
МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 615.012:663.1:57.084.1:599.323.4:539.1.047

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕЛЕТИРОВАННОГО ВАРИАНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ ОСТРОГО РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ У МЫШЕЙ

© 2025 г. Е. В. Мурзина^{1, *}, Г. А. Софронов¹, А. С. Симбирцев², Н. В. Аксенова¹,
Н. А. Климов³, О. М. Веселова¹, Е. В. Дмитриева¹, В. В. Копать⁴, А. А. Рябченкова⁴,
Е. Л. Чирак⁴, Е. Р. Чирак⁴, И. В. Духовлинов⁴

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

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
Санкт-Петербург, Россия

³Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: elenmurzina@mail.ru

Поступила в редакцию 8.11.2023 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 11.09.2024 г.

Цель работы — экспериментальное изучение радиозащитного действия рекомбинантного флагеллина, лишённого антигенных свойств, в условиях общего внешнего облучения мышей по показателям выживаемости и влиянию на гемо- и иммунопоэз. В работе использовано новое рекомбинантное производное флагеллина *Salmonella enterica* — белок dFliC, полученный путем структурно-ориентированного реинжиниринга ранее разработанной молекулы. Радиозащитное действие dFliC изучали на модели костномозговой формы острого радиационного поражения у мышей. 30-суточную выживаемость облученных мышей анализировали по методу Каплана—Мейера. Оценивали влияние белка dFliC на численность селезеночных колониеобразующих единиц (КОЕ-с) и миелокариоцитов в костном мозге, клеточный состав и цитокиновый профиль периферической крови мышей. Для статистической обработки результатов использовали программное обеспечение Statistica 8.0. Разработан протокол очистки молекулы рекомбинантного флагеллина dFliC и получены образцы белка, чистота которого составила 92.79%. Установлено, что введение dFliC в дозе 1 мг/кг за 15–30 мин до облучения в дозе 7.8 Гр повышало 30-суточную выживаемость мышей на 38% ($p < 0.05$). Применение dFliC способствовало повышению количества КОЕ-с на 9 сутки после облучения в дозе 7 Гр в 2.8 раза ($p < 0.05$), сохранению жизнеспособности гемопоэтических стволовых клеток, снижению тяжести тромбоцитопении. Регистрировалось повышение продукции ИЛ-3 и ГМ-КСФ, участвующих в регуляции ранних этапов развития кроветворных клеток, и хемоаттрактанта макрофагов ИЛ-12p40; содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-33 поддерживалось на более низком уровне, чем при облучении без применения dFliC. Структурная перестройка молекулы флагеллина не привела к снижению радиозащитного действия рекомбинантного белка. Показано, что противолучевая эффективность dFliC обеспечивается защитным действием на кроветворные клетки костного мозга и стимуляцией постлучевого восстановления гемо- и иммунопоэза путем регуляции экспрессии цитокинов с широким спектром биологической активности.

Ключевые слова: делетированный рекомбинантный флагеллин, рентгеновское излучение, выживаемость, эндогенное колониеобразование, мыши, цитокины

DOI: 10.31857/S0869803125010034, EDN: KNWTAV

Производные бактериального белка флагеллина обладают существенным терапевтическим потенциалом, обусловленным их способностью стимулировать врожденный и адаптивный им-

мунный ответ как результат активации толл-подобных рецепторов 5-го типа (TLR5), экспрессирующихся на поверхности иммунных клеток, включая дендритные клетки, макрофаги, лимфо-

циты и естественные клетки-киллеры, и на поверхности клеток радиочувствительных тканей (кишечного эпителия, гемопоэтических и прогениторных стволовых клеток) [1]. Активация флагеллином и его производными TLR5-зависимого сигналинга обеспечивает защиту нормальных тканей от радиационного и ишемически-реперфузионного повреждения, в особенности кровеносную и желудочно-кишечную системы, защищает репродуктивную систему и усиливает клеточную и тканевую регенерацию, кроме того есть данные, что флагеллин увеличивает выживаемость мышей с опухолями [2, 3].

Флагеллины также могут распознаваться цитозольными рецепторами. Показано, что в ответ на флагеллин, доставляемый в цитозоль через специфические транспортные системы факторов вирулентности, происходит активация инфламмасом NAIP5–NLRC4 [4]. Установлено, что флагеллин проявляет свои радиозащитные эффекты как через TLR5-зависимые сигнальные пути, так и через NLRC4, при этом NLRC4-связывающий домен, кроме того, участвует в развитии воспалительной реакции [5].

Флагеллин, являющийся мономером бактериального жгутика, структурно организован в четыре домена. Консервативные домены D0 и D1 необходимы для полимеризации жгутика и активации врожденного иммунитета — в них находятся участки, критически важные для связывания с TLR5. Гипервариабельные домены D2 и D3 определяют собственные антигенные свойства флагеллина [6] и при этом толерантны к делециям [7].

Однако при удалении гипервариабельных доменов D2 и D3 в консервативных доменах молекулы остаются Т- и В-клеточные эпитопы, являющиеся сильными антигенами, в силу чего повторное использование белка может значительно повысить риски нежелательных реакций и снизить эффективность препаратов на основе флагеллина [8]. Решением данной проблемы может стать разработка вариантов рекомбинантного флагеллина с элиминированными Т- и В-клеточными эпитопами и участком активации инфламماسомы с сохранением TLR5-опосредованной иммуномодулирующей активности [9]. Кроме того, идентификация и удаление эпитопов может увеличить биодоступность терапевтического белка за счет уменьшения эффективного размера молекулы и облегчения связывания с TLR5 [10].

Разработанный ранее делетированный флагеллин *Salmonella enterica* (рФЛ) показал радио-

протекторное действие [11–13]. Основным дальнейшим направлением работ с белком рФЛ в качестве противолучевого агента представляется его структурно-ориентированный реинжиниринг с помощью и экспериментальных, и вычислительных подходов, включающий внесение точечных мутаций и делеций в ключевые В- и Т-клеточные эпитопы и делецию участка активации инфламماسомы с минимальной потерей TLR5-зависимой активации ядерных факторов NF- κ B и AP-1. Изменение или удаление соответствующих аминокислотных последовательностей или доменов без ущерба для стабильной структуры и стимулирующей активности TLR5 имеет решающее значение для разработки нового варианта флагеллина.

Цель работы — экспериментальное изучение радиозащитного действия рекомбинантного флагеллина, лишенного антигенных свойств, в условиях общего внешнего облучения мышей по показателям выживаемости и влиянию на гемо- и иммунопоэз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Получение рекомбинантного белка dFliC

Аминокислотную последовательность белка dFliC сконструировали на основе охарактеризованной молекулы делетированного флагеллина GP532 [8] с сохранением домена ND0 для образования стабильной архитектуры D0/D1 [14]. Делеции доменов D2 и D3, а также мутации в иммуногенные В- и Т-клеточные эпитопы вносили в полноразмерную аминокислотную последовательность *Salmonella enterica* (UniProt ID P06179) согласно литературным данным [8]. Таким образом, в аминокислотную последовательность UniProt ID P06179 ввели мутации: 176AA–413AA с заменой делетированных доменов D2 и D3 на гибкий линкер SGGGGG, с внесенными мутациями в домены ND1 и CD0 (I49A, F53A, N68A, N100A, T102A, S104A, S106A, D107A, S110A, D113A, N127Q, F131A, N132A, G133A, Q142A, K144A, E153A, T154A, Q482D, N474Q, V488T). На N-конце белка ввели полигистидиновый тэг.

Полученную аминокислотную последовательность перевели в нуклеотидную с адаптацией кодонного состава для экспрессии в клетках *Escherichia coli* с помощью сервиса EMBOSS Backtranseq [15]. Нуклеотидную последовательность гена синтезировали химически и клонировали в вектор pET22a(+) (GenScript, США). Теоретические значения физико-химических

характеристик белка рассчитывали с помощью сервиса ExpAsy ProtParam [16]. Моделирование трехмерной структуры белка проводили с помощью I-TASSER [17]. Полученной плазмидой pET22a/dFliC трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5a по стандартному протоколу методом электропорации при условиях 1.8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом для наработки плазмидной ДНК [18]. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) и анализировали секвенированием по Сэнгеру. Для наработки белка dFliC клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой pET22a/dFliC при тех же условиях. Экспрессию белка dFliC в клетках индуцировали с помощью ИПТГ с конечной концентрацией 0.5 ммоль/л в среде LB в плоскодонных качалочных колбах объемом 250 мл. Контроль экспрессии осуществляли с помощью электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях [19].

Биомассу клеток *E. coli* BL21(DE3) после индукции белка ресуспендировали в буфере (50 ммоль/л Трис-НСl, 0.1% Тритон X-100, 0.5 ммоль/л NaCl, pH 8.0) из расчета 10 мл буфера на 1 г клеток. Суспензию разрушали ультразвуком (время озвучивания — 2 мин, время импульса — 30 с, время паузы между импульсами — 30 с, амплитуда — 70%) и центрифугировали при 10000 g 20 мин. Отмывку производили трижды. Полученный осадок, содержащий тельца включения, ресуспендировали в буфере (50 ммоль/л Трис-НСl, 0.1% Тритон X-114, 0.5 ммоль/л NaCl, 8 ммоль/л мочевины, 20 ммоль/л имидазол, pH 8.0) из расчета 10 мл буфера на 1 г исходной биомассы.

Хроматографическую очистку проводили с использованием хроматографа АКТА Purifier 100 (GE Healthcare, Швеция). Для обогащения по целевому белку на первой стадии хроматографической очистки использовали иммобилизованную металлоаффинную хроматографию на колонне HisTrap HP 5мл (Cytiva, США). Поглощение детектировали при длине волны 280 нм. Буфер А: 20 ммоль/л Трис-НСl, 0.5 ммоль/л NaCl, 8 ммоль/л мочевины, 0.1% Тритон X-100, 20 ммоль/л имидазол, pH 8.0. Буфер В: 20 ммоль/л Трис-НСl, 0.5 ммоль/л NaCl, 8 ммоль/л мочевины, 0.1% Тритон X-100, 0.5 ммоль/л имидазол, pH 8.0. Перед нанесением на колонну раствора с белком, колонну предварительно уравнивали 10 объемами колонны (CV) буфера В при скорости потока 5 мл/мин, затем промывали 5 CV буфера А.

Не связавшуюся с сорбентом фракцию отбирали для количественного определения целевого белка. Далее колонну промывали 5 CV буфера А. Элюцию осуществляли линейным градиентом 0–100% буфера В за 10 CV при скорости потока 5 мл/мин. После проведения металлоаффинной хроматографии рефолдинг белка осуществляли разведением в 40 раз буфером, содержащим 20 mM Tris-НСl, 0.1 моль/л NaCl, pH 8.0. На второй стадии хроматографической очистки рекомбинантный белок отделяли от липополисахаридов, остаточных белков, агрегатов и вспомогательных веществ с помощью гидрофобной хроматографии на HiTrap Phenyl HP 5мл (Cytiva, США). Для этого колонну уравнивали буфером А: 20 ммоль/л Трис-НСl, 0.75 ммоль/л NaCl, pH 8.0 при скорости потока 5 мл/мин. Концентрация NaCl в образце белка при нанесении на колонну составила 0.7 моль/л. Элюирование осуществляли 100% буфера В: 20 mM Tris-НСl, pH 8.0 за 5 CV при скорости потока 5 мл/мин. Полученную фракцию белка обессоливали и концентрировали с помощью колонок Amicon Ultra (Merck, Германия) с диаметром пор 10 кДа. Белок dFliC, сконцентрированный до 1 мг/мл, хранили в растворе, содержащем 50 ммоль/л Трис-НСl, 0.1% Tween-20, 0.3%-ный бензиловый спирт, pH 8.0.

Количество антигена и чистоту во всех отобранных фракциях определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и электрофорезом в 12%-ном ПААГ. Концентрацию белка в растворах определяли колориметрическим методом с использованием набора для анализа ВСА (Pierce, Германия) для создания корреляции полученных значений концентрации белка с площадью пика на хроматограмме, полученной с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для количественного определения содержания рекомбинантного белка и его чистоты применяли метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1100 и аналитической колонки Jupiter 300 C18, 5 мкм, 300Å, 4.6 × 250 мм, (Phenomenex, США). Элюирование проводили линейным градиентом 10–90% буфера В за 30 мин, скорость потока: 1 мл/мин, где буфер А — 0.1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде, буфер В — 0.1% ТФУ в ацетонитриле, температура колонки 50 °С. Поглощение детектировали при длине волны 214 нм. Отобранные на стадиях очистки фракции белка и очищенный белок анализировали также электрофорезом в 12%-ном ПААГ. Остаточные липополисахариды определяли с помощью гел-тестом варианта ЛАЛ-теста (Pyrotell Multi-test

0.125ЕУ/мл, США) согласно инструкции производителя. Остаточные белки штамма-продуцента определяли с помощью набора *E. coli* HCP ELISA Kit (Cygnus, США) согласно инструкции производителя. Остаточную ДНК штамма-продуцента определяли с помощью набора *E. coli* Host Cell DNA Detection Kit in Wells (Cygnus, США) согласно инструкции производителя. Белок рФЛ получали как описано ранее [11].

Экспериментальная модель. Исследование выполнено на мышинной модели костномозговой формы острого лучевого поражения, вызванного общим внешним облучением экспериментальных животных. В качестве биообъекта были использованы половозрелые белые нелинейные мыши-самцы (130 голов) массой тела 18–22 г, полученные в Питомнике лабораторных животных “Рапполово” Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Ленинградская обл.). Животных содержали в соответствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 г. “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур” в стандартных условиях вивария с поддержанием 12-часового цикла освещения, со свободным доступом к воде и пище. Для кормления использовали полнорационный гранулированный комбикорм “Комбикорм ЛБК-120” (ЗАО “Тосненский комбикормовый завод”). После поступления из питомника животные находились в 14-дневном карантине с ежедневным контролем общего состояния при визуальном осмотре; грызуны с выявленными отклонениями в эксперименты не включались. В качестве основного критерия рандомизации животных по экспериментальным группам использовали массу тела, межгрупповые отличия по данному показателю не превышали 10%.

Все манипуляции с лабораторными животными выполняли в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [20]. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом при Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова от 19 июля 2022 года (протокол № 267).

Для испытаний использовали препараты белков dFlis и рФЛ в концентрации 1 мг/мл, которые были охарактеризованы по параметрам качества, необходимым для проведения дальнейших исследований на животной модели. Для обоих белков содержание остаточных ДНК штамма-продуцента составляло менее 200.0 нг/мг белка, БШП – менее 10 мкг/мг белка (не более 1% от содержания

белка), содержание эндотоксинов в препаратах белков составляло менее 12.5 ЕЭ/мл. В качестве препарата сравнения использовали ИЛ-1β человека в виде субстанции коммерческого препарата “Беталейкин” в лекарственной форме – лиофилизат для приготовления раствора, 1 мкг/ампула. Разведение препаратов до необходимой концентрации проводили 0.9%-ным раствором хлорида натрия (физиологического раствора, ООО “Гротекс”, Россия) *ex tempore*, все препараты вводили экспериментальным животным внутривентрально (в/б) из расчета 0.1 мл на 10 г массы тела мыши. Инъекции dFlis и рФЛ осуществляли за 15–30 мин до облучения в дозе 1 мг/кг, согласно полученным нами ранее экспериментальным данным [12]. ИЛ-1β вводили животным в дозе 50 мкг/кг через 15–30 мин после облучения. Животным контрольных групп вводили 0.9%-ный раствор хлорида натрия в объеме 0.25 мл.

Облучение животных проводили с помощью рентгеновского терапевтического аппарата РУМ-17 (Мосрентген, СССР). Параметры облучения: напряжение 180 кВ, сила тока 14 мА; фильтры Cu 0.5 мм, Al 1 мм; мощность дозы 0.328 Гр/мин, направление “спина–грудь”, фокусное расстояние 50 см. Поглощенная доза рентгеновского излучения составляла 7 Гр (ЛД_{50–70/30}) или 7.8 Гр (ЛД_{70–90/30}). Одновременно облучали животных из разных экспериментальных групп. “Ложно облученных” мышей помещали в предназначенные для облучения пластиковые контейнеры и выдерживали при выключенной анодной трубке рентгеновской установки.

Изучение радиозащитной эффективности включало анализ параметров 30-суточной выживаемости и оценку состояния и восстановления гемо- и иммунопоэза у облученных в летальных дозах мышей. После облучения животных проводили ежедневный контроль их клинического состояния путем визуального осмотра и учет павших, два раза в неделю регистрировали массу тела мышей опытных и контрольных групп. Эвтаназию животных с целью забора биоматериала для исследований осуществляли методом декапитации с премедикацией внутримышечным введением золетила 100 (Virbas S.A., Франция). Для гематологических исследований отбирали образцы периферической крови в объеме 50 мкл в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА; анализ выполняли с помощью гематологического анализатора MicroCC-20Plus-Vet (High Technology, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Оставшуюся кровь собирали в пробирки, сыворотку отделяли центрифугированием

при 1500 g в течение 15 мин на центрифуге Эппендорф 5804R (Eppendorf AG, Германия), отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при температуре -40°C до проведения анализа цитокинового спектра (интерлейкинов – ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-11, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-23, ИЛ-27, ИЛ-33, интерферона β (ИФН- β), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP). Определение содержания цитокинов/хемокинов в образцах сыворотки крови мышей было проведено в отделе иммунологии Института экспериментальной медицины с использованием набора Mouse Cytokine Panel 2 (Merck Millipore Milliplex, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для оценки состояния гемопоэза у облученных животных на фоне применения профилактического препарата проводили исследование жизнеспособности стволовых кроветворных клеток костного мозга по тесту эндогенного колониообразования [21]. На 9-е сутки после облучения у мышей опытных и контрольных групп извлекали селезенки, взвешивали, фиксировали в чашках Петри свежеприготовленным раствором Буэна, содержащим 75 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 25 мл 40%-ного формалина и 5 мл ледяной уксусной кислоты, и через 24 ч проводили подсчет количества образовавшихся колониобразующих единиц (КОЕ-с), учитывая колонии диаметром более 0.4 мм. Изменения массы селезенки у мышей разных групп оценивали по абсолютным значениям и по массовым коэффициентам, представляющим собой отношение массы органа (мг) к массе тела животного (г).

Получение клеточной суспензии костного мозга и подсчет общего количества ядросодержащих клеток (миелокариоцитов) проводили в соответствии с общепринятой методикой [22].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программного обеспечения “Excel” (Microsoft Office, США) и Statistica 8,0 (StatSoft, США) с использованием непараметрических критериев – логрангового, χ^2 , ANOVA Краскела–Уоллеса, Манна–Уитни. Выживаемость облученных животных анализировали по методу Каплана–Майера. При проведении парных сравнений различия принимали статистически значимыми при $p < 0.05$, в случае сравнений нескольких групп применяли поправку Бонферрони. Результаты представлены в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q25; Q75).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика делетированного рекомбинантного белка dFliC

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка dFliC основана на последовательности *S. enterica* UniProt ID P06179, в которую внесены замены I49A, F53A, N68A, N100A, T102A, S104A, S106A, D107A, S110A, D113A, N127Q, F131A, N132A, G133A, Q142A, K144A, E153A, T154A, Q482D, N474Q, V488T, располагающиеся в доменах D0 и D1. Гипервариабельные домены D2 и D3 (аминокислоты 176–413) заменены на гибкий аминокислотный линкер SGGGGG, обеспечивающий правильную пространственную укладку консервативных доменов [23].

На N-конце белка дополнительно введен полигистидиновый тэг $6 \times \text{His}$, позволяющий проводить очистку белка путем металл-хелатной аффинной хроматографии. Длина белка составляет 303 аминокислоты. Теоретически предсказаны масса белка в 31.5 кДа и изоэлектрическая точка 5.87. Структура белка dFliC представлена на рис. 1.

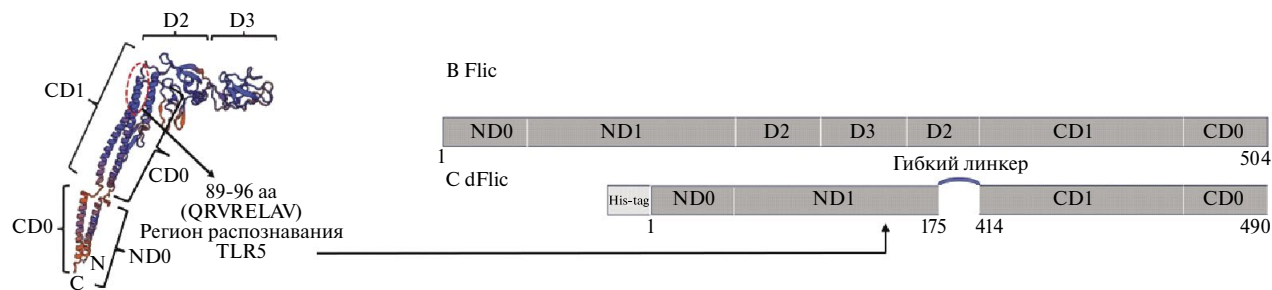


Рис. 1. Структура рекомбинантного белка dFliC: А – доменная 3D-структура FliC UniProt ID P06179, полученная с помощью iTASSER, В – доменная структура FliC, С – доменная структура белка dFliC.

Fig. 1. Structure of the recombinant protein dFliC: А – 3D structure of FliC UniProt ID P06179 domains, obtained using iTASSER, В – structure of FliC domains, С – structure of dFliC domains.

Выход биомассы в условиях культивирования в плоскодонных качалочных колбах составил 8 г/л за 3 ч индукции. При таких условиях эффективность экспрессии составляла до 30% от общего белка, оценка производилась денситометрически (Syngene Bio Imaging systems, GB). В ходе металлоаффинной хроматографии на хроматографическую колонну HisTrap HP 5мл нанесли 380 мг рекомбинантного флагеллина с концентрацией целевого белка 1.9 мг/мл. В ходе первой стадии хроматографической очистки суммарно было получено 245 мг FliC в концентрации 1.5 мг/мл. После проведения рефолдинга методом разведения было получено 170 мг белка. Эффективность рефолдинга составила 69% (ВЭЖХ-анализ). В результате гидрофобной хроматографии с использованием HiTrap Phenyl HP 5 мл было получено 130 мг рекомбинантного белка dFliC в концентрации 8.6 мг/мл. Чистота элюата проанализирована с помощью электрофореза в 12% ПААГ (рис. 2) в денатурирующих условиях.

В результате хроматографической очистки был получен препарат белка dFliC с концентрацией 1 мг/мл. Чистота полученного белка по ВЭЖХ составила 92.78% (рис. 3). Время удержания dFliC: 14.294 мин.

Содержание остаточных ДНК штамма-продуцента менее 200.0 нг/мг белка, БШП — менее 10 мкг/мг белка (не более 1% от содержания белка). Содержание эндотоксинов в препарате белка составило менее 12.5 ЕЭ/мл.

Оценка радиозащитной эффективности рекомбинантного белка dFliC

На первом этапе работы было оценено влияние белка dFliC на параметры 30-суточной выживаемости лабораторных мышей после облучения в дозе 7.8 Гр в сравнении с вариантом рекомбинантного флагеллина рФЛ, а также с действием противолучевого препарата с доказанной эффективностью — рекомбинантного ИЛ-1 β [24]. Все сравниваемые препараты демонстрировали сопоставимую эффективность и способствовали защите мышей от гибели в результате костно-мозговой формы острого лучевого поражения (рис. 4).

30-суточная выживаемость животных, подвергнутых воздействию облучения без фармакологической защиты, составила $23.1 \pm 11.7\%$ (95%-ный ДИ: 17.6; 28.4). Применение dFliC приводило к повышению данного показателя на 38.4%, обеспечив защиту от гибели $61.5 \pm 13.5\%$

(95%-ный ДИ: 45.2; 76.8) животных в группе; использование рФЛ увеличило выживаемость мышей на 43.6% — до $66.7 \pm 13.6\%$ (95%-ный ДИ: 48.9; 84.5). Вместе с тем существенного влияния на продолжительность жизни погибших от облучения мышей использованные биотехнологические препараты не оказали.

Таким образом, экспериментально подтверждено, что структурная перестройка молекулы рекомбинантного флагеллина не привела к снижению радиозащитного действия.

Изучение механизмов радиозащитного действия рекомбинантного белка dFliC

Второй этап экспериментальных исследований был направлен на получение более детальной характеристики радиозащитного эффекта флагеллин-содержащего белка dFliC, для чего

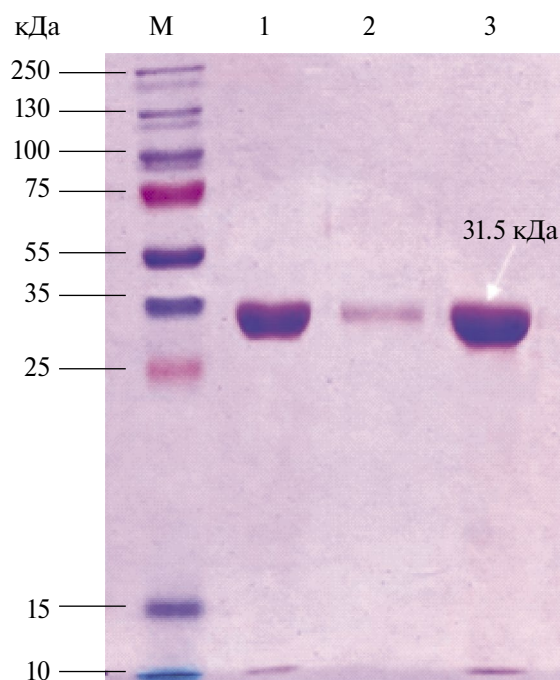


Рис. 2. Электрофореграмма результатов хроматографической очистки dFliC методом гидрофобной хроматографии в 12%-ном ПААГ. М — Смесь маркерных фрагментов PageRuler Protein Ladder Plus; 1 — dFliC, фракция, наносимая на колонну (8 мкг); 2 — dFliC, фракция, не связавшаяся с колонной в ходе гидрофобной хроматографии (10 мкл); 3 — dFliC, целевая фракция, полученная в ходе гидрофобной хроматографии (10 мкг).

Fig. 2. Electropherogram of the results of chromatographic purification of dFliC using hydrophobic chromatography (HIC) in 12% PAAG. M — Mixture of marker fragments PageRuler Protein Ladder Plus; 1 — dFliC, fraction applied to the column (8 μ g); 2 — dFliC, unbound fraction from the column during HIC (10 μ l); 3 — dFliC, target fraction obtained during HIC (10 μ g).

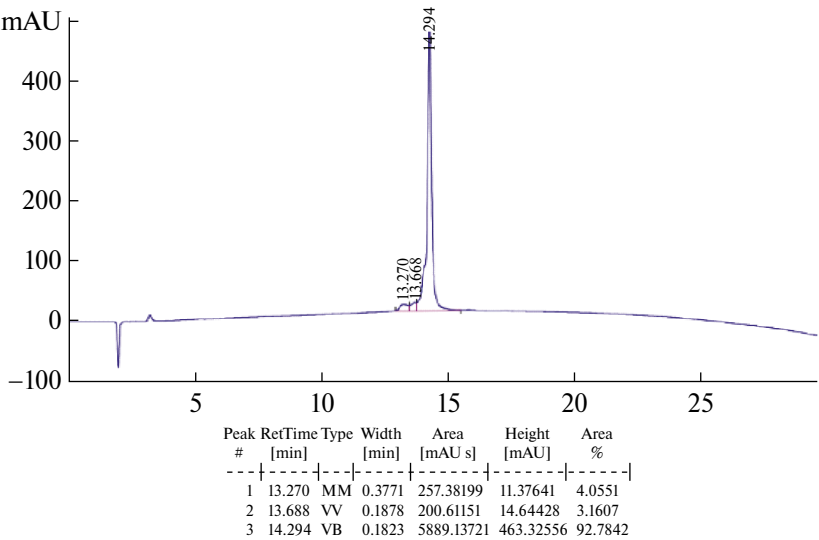


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ образца очищенного рекомбинантного белка dFliC на хроматографе Agilent 1100 с использованием аналитической колонки Jupiter C18, 5 мкм, 46 300 А°, 4,6 × 250 мм (Phenomenex, США). Время удержания: 14.294 мин. Чистота целевого белка: 92.79%.

Fig. 3. HPLC analysis of a sample of purified recombinant dFliC protein using Agilent 1100 chromatograph using an analytical column Jupiter C18, 5 μm, 46,300 Å°, 4.6 × 250 mm (Phenomenex, USA). Retention time: 14.294 min. Purity of target protein: 92.79%.

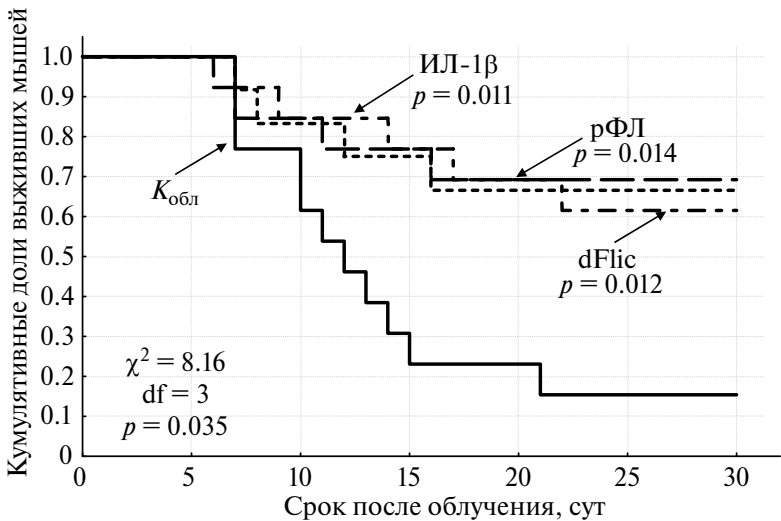


Рис. 4. Кривые выживаемости мышей после общего облучения в дозе 7.8 Гр без лечения ($K_{обл}$) и профилактического применения флагеллин-содержащих белков (pФЛ и dFliC) в дозе 1 мг/кг или рекомбинантного интерлейкина-1β (ИЛ-1β), 50 мкг/кг.

p – значимость отличий с группой “ $K_{обл}$ ” (логранговый критерий).

Fig. 4. Survival curves of mice after total body X-ray irradiation at a dose of 7.8 Gy without treatment and the use of flagellin-containing proteins (“pФЛ” and “dFliC”) at a dose of 1 mg/kg or recombinant interleukin-1β (“ИЛ-1β”), 50 μg/kg.

была использована методика эндогенного колониобразования с облучением мышей в дозах 7 и 7.8 Гр.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что радиационное воздействие приводило к значительному снижению размеров и массы селезенки у животных всех групп на 9-е сутки после

облучения, что отразилось и в значениях массовых коэффициентов данного иммунного органа. Применение dFliC способствовало уменьшению выраженности повреждающего действия рентгеновского излучения, при этом в случае облучения животных в дозе 7 Гр отличия между группами с использованием рекомбинантного белка или без него были статистически значимы.

Таблица 1. Масса и массовые коэффициенты селезенки интактных мышей ($K_{\text{биол}}$) и на 9-е сутки после общего облучения в разных дозах и введения dFliC в дозе 1 мг/кг, Me (Q25; Q75)**Table 1.** Weight and mass index of the spleen in mice on day 9 after total body X-ray irradiation and administration of dFliC at a dose of 1 mg/kg

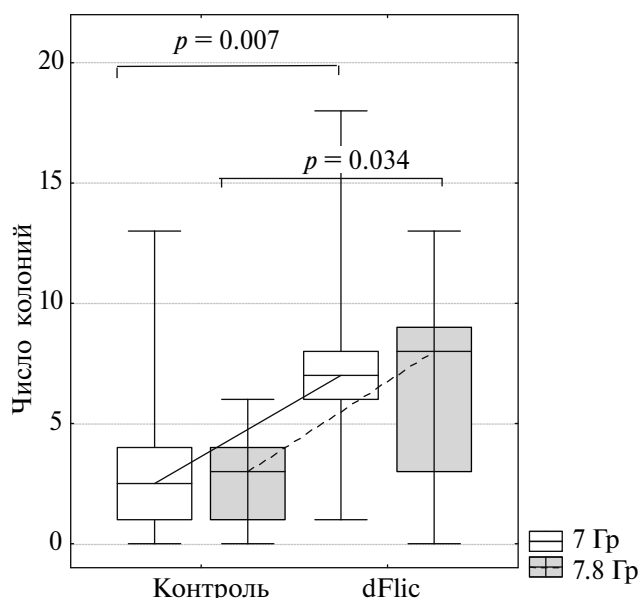
Группы	Масса селезенки, мг	Массовый коэффициент селезенки
$K_{\text{биол}}$	146 (118; 175)	5.5 (4.35; 6.1)
dFliC	136 (113; 166)	4.9 (3.9; 5.8)
7 Гр	60.5 (50; 75) *	2.57 (1.81; 2.85) *
dFliC + 7 Гр	79 (59; 97) * #	3.04 (2.36; 4.11) * #
7.8 Гр	63 (55; 81) *	2.62 (2.01; 3.26) *
dFliC + 7.8 Гр	77 (65; 97) **	3.25 (2.97; 3.63) *

* Отличия статистически значимы с группой " $K_{\text{биол}}$ ", $p < 0.001$, ** то же, $p < 0.05$; # то же с группой "7 Гр", $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

Межгрупповое сравнение эффективности образования эндогенных колоний также выявило положительное влияние рекомбинантного белка dFliC: количество образовавшихся КОЕ-с статистически значимо возрастало: с 2.5 (1; 4) у животных контрольной группы до 7 (6; 8) при применении dFliC до облучения в дозе 7 Гр и с 3 (1; 4) до 8 (3; 9) колоний соответственно, у облученных животных в дозе 7.8 Гр (рис. 5). Полученные данные подтверждают, что использование dFliC в профилактических целях способствовало повышению устойчивости костномозговых клеток-предшественников гемопоэза к лучевому воздействию [21].

Численность ядросодержащих клеток в костном мозге бедренных костей мышей на 9-е сутки после облучения в дозах 7 и 7.8 Гр без лечения снизилась более чем на 30% в сравнении с показателями у интактных животных (рис. 6). Однократное введение dFliC без последующего облучения практически не изменяло клеточность костного мозга, регистрируемую на 9-е сутки, в то время как его использование до облучения в дозе 7 Гр статистически значимо уменьшало степень опустошения костного мозга в сравнении с облученными без лечения животными. При облучении в дозе 7.8 Гр наблюдалась значительная индивидуальная вариабельность численности сохранившихся кроветворных клеток, в силу чего значимые отличия между группами животных, облученных без фармакологической защиты или с применением dFliC, не выявлялись. Тем не менее при использовании dFliC у 50% мышей значение данного показателя находилось на уровне, сопоставимом с животными группы биологического контроля.

Изучение показателей периферической крови мышей показало, что на 9-е сутки после рентгеновского воздействия в дозах 7 и 7.8 Гр у облученных животных регистрировалась тяжелая лейкопения, выражающаяся в более чем десятикратном снижении уровня циркулирующих лейкоцитов, однако на данном сроке наблюдения

**Рис. 5.** Число 9-суточных эндогенных колоний на селезенках мышей после общего облучения в разных дозах без лечения (Контроль) и с применением dFliC в дозе 1 мг/кг, Me (Q25; Q75).

p — значимость отличий с группой " $K_{\text{обл}}$ " (критерий Манна–Уитни).

Fig. 5. The number of endogenous colony-forming units on the spleens of mice on day 9 after total body X-ray irradiation and the use of dFliC at a dose of 1 mg/kg.

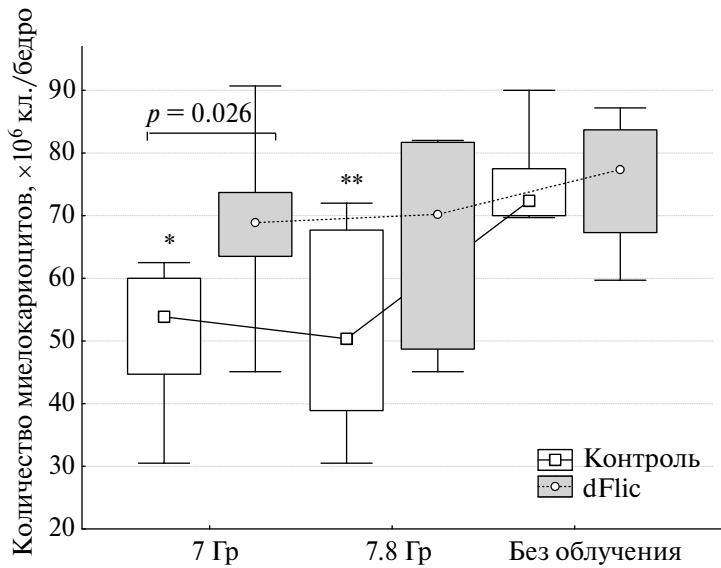


Рис. 6. Число ядросодержащих клеток в костном мозге мышей на 9-е сутки после общего облучения без лечения (Контроль) или с профилактическим введением dFliC, Ме (Q25; Q75).
* Отличия статистически значимы в сравнении с животными без облучения, $p < 0.005$; ** то же, $p < 0.01$ (критерий Манна–Уитни).
Fig. 6. Number of myelokaryocytes in the mouse bone marrow on day 9 after total body X-ray irradiation without treatment or using dFliC.
* $p < 0.005$; ** – $p < 0.01$ vs unirradiated mice (Mann–Whitney U Test)

различий с контрольными группами после применения препарата не выявлялось, хотя отмечалась тенденция к повышению общего содержания лейкоцитов (табл. 2).

У животных контрольной группы, облученных в дозе 7.8 Гр, на 9-е сутки выявлялось зна-

чимое снижение числа эритроцитов, в 2 раза по сравнению с животными группы биологического контроля ($p = 0.004$), которое при применении dFliC поддерживалось на уровне физиологической нормы (табл. 2). Изменения содержания гемоглобина в крови мышей характеризовались сходной направленностью: введение dFliC перед

Таблица 2. Показатели периферической крови интактных мышей ($K_{\text{биол}}$) и на 9-е сутки после общего облучения и введения dFliC, 1 мг/кг, в/б, Ме (Q25; Q75)

Table 2. Peripheral blood parameters of mice on day 9 after total body X-ray irradiation and administration of dFliC at a dose of 1 mg/kg

Группы	Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	Эритроциты, ×10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л
	норма 3.5–13	норма 7–11	норма 95–168
$K_{\text{биол}}$	3.5 (3.2; 4.4)	9.4 (8.1; 9.9)	132 (120; 150)
dFliC	4.9 (4.6; 5.1) *	8.3 (7.3; 8.8)	123 (113; 140)
7 Гр	0.2 (0.15; 0.31) **	7.5 (6.3; 8.8) *	116 (96.5; 135)
dFliC + 7 Гр	0.35 (0.2; 0.55) **	7.5 (5.4; 8.7) *	116 (87.5; 135)
7.8 Гр	0.22 (0.2; 0.4) **	4.7 (3.9; 5.8) *	72.5 (60; 90) **
dFliC + 7.8 Гр	0.35 (0.25; 0.4) **	6.8 (6.1; 8.2) # **	108 (96; 118) #

* Отличия статистически значимы с группой “ $K_{\text{биол}}$ ”. $p < 0.05$. ** то же, $p < 0.005$; # то же с группой “7.8 Гр”, $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

облучением в дозе 7.8 Гр способствовало сохранению уровня, характерного для интактных животных; у мышей, облученных в той же дозе без защитного препарата, отмечалось почти 2-кратное снижение величины данного показателя ($p = 0.004$ в сравнении с группой “К_{биол}”).

После воздействия рентгеновского излучения в обеих дозах у животных, облученных без фармакологической коррекции, регистрировалась тромбоцитопения, тяжесть которой носила дозозависимый характер (рис. 7). Количество тромбоцитов в крови снизилось ниже границы физиологической нормы, что в сравнении с интактными животными составило 2.9 и 3.1 раза соответственно, после облучения в дозах 7 или 7.8 Гр. Инъекции dFliC за 15–30 мин до облучения способствовали статистически значимому повышению содержания тромбоцитов в периферической крови по сравнению с соответствующей контрольной группой, которое у 75% животных, облученных в дозе 7 Гр, и у 60% – в дозе 7.8 Гр, находилось в пределах нормальных значений показателя для данного вида грызунов.

Изучение содержания цитокинов/хемокинов в периферической крови мышей показало, что радиационное воздействие в дозах 7 или 7.8 Гр привело к нарушениям экспрессии восьми из 13 аналитов, сохраняющимся на 9-е сутки после облучения (рис. 8), что согласуется с данными, представленными в научной литературе, свидетельствующими о значительной модификации продукции широкого спектра цитокинов при действии ионизирующих излучений [25–27].

Острое лучевое воздействие приводило к изменениям секреции ИЛ-1 β , ИЛ-3 и ГМ-КСФ (рис. 8), рекомбинантные аналоги которых используются для стимуляции костномозгового кроветворения при лечении широкого круга заболеваний, в частности при лучевой терапии опухолей [28–30]. Наиболее значимые изменения отмечались для ИЛ-1 β – многофункционального цитокина с плейотропным действием, при этом применение dFliC способствовало поддержанию более низкого уровня данного провоспалительного цитокина, что можно рассматривать как положительный фактор с точки зрения минимизации

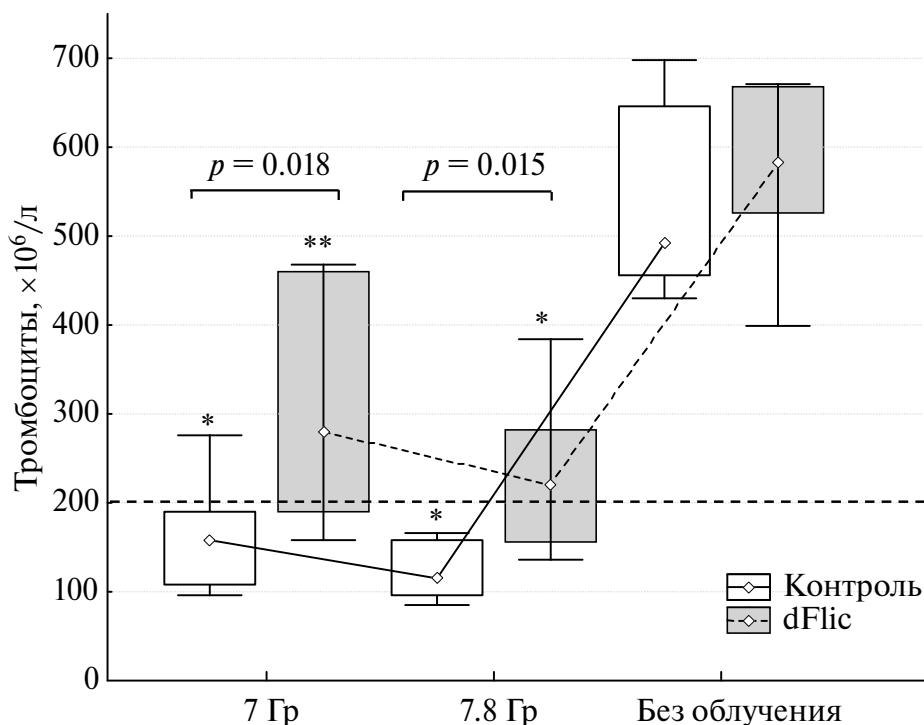


Рис. 7. Содержание тромбоцитов в крови мышей на 9-е сутки после общего облучения без лечения (Контроль) или с профилактическим применением dFliC, Me (Q25; Q75).

* Отличия статистически значимы в сравнении с группой “Контроль без облучения”, $p < 0.05$; ** – то же, $p < 0.005$ (критерий Манна–Уитни). Пунктирной линией обозначена нижняя граница физиологической нормы.

Fig. 7. Platelet count in the blood of mice on day 9 after total body X-ray irradiation at doses of 7 and 7.8 Gy without treatment or using deimmunized recombinant flagellin (dFliC).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ vs unirradiated mice (Mann–Whitney U Test).

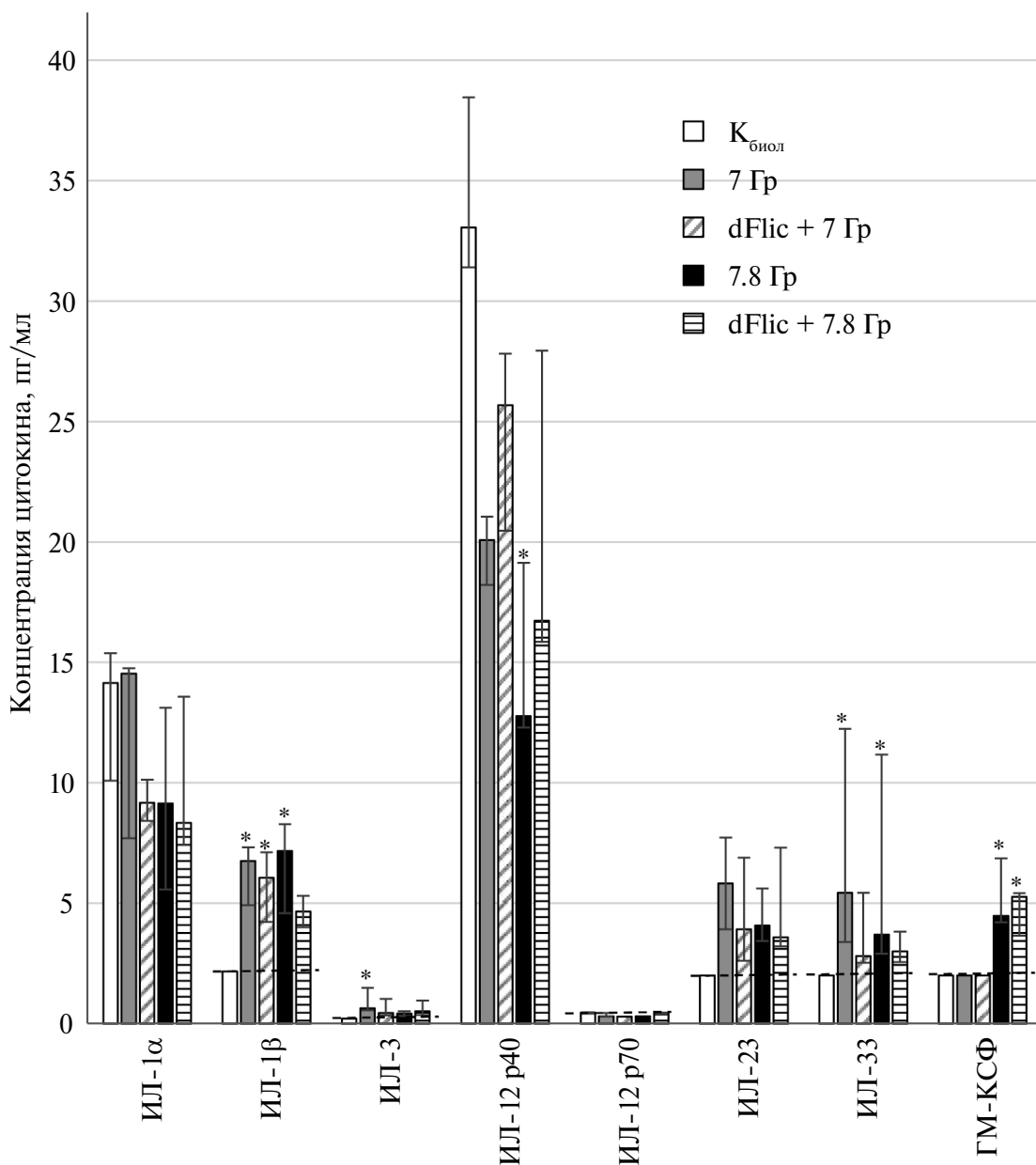


Рис. 8. Содержание цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови intactных мышей ($K_{\text{биол}}$) и на 9-е сутки после общего облучения в дозах 7 и 7.8 Гр без лечения или с применением деиммунизированного рекомбинантного флагеллина (dFlic) в дозе 1 мг/кг, Ме (Q25; Q75).

* Отличия статистически значимы с группой " $K_{\text{биол}}$ ", $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни). Пунктирной линией обозначен предел определения аналита.

Fig. 8. Cytokine concentration (pg/ml) in the blood serum of mice on day 9 after total body X-ray irradiation at a dose of 7 and 7.8 Gy alone or using deimmunized recombinant flagellin (dFlic) at a dose of 1 mg/kg.

* $p < 0.05$ vs unirradiated mice (Mann–Whitney U Test).

зации рисков нежелательных эффектов. Уровни ИЛ-3, стимулятора гранулоцитарного, моноцитарного, мегакариорцитарного и эритроидного роста кроветворения, и ГМ-КСФ, обеспечивающего стимуляцию предшественников гемопоэза и дифференцировку моноцитов в зрелые тканевые макрофаги и антиген-представляющие

клетки, после облучения в дозе 7.8 Гр на фоне предварительного введения dFlic были незначительно выше, чем без применения рекомбинантного белка, при этом ГМ-КСФ в сыворотке крови intactных животных или после облучения в дозе 7 Гр не определялся (предел определения составлял <2.98 пг/мл).

Рентгеновское излучение также стимулировало экспрессию ИЛ-33, члена семейства ИЛ-1, обладающего провоспалительной активностью, который практически отсутствовал в крови интактных мышей. Применение dFliC приводило к снижению уровня данного белка на 9-е сутки после облучения животных, который наряду с положительными эффектами – регуляция активности лимфоидных клеток врожденного иммунитета, заживление ран и, как недавно было показано, стимуляция регенерации радиационно-индуцированного повреждения крипт кишечника [31], участвует в развитии аллергического воспаления и регуляции опухолевого роста, в силу чего чрезмерная продукция данного цитокина может привести к нежелательным эффектам.

На 9-е сутки после облучения мышей было выявлено изменение сывороточного уровня цитокинов семейства ИЛ-12, основной функцией которого является регуляция дифференцировки активированных патогенами клонов Т-хелперов (Th). Рентгеновское излучение в обеих дозах приводило к существенному угнетению продукции ИЛ-12p40, преимущественно способствующему дифференцировке Th1 и вместе с ИЛ-12p70 действующего как хемоаттрактант макрофагов, при этом профилактическое использование dFliC обеспечивало повышение содержания цитокина в сыворотке крови облученных мышей.

Содержание в крови мышей цитокина ИЛ-23, усиливающего Th17 реакции и участвующего в активации Т-клеток памяти, на 9-е сутки после радиационного воздействия находилось на более высоком уровне в сравнении с интактными животными, но существенно не отличалось между экспериментальными группами. Цитокины ИЛ-7, ИЛ-11, ИЛ-27, ИФН- β и TSLP не определялись в сыворотке крови как интактных мышей, так и животных после облучения.

Обобщение полученных данных о содержании эндогенных медиаторов в периферической крови мышей позволяет заключить, что применение dFliC в короткие сроки до радиационного воздействия оказало модифицирующее влияние на экспрессию ряда цитокинов, участвующих в формировании защитных реакций и восстановительных процессов после лучевого поражения. Суммарные результаты указывают на то, что эффективность молекулы dFliC существенно не снизилась в результате проведенной структурной перестройки. Использование dFliC способствовало поддержанию на безопасном уровне плазменного

содержание провоспалительных цитокинов, снижая риски развития постлучевой воспалительной реакции, которая может приобретать характер самоподдерживающегося процесса в результате наличия положительной обратной связи между разными звеньями патогенеза лучевого поражения, увеличивая степень его тяжести [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана молекула рекомбинантного флагеллина dFliC, получены образцы белка для проведения исследования радиопротекторной эффективности и влияния на гемо- и иммунopoэз в мышинной модели. В результате хроматографической очистки был получен препарат белка dFliC с концентрацией 1 мг/мл. Чистота полученного белка по ВЭЖХ составила 92.79%. Время удержания dFliC: 14.294 мин. Содержание остаточных ДНК штамма-продуцента менее 200.0 нг/мг белка, БШП – менее 10 мкг/мг белка. Содержание эндотоксинов в препарате белка составило менее 12.5 ЕЭ/мл.

В проведенном исследовании мы подтвердили, что структурно-ориентированный реинжиниринг молекулы флагеллина не привел к снижению радиопротекторной эффективности исследуемого рекомбинантного белка dFliC. Было показано, что радиозащитное действие реализуется путем модификации экспрессии цитокинов с широким спектром биологической активности, регулирующих ранние этапы развития кроветворных клеток и действующие на клетки разных ростков, что важно для одновременного усиления миелопоэза. При применении белка dFliC в короткие сроки до облучения отмечалось снижение степени поражения кроветворной системы, выражающееся в сохранении большего количества жизнеспособных клеток в костном мозге, способных к восстановлению гемопоэза, и улучшению показателей периферической крови, регистрируемых в период разгара острой лучевой болезни, что в целом обеспечивало повышение выживаемости лабораторных мышей после воздействия летальных доз рентгеновского излучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tallant T., Deb A., Kar N. et al. A Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2004;4:33.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-33>
2. Rhee S.H., Im E., Pothoulakis C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology.* 2008;135(2):518–528.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.022>
3. Singh V.K., Seed T.M. Entolimod as a radiation countermeasure for acute radiation syndrome. *Drug Discov. Today.* 2021;26(1):17–30.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.003>
4. Molofsky A.B., Byrne B.G., Whitfield N.N. et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.* 2006;203(4):1093–1104.
<https://doi.org/10.1084/jem.20051659>
5. Lai L., Yang G., Yao X., Wang L., Zhan Y., Yu M., Yin R., Li C., Yang X., Ge C. NLRC4 mutation in flagellin-derived peptide CBLB502 ligand-binding domain reduces the inflammatory response but not radioprotective activity. *J. Radiat. Res.* 2019;60(6):780–785.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrz062>
6. Biedma M.E., Cayet D., Tabareau J. et al. Recombinant flagellins with deletions in domains D1, D2 and D3: Characterization as novel immunoadjuvants. *Vaccine.* 2019;37(4):652–663.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.009>
7. Malapaka R.R., Adebayo L.O., Tripp B.C. A deletion variant study of the functional role of the *Salmonella* flagellin hypervariable domain region in motility. *J. Mol. Biol.* 2007;365(4):1102–1116.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.054>
8. Mett V., Kurnasov O.V., Bespalov I.A. et al. A deimmunized and pharmacologically optimized Toll-like receptor 5 agonist for therapeutic applications. *Commun. Biol.* 2021;4(1):466.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-01978-6>
9. Rhee J.H., Khim K., Puth S., Choi Y., Lee S.E. Deimmunization of flagellin adjuvant for clinical application. *Curr. Opin. Virol.* 2023;60:101330.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101330>
10. Zinsli L.V., Stierlin N., Loessner M.J., Schmelcher M. Deimmunization of protein therapeutics – Recent advances in experimental and computational epitope prediction and deletion. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021;19:315–329.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.024>
11. Гребенюк А.Н., Аксенова Н.В., Петров А.В. и др. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности. *Вестн. Рос. воен.-мед. академии.* 2013;3:75–80. [Grebnyuk A.N., Aksenova N.V., Petrov A.V. et al. Poluchenie razlichnykh variantov rekombinantnogo flagellina i otsenka ikh radiozashchitnoy effektivnosti = Preparation of different recombinant flagellin variants and evaluation of their radioprotective efficacy. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii.* 2013;3:75–80. (In Russ.)].
12. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В. и др. Экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина. *Вестн. Рос. воен.-мед. академии.* 2017;19(3):122–128. [Murzina E.V., Sofronov G.A., Aksenova N.V. et al. Experimental estimation of the radioprotective efficiency of recombinant flagellin. *Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii.* 2017;19(3):122–128. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.17816/brmma623038>
13. Лисина Н.И., Щеголева Р.А., Шлякова Т.Г. и др. Противолучевая эффективность флагеллина в опытах на мышах. *Радиаци. биология. Радиоэкология.* 2019;59(3):274–278. [Lisina N.I., Shchegoleva R.A., Shlyakova T.G. et al. Evaluation of antiradiation efficiency of flagellin in experiments of mice. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya* = *Radiation biology. Radioecology.* 2019;59(3):274–278. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.1134/S086980311903007X>
14. Wang F., Burrage A.M., Postel S. et al. A structural model of flagellar filament switching across multiple bacterial species. *Nat. Commun.* 2017;8(1):960.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01075-5>
15. Madeira F., Park Y.M., Lee J. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):636–641.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv268>
16. Wilkins M.R., Gasteiger E., Bairoch A. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *Methods Mol. Biol.* 1999;112:531–552.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>
17. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):174–181.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>

18. Green M.R., Sambrook J. Transformation of *Escherichia coli* by electroporation. *Cold Spring Harb. Protocols*. 2020;2020(6):101220. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101220>
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
20. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: Rus-LASA “НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными”, 2012. 48 с. [Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). *Official J. Europ. Union*. 2010;33–79. (In Russ.)].
21. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat. Res*. 2011;175(2):145–149. <https://doi.org/10.1667/rrxx28.1>
22. Ковальчук Л.В., Игнатъева Г.А., Ганковская Л.В. и др. Иммунология: практикум. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 176 с. [Koval'chuk L.V., Ignat'eva G.A., Gankovskaya L.V. i dr. *Immunologiya: praktikum* = *Immunology: a practical course*. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 176 p. (In Russ.)].
23. Chen X., Zaro J.L., Shen W.C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2013;65(10):1357–1369. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
24. Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. Санкт-Петербург: Фолиант, 2012. 216 с. [Grebenyuk A.N., Legeza V.I. *Protivoluchevye svojstva interlejkina-1* = *Antiradiation properties of interleukin-1*. Sankt-Peterburg: Foliant, 2012. 216 p. (In Russ.)].
25. Schae D., Kachikwu E.L., McBride W.H. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat. Res*. 2012;178(6):505–523. <https://doi.org/10.1667/RR3031.1>
26. Васин М.В., Соловьев В.Ю., Мальцев В.Н. и др. Первичный радиационный стресс, воспалительная реакция и механизм ранних пострadiационных репаративных процессов в облученных тканях. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2018;63(6):71–81. [Vasin M.V., Solov'ev V.Yu., Mal'tsev V.N. et al. Primary radiation stress, inflammatory reaction and the mechanism of early postirradiation reparative processes in irradiated tissue. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2018;63(6):71–81. (In Russ.)]. https://doi.org/10.12737/article_5c0eb50d2316f4.12478307
27. Рыбкина В.Л., Азизова Т.В., Адамова Г.В., Ослина Д.С. Влияние ионизирующего излучения на цитокиновый статус (обзор литературы). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2022;62(6):578–590. [Rybkina V.L., Azizova T.V., Adamova G.V., Oslina D.S. Effect of ionizing radiation on cytokine status (Literature review). *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya* = *Radiation biology. Radioecology*. 2022;62(6):578–590. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S086980312206011X>
28. DiCarlo A.L., Horta Z.P., Aldrich J.T. et al. Use of growth factors and other cytokines for treatment of injuries during a radiation public health emergency. *Radiat. Res*. 2019;192(1):99–120. <https://doi.org/10.1667/RR15363.1>
29. Симбирцев А.С., Кетлинский С.А. Перспективы использования цитокинов и индукторов синтеза цитокинов в качестве радиозащитных препаратов. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019;59(2):170–176. [Simbirtsev A.S., Ketlinsky S.A. Perspectives for cytokines and cytokine synthesis inducers as radioprotectors. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya* = *Radiation biology. Radioecology*. 2019;59(2):170–176. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0869803119020164>
30. Легеза В.И., Драчев И.С., Чепур С.В. Осложнения лучевой противоопухолевой терапии (клиника, патогенез, профилактика, лечение). Санкт-Петербург: СпецЛит, 2022. 207 с. [Legeza V.I., Drachev I.S., Chepur S.V. *Oslozhneniya luchevoj protivopuholevoj terapii (klinika, patogeneza, profilaktika, lechenie)* = *Complications of radiation antitumor therapy (clinic, pathogenesis, prevention, treatment)*. Sankt-Peterburg: SpecLit, 2022. 207 p. (In Russ.)].
31. Guan R., Pan M., Xu X. et al. Interleukin-33 potentiates TGF- β signaling to regulate intestinal stem cell regeneration after radiation injury. *Cell Transplant*. 2023;32:9636897231177377. <https://doi.org/10.1177/09636897231177377>
32. Пономарев Д.Б., Степанов А.В., Селезнев А.Б., Ивченко Е.В. Ионизирующие излучения и воспалительная реакция. Механизмы формирования и возможные последствия. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2023;63(3):270–284. [Ponomarev D.B., Stepanov A.V., Seleznyov A.B., Ivchenko E.V. Ionizing radiation and inflammatory reaction. Formation mechanism and implications. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya* = *Radiation biology. Radioecology*. 2023;63(3):270–284. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0869803123030128>

Development of Shortened Recombinant Flagellin and Study of Its Radioprotective Efficacy in Mice with Acute Radiation Injury

E. V. Murzina^{1, *}, G. A. Sofronov¹, A. S. Simbirtsev², N. V. Aksenova¹, N. A. Klimov³,
O. M. Veselova¹, E. V. Dmitrieva¹, V. V. Kopat⁴, A. A. Riabchenkova⁴, E. L. Chirak⁴,
E. R. Chirak⁴, I. V. Dukhovlinov⁴

¹Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

²St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
Saint Petersburg, Russia

³Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

⁴"ATG Service Gene" LLC, Saint Petersburg, Russia

*E-mail: elenmurzina@mail.ru

The aim of the work is an experimental study of the radioprotective effect of shortened recombinant flagellin under conditions of total body irradiation of mice by survival rates and the effect on hemo- and immunopoiesis. A new recombinant shortened derivative of *Salmonella enterica* – dFliC protein obtained by structure-oriented reengineering of a previously developed molecule was used. The radioprotective effect of dFliC was studied in the mouse model of hematopoietic acute radiation syndrome. The 30-day survival of irradiated mice was analyzed using the Kaplan-Meier method. The effect of dFliC protein on the number of splenic colony-forming units (CFU-s) and myelokaryocytes in the bone marrow, peripheral blood parameters, and the cytokine profile in the blood serum of mice was assessed. Statistica 8.0 software was used for statistical processing of the results. A purification test record for the recombinant flagellin dFliC was developed, and protein samples with a purity of 92.79% according to HPLC were obtained. Administration of dFliC at a dose of 1 mg/kg 30 min prior to 7.8 Gy X-rays increased 30-day survival of mice by 38% ($p < 0.05$ compared to the vehicle control). On day 9 after X-ray irradiation at a dose of 7 Gy, the number of colonies increased 2.8 times in dFliC-treated mice ($p < 0.05$), the viability of hematopoietic progenitor cells increased and the severity of thrombocytopenia decreased. An increase in the production of cytokines involved in hematopoiesis, IL-3, GM-CSF and IL-12p40, has been recorded. The level of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-33 was maintained at a lower level than when exposed to radiation without dFliC. Deimmunization and structural rearrangement of the flagellin molecule did not lead to a decrease in the radioprotective effect of the recombinant protein. Radioprotective efficacy of dFliC is provided by a protective effect on bone marrow hematopoietic cells and stimulation of postradiation restoration of hemo- and immunopoiesis by regulating the expression of cytokines with a wide range of biological activity.

Keywords: shortened recombinant flagellin, X-rays, survival rate, endogenous colony formation, mice, cytokines

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Мурзина Елена Викторовна, <https://orcid.org/0000-0001-7052-3665>, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; elenmurzina@mail.ru

Софронов Генрих Александрович, <https://orcid.org/0000-0002-8587-1328>, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; gasofronov@mail.ru

Симбирцев Андрей Семенович, <https://orcid.org/0000-0002-8228-4240>, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; simbas@mail.ru

Аксенова Наталия Владимировна, <https://orcid.org/0000-0002-5645-7072>, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; nataaks@mail.ru

Климов Николай Анатольевич, <https://orcid.org/0000-0002-5243-8085>, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; nklimov@mail.ru

Веселова Ольга Михайловна, <https://orcid.org/0009-0007-9345-1845>, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; veselova28@mail.ru

Дмитриева Елена Владимировна, <https://orcid.org/0000-0001-6514-7837>, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; ev.dmitrieva@yandex.ru

Копать Владимир Владиславович, <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>, ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, Россия; kopat@service-gene.ru

Рябченкова Анастасия Андреевна, <https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>, ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, Россия; riabchenkova@service-gene.ru

Чирак Евгений Леонидович, <https://orcid.org/0000-0001-9167-5000>, ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, Россия; chirak.evgenii@service-gene.ru

Чирак Елизавета Романовна, <https://orcid.org/0000-0002-1610-8935>, ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, Россия; chirak.elizaveta@service-gene.ru

Духовлинов Илья Владимирович, <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>, “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, Россия; atg@service-gene.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Murzina Elena Viktorovna, <https://orcid.org/0000-0001-7052-3665>, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; elenmurzina@mail.ru

Sofronov Genrikh Aleksandrovich, <https://orcid.org/0000-0002-8587-1328>, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; gasofronov@mail.ru

Simbirtsev Andrei Semenovich, <https://orcid.org/0000-0002-8228-4240>, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia; simbas@mail.ru

Aksenova Natalia Vladimirovna, <https://orcid.org/0000-0002-5645-7072>, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; nataaks@mail.ru

Klimov Nicolay A., <https://orcid.org/0000-0002-5243-8085>, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; nklimov@mail.ru

Veselova Olga Mihajlovna, <https://orcid.org/0009-0007-9345-1845>, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; veselova28@mail.ru

Dmitrieva Elena Vladimirovna, <https://orcid.org/0000-0001-6514-7837>, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; ev.dmitrieva@yandex.ru

Kopat Vladimir Vladislavovich, <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>, “ATG Service Gene” LLC, St. Petersburg, Russia; kopat@service-gene.ru

Riabchenkova Anastasia Andreevna, <https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>, “ATG Service Gene” LLC, St. Petersburg, Russia; riabchenkova@service-gene.ru

Chirak Evgenii Leonidovich, <https://orcid.org/0000-0001-9167-5000>, “ATG Service Gene” LLC, St. Petersburg, Russia; chirak.evgenii@service-gene.ru

Chirak Elizaveta Romanovna, <https://orcid.org/0000-0002-1610-8935>, “ATG Service Gene” LLC, St. Petersburg, Russia; chirak.elizaveta@service-gene.ru

Dukhovlinov Ilya Vladimirovich, <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>, “ATG Service Gene” LLC, St. Petersburg, Russia; atg@service-gene.ru

ВКЛАД АВТОРОВ

Мурзина Е.В. — концепция и дизайн исследования, обзор и анализ данных, написание текста; Софронов Г.А., Симбирцев А.С., Копать В.В. — концепция и дизайн исследования, научное редактирование текста; Духовлинов И.В. — концепция и дизайн исследования, создание образцов для испытания и организация их синтеза; Аксенова Н.В., Климов Н.А., Веселова О.М., Дмитриева Е.В. — получение и статистический анализ данных; Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р. — синтез образцов, получение и анализ данных, написание текста.