

Р.Ю. Сапожников<sup>1</sup>, Ю.Ш. Халимов<sup>1</sup>, В.И. Легеза<sup>1</sup>,  
А.Н. Власенко<sup>1</sup>, И.С. Драчев<sup>2</sup>, Е.Б. Супрунова<sup>2</sup>,  
А.Н. Гребенюк<sup>3</sup>, А.С. Симбирцев<sup>4</sup>

## Профилактическая и лечебная эффективность рекомбинантного флагеллина при остром радиационном поражении

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

<sup>4</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

**Резюме.** Изучено влияние профилактического и терапевтического введения рекомбинантного флагеллина на показатели выживаемости белых беспородных мышей – самцов, подвергнутых воздействию сублетальных доз гамма-излучения. Установлено, что противолучевая активность рекомбинантного флагеллина наиболее эффективно проявляется при профилактическом его введении за 15–30 мин до облучения. Однократное внутривнутрибрюшинное введение в дозе 1000 мкг/кг повышает выживаемость мышей, облучённых в дозе 7 Гр, более чем на 50% ( $p < 0,05$ ). Введение дозы, превышающей 1000 мкг/кг, оказывает выраженное токсическое действие, что усугубляет тяжесть течения острого радиационного поражения и значительно увеличивает гибель лабораторных животных. Терапевтическое введение рекомбинантного флагеллина в дозе 2, 20, 200 и 1000 мкг/кг подкожно через 15–30 мин после облучения в дозе 7 Гр оказывает выраженный терапевтический эффект. Выживаемость лабораторных животных после введения этих доз рекомбинантного флагеллина составляет от 39 до 50% в различных группах. Значимых различий между группами при оценке выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) не выявлено. Следовательно, с увеличением либо с уменьшением дозы рекомбинантного флагеллина его лечебная эффективность не меняется. При профилактическом введении рекомбинантного флагеллина в дозе 1000 мкг/кг подкожно за 15–30 мин до облучения лабораторных животных в дозе 6,5 Гр количество колониеобразующих единиц в селезенке составляет  $20 \pm 3$ . Это почти в четыре раза превышает исследуемый показатель ( $6 \pm 2$  колониеобразующие единицы селезенки, абс. ед.) при терапевтическом введении рекомбинантного флагеллина в дозе 20 мкг/кг подкожно через 15–30 мин после облучения в дозе 7 Гр. Полученные результаты подтверждают перспективность проведения дальнейших исследований, направленных на разработку флагеллинсодержащих средств химической защиты от лучевого поражения.

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

**Введение.** В настоящее время одной из важнейших и крайне актуальных проблем клинической фармакологии, радиобиологии и медицины в целом остаются вопросы противорадиационной защиты человека. Расширение контактов с источниками ионизирующих излучений в технике и медицине, возможность возникновения аварийных ситуаций на объектах атомной энергетики и ядерных силовых установках — все это определяет необходимость иметь в арсенале современной медицины специальные лекарственные средства, ослабляющие последствия радиационных воздействий [1].

В последнее десятилетие 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-го типа (toll-like receptors – TLR-5), локализованных на поверхности многих клеток иммунной системы (дендритных, макрофагов, нейтрофилов, Т-клеток) и разных типов эпителиальных клеток. Агонисты толл-подобных рецепторов в последнее десятилетие привлекают пристальное внимание исследователей, поскольку их действие в эксперименте сопровождается мощным иммуностимулирующим действием, что может быть использовано не только для лечения инфекций, но и в борьбе с онкологическими, аллергическими и другими заболеваниями. Первым агонистом толл-подобных рецепторов, нашедшим применение в клинической практике, стал имиквимод, одобренный для терапии базальноклеточного рака [1, 2].

В остром опыте на лабораторных животных доказано, что рекомбинантный флагеллин, синтезированный отечественными специалистами, проявляет выраженную радиозащитную активность [2]. В Санкт-

Петербургском государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов (Гос. НИИ ОЧБ) разработана технологическая платформа, позволяющая синтезировать высокоочищенные препараты рекомбинантного флагеллина (рФЛ) – как полноразмерного белка, так и его deletированных производных, однако имеются лишь единичные сообщения о его противолучевой активности [2, 4].

**Цель исследования.** В экспериментах на мелких лабораторных животных изучить противолучевые свойства рФЛ в условиях его профилактического и лечебного применения.

**Материалы и методы.** Исследование радиозащитного действия рФЛ проводили в опытах *in vivo* на 120 беспородных мышах – самцах массой тела 20–35 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 [3]. Для моделирования острого радиационного поражения (ОРП) лабораторных животных подвергали однократному относительно равномерному гамма-облучению на установке «ИГУР-1». Оценивали течение и исходы ОРП по влиянию на 30-суточную выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) облучённых мышей. Для оценки механизмов специфической активности рФЛ исследовали экстрамедулярное кроветворение по методике эндогенного колониеобразования [13]. Определяли количество эндогенных колониеобразующих единиц селезенки (КОЕс) на 9-е сутки после облучения. В работе использовали рФЛ, синтезированный с использованием гена *FliC*, кодирующего разновидность флагеллина бактерий *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, в Гос. НИИ ОЧБ [2].

Полученные данные подвергали стандартной 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, количества эндогенных колоний – с помощью U-критерия Манна – Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Опыты показали, что введение рФЛ улучшает течение и исходы ОРП при введении как до, так и после воздействия ионизирующего излучения. Так, при облучении мышей в дозе 7 Гр выживаемость животных контрольной группы к 30-м суткам составила 21±8%, а величина СПЖ – 14±2 сут. В

случае профилактического подкожного введения рФЛ выживаемость облученных мышей в зависимости от введенной дозы увеличивалась на 10–30%, а величина СПЖ – на 1–6 сут (табл. 1).

Таблица 1  
Профилактическая эффективность рФЛ при облучении в дозе 7 Гр

Группа	Доза препарата, мкг/кг	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Контрольная	–	21±8	14±2
Получавшая рФЛ	20	28±11	15±2
	200	33±11	16±2
	1000	50±12*	22±2

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

При этом наблюдалась прямая зависимость радиозащитного эффекта препарата от введенной дозы. Наименее эффективной оказалась доза 20 мкг/кг. При введении рФЛ в такой дозе выживаемость составила 28±11%, а величина СПЖ – 15±2 сут. В случае введения рФЛ в дозе 200 мкг/кг выживаемость облученных мышей увеличивалась до 33±11%, а величина СПЖ – до 16±2 сут. Наилучшее противолучевое действие препарата отмечено при его введении в дозе 1000 мкг/кг. В этом случае выживаемость мышей составляла 50±12%, а величина СПЖ – 22±2 сут. Выявлено, что с увеличением дозы рФЛ ухудшается его переносимость. Доза препарата, равная 1000 мкг/кг, близка для мышей к субтоксической. Так, если при подкожном введении рФЛ в дозе 2 мкг/кг неблагоприятное действие препарата не проявляется, то его введение в дозе 1000 мкг/кг характеризуется развитием у мышей вялости, заторможенности и снижения реакции на внешние раздражители.

При введении рФЛ после облучения также улучшаются течение и исходы ОРП. В этом случае значение показателя выживаемости увеличивается на 21–30%, а СПЖ – на 4–8 сут в зависимости от дозы препарата. Так, наилучшие результаты отмечены при введении рФЛ в дозе 2 и 20 мкг/кг. При введении препарата в таких дозах выживаемость облученных мышей составляет 50±12%, а величина СПЖ – 22±3 сут. Увеличение вводимой дозы рФЛ приводит к снижению выживаемости.

Таблица 2  
Терапевтическая эффективность рФЛ при облучении в дозе 7 Гр

Группа	Доза препарата, мкг/кг	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Контрольная	–	21±8	14±2
Получавшая рФЛ	2	50±14*	22±3
	20	50±12*	21±2
	200	39±11*	18±2
	1000	42±14*	21±2

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

мости и СПЖ. Так, при введении рФЛ в дозе 200 и 1000 мкг/кг выживаемость составляет  $39 \pm 11\%$  и  $42 \pm 14\%$ , а СПЖ –  $18 \pm 2$  сут и  $21 \pm 2$  сут соответственно (табл. 2).

Вероятно, такая закономерность связана с токсическими свойствами препарата при его введении в больших дозах.

Для выяснения механизмов специфической активности рФЛ исследовано его влияние на гемопоэз облучённых мышей. Установлено, что к 9-м суткам после облучения масса селезенки мышей, облученных в дозе 6,5 Гр, составила  $79 \pm 10$  мг, при этом на поверхности органа насчитывалось в среднем  $5 \pm 2$  эндогенных колоний. При профилактическом введении рФЛ в дозе 1000 мкг/кг на 9-е сут после облучения зафиксировано количество КОЕс, в 4 раза превышающее показатели контрольной группы –  $20 \pm 3$  КОЕс (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние рФЛ на показатели экстрамедуллярного кроветворения при облучении мышей в дозе 6,5 Гр**

Группа	Доза препарата, мкг/кг	Масса селезенки, мг	Количество КОЕс, абс. ед.
Контрольная	–	$79 \pm 10$	$5 \pm 2$
Профилактического введения рФЛ	1000	$84 \pm 18$	$20 \pm 3^*$
Терапевтического введения рФЛ	20	$74 \pm 10$	$6 \pm 2$

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

Иная картина наблюдалась при введении рФЛ после облучения: количество эндогенных КОЕс при введении препарата в дозе 20 мкг/кг существенно не отличалось от значения показателя в контрольной группе. Таким образом, в случае профилактического введения рФЛ механизмы действия препарата связаны со стимуляцией кроветворения, а при введении после облучения влияние данного механизма незначительно, что подтверждается работами других авторов [2, 9, 11, 12]. Данные литературы [2, 6, 7, 8] также свидетельствуют о повышении в крови животных после введения флагеллина уровня цитокинов, обладающих гемостимулирующим действием. Тем не менее механизм радиозащитного действия рФЛ может быть более сложным, что требует дополнительного исследования.

Полученные результаты в общем согласуются с данными зарубежных исследователей [6, 11] о высокой противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина. По современным представлениям, фармакологическая активность флагеллина обусловлена активацией ядерного фактора транскрипции каппа-В (NF- В), являющегося одним из основных регуляторов экспрессии генов, стимулирующих пролиферацию антиапоптотических белков, белков-антиоксидантов и большого спектра провоспалительных цитокинов, что и предопределяет потенциал флагеллина как био-

логического протектора от воздействия ионизирующего излучения. Несмотря на то, что активация всех толл-подобных рецепторов происходит по общему сценарию, флагеллин как лиганд TLR-5 с позиции применения в качестве радиопротекторного средства обладает рядом преимуществ. Так, рецепторы TLR-5 интенсивно экспрессируются клетками гемопоэтической системы и эпителия кишечника, являющимися первичными мишенями при радиационном поражении, при этом образование комплекса TLR-5-флагеллин хорошо переносится млекопитающими [9]. Активация NF- В-сигнального пути при связывании флагеллина рецепторами TLR-5 не приводит к развитию «цитокинового шторма», вызванного гиперпродукцией фактора некроза опухолей альфа, как это имеет место в случае лигандов других толл-подобных рецепторов, а способствует стимуляции защитных реакций организма, например, в результате индукции нейтрофилами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, повышающего выживаемость, пролиферацию и дифференцировку предшественников гранулоцитов, и интерлейкина-6, ускоряющего восстановление костномозгового кроветворения после радиационного воздействия [7, 9].

Также ключевыми механизмами радиозащитной эффективности флагеллина как агониста TLR-5 являются ингибирование радиационно-индуцированного апоптоза и снижение интенсивности свободно-радикальных процессов, обусловленное активацией системы антиоксидантной защиты организма [5, 6, 10, 12]. 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 флагеллинсодержащих средств химической защиты от лучевого поражения.

**Выводы**

1. Рекомбинантный флагеллин оказывает радиозащитное действие при его введении лабораторным животным в дозе 1000 мкг/кг подкожно за 15–30 мин до гамма-облучения в дозе 7 Гр. За 30-суточный период наблюдения рФЛ увеличивает выживаемость 50% лабораторных животных при 80% гибели животных в контрольной группе. Введение флагеллина в дозе, превышающей 1000 мкг/кг, оказывает выраженное токсическое действие.

2. Терапевтическое введение рекомбинантного флагеллина в дозе 2, 20, 200, 1000 мкг/кг подкожно через 15–30 мин после облучения в дозе 7 Гр оказывает выраженный терапевтический эффект. Выживаемость лабораторных животных составляет 40–50% при 80% гибели в контрольной группе.

3. Профилактическое введение рекомбинантного флагеллина в дозе 1000 мкг/кг подкожно за 15–30 мин до облучения в дозе 6,5 Гр не влияет на массу

селезенки мышей. В то же время количество колониобразующих единиц в селезенке увеличивается в четыре раза по сравнению с контрольной группой. Введение рекомбинантного флагеллина в дозе 20 мкг/кг подкожно через 15–30 мин после облучения в дозе 7 Гр не оказывает влияния на количество КОЕс.

### 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Carvalho, F.A. TLR5 activation induces secretory interleukin-receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage / F.A. Carvalho [et al.] // Mucosal Immunol. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 102–111.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Krivokrysenko, V.I. Identification of granulocyte colonystimulating 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.
12. 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.
13. Till J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E. Till, E.A. McCulloch // Rad. Res. 1961. – Vol. 14. – P. 213–222.

R.Yu. Sapozhnikov, Yu.Sh. Khalimov, V.I. Legeza, A.N. Vlasenko,  
I.S. Drachev, E.B. Suprunova, A.N. Grebenyuk, A.S. Simbirtsev

### Preventive and therapeutic efficacy of recombinant flagellin in acute radiation injury

**Abstract.** The effect of prophylactic and therapeutic administration of recombinant flagellin on the survival rates of white outbred male mice exposed to sublethal doses of gamma radiation was studied. It has been established that the antiradiation activity of recombinant flagellin is most effectively manifested in its prophylactic administration 15–30 minutes before irradiation. A single intraperitoneal injection in a dose of 1000 µg/kg increases the survival rate of mice irradiated at a dose of 7 Gy by more than 50% ( $p < 0,05$ ). The administration of a dose exceeding 1000 mcg/kg has a pronounced toxic effect, which aggravates the severity of acute radiation injury and significantly increases the death of laboratory animals. The therapeutic administration of recombinant flagellin at a dose of 2, 20, 200 and 1000 µg/kg subcutaneously, 15–30 minutes after irradiation at a dose of 7 Gy, has a pronounced therapeutic effect. The survival rate of laboratory animals after administration of these doses of recombinant flagellin is from 39 to 50% in different groups. There were no significant differences between groups in the assessment of survival and average life expectancy. Consequently, with increasing or decreasing the dose of recombinant flagellin, its therapeutic efficacy does not change. With the prophylactic administration of recombinant flagellin at a dose of 1000 µg/kg subcutaneously 15–30 minutes before the irradiation of laboratory animals at a dose of 6,5 Gy, the number of colony forming units in the spleen is  $20 \pm 3$ . This is almost four times the studied indicator ( $6 \pm 2$  colony-forming units in the spleens, abs.), with therapeutic administration of recombinant flagellin at a dose of 20 µg/kg subcutaneously 15–30 minutes after irradiation at a dose of 7 Gy. The results confirm the promise of further research aimed at developing flagellin-containing chemical protection from radiation injury.

**Key words:** recombinant flagellin, radioprotective efficacy, acute radiation injury, toll-like receptors, gamma radiation, survival, prophylactic and therapeutic administration of flagellin-containing agents.

Контактный телефон: 8-981-888-89-21; e-mail: vmeda-nio@mil.ru