

Т.Р. Гайнутдинов^{1,2}, С.А. Рыжкин^{1,2,3,4,5}, К.Н. Вагин^{1,2}, Е.Ю. Тризна², С.Е. Охрименко^{3,6}

ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИКО-ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ОЦЕНКЕ ПРОТИВОРАДИАЦИОННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМА *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*

¹ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва

⁴ Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань

⁵ Академия наук Республики Татарстан, Казань

⁶ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Тимур Рафкатович Гайнутдинов, e-mail: gtr_timur@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучить клинико-гематологические и иммунологические показатели при оценке противорадиационной эффективности терапевтического средства на основе микроорганизма *Fusobacterium necrophorum*.

Материал и методы: Исследования по определению противорадиационной эффективности убитых гамма-облучением штаммов микроорганизмов проводили на беспородных половозрелых белых мышах и белых крысах с массой тела, соответственно, 18–20 и 180–200 г, разделенных по принципу аналогов на опытные и контрольные группы. Моделирование острой лучевой болезни проводили на гамма-установке «Пума» с радиоактивным источником цезий-137 в дозе ЛД_{100/30}. В качестве потенциальных противолучевых препаратов использовали инактивированные облучением на гамма-установке «Исследователь» препараты микробного происхождения *F. necrophorum* штамм 8TS630501 в дозах 15, 20, 25 и 30 кГр. Испытуемые препараты вводили подкожно в объеме 0,2 см³ белым мышам и 2,0 см³ белым крысам через 3 сут после радиационного воздействия.

Результаты: Экспериментально установлено, что полная стерилизация микроба наступает при дозах 25 и 30 кГр. Культура *F. necrophorum*, облученная в дозах 25 и 30 кГр и введенная животным через 3 сут после внешнего радиационного воздействия, способствовала выживанию, сохранению от 60 до 80 % летально облученных белых мышей и крыс. При этом восстановление количества лейкоцитов и гемоглобина происходило медленно и продолжалось вплоть до конца исследований. У животных, леченных разработанными лечебными средствами, также отмечалось снижение количества Т-клеток, но оно носило менее выраженный характер, чем в группе контроля облучения. В-лимфоциты поражаются аналогично Т-лимфоцитам. Минимум количества В-лимфоцитов в опытных группах отмечен на 14 сут. Исследования по изучению интенсивности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в периферической крови у гамма-облученных, леченных и интактных крыс по содержанию малонового диальдегида позволили установить, что в группе облученного контроля происходит достоверное возрастание показателя ПОЛ в крови по отношению к биологическому контролю и к группам лечения.

Заключение: Установлено, что наиболее высокой противорадиационной эффективностью обладает лечебное средство микробного происхождения (РНФ-30), который был получен путем гамма-облучением в дозе 30 кГр культуры *F. necrophorum*.

Ключевые слова: острая лучевая болезнь, *Fusobacterium necrophorum*, противорадиационное средство, лабораторные животные, клинико-гематологические и иммунологические показатели, радиотоксины, выживаемость

Для цитирования: Гайнутдинов Т.Р., Рыжкин С.А., Вагин К.Н., Тризна Е.Ю., Охрименко С.Е. Изучение клинико-гематологических и иммунологических показателей при оценке противорадиационной эффективности терапевтического средства на основе микроорганизма *Fusobacterium necrophorum* // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 3. С. 19–25. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-19-25

T.R. Gaynutdinov^{1,2}, S.A. Ryzhkin^{1,2,3,4,5}, K.N. Vagin^{1,2}, E.Yu. Trizna², S.E. Ohrimenko^{3,6}

Study of Clinical, Hematologic and Immunologic Parameters in Assessing the Anti-Radiation Efficacy of the Therapeutic Agent Based on the Microorganism *Fusobacterium Necrophorum*

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

² Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia

⁴ Kazan State Medical University, Kazan

⁵ Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan, Kazan, Russia

⁶ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Timur Rafkatovich Gaynutdinov, e-mail: gtr_timur@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To study clinical, hematologic and immunologic parameters in assessing the anti-radiation efficacy of the therapeutic agent based on the microorganism *Fusobacterium necrophorum*.

Material and methods: The studies on determination of the anti-radiation efficacy of the strains of microorganisms killed by gamma-irradiation were carried out on sexually mature sexless white mice and white rats with live weight of 18–20 and 180–200 g, respectively, divided into experimental and control groups according to the principle of analogs. Modeling of acute radiation sickness was carried out on a Puma gamma unit with a radioactive source of cesium-137 at a dose of LD_{100/30}. As potential anti-radiation drugs we used inactivated by irradiation on the gamma unit Explorer preparations of microbial origin *F. necrophorum* strain 8, *necrophorum* strain 8TS630501 at doses of 15, 20, 25 and 30 kGy. The tested preparations were injected subcutaneously in the volume of 0.2 cm³ to white mice and 2.0 cm³ to white rats 3 days after radiation exposure.

Results: It was experimentally established that complete sterilization of the microbe occurs at doses of 25 and 30 kGy. The culture of *F. necrophorum*, irradiated at doses of 25 and 30 kGy and administered to animals 3 days after external radiation exposure, promoted survival, preservation of 60 to 80 % of lethally irradiated white mice and rats. At the same time the recovery of leukocytes and hemoglobin number was slow and continued until the end of the study. In animals treated with the developed therapeutic agents, there was also a decrease in the number of T-cells, but it was less pronounced than in the irradiation control group. The number of B-lymphocytes was affected similarly to T-lymphocytes. The minimum of the number of B-lymphocytes in the experimental groups was noted at 14 days. Studies on the intensity of the process of lipid peroxidation (LPO) in the content of malonic dialdehyde in peripheral blood of gamma-irradiated, treated and intact rats, it was found that in the irradiated control group there is a significant increase in the LPO index in blood in relation to biological control and treatment groups.

Conclusion: It has been established that the highest anti-radiation efficacy is possessed by a therapeutic agent of microbial origin (RNF-30), which was obtained by gamma-irradiation at a dose of 30 kGy of the culture of *F. necrophorum*.

Keywords: acute radiation disease, *Fusobacterium necrophorum*, anti-radiation agent, laboratory animals, clinical, hematological and immunological parameters, radiotoxins, survival rate

For citation: Gaynutdinov TR, Ryzhkin SA, Vagin KN, Trizna EYu, Ohrimenko SE. Study of Clinical, Hematologic and Immunologic Parameters in Assessing the Anti-Radiation Efficacy of the Therapeutic Agent Based on the Microorganism *Fusobacterium Necrophorum*. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(3):19–25. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-19-25

Введение

Источники ионизирующего излучения в настоящее время находят широкое применение в медицине, промышленности, сельском хозяйстве и в других сферах народного хозяйства [1–3]. Имеющие место аварии на предприятиях ядерно-энергетического цикла, возникающие в результате нарушения их эксплуатации, оказывают пагубное действие на экосистему и обуславливают возможность возникновения лучевой болезни [4–6].

В последнее время всё чаще гамма-облучение находит применение в биопромышленности при получении вакцин, антигенов и других биологических препаратов. Более широко для этих целей используются гамма-излучающие изотопы кобальта-60 и цезия-137, а также ускоренные электроны [7, 8].

Патогенные агенты болезней человека и животных по-разному реагируют на воздействие γ -облучения [9, 10]. Это зависит от вида возбудителя, его состояния, среды, в которой он находится, мощности, дозы ионизирующей радиации и других факторов [11].

С использованием полной инактивации микроорганизмов гамма-облучением были получены бруцеллезные, сальные, сибире-язвенные радиоантигены, а также радиовакцины против псевдобошениства, классической чумы свиней, бруцеллеза и сибирской язвы, которые используются по своему прямому назначению, а именно для серодиагностики и иммунопрофилактики особо опасных болезней человека и животных [12, 13].

Имеются сообщения о применении природных радиопротекторов [14, 15], веществ микробного происхождения в качестве радиозащитных препаратов [16, 17] для лечения острой лучевой болезни.

Использование в качестве лечебного препарата возбудителя некробактериоза, инактивированного гамма-облучением, в доступных печатных изданиях и интернет-ресурсах нами не обнаружено. Однако данный вопрос имеет научный и практический интерес, поэтому целью наших исследований является изучение противорадиационной эффективности терапевтического средства на основе микроорганизма *Fusobacterium necrophorum* и оценка клинико-гематологических и иммунологических показателей в эксперименте.

Материал и методы

Эксперименты по оценке противорадиационной эффективности терапевтических средств на основе микроорганизма *Fusobacterium necrophorum* проводили на белых мышках и крысах обоего пола с живой массой тела 18–20 и 180–200 г. соответственно.

Внешнее тотальное облучение животных проводили на гамма-установке «Пума» с мощностью экспозиционной дозы 5,38 Р/мин ($2,31 \times 10^{-5}$ А/кг): белых мышей – в дозе 7,9 Гр, крыс – 8,3 Гр.

Для испытания противорадиационной эффективности были взяты инактивированные в дозах 25, 30, 35 кГр, а также живые культуры *F. necrophorum*, облученные в дозах 15, 20 кГр. В качестве контрольного препарата использовали противорадиационное средство – противорадиационную лечебную сыворотку (ПРЛС).

Способ получения разработанных нами лечебных средств на основе *F. necrophorum*, определение стерильности, реактогенности, безвредности и токсичности представлены в опубликованных ранее работах [18, 19].

В следующей серии опытов проводили исследования по определению оптимальной лечебной дозы инактивированного облучением *F. necrophorum*. Опыты проводили на 70 белых мышках, разделенных на 7 групп по 10 животных в каждой. Животных облучали в дозе 8,0 Гр (ЛД_{100/30}) и через 3 сут после облучения однократно подкожно вводили испытуемый препарат *F. necrophorum*, облученный в дозе 25 кГр в дозах, соответственно, 1×10^8 микробных клеток м.к./особь в объеме 0,1 см³ (1-я группа), 2×10^8 м.к./особь в объеме 0,2 см³ (2-я), 3×10^8 м.к./особь в объеме 0,3 см³ (3-я), 4×10^8 м.к./особь в объеме 0,4 см³ (4-я), 5×10^8 м.к./особь в объеме 0,5 см³ (5-я группа). Облученным животным 6-й и не облученной (7-й) группы препараты не вводили, они служили контролем облучения и биологическим контролем соответственно. Оценку результатов исследований проводили по выживаемости животных.

В следующей серии опытов проводили исследования по определению оптимальных сроков лечебного применения радиоинактивированного штамма *F. necrophorum*. Для решения этой задачи опыты проводили на 60 белых мышках, разделенных на 10 групп, по 6 животных в каждой. Облученным в дозе 8,0 Гр животным через 1–10 сут после облучения подкожно однократно вводили облу-

ченные в дозах 25 и 30 кГр *F. necrophorum* в дозе 2×10^8 м.к. ($0,2 \text{ см}^3$) на животное.

Учитывая, что эффективная лечебная доза препарата зависит от кратности его применения, проводили следующую серию опытов на белых мышах. В опытах использовали 30 белых мышей, разделенных на 3 группы, по 10 животных в каждой. Облученным в дозе 8,0 Гр животным через 3 сут после облучения одно-, двух- и трехкратно подкожно вводили радиоинактивированные в дозах 25 и 30 кГр культуры *F. necrophorum* в оптимальной лечебной дозе 1×10^{10} м.к./кг. Оценку эффективности проводили по выживаемости облученных животных.

Эксперименты по оценке противолучевой эффективности вышеуказанных потенциальных противорадиационных средств проводили на 48 белых мышах, разделенных на 8 групп по 6 животных в каждой. При этом животных 7 групп подвергали γ -облучению в летальной дозе – 7,9 Гр, а животных 8-й группы не облучали и не лечили – они служили биологическим контролем.

Лечение облученных животных с использованием испытуемых средств проводили по следующей схеме. Облученным в дозе 7,9 Гр животным 1-й группы через 3-е сут после облучения однократно подкожно в дозе 1×10^{10} м.к./кг вводили лечебное средство радионекрофорум (РНФ), полученное на основе гамма-облучения *F. necrophorum* в дозе 15 кГр (РНФ-15), 2-й группе в аналогичных условиях вводили лечебное средство РНФ, полученное на основе гамма-облучения *F. necrophorum* в дозе 20 кГр (РНФ-20); 3-й группе – лечебное средство РНФ, полученное на основе гамма-облучения *F. necrophorum* в дозе 25 кГр (РНФ-25); 4-й группе – лечебное средство РНФ, полученное на основе гамма-облучения *F. necrophorum* в дозе 30 кГр (РНФ-30); 5-й группе – лечебное средство РНФ, полученное на основе гамма-облучения *F. necrophorum* в дозе 35 кГр (РНФ-35); 6-й группе – лечебное средство ПРЛС подкожно в дозе 50,0 мг/кг; 7-я группа – контроль облучения; 8-я группа – биологический контроль.

За опытными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение, учитывали клинический статус, выживаемость, рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных.

Для подтверждения полученных на белых мышах данных по оценке терапевтической активности испытуемых средств проводили вторую серию опытов на другом виде лабораторных животных – белых крысах. В опытах были использованы 24 белые крысы, разделенные на 4 группы по 6 животных в каждой. При этом животных первых 3 групп подвергали гамма-облучению в летальной дозе (8,3 Гр), животных 4-й группы не облучали и не лечили – они служили биологическим контролем.

Лечение облученных белых крыс с использованием испытуемых средств проводили по следующей схеме. Облученным в дозе 8,3 Гр животным 1-й группы через 3 сут после облучения однократно подкожно в дозе 1×10^{10} м.к./кг ($2,0 \text{ см}^3$) вводили препарат РНФ, полученный путем облучения *F. necrophorum* в дозе 30 кГр (РНФ-30); 2-й группе в аналогичных условиях – ПРЛС подкожно в дозе 50 мг/кг ($1,0 \text{ см}^3$); 3-я группа – служила контролем облучения; 4-я группа – биологическим контролем.

Наблюдение за опытными и контрольными животными вели ежедневно в течение 30 сут, изучали клинические (общее состояние, выживаемость, среднюю продолжительность жизни павших животных), гематологические показатели (содержание форменных элементов периферической крови, уровень гемоглобина, общего белка), состояние клеточных (содержание Т- и В-лимфоцитов) факторов иммунитета, уровень малонового

диальдегида. Кровь для исследований у животных отбирали на 3, 7, 14, 21, 28 сут после облучения.

Иммунный статус животных определяли по состоянию клеточного и гуморального иммунитета. Состояние клеточного (Т-, В-лимфоциты) звеньев иммунитета оценивали по методу розеткообразования, который основан на взаимодействии мембранных рецепторов Т- и В-лимфоцитов с эритроцитами, что при микроскопировании визуально определяется в виде розеткообразования, когда к поверхности лимфоцитов присоединены 3 и более эритроцитов. С помощью варьирования режимов розеткообразования идентифицируются Т- и В-лимфоциты с определенными свойствами, отражающие дифференцированность и функциональную принадлежность. Для определения регуляторных субпопуляций использовали нагрузочные тесты с теофиллином. Теофиллинрезистентные лимфоциты (ТФР) составили субпопуляцию Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью, а теофиллинчувствительные (ТФЧ) – супрессорной активностью. Для получения данных использовали метод розеткообразования с эритроцитами барана, для Т-клеток, а для получения В-клеток применяли метод ЕАС-розеток. Количество 0-клеток, не имеющих ни Т-, ни В-маркеров, определяли расчетным методом по формуле: 0-клетки % = $100\% - (Е-РОК\% + МРОК\%)$.

О степени интенсивности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА), реакция которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) положена в основу одного из самых распространенных методов изучения ПОЛ в биологических системах. Количественные методы определения ПОЛ основаны на регистрации разности в концентрации радикальных предшественников (по изменению оптической плотности) до и после их окислительной деградации.

Проведение экспериментов на лабораторных животных осуществляли с использованием регламентированных и описанных в научной литературе методов и способов гуманного отношения к животным в соответствии с законодательством и правовыми актами РФ, Хельсинкской Декларации (1969) рекомендации комитета по этике ВОЗ (Протокол ЛЭК № 11 от 28 февраля 2023 г.).

Результаты и обсуждение

Проведенными исследованиями впервые установлено, что полная инактивация возбудителя некробактериоза штамм 8TS630501 наступает при облучении его в дозе 25 кГр. Облучение в дозе 5 кГр не влияет на рост данной культуры. Ингибирование роста облученного в дозах 10, 15 и 20 кГр *F. necrophorum* находится в прямой зависимости от степени радиационного воздействия [18].

Результаты опытов по определению оптимальной лечебной дозы изучаемого лечебного средства показали, что выживаемость летально облученных белых мышей в 1-й группе составляла 70 %, во 2-й – 80 %, в 3-й – 80 %, в 4-й – 70 %, в 5-й – 60 %, 6-й – 0 %, 7-й – 100 %.

Таким образом, оптимальной лечебной дозой препарата является $0,2 \text{ см}^3$, которая содержит 2×10^8 микробных клеток *F. necrophorum*. В пересчете на 1 кг живой массы животных лечебная доза препарата составляет 1×10^{10} м.к./кг.

Результаты исследований по определению реактогенности показали, что использование лечебных средств никаких реакций не вызывало: животные были активны, охотно принимали корм и воду, адекватно реагировали на естественные раздражители, что свидетельствует об ареактогенности препарата и переносимости

использованной терапевтической дозы. Проведенные исследования по определению безвредности и токсичности показали, что испытуемые инактивированные гамма-облучением бактериальные культуры при введении их подкожно в дозах от 1×10^8 м.к./особь в объеме $0,1 \text{ см}^3$ до 1×10^9 м.к./особь ($1,0 \text{ см}^3$) не оказывали неблагоприятного воздействия на белых мышей, не вызывали гибели их в течение 14 сут наблюдения, что свидетельствует об их атоксичности. Полученные данные показывают, что препараты безвредны, так как введение их в двух-четырёх-пятикратной терапевтической дозе не вызывало клинических признаков проявления болезни, падежа животных в течение вышеуказанного срока [19].

Результаты проведенных исследований по определению оптимальных сроков лечебного применения радиоинактивированного штамма *F. necrophorum* показали, что выживаемость животных по группам составляла: 1-я – 83,3 %; 2-я – 83,3 %; 3-я – 83,3 %; 4-я – 66,7 %; 5-я – 66,7 %; 6-я – 50 %; 7-я – 33,3 %; 8-я – 33,3 %; 9-я – 33,3 %; 10-я – 33,3 %.

Таким образом, однократное подкожное введение в лечебной дозе 1×10^{10} м.к./кг смешанной пробы *F. necrophorum* обеспечивало 83,3 %-ную выживаемость летально облученных животных.

Результаты опытов, проведенных на белых мышках по определению кратности применения лечебного средства на основе *F. necrophorum* показали, что увеличение кратности применения до двух и трех раз с интервалом 24 часа между введениями не оказывало существенного влияния на выживаемость животных, что свидетельствует о целесообразности однократного применения препарата.

Результаты исследований следующей серии опытов по изучению противорадиационной эффективности испытуемых терапевтических средств, проведенных на белых мышках, представлены в табл. 1.

Из представленных в таблице данных видно, что из 6 вариантов потенциальных противорадиационных средств микробного и животного происхождения, противорадиационную активность оказывали 4. Из них (группа 6) ПРЛС обеспечивал 50 %-ую выживаемость, 2 средства (группы 3, 5) вылечивали животных от крайне тяжелой степени ОЛБ в 66,7 % случаев и 1 средство (группа 4) обладали максимальной противорадиационной активностью 83,3 %.

У животных группы контроля облучения наблюдалась острая лучевая болезнь (ЛД_{100/30}) крайне тяжелой степени со 100 % летальностью облученных животных при средней продолжительности жизни павших мышей 9,8 сут. Применение испытуемых средств оказывало мо-

дифицирующее действие на течение, степень тяжести, исход болезни и выживаемость животных.

Установлено, что противорадиационную эффективность от ОЛБ проявляли радиоинактивированный *F. necrophorum*, облученный в дозах 15, 20 кГр (1, 2 группа), который обеспечивал выживаемость животных в 33,3 и 16,7 % случаев. Хотя указанные препараты проявляли низкую противорадиационную эффективность, они продлевали жизнь белых мышей в 1,3-2,1 раза по сравнению с контролем.

Применение радиоинактивированного возбудителя некробактериоза, облученного в дозе 25 и 35 кГр (3, 5 группа), а также ПРЛС (6 группа), значительно облегчали течение ОЛБ, степень ее проявления, увеличивали сроки продолжительности жизни (СПЖ), выживаемость животных. Показано, что применение указанных средств переводит крайне тяжелое течение острой лучевой болезни в тяжелую, увеличивая выживаемость от 50 до 66,6 % и СПЖ – от 10,0 до 13,2 сут, что превышает контрольный уровень до 1,3 раза.

Наиболее высокий противорадиационный эффект был достигнут при применении радиоинактивированного в дозе 30 кГр *F. necrophorum* (4 группа), с обеспечением выживаемости опытных облученных (ЛД_{100/30}) животных в 83,3 % случаев, тем самым продлевая срок продолжительности жизни до 19 сут, что превосходит СПЖ леченных и контрольных животных, переводя крайне тяжелое течение ОЛБ в среднюю степень ОЛБ.

Результаты проведенных исследований по определению противорадиационной эффективности испытуемых лечебных средств, проведенных на белых крысах, представлены в табл. 2.

Из представленных в таблице данных видно, что острая лучевая болезнь у крыс 3-й группы, у которых лечебные препараты не применяли, протекала крайне тяжело в костномозговой форме с максимальным падежом животных и средней продолжительностью жизни (СПЖ) 8,2 сут. Применение лечебных препаратов приводило к облегчению течения ОЛБ, переводя крайне тяжелую степень болезни в среднюю, и значительно увеличивая СПЖ павших белых крыс.

В качестве контрольного препарата в опыте использовали противорадиационную лечебную сыворотку (ПРЛС), которая обладала радиопротекторным эффектом, переводя крайне тяжелую степень течения болезни в тяжелую, тем самым, предотвращая 50 %-ую гибель летально облученных животных при средней продолжительности жизни 13 сут.

Наиболее высокими противорадиационными свойствами обладало средство микробного происхождения радиоинактивированный возбудитель некробактериоза,

Таблица 1

Терапевтические свойства испытуемых препаратов в опытах на белых мышках, $n = 6$
Therapeutic properties of the tested drugs in experiments on white mice, $n = 6$

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата, на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	РНФ-15	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	20,7	33,33
2	РНФ-20	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	12,8	16,66
3	РНФ-25	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	11,5	66,66
4	РНФ-30	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	средняя	19,0	83,33
5	РНФ-35	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	13,2	66,66
6	ПРЛС	1,0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	10,0	50,0
7	Контроль облучения	–	–	крайне тяжелая	9,8	0
8	Биологический контроль	–	–	–	–	100

Примечание: СПЖ – средняя продолжительность жизни; РНФ (радионекрофорум) – радиоинактивированный *F. necrophorum*; ПРЛС – противорадиационная лечебная сыворотка; 1-кратно – однократное введение; п/к – подкожное введение

Таблица 2

Выживаемость облученных белых крыс, подвергнутых лечению испытываемыми препаратами, n = 6

Survival rate of irradiated white rats treated with test drugs, n = 6

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата, на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	РНФ-30	2×10 ⁹ м.к.	1-кратно п/к	средняя	10,0	83,3
2	ПРЛС	10,0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	13	50
3	Контроль облучения	–	–	крайне тяжелая	8,2	0
4	Биологический контроль	–	–	–	–	100

Примечание: Условные обозначения согласно табл. 1

облученный в дозах 30 кГр (1-я группа), которое модифицировало крайне тяжелую степень течения болезни в среднюю, увеличивая выживаемость до 83,3 %, а также СПЖ павших животных до 10 сут, что значительно превышало показатели у контрольных животных.

Общее состояние крыс группы биологического контроля в течение всего срока исследований (30 сут) было удовлетворительным. Они адекватно реагировали на внешние раздражители, активно передвигались по клетке, хорошо поедали корм. Кожный покров был гладким и блестящим. Случаев гибели не наблюдалось.

В табл. 3 и 4 представлены результаты исследования периферической крови гамма-облученных и леченных белых крыс.

Данные, представленные в табл. 3 показывают, что выраженной реакцией организма на гамма-облучение является изменение числа клеток белой крови. Как видно из таблицы, через 3 сут после облучения у животных опытных групп наблюдалось достоверное, по сравнению с контролем, снижение общего количества лейкоцитов, которое продолжалось на протяжении всего периода исследований.

Наименьшее количество клеток белой крови наблюдалось на 14-е сут опыта и составляло у животных группы контроля облучения $3,13 \pm 0,14 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,001$)

против $9,77 \pm 0,74 \times 10^9/\text{л}$ биологического контроля. На всем протяжении эксперимента у крыс, подвергнутых гамма-облучению и лечению разработанными средствами, наблюдалось увеличение количества лейкоцитов по сравнению с группой контроля облучения, но в сравнении с группой биологического контроля количество лейкоцитов у пролеченных животных во все сроки опыта было ниже, и к концу исследований (28 сут) количество лейкоцитов в крови этих животных не доходило до уровня группы биологического контроля.

Изменения количества эритроцитов и гемоглобина у животных облученного контроля в течение первых суток после облучения были незначительными. В период с 7 по 14 сут изменения со стороны красной крови у этих животных носили более выраженный и достоверный характер. Максимальное проявление анемии наблюдалось на 14 сут опыта со снижением количества эритроцитов на 26,9 % и концентрации гемоглобина на 23,7 % от исходных величин. Изменения количества эритроцитов у пролеченных крыс не имеют особых различий с группой биологического контроля. Концентрация гемоглобина у пролеченных животных снижается с 14-х сут исследований. Начиная с 21 сут опыта у леченных животных, концентрация гемоглобина в крови возрастала, но исходного уровня не достигала.

Таблица 3

Показатели крови белых крыс в разные сроки после гамма-облучения и лечения, n = 6

Blood counts of white rats at different times after gamma irradiation and treatment, n = 6

Срок после облучения, сут	Группа опыта	Показатели				
		гемоглобин, г/л	эритроциты, 10 ¹² /л	лейкоциты, 10 ⁹ /л	гематокрит, %	общий белок, г/л
3	1	124,6 ± 2,40	7,41 ± 0,22	4,95 ± 0,46***	35,73 ± 0,11	67,10 ± 2,40
	2	121,60 ± 2,53	6,70 ± 0,35	4,12 ± 0,22***	35,50 ± 0,47	66,02 ± 0,28*
	3	119,8 ± 2,30	6,41 ± 0,30	3,64 ± 0,27	33,22 ± 0,51**	59,80 ± 1,80**
	4	128,8 ± 4,50	6,94 ± 0,62	10,56 ± 0,16	36,45 ± 0,55	70,80 ± 1,90
7	1	111,2 ± 2,70	7,03 ± 0,23	5,12 ± 1,2**	36,96 ± 0,40	70,10 ± 2,30
	2	115,50 ± 4,21	6,83 ± 0,42	4,18 ± 0,38***	36,17 ± 0,66	68,28 ± 0,93
	3	110,2 ± 1,90*	5,62 ± 0,23*	3,75 ± 0,25***	34,25 ± 0,41**	54,20 ± 2,50***
	4	120,0 ± 3,80	7,01 ± 0,42	9,98 ± 0,67	36,56 ± 0,56	71,30 ± 2,20
14	1	109,6 ± 3,40***	6,91 ± 0,55	4,81 ± 0,43***	32,62 ± 0,42	68,30 ± 1,80
	2	113,67 ± 3,47**	6,20 ± 0,33	3,80 ± 0,19***	32,17 ± 0,34***	66,95 ± 0,85
	3	100,1 ± 2,20***	5,19 ± 0,12***	3,13 ± 0,14***	28,29 ± 1,00***	51,10 ± 2,70***
	4	131,2 ± 2,40	7,10 ± 0,33	9,77 ± 0,74	36,44 ± 0,44	69,90 ± 2,50
21	1	110,2 ± 4,80**	7,11 ± 0,11	5,95 ± 0,83**	36,90 ± 0,71	70,30 ± 5,10
	2	113,87 ± 1,51**	6,48 ± 0,43	5,70 ± 0,38***	36,50 ± 0,47	68,78 ± 0,50
	3	–	–	–	–	–
	4	134,5 ± 4,30	6,98 ± 0,36	10,21 ± 0,62	36,74 ± 1,30	69,20 ± 3,40
28	1	116,1 ± 2,80*	7,00 ± 0,21	7,00 ± 0,88*	35,67 ± 1,23	70,60 ± 1,80
	2	116,50 ± 1,74**	6,66 ± 0,39	6,93 ± 0,38**	35,83 ± 0,52	69,25 ± 0,68
	3	–	–	–	–	–
	4	130,0 ± 3,80	7,02 ± 0,25	10,12 ± 0,57	35,84 ± 0,55	72,10 ± 2,60

Примечание: Данные представлены в виде: среднее арифметическое ± средняя квадратическая погрешность ($M \pm m$). Статистически значимое различие по отношению к контрольной группе при * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по критерию Стьюдента; 1-я группа – гамма-облучение в дозе 8,3 Гр и лечение радиоинaktivированным *F. necrophorum* в дозе 30 кГр (РНФ-30); 2-я группа – облучение животных в дозе 8,3 Гр и лечение ПРЛС подкожно в дозе 4 мг/особь; 3-я группа – контроль облучения; 4-я группа биологический контроль

Показатель гематокрита у крыс группы контроля облучения в период с 3 сут по 14-е сут опыта достоверно снижался. Этот показатель у пролеченных животных не снижался и был на уровне биологического контроля. Минимальное значение этого показателя в группе контроля облучения отмечено на 14 сут после облучения и составило $28,29 \pm 1,00$ % при $36,44 \pm 0,44$ % в биологическом контроле, а в группе с применением РНФ-30 этот показатель составлял $32,62 \pm 0,42$ %, ПРЛС – $32,17 \pm 0,34$ % соответственно.

Содержание общего белка в сыворотке крови животных в группе контроля облучения в течение первых трех суток достоверно снижалось до $59,80 \pm 1,80$ г/л ($p < 0,01$), с минимальным значением на 14 сут после гамма-облучения $51,10 \pm 2,70$ г/л ($p < 0,001$) по сравнению с группой биологического контроля $69,90 \pm 2,50$ г/л. У пролеченных животных существенных отличий этого показателя от такового в группе биологического контроля за период исследований не отмечалось.

Таким образом, изменения морфологического состава периферической крови гамма-облученных крыс характеризовались развитием выраженной лейкопении и анемии. У леченных животных изменения показателей эритроцитов были менее выраженными. Восстановление количества лейкоцитов и гемоглобина происходило медленно и продолжалось вплоть до конца исследований. При этом во все сроки исследований у животных, леченных разработанными лечебными средствами, количество лейкоцитов было выше по сравнению с группой контроля облучения.

Результаты исследований показателей системы иммунитета и интенсивности процесса перекисного окисления липидов у облученных и леченных белых крыс представлены в табл. 4.

Из данных таблицы видно, что у облученных белых крыс группы облученного контроля происходит резкое снижение количества Т- и В-лимфоцитов. Уже на 3-е сут количество Т-клеток у облученных животных снижено на 60 % ($p < 0,001$), максимум снижения отмечается на

14-е сут исследований и составляет $9,49 \pm 0,26$ % (33 % от уровня биологического контроля).

У животных, леченных разработанными лечебными средствами, также отмечалось снижение количества Т-клеток, но оно носило менее выраженный характер, чем в группе контроля облучения. Минимум количества Т-клеток у животных данной группы отмечен к 14-е сут и составил $13,69 \pm 0,24$ %, $13,28 \pm 0,68$ %, что на 47,6 %, 46,2 % ниже контрольных значений. В дальнейшем происходит восстановление количества Т-лимфоцитов, но даже к концу срока исследований (28 сут) в этих группах уровень Т-клеток полностью не восстанавливается до уровня биологического контроля. Количество В-лимфоцитов изменяется аналогично Т-лимфоцитам. Минимум количества В-лимфоцитов в опытных группах отмечен на 14 сут. Восстановление содержания В-клеток в периферической крови в общих чертах напоминает те же закономерности, которые проявляются при восстановлении Т-лимфоцитов. К концу срока исследований популяция В-клеток также полностью не восстанавливается.

Результаты исследований интенсивности процесса перекисного окисления липидов по содержанию в периферической крови у гамма-облученных и интактных крыс малонового диальдегида, позволили установить, что в группе облученного контроля происходит достоверное возрастание показателя перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови в первые трое суток по отношению к исходному и составляет в плазме $8,19 \pm 0,31$ нмоль/мл ($p < 0,01$) при $7,03 \pm 0,16$ нмоль/мл в исходном, в гемолизате – $7,59 \pm 0,12$ нмоль/мл ($p < 0,001$) при $5,01 \pm 0,18$ нмоль/мл в группе биологического контроля. Этот показатель оставался на этом же уровне на 7 сут эксперимента. Количество малонового диальдегида значительно возрастало на 14–21-е сут опыта. Максимальное повышение этого показателя в группе облученного контроля приходится на 14-е сут и составляет в крови $9,56 \pm 0,31$ нмоль/мл ($p < 0,001$) при $6,26 \pm 0,37$ нмоль/мл в группе биологического контроля, в гемолизате эритроцитов –

Таблица 4

Показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов у белых крыс при облучении и применении лечебных средств, $n = 6$
Indicators of the immune system and lipid peroxidation in white rats under irradiation and the use of medicinal products, $n = 6$

Срок после облучения, сут	Группа опыта	Т-клетки, %	В-клетки, %	МДА, нмоль/мл	
				гемолизат	плазма
3	1	$14,62 \pm 0,33^{***}$	$5,39 \pm 0,24^{***}$	$7,04 \pm 0,23^{***}$	$7,98 \pm 0,12$
	2	$13,88 \pm 0,15^{***}$	$5,23 \pm 0,34^{***}$	$7,18 \pm 0,64^{**}$	$8,10 \pm 0,40^*$
	3	$11,21 \pm 0,11^{***}$	$4,35 \pm 0,71^{***}$	$7,59 \pm 0,12^{***}$	$8,19 \pm 0,31^{**}$
	4	$28,09 \pm 0,14$	$9,41 \pm 0,17$	$5,01 \pm 0,18$	$7,03 \pm 0,16$
7	1	$15,10 \pm 0,21^{***}$	$4,54 \pm 0,49^{***}$	$6,06 \pm 0,33$	$8,30 \pm 0,33$
	2	$14,12 \pm 0,26^{***}$	$4,73 \pm 0,39^{***}$	$6,07 \pm 0,61$	$8,60 \pm 0,53$
	3	$11,51 \pm 0,27^{***}$	$3,47 \pm 0,21^{***}$	$7,81 \pm 0,12^{***}$	$8,94 \pm 0,28^*$
	4	$28,50 \pm 0,18$	$9,51 \pm 0,25$	$5,26 \pm 0,41$	$7,04 \pm 0,61$
14	1	$13,69 \pm 0,24^{***}$	$4,11 \pm 0,72^{***}$	$6,73 \pm 0,83$	$8,89 \pm 0,33^{***}$
	2	$13,28 \pm 0,68^{***}$	$4,23 \pm 0,62^{***}$	$6,57 \pm 0,81$	$8,95 \pm 0,48^{**}$
	3	$9,49 \pm 0,26^{***}$	$2,91 \pm 0,38^{***}$	$7,96 \pm 0,21^{***}$	$9,56 \pm 0,31^{***}$
	4	$28,73 \pm 0,11$	$9,62 \pm 0,23$	$5,12 \pm 0,14$	$6,26 \pm 0,37$
21	1	$17,91 \pm 0,32^{***}$	$5,85 \pm 0,82^{***}$	$5,90 \pm 0,13$	$8,17 \pm 0,33^{**}$
	2	$17,28 \pm 0,25^{***}$	$5,30 \pm 0,19^{***}$	$5,90 \pm 0,67$	$8,65 \pm 0,90^*$
	3	–	–	–	–
	4	$29,30 \pm 0,15$	$9,87 \pm 0,21$	$5,31 \pm 0,72$	$6,45 \pm 0,30$
28	1	$21,14 \pm 0,74^{***}$	$7,41 \pm 0,13$	$5,59 \pm 0,12$	$6,80 \pm 0,41$
	2	$20,12 \pm 0,34^{***}$	$7,22 \pm 0,50^*$	$5,50 \pm 0,84$	$6,95 \pm 0,54$
	3	–	–	–	–
	4	$28,94 \pm 0,71$	$9,57 \pm 0,68$	$5,20 \pm 0,19$	$6,83 \pm 0,60$

Примечание: Условные обозначения согласно табл. 3

7,96 ± 0,21 нмоль/мл ($p < 0,001$) при 5,12 ± 0,14 нмоль/мл в контрольной группе.

Заключение

Облучение вызывало у всех контрольных животных, а также леченых крыс выраженные изменения в периферической крови. Однако, несмотря на сходный характер этих изменений, между контрольными и пролеченными животными наблюдались определенные различия, проявлявшиеся в меньшем снижении количества лейкоцитов и других показателей крови и более ранним и выраженным восстановлением их у пролеченных животных. Введение разработанных лечебных средств облученным животным вызывало у них более медленное снижение

числа лейкоцитов в периферической крови. Выживаемость крыс при этом составила до 83,3 % при абсолютной гибели контроля облучения.

Таким образом, проведенными исследованиями на лабораторных животных установлено, что наиболее высокой противорадиационной эффективностью обладает лечебное средство микробного происхождения (РНФ-30), которое было получено путем гамма-облучения в дозе 30 кГр культуры *F. necrophorum*.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Baird E., Reid C., Cancio L.C., Gurney J.M., Burmeister D.M. A Case Study Demonstrating Tolerance of the Gut to Large Volumes of Enteral Fluids in Burn Shock. *Int J Burns Trauma*. 2021;11(3):202–206. doi: 10.1002/14651858.CD007715.pub2. PMID: 34336386 PMCID: PMC8310868.
- Cannon G., Kiang J.G. An Overview of the Impact of Radiation on Ecology: Wildlife Population. *Int J Radiat Biol*. 2020;1–9. Online ahead of print. Doi: 10.1080/09553002.2020.1793021. PMID: 32663058.
- Burmeister D.M., Johnson T.R., Lai Z., Scroggins S., DeRosa M., Jonas R.B., Zhu C., Scherer E., Stewart R.M., Schwacha M.G., Jenkins D.H., Eastridge B.J., Nicholson S.E. The Gut Microbiome Distinguishes Mortality in Trauma Patients Upon Admission to the Emergency Department. *J Trauma Acute Care Surg*. 2020;88(5):579–587. Doi:10.1097/TA.0000000000002612 PMID: 32039976 PMCID: PMC7905995
- Jones C.B., Davis C.M., Sfanos K.S. The Potential Effects of Radiation on the Gut-Brain Axis. *Radiat Res*. 2020;193(3):209–222. Doi: 10.1667/RR15493.1. PMID: 31898468 Review.
- Kalkeri R., Walters K., Pol W.V.D., McFarland B.C., Fisher N., Koide F., Morrow C.D., Singh V.K. Changes in the Gut Microbiome Community of Nonhuman Primate Following Radiation Injury. *BMC Microbiome*. 2021;21(1):93. Doi: 10.1186/s12866-021-02146-w PMID: 33781201.
- Kiang J.G., Smith J.T., Cannon G., Anderson M.N., Ho C., Zhai M., Cui W., Xiao M. Ghrelin, a Novel Therapy, Corrects Cytokine and NF-κB-AKT-MAPK Network and Mitigates Intestinal Injury Induced by Combined Radiation and Skin-Wound Trauma. *Cell Biosci*. 2020;10:63. Doi: 10.1186/s13578-020-00425-z PMID: 32426105.
- Гайнутдинов Т.Р., Вагин К.Н., Рыжкин С.А. Способ лечения радиационно-термических ожогов // Радиация и риск. Бюллетень национального радиационно-эпидемиологического регистра. 2023. Т.32, №1. С 108–117. [Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Ryzhkin S.A. Method of Treatment of Radiation-Thermal Burns. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk*. Bulletin of the National Radiation-Epidemiological Register. 2023;32(1):108–117 (In Russ.)]. DOI: 10.21870/0131-3878-2023-32-1-108-117
- DiCarlo A.L., Bandremer A.C., Hollingsworth B. A., Kasim S., Lanionu A., Todd N.F., Wang S.J., Wertheimer E.R., Rios, C.I. Cutaneous Radiation Injuries: Models, Assessment and Treatments. *Radiation research*. 2020;194(3):315–344. Doi: 10.1667/RADE-20-00120.1.
- Körmöndi S., Terhes G., Pál Z., Varga E., Harmati M., Buzás K., Urbán E. Human Pasteurellosis Health Risk for Elderly Persons Living with Companion Animals. *Emerging infectious diseases*. 2019;25(2):229–235. Doi: 10.3201/eid2502.180641.
- Peng Z., Wang X., Zhou R., Chen H., Wilson B.A., Wu B. *Pasteurella Multocida*: Genotypes and Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR. 2019;83(4):e00014-19. Doi: 10.1128/MMBR.00014-19
- Kannagara D.W., Pandya D., Patel P. *Pasteurella multocida* Infections with Unusual Modes of Transmission from Animals to Humans: a Study of 79 Cases with 34 Nonbite Transmissions. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2020;Sep;20(9):637–651. Doi: 10.1089/vbz.2019.2558. Epub 2020 May 18. PMID: 32423307.
- Shome R., Deka R.P., Sahay S., Grace D., Lindahl J.F. Seroprevalence of Hemorrhagic Septicemia in Dairy Cows IN Assam, India. *Infection Ecology and Epidemiology*. 2019;9(1):1604064. Doi: 10.1080/20008686.2019.1604064.
- Davis C.M., Allen A.R., Bowles D.E. Consequences of Space Radiation on the Brain and Cardiovascular System. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog*. 2021;39(2):180–218. Doi: 10.1080/26896583.2021.1891825 PMID: 33902387
- Gorbunov N.V., Kiang J.G. Brain Damage and Patterns of Neurovascular Disorder after Ionizing Irradiation. *Complications in Radiotherapy and Radiation Combined Injury*. *Radiat Res*. 2021;196(1):1–16. Doi: 10.1667/RADE-20-00147.1. PMID: 33979447.
- Wang Z., Wang Q., Wang X., Zhu L., Chen J., Zhang B., Chen Y., Yuan, Z. Gut Microbial Dysbiosis is Associated with Development and Progression of Radiation Enteritis during Pelvic Radiotherapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019;23(5):3747–3756. Doi: 10.1111/jcmm.14289

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» для выполнения научно-исследовательской работы, государственная регистрация № 01200202604.

Участие авторов. Т.Р. Гайнутдинов – проведен литературный обзор по теме статьи, выполнена экспериментальная часть работы, обработан полученный материал, отредактирован текст, подготовлена рукопись. С.А. Рыжкин – научное руководство. К.Н. Вагин – оказана консультативная помощь по выполнению исследований. Е.Ю. Тризна – выполнена экспериментальная часть работы. С.Е. Охрименко – оказана консультативная помощь в выполнении экспериментальной части работы..

Поступила: 20.01.2024. Принята к публикации: 27.02.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out at the expense of the funds of the subsidy allocated by the Federal State Budgetary Institution "FCTRB-VNIVI" for the performance of research work, state registration No. 01200202604.

Contribution. T.R. Gaynutdinov – a literary review on the topic of the article was conducted, the experimental part of the work was performed, the received material was processed, the text was edited, the manuscript was prepared. S.A. Ryzhkin – scientific guidance. K.N. Vagin – advisory assistance was provided on the implementation of research. E.Y. Trizna – the experimental part of the work was performed. S.E. Okhrimenko – advisory assistance was provided in the implementation of the experimental part of the work..

Article received: 20.01.2024. Accepted for publication: 27.02.2024.