались в карантине, затем были рандомизированы по группам, включающим 12–15 особей, и до окончания опыта находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Кормление животных проводилось 1 раз в сутки в первой половине дня без ограничения доступа к воде. Все манипуляции осуществлялись с соблюдением правил биоэтики при работе с лабораторными животными [6].

В работе исследовали рФЛ, синтезированный с использованием гена FliC, кодирующего разновидность флагеллина бактерий *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, в Гос. НИИ ОЧБ [2]. Для введения животным использовали рФЛ в лекарственной форме – раствор для инъекций с содержанием белка 0,2 мг/мл. Во всех опытах раствор рФЛ вводили мышам в брюшную полость в дозах, определённых задачами каждого конкретного раздела работы с учётом данных литературы и результатов ранее проведённого исследования [4, 9, 22, 24]. Животным контрольных групп в том же объёме и в те же сроки вводили физиологический раствор.

Для моделирования острой лучевой болезни животных подвергали однократному относительно равномерному рентгеновскому облучению на рентгенотерапевтической установке «РУМ-17» при напряжении 180 кВ, силе тока 14 мА, фильтре 0,5 мм Cu + 1 мм Al. Параметры воздействия: направление облучения спина – грудь; кожно-фокусное расстояние 50 см; мощность дозы 0,2 мА/кг (38,4 Р/мин). Проводилось одновременное облучение мышей (до 15 особей), для чего животные помещались в пластиковые пеналы, которые укреплялись на подставке (кимографе), вращающейся со скоростью 2 об/мин. Контрольных и подопытных мышей облучали одновременно – в утренние часы. Поглощённая доза излучения в разных сериях экспериментов составляла 6,5 Гр (СД_{50–70}); 7,5 Гр (СД_{60–80}); 8 Гр (СД_{70–90}); 8,5 Гр (СД_{80–100}). Для дозиметрического контроля использовали индивидуальный дозиметр «ИД-11».

Оценку противолучевой эффективности рФЛ проводили путём изучения 30-суточной выживаемости мышей, динамики их гибели и продолжительности жизни погибших от облучения животных. На протяжении всего периода наблюдения еженедельно фиксировалась масса тела (МТ) мышей. Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0. Проверку соответствия вида распределения изучаемых признаков закону нормального распределения проводили с помощью критерия Шапиро – Уилка. Выживаемость облучённых животных анализировали по методу Каплана – Мейера. Для сравнения выживаемости мышей подопытных и контрольных групп использовали точный критерий Фишера (двусторонний тест), средней продолжительности жизни погибших от облучения животных (СПЖ) – критерий Гехана – Вилкоксона. Также в работе

применялись следующие виды анализа: U-критерий Манна – Уитни для несвязанных выборок; W-критерий Вилкоксона для парных сравнений; H-критерий Краскела – Уоллиса для сравнения трёх и более выборок; корреляционный анализ Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее значение изучаемого признака, σ – среднеквадратическое отклонение, или Me (N_{25} ; N_{75}), где Me – медиана, N_{25} и N_{75} – нижний и верхний квартили. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0,05$; в случае множественных сравнений для уровня значимости α вводилась поправка Бонферрони [3].

Результаты и их обсуждение. Перед проведением исследования радиозащитных свойств рФЛ проверялась его переносимость мышами, для чего раствор рФЛ вводили однократно внутривентриально в дозе 2 мг/кг. Учитывались следующие показатели: общее состояние и поведение животных, изменение их МТ, состояние шёрстного покрова и кожи, слизистых оболочек рта и глаз, органов дыхания и пищеварения. 7-суточный период наблюдения показал, что введение препарата хорошо переносилось животными, не ухудшало их общего состояния, не нарушало деятельности важнейших функциональных систем организма. Статистически значимых различий в изменении МТ у животных, получавших рФЛ, по сравнению с контрольными животными не выявлено ($108,2 \pm 3,81$ и $106,7 \pm 3,51\%$ соответственно). Было сделано заключение, что внутривентриальное введение рФЛ не оказывает выраженного патогенного действия на мышей, и препарат может быть изучен в качестве потенциального средства, обладающего противорадиационной активностью.

Радиозащитные свойства рФЛ изучали в трёх сериях опытов. Первая серия опытов носила скрининговый характер; её основной задачей было определение наиболее оптимальной схемы введения рФЛ. Исследуемый препарат вводили как в профилактических, так и в лечебных целях в разные временные интервалы по отношению к острому лучевому воздействию (± 24 ч, ± 2 ч, $\pm 15-30$ мин, а также 5-кратно – через 15-30 мин после облучения и каждые 24 ч). Было установлено, что при облучении мышей в дозе 7,5 Гр наибольшую радиозащитную эффективность рФЛ проявлял в условиях профилактического применения за 15–30 мин до облучения: 30-суточная выживаемость животных в данной экспериментальной группе составила 67%, т. е. возросла на 31% по сравнению с контрольной. Менее выраженное протекторное действие препарат оказывал при введении его за 2 ч до или через 15–30 мин после воздействия ионизирующего излучения: в этих условиях было отмечено повышение выживаемости животных на 11%. СПЖ погибших от облучения мышей составила от 9 до 11 суток, при этом применение рФЛ во всех изученных схемах профилактики и терапии радиационных поражений не оказывало существенного влияния на значение данного показателя.

Во второй серии опытов оценивалось влияние профилактического применения рФЛ (1 мг/кг, внутривентриально) за 15–30 мин или за 2 ч до воздействия на показатели выживаемости мышей, облучённых в разных дозах – 6,5; 7,5 и 8,5 Гр. На рисунке 1 представлена динамика гибели облучённых животных за 30-суточный период наблюдения.

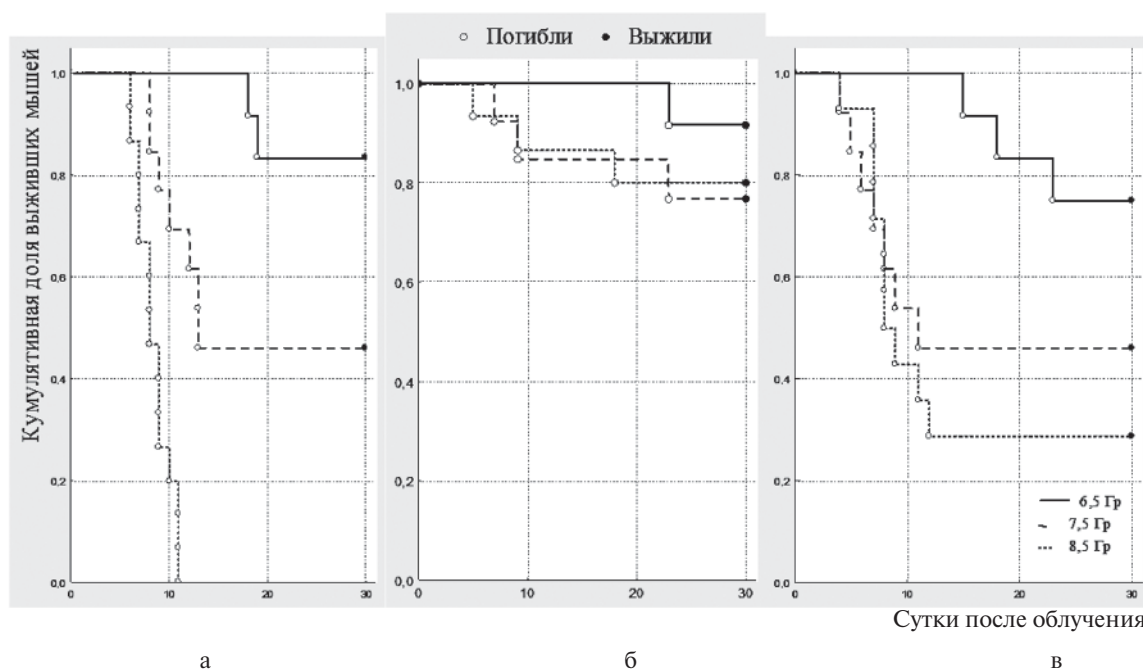


Рис. 1. Кривые выживаемости (Kaplan – Meier) мышей, подвергнутых острому рентгеновскому облучению в дозах 6,5; 7,5 и 8,5 Гр и профилактическому введению рекомбинантного флагеллина (1 мг/кг, внутривентриально): а – облучение (контроль); б – введение рФЛ за 15–30 мин до облучения; в – введение рФЛ за 2 ч до облучения

Как видно из представленных на рисунке 1 данных, летальность животных, подвергнутых облучению без применения рФЛ, повышалась при увеличении дозы радиационного воздействия и составила при облучении в дозе 6,5 Гр – 17%, в дозе 7,5 Гр – 54%. Доза 8,5 Гр приводила к гибели всех мышей контрольной группы. Выраженный протекторный эффект на выживаемость животных оказывали инъекции рФЛ за 15-30 мин до облучения. Применение рФЛ в данный срок повышало долю выживших мышей при облучении в дозе 6,5 Гр на 13%; на 36% – в дозе 7,5 Гр ($p < 0,05$) и до 80% в дозе 8,5 Гр ($p < 0,001$).

При введении рФЛ за 2 ч до воздействия максимальное снижение летальности имело место при облучении в дозе 8,5 Гр (на 39% по сравнению с показателем контрольной группы, $p < 0,05$). ПЖ погибших от облучения в дозе 6,5 Гр мышей составила в среднем 21-23 суток; при облучении в дозах 7,5 и 8,5 Гр уменьшалась до 7–10 суток. При этом введение рФЛ как за 2 ч, так и за 15-30 мин до радиационного воздействия не оказывало значимого влияния на сроки гибели животных от острой лучевой болезни.

Таким образом, радиозащитная активность рФЛ максимально проявляется в условиях его применения в короткие сроки до облучения мышей в летальных дозах рентгеновского излучения (табл. 1).

Для характеристики величины радиозащитного эффекта рассчитывали фактор изменения дозы (ФИД), представляющий собой отношение равноэффективных доз облучения, вызывающих гибель

50% животных опытной группы за 30-суточный период наблюдения ($СД_{50/30}$), к аналогичному показателю для животных контрольной группы. Определение $СД_{50}$ проводили методом пробит-анализа по D. Finney [12]. Расчётное значение $СД_{50/30}$ для животных контрольной группы составило $7,04 \pm 0,01$ Гр (95% ДИ: 6,99; 7,10). Введение рФЛ за 2 ч до облучения не оказывало значимого влияния на величину данного показателя ($7,12 \pm 0,01$ Гр, 95% ДИ: 7,06; 7,18). При профилактическом применении рФЛ за 15–30 мин до радиационного воздействия расчётное значение $СД_{50/30}$ возрастало до $11,7 \pm 0,28$ Гр (95% ДИ: 9,43; 14,1), ФИД по выживаемости мышей составил $\sim 1,6$, что может свидетельствовать о перспективности рФЛ в качестве радиопротектора экстренного действия.

В третьей серии опытов было изучено дозовое влияние профилактического или терапевтического введения рФЛ на выраженность радиозащитного эффекта, для чего препарат вводили в дозах 2; 1 и 0,5 мг/кг в сроки ± 15 –30 мин по отношению к облучению в дозе 8 Гр.

Данные о 30-суточной выживаемости облучённых мышей и ПЖ павших животных приведены в таблице 2. Доза облучения 8 Гр вызывала гибель более 80% животных контрольной группы, которая происходила на 4–17 сутки после острого лучевого воздействия. Превентивное введение рФЛ оказывало позитивное действие на снижение летальности животных во всём исследованном диапазоне доз. При этом наибольший эффект отмечался после введения препарата в дозе

Таблица 1

Расчётные значения рангов показателей радиозащитной эффективности рекомбинантного флагеллина (1 мг/кг, внутривенно) при профилактическом введении мышам, облучённым в дозах 6,5; 7,5 и 8,5 Гр

Доза облучения, Гр	Группы животных			n	H-критерий Краскелла – Уоллеса	p
	Контроль (облучение)	рФЛ за 2 ч до облучения	рФЛ за 15–30 мин до облучения			
6,5	194, n=12	199,5, n=12	272,5, n=12	36	4,34	0,114
7,5	232, n=13	219, n=13	329, n=13	39	4,95	0,084
8,5	222,5, n=15	280,5, n=14	487, n=15	44	15,76	0,000

Таблица 2

Влияние рекомбинантного флагеллина на показатели 30-суточной выживаемости мышей, подвергнутых однократному общему острому рентгеновскому облучению в дозе 8 Гр

Доза флагеллина	n	Выживаемость, %	p (точный критерий Фишера)	ПЖ павших мышей $Me (H_{25}; H_{75})$	p (критерий Гехана – Вилкоксона)
Профилактическое введение (15–30 мин до облучения)					
2 мг/кг	15	86,7±	0,007	n=2	0,000
1 мг/кг	15	53,3±	0,128	10 (8; 22) n=7	0,094
0,5 мг/кг	15	40±	0,427	10 (9; 21) n=9	0,188
облучение	15	20±	–	10 (8; 13) n=12	–
Терапевтическое введение (15–30 мин после облучения)					
2 мг/кг	12	58,3±	0,089	7 (6; 11) n=5	0,066
1 мг/кг	12	25±	1	10 (9; 21) n=9	0,315
0,5 мг/кг	12	53,8±	0,097	13 (10; 16) n=6	0,094
облучение	12	16,7±	–	10 (7; 13) n=10	–

2 мг/кг, выживаемость мышей возросла на 67% ($p < 0,01$). Введение рФЛ в дозе 1 мг/кг увеличивало выживаемость на 33%, в дозе 0,5 мг/кг – на 20%.

Пострадиационное применение рФЛ также приводило к снижению летальности подопытных животных, но в меньшей степени: в дозе 2 мг/кг – на 42%, в дозе 1 мг/кг – на 8%, в дозе 0,5 мг/кг – на 7%, но различия не имели статистической значимости. СПЖ мышей после облучения в дозе 8 Гр составила 10 суток, при этом 50% животных погибло на 7–13 сутки после лучевого воздействия. При профилактическом введении рФЛ в дозе 2 мг/кг ПЖ павших мышей составила 10 и 28 суток ($n=2$). Применение ФЛ в дозах 1 мг/кг и 0,5 мг/кг, также как инъекции препарата в терапевтических целях, не оказывали значимого влияния на ПЖ погибших от облучения мышей.

На заключительном этапе работы были проанализированы данные еженедельного мониторинга МТ облучённых и контрольных мышей. У животных, не подвергавшихся радиационному воздействию и введению рФЛ («биологический контроль»), отмечался еженедельный прирост МТ в среднем на 5–7%, что свидетельствовало о хорошем общем состоянии животных данной группы. Воздействие рентгеновского излучения в диапазоне доз $СД_{50-100}$ без применения рФЛ приводило к существенному дозозависимому снижению МТ облучённых животных в период развития острой лучевой болезни, которое составляло в среднем 15–20% от исходного уровня в течение первой недели и 25–30% в течение второй. Была изучена зависимость выживаемости подвергнутых воздействию ионизирующего излучения мышей от

степени радиационно-индуцированного падения их МТ в течение 7 суток после облучения и оценено влияние профилактического (терапевтического) введения рФЛ (1 мг/кг) на характер данной зависимости. Для проведения корреляционного анализа, результаты которого отражает рисунок 2, использовались данные, полученные во всех сериях опытов.

Как видно из представленных на рисунке 2а данных, между степенью потери МТ облучённых в разных дозах мышей (6,5; 7,5; 8 и 8,5 Гр) и их выживаемостью за 30-суточный период наблюдения существует сильная отрицательная корреляционная связь: коэффициент корреляции Спирмена (R_{Sp}) составил $-0,94$ (95% ДИ: $-0,942$; $-0,938$; $p < 0,001$). Профилактическое применение рФЛ (в дозе 1 мг/кг) существенным образом модифицировало характер данной зависимости: R_{Sp} составил $-0,055$ (95% ДИ: $-0,069$; $-0,038$; $p = -0,685$; рис. 2б), что было статистически значимо по отношению к R_{Sp} в группах мышей, облучённых без применения рФЛ ($p < 0,001$). Анализ связи исследуемых признаков в случае пострадиационного введения рФЛ показал, что сильная отрицательная корреляция сохранялась, однако сила взаимосвязи несколько уменьшалась: $R_{Sp} = -0,72$ (95% ДИ: $-0,713$; $-0,734$; $p < 0,001$), рисунок 2в.

Таким образом, данные корреляционного анализа выявили значимое модулирующее влияние рФЛ, применённого в дозе 1 мг/кг в профилактических целях за 15–30 мин до облучения, на динамику радиационно-индуцированного падения МТ мышей, что может свидетельствовать о снижении тяжести течения острой

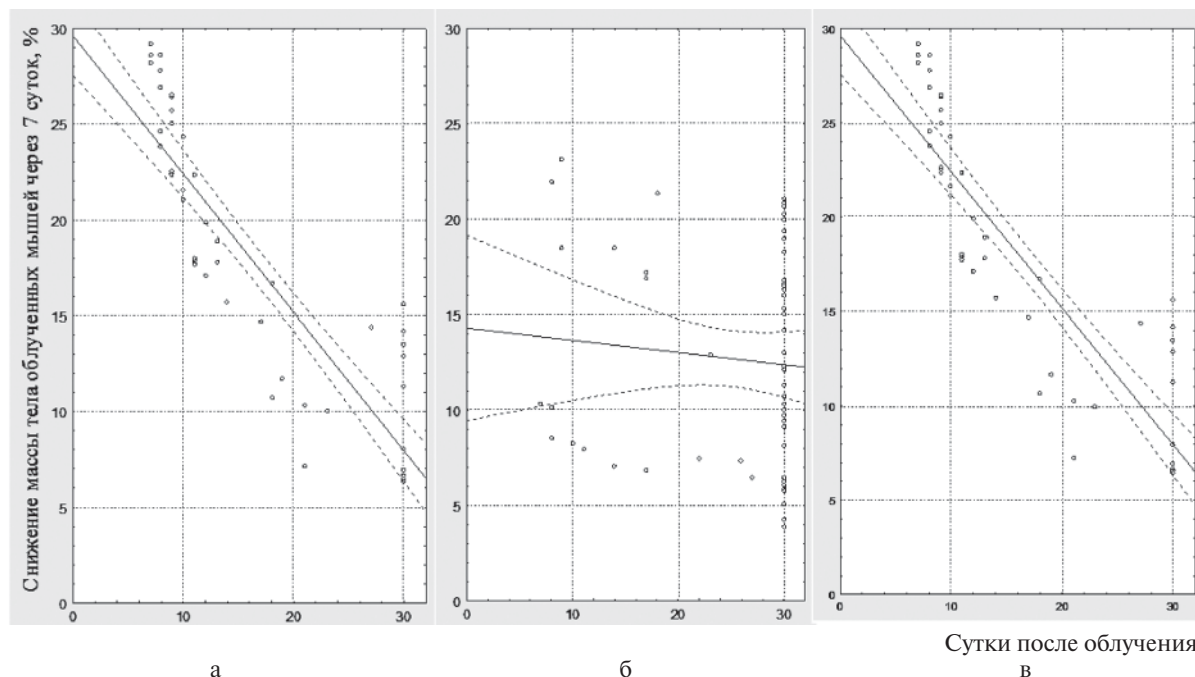


Рис. 2. Влияние флагеллина на характер зависимости выживаемости облучённых мышей ($СД_{60-100/30}$) и степени радиационно-индуцированного снижения массы тела мышей в течение первой недели после воздействия: а – облучение ($n=51$); б – облучение + профилактическое введение рФЛ ($n=56$); в – облучение + терапевтическое введение рФЛ ($n=40$)

лучевой болезни у подвергнутых радиационному воздействию животных.

В целом максимальный радиозащитный эффект рФЛ, синтезированного с использованием гена *FliC* бактерий *S. Typhimurium* в Санкт-Петербургском Гос. НИИ ОЧБ, проявляется в условиях профилактического введения за 15–30 мин до воздействия летальных доз рентгеновского излучения ($СД_{50-100/30}$). Однократное внутрибрюшинное введение в дозе 1 мг/кг статистически значимо по сравнению с контрольными группами повышало выживаемость мышей, облучённых в дозах 7,5 и 8,5 Гр на 37 и 80% соответственно ($p < 0,05$). 30-суточная выживаемость мышей, облучённых в дозе 8 Гр, при введении рФЛ (1 мг/кг) за 15–30 мин до острого лучевого воздействия возрастала до 53%, в дозе 2 мг/кг – до 87% ($p < 0,01$), в то время как в контрольной группе выжило 20% животных. Выявлено значительное модифицирующее влияние флагеллина в условиях профилактического введения в короткие сроки до облучения на динамику радиационно-индуцированной потери массы тела мышей, а также на силу корреляционной связи между степенью снижения массы тела облучённых мышей и их продолжительностью жизни. Также было показано, что внутрибрюшинное введение рФЛ в дозе 2 мг/кг хорошо переносится мышами, не оказывая выраженного побочного действия и не ухудшая общего состояния животных.

Полученные нами результаты в общем согласуются с данными о высокой радиозащитной эффективности рекомбинантного флагеллина, представленными в работах зарубежных исследователей [9, 16, 22]. По современным представлениям, фармакологическая активность флагеллина обусловлена активацией ядерного фактора транскрипции каппа В (NF-κB), являющегося одним из основных регуляторов экспрессии генов, стимулирующих пролиферацию антиапоптотических белков, белков антиоксидантов и большого спектра провоспалительных цитокинов, что и предопределяет потенциал флагеллина как биологического протектора от воздействия ионизирующего излучения. Несмотря на то, что активация всех ТЛР происходит по общему сценарию, флагеллин как лиганд ТЛР5 с позиции применения в качестве радиопротекторного средства обладает рядом преимуществ. Так, рецепторы ТЛР5 интенсивно экспрессируются клетками гемопоэтической системы и эпителия кишечника, являющимися первичными мишенями при радиационном поражении, при этом образование комплекса ТЛР5-флагеллин хорошо переносится млекопитающими [14, 20]. Активация NF-κB-сигнального пути при связывании флагеллина рецепторами ТЛР5 не приводит к развитию «цитокинового шторма», вызванного гиперпродукцией фактора некроза опухолей α, как это имеет место в случае лигандов других ТЛР, а способствует стимуляции защитных реакций организма, в частности – в результате индукции нейтрофилами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, повышающего

выживаемость, пролиферацию и дифференцировку предшественников гранулоцитов, и интерлейкина-6, ускоряющего восстановление костномозгового кроветворения после радиационного воздействия [10, 16, 22]. Также ключевыми механизмами радиозащитной эффективности флагеллина как агониста ТЛР5 являются ингибирование радиационно-индуцированного апоптоза и снижение интенсивности свободной-радикальных процессов, обусловленное активацией системы антиоксидантной защиты организма [9, 11, 15, 17]. Таким образом, в основе противолучевого действия флагеллина лежит его способность оказывать влияние на течение основных патологических процессов, приводящих организм к гибели при воздействии летальных доз ионизирующего излучения.

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

Выводы

1. Рекомбинантный флагеллин, синтезированный отечественными специалистами, проявляет выраженную радиозащитную активность. Введение препарата в дозах 1 и 2 мг/кг, внутрибрюшинно, за 15–30 мин до облучения мышей в диапазоне доз $СД_{70-100}$ за 30-суточный период наблюдения обеспечивает выживаемость 67–87% животных.
2. Профилактическое введение флагеллина оказывает значимое модифицирующее влияние на динамику и степень радиационно-индуцированной потери массы тела облучённых мышей.
3. Рекомбинантный флагеллин может служить основой для разработки фармакологически оптимизированных производных, а также компонентом рецептур с противорадиационными свойствами.

Литература

1. 30 лет после Чернобыля: патогенетические механизмы формирования соматической патологии, опыт медицинского сопровождения участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции: монография / под ред. С.С. Алексанина. – СПб.: Политехника-принт, 2016. – 506 с.
2. 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.
3. Боровиков, В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В.П. Боровиков. – М.: Горячая линия – Телеком, 2013. – 288 с.
4. Гребенюк, А.Н. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности / А.Н. Гребенюк [и др.]. // Вестн. Росс. военно-мед. акад. – 2013. – Т. 43, № 3. – С. 75–80.
5. Гребенюк, А.Н. Практическое руководство по использованию медицинских средств противорадиационной защиты при чрезвычайных ситуациях и обеспечению ими аварийных медико-санитарных формирований и региональных аварийных центров / А.Н. Гребенюк [и др.]. – М.: Комментарий, 2015. – 304 с.

6. 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.
7. Лушников, Е.Ф. Современная лучевая патология человека: проблемы методологии исследований, этиологии, патогенеза и классификации / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. – Обнинск: ФГБУ МРНЦ Минздравсоцразвития России, 2012. – 236 с.
8. Софронов, Г.А. Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина / Г.А. Софронов [и др.] // Мед. акад. журн. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 7–20.
9. 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.
10. Carvalho, F.A. TLR5 activation induces secretory interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage / F.A. Carvalho [et al.] // Mucosal Immunol. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 102–111.
11. 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.
12. Finney, D.J. The median lethal dose and its estimation / D.J. Finney // Arch. Toxicol. – 1985. – Vol. 56, № 4. – P. 215–218.
13. Fushiki, S. Radiation hazards in children -lessons from Chernobyl, Three Mile Island and Fukushima / S. Fushiki // Brain Dev. – 2013. – Vol. 35, № 3. – P. 220–227.
14. Honko, A.N., Mizel S.B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity / A.N. Honko, S.B. Mizel // Immunol. Res. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 83–101.
15. Jones, R.M. Flagellin administration protects gut mucosal tissue from irradiation-induced apoptosis via MKP-7 activity / R.M. Jones [et al.] // Gut. – 2011. – Vol. 60, № 5. – P. 648–657.
16. Krivokrysenko, V.I. Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure / V.I. Krivokrysenko [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2012. – Vol. 343, № 2. – P. 497–508.
17. 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.
18. Prasanna, P.G. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? / P.G. Prasanna [et al.] // Transl. Cancer Res. – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 35–48.
19. Singh, V.K. Medical countermeasures for unwanted CBRN exposures: part II radiological and nuclear threats with review of recent countermeasure patents / V. Singh [et al.] // Expert Opin. Ther. Patents. – 2016. – Vol. 26, № 12. – P. 1399–1408.
20. Takeda, K. Toll-like receptors / K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 21. – P. 335–376.
21. Toshkov, I.A. Mitigation of radiation-induced epithelial damage by the TLR5 agonist Entolimod in a mouse model of fractionated head and neck irradiation / I.A. Toshkov [et al.] Radiat. Res. – 2017. – Vol. 187, № 5. – P. 570–580.
22. Vijay-Kumar, M. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation / M. Vijay-Kumar [et al.] J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, № 12. – P. 8280–8285.
23. Wang, Z.D. Toll-like receptor 5 agonist protects mice from radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis / Z.D. Wang [et al.] Asian. Pac. J. Cancer Prev. – 2012. – Vol. 13, № 9. – P. 4763–4767.
24. Xiao, Y. Over-activation of TLR5 signaling by high-dose flagellin induces liver injury in mice / Y. Xiao [et al.] Cell Mol. Immunol. – 2015. – Vol. 12, № 6. – P. 729–742.
25. Zhou, S.X. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a Myd88 dependent manner / S.X. Zhou [et al.] // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 2807–2812.

E.V. Murzina, G.A. Sofronov, N.V. Aksenova, O.M. Veselova, A.N. Grebenyuk, I.V. Dukhovlinov, A.I. Orlov

Experimental estimation of the radioprotective efficiency of recombinant flagellin

Abstract. The effect of prophylactic or therapeutic administration of domestic recombinant flagellin on the survival of mice exposed to lethal doses X-rays ($LD_{60/30}$ – $LD_{100/30}$) was studied. Studied different patterns of use recombinant flagellin in relation to the effects of radiation exposure: \pm 15–30 min, 2 h, 24 h. It is shown that the greatest radioprotective effect of the drug manifests after its introduction for 15–30 min before irradiation. A single intraperitoneal injection of 1 mg/kg flagellin increased the survival rate of mice after irradiation of 7,5 and 8,5 Gy of 37 and 80%, respectively. The calculated value $CD_{50/30}$ increased from $7,04 \pm 0,01$ Gy (95% CI: 6,99; 7,10) in untreated mice to $11,7 \pm 0,28$ Gy (95% CI: 9,43; 14,1) in animals with the use of recombinant flagellin. 30-day survival of mice, when the drug is administered 15–30 min prior to irradiation of 8 Gy at a dose of 1 mg/kg increased to 53%, of 2 mg/kg up to 87% ($p < 0,01$). In the control group survived, 20% of mice. We also observed a significant modifying effect of flagellin on severity of radiation-induced weight loss in mice. The value Spearman R increased from $-0,94$ in irradiation control to $-0,055$ in mice that received injection of flagellin 15–30 min before X-rays ($p < 0,001$). It was also shown that mice tolerate flagellin intraperitoneal injection of 2 mg/kg. Significant side effects of the drug have not been identified. The obtained results confirm the prospects of further research aimed at developing flagellin-based medical countermeasures for radiation exposure.

Key words: recombinant flagellin, radioprotective efficacy, X-radiation, mice, survival rate, therapeutic administration, preventive administration.

Контактный телефон: +7-981-815-05-34; e-mail: elenmurzina@mail.ru