

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 616-03:615.331:539.1.047

**РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА
НА ОСНОВЕ *Escherichia coli*, ОЦЕНКА БЕЗВРЕДНОСТИ
И ПРОТИВОРАДИАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ**

© 2024 г. Т. Р. Гайнутдинов^{1,2*}, К. Н. Вагин^{1,2}

¹Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: gtr_timur@mail.ru

Поступила в редакцию 26.01.2023 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Представлены разработка, оценка безвредности и противорадиационной активности терапевтического средства на основе культуры *Escherichia coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1”. Для получения противорадиационного средства возбудитель колибактериоза выращивали на мясопептонном бульоне в условиях термостата при температуре 37°C в течение 3 сут. Выраженную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 50 мин, надосадочную жидкость сливали. Осадок доводили дистиллированной водой до 1 млрд в см³. Из выращенных культур готовили мазки и окрашивали их по Граму для определения чистоты и видовой принадлежности выращенной культуры. Приготовленную взвесь разливали в стерильные флаконы на 10, 50 или 100 см³, укупоривали их резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками, маркируя с указанием штамма, дозы облучения и даты. Облучение микробного материала проводили на γ -установке “Исследователь”, источник ⁶⁰Со, мощность поглощенной дозы 1.028 Гр/сек, в диапазонах поглощенных доз от 7.5 до 30.0 кГр с междозовыми интервалами 2.5 и 5.0 кГр. Степень инактивации γ -облученных культур *E. coli* определяли путем высева их на мясопептонный агар и термостатирования в течение 168 ч, регистрируя наличие или отсутствие роста микроорганизмов. Проведенными исследованиями установлено, что сроки и степень роста облученных культур *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1” находятся в прямой зависимости от дозы радиационного воздействия, их полная инактивация наступает при облучении в дозе 25.0 кГр. Дальнейшие исследования показали, что разработанный биопрепарат, полученный на базе *E. coli*, стерилен, ареактогенен, нетоксичен и безвреден. Механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения противорадиационных средств на основе *E. coli* штаммов «ПЛ-6» и «КВ-1» заключался в восстановлении гематологических, биохимических и иммунных показателей, что способствовало сохранению от 66.7 до 83.3% летально облученных животных.

Ключевые слова: микроорганизм, белые мыши, крысы, облучение, острая лучевая болезнь, биопрепарат, терапия, эффективность, резистентность организма

DOI: 10.31857/S0869803124020059, **EDN:** NBFYQE

Ядерные взрывы и радиационные аварии приводят к одновременному или последовательному воздействию на организм сочетанного (внешнего и внутреннего облучения) и комбинированного (радиационно-термического, радиационно-биологического поражения) излучений, в результате которого возникает тяжело протекающий процесс, ведущий к необратимым патологическим изменениям в живом организме [1, 2].

Результатом воздействия ионизирующего излучения на организм является поражение костного мозгового кроветворения и лимфопоэза, в результате чего происходит опустошение иммунокомпетентных клеток, поражаются клеточные и гуморальные звенья иммунной системы. Динамика лимфоцитов

после применения воздействия γ -облучения малыми дозами является изменчивым процессом, мгновенно реагирующим и сохраняющим постоянство. Продолжая наблюдения через год, З.А. Воронцова и В.В. Зюзина (2011) [3] обнаружили повышение числа стромальной и интраэпителиальной клеточной популяции. Согласно литературным данным, у людей, подвергавшихся радиационному воздействию в различные сроки, возникают повреждения иммунной системы организма [4]. Последствия лучевой терапии высоких доз проявляются раньше, чем при воздействии низкими дозами. При действии высоких доз часть лимфоцитов погибают в течение двух дней, открывая ворота различным инфекциям. Исследованиями Е.И. Tolstykh et al. (2013) [5] показано, что

усиление аутоиммунных процессов, изменения иммунологических реакций возникают в результате гипоплазии лимфатических узлов.

О.А. Слюсарева, З.А. Воронцова (2010) [6] отмечают, что тяжесть лучевых поражений определяется скоростью обновления и радиочувствительностью клеток. Повышенная чувствительность клеток к воздействию ионизирующего излучения и нарушение индукции адаптивного ответа в клетках являются проявлением нестабильности генома [7, 8].

Интенсивное развитие радиационной иммунологии, в том числе иммунотерапии и иммунопрофилактики, определило одно из основных направлений: разработку средств терапии при лучевой болезни, способных снижать летальные эффекты ионизирующего излучения, не вызывая в организме при этом побочного действия [9, 10].

Наши предыдущие исследования по изучению противорадиационных средств на основе микроорганизмов показывают их высокую эффективность при терапии лучевой болезни [11].

Механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения препаратов микробной природы реализовался путем усиления эндогенной продукции интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), колониестимулирующего фактора (КСФ), туморнекротического фактора (ТНФ- α) [12, 13], которые регулируют гомопоез, преодолевают миелосупрессию, обеспечивая повышение выживаемости животных [14, 15].

В последнее время для раннего терапевтического эффекта наблюдается смещение акцента в сторону привлечения биологических факторов противолучевой защиты, а именно использование микроорганизмов кишечного-тифозной группы (*E. coli* и др.) [16, 17], обладающих длительным защитным свойством и без проявления побочных эффектов.

Метаболиты кишечной палочки обеспечивают пролонгированную радиорезистентность у летально облученных животных. Микроорганизмы-продуценты при выращивании их на жидкой питательной среде — мясопептонном бульоне (МПБ) — выделяют уникальный набор продуктов метаболизма (бактериоцины, аминокислоты, пробиотические компоненты, лизоцим, ферменты, гормоны, полипептиды), которые обладают антитоксическим, антибактериальным, метаболизмкорректирующим и иммуномодулирующим эффектами, обеспечивая устойчивость макроорганизма к стресс-факторам. Эшерихии в процессе своей жизнедеятельности выделяют антибактериальные вещества (колицины), фермент каталазу и аминокислоты [18].

Вышесказанное стало основанием для разработки средства на основе эшерихий для терапии острой лучевой болезни (ОЛБ), соответственно, целью наших исследований стала разработка способа получения терапевтического средства на основе *Escherichia coli*, оценка его безвредности и противорадиационной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Противорадиационное средство микробного происхождения получали, используя производственный штамм *Escherichia coli* штамм (шт.) “ПЛ-6” (эшерихиозной диареи поросят, полученный из коллекции музея штаммов ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”) и патогенный штамм *Escherichia coli* шт. “КВ-1” (эшерихиозной диареи телят, полученный из коллекции музея штаммов ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”). Культуры выращивали на мясопептонном бульоне (МПБ), термостатировали при температуре 37°C в течение 3 сут. Выраженную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40–50 мин, надосадочную жидкость декантировали, осадок доводили дистиллированной водой по стандарту мутности им. Л.А. Тарасевича до 10 ед. (1 млрд/см³). Из выращенных культур готовили мазки и окрашивали их по Граму для определения чистоты и видовой принадлежности выращенной культуры.

Приготовленную взвесь разливали в стерильные флаконы на 10, 50 или 100 см³, укупоривали их резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками, маркируя с указанием штамма, дозы облучения и даты.

Облучение микробного материала проводили на γ -установке “Исследователь” (Россия), источник ⁶⁰Со, мощность поглощенной дозы 1.028 Гр/сек, в диапазонах поглощенных доз от 7.5 до 30.0 кГр с междозовыми интервалами 2.5 и 5.0 кГр.

Степень инактивации γ -облученных культур *E. coli* определяли путем посева их на мясопептонный агар (МПА), выращивали в условиях термостата в течение 168 ч, регистрируя наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

Из выращенных культур делали мазки, окрашивали по Граму, микроскопировали под иммерсией с 90-кратным увеличением.

Облученные культуры подвергали микробиологическому анализу, для чего делали серийные разведения в стерильном фосфатном буфере и анализировали с помощью стандартных процедур путем пересева на чашки Петри с МПА. Последние инкубировали в течение 24 ч при 37°C перед подсчетом

колоний на трех чашках Петри с 30–300 колониями и подсчитывали с помощью автоматического счетчика колоний New Brunswick Scientific Rietran II R, среднее число рассчитывали для каждого образца. Рост и концентрацию вышеуказанных штаммов на питательных средах определяли по оптической плотности с помощью прибора фотоэлектроколориметра ФЭК-56М (светофильтр с длиной волны 540 нм).

Радиоинактивированные в дозе 30.0 кГр культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” использовали в качестве противорадиационных средств, в первой серии опытов определяли стерильность в соответствии с Межгосударственным стандартом ГОСТ 28085-2013 [19], путем посева испытуемого средства на питательные среды.

В следующей серии опытов проводили исследования по установлению оптимальной лечебной дозы облученных дозе 30 кГр культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”. Опыты проводили на 120 белых мышах (аутбредные нелинейные мыши, получены из научно-вспомогательного виварного подразделения ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ) обоего пола массой 18–20 г, разделенных на 12 групп, по 10 животных в каждой. Животных подвергали воздействию облучения в дозе 7.7 Гр (ЛД_{80/30}) и через 3 сут после облучения однократно подкожно вводили испытуемые лечебное средство по следующей схеме: 1-я группа — 0.1 см³ (*E. coli* шт. “КВ-1”), 2-я — 0.2 см³ (*E. coli* шт. “КВ-1”), 3-я — 0.3 см³ (*E. coli* шт. “КВ-1”), 4-я — 0.4 см³ (*E. coli* шт. “КВ-1”), 5-я — 0.5 см³ (*E. coli* шт. “КВ-1”), 6-я — 0.1 см³ (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 7-я — 0.2 см³ (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 8-я — 0.3 см³ (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 9-я — 0.4 см³ (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 10-я — 0.5 см³ (*E. coli* шт. “ПЛ-6”). Облученным белым мышам 11-й группы и необлученным 12-й группы средства не вводили, они служили контролем облучения и биологическим контролем соответственно. Оценку результатов исследований проводили по выживаемости животных.

В третьей серии опытов определяли реактогенность, безвредность и токсичность испытуемых средств в соответствии с Межгосударственным стандартом ГОСТ 31926-2013 [20]. Перед проведением испытаний из флаконов облученных дозой 30 кГр культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” готовили смешанную пробу, отбирая из них по 32.5 см³ средства, и переносили в стерильный флакон, перед применением содержимое флакона тщательно перемешивали.

Для определения реактогенности опыты проводили на 20 белых мышах обоего пола живой массой

18–21 г, разделенных по принципу аналогов на две группы, по 10 животных в каждой. Животным 1-й группы исследуемое средство вводили в дозе 2×10⁸ микробных клеток (м.к.) на особь в объеме 0.2 см³ однократно подкожно. Животным 2-й группы испытуемый образец не вводили, они служили биологическим контролем. Оценку местного действия осуществляли на основании данных ежедневных 7-суточных наблюдений.

Согласно вышеуказанному регламентирующему документу ГОСТ 31926-2013, проводили оценку безвредности и токсичности радиоинактивированных в дозе 30.0 кГр культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1”. Опыты проводили на 110 здоровых белых мышах обоего пола массой 19–21 г, разделенных на 11 групп, по 10 животных в каждой. Перед испытанием смешанную культуру перемешивали и в разных концентрациях вводили животным в объемах 0.1 см³ (1×10⁸ микробных клеток на особь (м.к./особь)) — 1-я группа, 0.2 см³ (2×10⁸ м.к./особь) — 2-я, 0.3 см³ (3×10⁸ м.к./особь) — 3-я, 0.4 см³ (4×10⁸ м.к. особь) — 4-я, 0.5 см³ (5×10⁸ м.к./особь) — 5-я, 0.6 см³ (6×10⁸ м.к./особь) — 6-я, 0.7 см³ (7×10⁸ м.к./особь) — 7-я, 0.8 см³ (8×10⁸ м.к./особь) — 8-я, 0.9 см³ (9×10⁸ м.к./особь) — 9-я, 1.0 см³ (1×10⁹ м.к./особь) — 10-я группа, животным 11-й группы испытуемое средство не вводили, они служили биологическим контролем.

Полученные терапевтические средства в дальнейшем использовали в качестве лечебного средства при острой лучевой болезни.

Опыты по использованию полученных на 1-м этапе работы лечебных средств на основе культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” проводили на белых мышах и крысах обоего пола с живой массой 18–20 и 180–200 г соответственно.

Внешнее тотальное облучение животных проводили на γ -установке “Пума” с мощностью экспозиционной дозы 5.38 Р/мин (2.31×10⁻⁵ А/кг): белых мышей в дозе 7.9 Гр, крыс — 8.0 Гр.

В качестве контрольного препарата использовали противолучевую сыворотку (ПРЛС) с известным защитным эффектом [21].

Эксперименты по оценке противолучевой эффективности разработанных средств лечения проводили на 30 белых мышах, разделенных на пять групп, по шесть животных в каждой. При этом животных первых четырех групп подвергали воздействию γ -облучения в летальной дозе — 7.9 Гр, а животных 5-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 сут после облучения однократно подкожно в дозе 1×10^{10} м.к./кг вводили облученный в дозе 30 кГр *E. coli* шт. “ПЛ-6”; 2-й — в аналогичных условиях вводили облученный в дозе 30 кГр *E. coli* шт. “КВ-1”; 3-й — лечебное средство ПРЛС подкожно в дозе 50.0 мг/кг (в объеме 0.1 см³); 4-я — контроль облучения; 5-я — биологический контроль.

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

На втором этапе работы для подтверждения полученных на белых мышах данных по оценке терапевтической активности испытуемых средств проводили серию опытов на другом виде лабораторных животных — белых крысах. В опытах были использованы 30 белых крыс, разделенных на пять групп по шесть животных в каждой. При этом животных первых четырех групп подвергали γ -облучению в летальной дозе (8.0 Гр), животных 5-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 8.0 Гр животным 1-й группы через 3 сут после облучения однократно подкожно в дозе 2×10^9 м.к./особь в объеме 2.0 см³ вводили лечебное средство на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр; 2-й в аналогичных условиях — *E. coli* шт. «КВ-1», облученный в дозе 30 кГр; 3-й в аналогичных условиях — ПРЛС подкожно в дозе 50 мг/кг (в объеме 1.0 см³); 4-я — служила контролем облучения; 5-я — биологическим контролем.

Наблюдение за опытными и контрольными животными вели ежедневно в течение 30 дней, изучали клинические (общее состояние, выживаемость, средняя 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 из хвостовой вены в области средней трети хвостовых позвонков на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки 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 три 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 составили субпопуляцию Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью, а теофиллинчувствительные — 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 %) [22].

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 (М.С. Гончаренко и А.М. Латина [23] в модификации В.А. Гурьяновой и Е.И. Трошина [24]). Количественные методы определения ПОЛ регистрировали по 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.).

Полученный в ходе экспериментов цифровой материал гематологических и иммунологических исследований подвергали статистической обработке с использованием общепринятых методов, степень достоверности различий между сравнительными показателями определяли по критерию Стьюдента, а выживаемость животных — по точному критерию Фишера. Цифровые данные, полученные в экспе-

Таблица 1. Интенсивность роста облученной культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6” на мясопептонном агаре
Table 1. Growth rate of irradiated *E. coli* culture strain “PL-6” on meat-peptone agar

Доза облучения, кГр	Интенсивность роста, ч						
	24	48	72	96	120	144	168
7.5	+	++	++	++	+++	+++	+++*
10.0	+	++	++	++	++	+++	+++*
12.5	+	++	++	++	++	+++	+++*
15.0	+	+	+	+	++	++	++*
17.5	+	+	+	+	+	++	++*
20.0	—	+	+	+	+	+	++*
25.0	—	—	—	—	—	—	—
30.0	—	—	—	—	—	—	—
Контроль (необлученная культура)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*

Примечание. (—) — отсутствие роста; (+) — слабый рост; (++) — умеренный рост; (+++) — обильный рост; (*) — сделан мазок.

рименте, обработаны биометрически на персональном компьютере с использованием прикладной программы GraphPadPrismv 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенными исследованиями показано, что сроки и степень роста облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” находятся в прямой зависимости от дозы радиационного воздействия, их полная инактивация наступает при облучении в дозе 25.0 кГр (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что культура *E. coli* шт. “ПЛ-6” устойчива к воздействию ионизирующей радиации. γ —Облучение в дозе от 7.5 до 12.5 кГр сдерживает рост в течение суток после посева. Облучение их в дозе 15.0 и 17.5 кГр ингибирует развитие культуры, проявляющееся в слабом росте в первые 4 и 5 сут после посева. При воздействии облучения в дозе 20.0 кГр рост появляется на 2-е сут и идет слабо от 48 до 144 ч после посева. На 6-е сут после посева обильный рост наблюдался у образцов, облученных в дозах 7.5 и 15.0 кГр, умеренный — при дозах 15.0 и 17.5 кГр и слабый — при дозе 20.0 кГр, отсутствие — при дозах 25.0 и 30.0 кГр.

Результаты параллельных радиомикробиологических исследований с использованием вирулентного шт. *E. coli* “КВ-1” представлены в табл. 2.

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что *E. coli* шт. “КВ-1” менее устойчив к воздействию γ -лучей, чем “ПЛ-6”, что выражается в более отчетливом угнетении роста культуры в первые сутки после посева облученного в дозах от 7.5 до 15.0 кГр

материала, умеренном — при дозе 7.5 кГр и обильном — в контрольном образце. Облучение в диапазонах доз от 6 сут после посева, 17.5 кГр — от 48 до 144 ч, 20.0 кГр — от 72 до 144 ч. На 7-е сут выращивания культуры, подвергнутой облучению в дозах 7.5 и 10 кГр, наблюдали обильный рост, в пробах, облученных от 12.5 до 17.5 кГр, — умеренный рост и в дозе 20.0 кГр — слабый. Отсутствие роста отмечено в пробах, облученных в дозах 25.0 и 30.0 кГр.

При микроскопии мазков, сделанных из необлученных и облученных в разных диапазонах доз культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6” выявили грам-отрицательные, неспорообразующие палочки, располагающиеся в мазках одиночно.

Для определения контаминации микроорганизмами и грибами смешенную радиоинaktivированную культуру высевали на жидкие питательные среды: Сабуро, МПБ и МППБ (среда Китта—Тароцци) и на твердые питательные среды: Сабуро, МПА. На посев использовали по три пробирки и две чашки Петри с питательной средой на каждую пробу, в которые вносили по 1.0 см³ испытуемых лекарственных средств. Из отобранных флаконов в среду Китта—Тароцци высевали по 1.0 см³ в две пробирки вместимостью 10–12 см³ и по 5 см³ в два флакона объемом 100 см³. Для определения контаминации микоплазмами каждую пробу средства по 10 см³ вносили в 100 см³ флаконы с жидкой средой Хейфлика, а также по 0.2 см³ на четыре чашки Петри с аналогичной твердой питательной средой.

Пробирки и флаконы с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при

Таблица 2. Интенсивность роста облученной культуры *E. coli* штамм “КВ-1” на мясопептонном агаре
Table 2. Growth rate of irradiated *E. coli* culture strain “KV-1” on meat-peptone agar

Доза облучения, кГр	Интенсивность роста, ч						
	24	48	72	96	120	144	168
7.5	+	++	++	++	++	+++	+++*
10.0	+	+	++	++	++	++	+++*
12.5	+	+	+	++	++	++	+++*
15.0	+	+	+	+	+	+	+++*
17.5	—	+	+	+	+	+	+++*
20.0	—	—	+	+	+	+	+++*
25.0	—	—	—	—	—	—	—
30.0	—	—	—	—	—	—	—
Контроль (необлученная культура)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*

Примечание. (—) — отсутствие роста; (+) — слабый рост; (++) — умеренный рост; (+++) — обильный рост; (*) — сделан мазок.

температуре 37°C, среду Хейфлика — в микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5–10% диоксида углерода), а среду Сабуро — при комнатной температуре (22.5 ± 2.5)°C, в течение 14 сут, за исключением жидкой среды Хейфлика, инкубировали 20–21 день. Одновременно в тех же условиях инкубировали по одному флакону, содержащему 100 см³, и по две чашки Петри со средой Хейфлика — контроль стерильности питательной среды.

На 3-й день после посева проводили пересев материала от каждой жидкой среды Хейфлика в количестве не менее 0.2 см³ на две чашки Петри каждой твердой указанной среды. Пересев повторяли на 7, 14 и 20-й дни испытания. Пересевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (используя прибор анаэроустат) в течение 21 дня.

По истечении 14 сут наблюдения в изучаемых жидких и твердых питательных средах роста отмечено не было. Согласно регламентированному стандарту ГОСТ 28085-2013 [19], делали пересев из указанных сред на МПБ, среду Китта–Тароцци, жидкую и твердую среду Сабуро в тех же объемах и условиях, что и при посеве, вторичные посевы выдерживали в течение 14 сут.

По истечении периода наблюдений роста микроорганизмов, грибов и микоплазм отмечено не было, что свидетельствует об их стерильности.

Результаты проведенных опытов по установлению оптимальной лечебной дозы лечебных средств на основе культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”, облученных дозой 30 кГр, показали, что выживаемость

летально облученных белых мышей в 1-й группе составляла 60%, во 2-й — 70%, в 3-й — 70%, в 4-й — 70%, в 5-й — 60%, в 6-й — 50%, в 7-й — 60%, в 8-й — 60%, в 9-й — 60%, в 10-й — 50%, в 11-й — 20% и в 12-й — 100%.

Таким образом, оптимальная лечебная доза разрабатываемого противорадиационного лечебного средства — 0.2 см³, которая содержит 2×10^8 м.к. *E. coli*. В пересчете на 1 кг живой массы доза средства составляет 0.1×10^9 м.к./кг.

Проведенными клиническими испытаниями доказано, что разработанные лечебные средства на основе культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”, облученных дозой 30 кГр, не обладают реактогенной активностью. При ежедневном визуальном наблюдении у животных, которым применяли лечебные средства в указанных дозах (2×10^8 м.к./особь в объеме 0.2 см³), никаких реакций не выявлено: животные были активны, охотно принимали корм и воду, адекватно реагировали на естественные раздражители.

Результаты проведенных опытов по определению токсичности показали, что испытуемые инактивированные γ -облучением в дозе 30.0 кГр бактериальные культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” при подкожном введении в объемах от 0.1 до 1.0 см³, содержащие от 100 млн до 1 млрд м. к., не оказывали неблагоприятного воздействия на животных, не вызывали гибели их в течение 14 сут наблюдения, т. е. предлагаемые лечебные средства не токсичны, а также в ходе исследований доказано, что данные биопрепараты безвредны, так как введение их

Таблица 3. Терапевтические свойства разработанных биопрепаратов в опытах на белых мышах, $n = 6$
Table 3. Therapeutic properties of the developed biological products in experiments on white mice, $n = 6$

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	<i>E. coli</i> штамм “ПЛ-6” — 30	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	10.0	50.0
2	<i>E. coli</i> штамм “КВ-1” — 30	2×10^8 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	13.0	66.7*
3	ПРЛС	1.0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	10.0	50.0
4	Контроль облучения	—	—	крайне тяжелая	9.8	0
5	Биологический контроль	—	—	—	—	100

Примечание. Статистически значимое различие по отношению к группе контроля облучения при * — $p < 0.05$ по точному критерию Фишера; СПЖ — средняя продолжительность жизни; ПРЛС — противолучевая сыворотка; 1-кратно — однократное введение; п/к — подкожно; 1-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр и через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе 1×10^{10} м.к./кг введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6”; 2-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр, через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе 1×10^{10} м.к./кг введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “КВ-1”; 3-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр, через 3 сут после воздействия введение ПРЛС подкожно в дозе 1.0 мг/особь (в объеме 0.1 см³); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

опытным животным в 2–4-кратной дозе не вызывало никаких изменений клинических признаков и гибели животных в течение периода наблюдения (14 сут).

Результаты опытов по изучению противорадиационной эффективности разработанных лечебных средств на основе облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” представлены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 данных видно, что полученные потенциальные противорадиационные микробные средства на основе *E. coli* оказывали противорадиационную активность. Из них лечебное средство на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6” и контрольный препарат ПРЛС (варианты 1, 3) обеспечивали 50%-ную выживаемость, одно средство на основе *E. coli* шт. “КВ-1” (вариант 2) — обладало максимальной противорадиационной активностью, вылечивая животных от крайне тяжелой степени ОЛБ в 66.7% случаев ($p = 0.038$, $p < 0.05$ по отношению к группе контроля облучения).

У животных группы контроля облучения (4-я группа) наблюдалось острая лучевая болезнь (ЛД_{100/30}) крайне тяжелой степени со 100%-ной летальностью облученных животных при средней продолжительности жизни павших мышей 9.8 сут. Применение испытуемых средств оказывало модифицирующее действие на течение, степень тяжести, исход болезни и выживаемость животных.

Установлено, что однократное подкожное введение радиоинактивированного γ -лучами возбудителя колибактериоза, облученного в дозе 30 кГр (1-я, 2-я группа), а также ПРЛС (3-я группа) значительно

облегчали течение ОЛБ, степень ее проявления, срок продолжительности жизни (СПЖ), выживаемость животных. Показано, что применение указанных средств переводит крайне тяжелое течение острой лучевой болезни в тяжелое, увеличивая выживаемость от 50 до 66.6% и срок продолжительности жизни — от 10 до 17 сут, что превышает контрольный уровень до 1.7 раза.

Результаты второго этапа работы по оценке терапевтической активности испытуемых средств, проведенные на белых крысах, представлены в табл. 4.

Из представленных в табл. 4 данных видно, что острая лучевая болезнь у крыс 4-й группы, которым лечебные средства не применяли, протекала тяжело в костномозговой форме с падежом животных на 2, 4, 6, 9, 11-е сут со СПЖ 6.4 сут, выживаемость животных в данной группе составила 16.7%.

Применение лечебных средств приводило к облегчению течения ОЛБ, переводя тяжелую степень болезни в среднюю и значительно увеличивая СПЖ павших белых крыс.

При применении разработанного лечебного средства *E. coli* шт. “ПЛ-6”-30 и контрольного препарата (ПРЛС) (1-я, 3-я группа) оказывало облегчающее действие на течение острой лучевой болезни, значительно повышая выживаемость животных до 66.7 % при СПЖ до 11.5–12.5 сут.

Наиболее высоким противорадиационным свойством обладало средство микробного происхождения: радиоинактивированный возбудитель

Таблица 4. Выживаемость облученных белых крыс, подвергнутых лечению разработанными биопрепаратами на основе облученных культур *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1”, $n = 6$

Table 4. Survival rate of irradiated white rats treated with developed biologics based on irradiated cultures of *E. coli* strains “PL-6” and “KV-1”, $n = 6$

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	<i>E. coli</i> штамм “ПЛ-6” — 30	2×10^9 м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	12.5	66.7
2	<i>E. coli</i> штамм “КВ-1” — 30	2×10^9 м.к.	1-кратно п/к	средняя	14.0	83.3*
3	ПРЛС	10.0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	11.5	66.7
4	Контроль облучения	—	—	тяжелая	6.4	16.7
5	Биологический контроль	—	—	—	—	100

Примечание. Статистически значимое различие по отношению к группе контроля облучения при * — $p < 0.05$ по точному критерию Фишера; СПЖ — средняя продолжительность жизни; ПРЛС — противолучевая сыворотка; 1-кратно — однократное введение; п/к — подкожно; 1-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр и через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе 2×10^9 м.к./особь (в объеме 2.0 см³) введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6”; 2-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе 2×10^9 м.к./особь (в объеме 2.0 см³) введение культуры *E. coli* штамм “КВ-1” облученной в дозе 30 кГр; 3-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия введение ПРЛС подкожно в дозе 10 мг/особь (в объеме 1.0 см³); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

колибактериоза, облученный в дозах 30 кГр (2-я группа), модифицирующий тяжелую степень течения болезни в среднюю, увеличивая выживаемость до 83.3%, а также СПЖ павших животных до 14 сут, что значительно превышало показатели контрольных животных ($p = 0.03$, $p < 0.05$ по отношению к группе контроля облучения).

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. 5 и 6 представлены результаты исследования периферической крови γ -облученных и леченных белых крыс разработанными биопрепаратами на основе облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1”.

Данные, представленные в табл. 5, показывают, что выраженной реакцией организма на γ -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 наблюдали на 14-е сутки опыта: составляло у животных группы контроля облучения $3.05 \pm$

0.42×10^9 /л ($p < 0.001$) против $10.50 \pm 0.24 \times 10^9$ /л биологического контроля. На всем протяжении эксперимента у крыс, подвергнутых воздействию γ -излучения и лечению разработанными средствами, наблюдали увеличение количества лейкоцитов по сравнению с группой контроля облучения, но в сравнении с группой биологического контроля количество лейкоцитов у леченых 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-х по 14-е сутки изменения со стороны красной крови у этих животных носили более выраженный и достоверный характер. Максимальное проявление анемии наблюдалось на 14-е сутки опыта, количество эритроцитов составило $6.03 \pm 0.35 \times 10^{12}$ /л, а гемоглобина — 109.17 ± 2.03 г/л против данных биологического контроля $7.17 \pm 0.34 \times 10^{12}$ /л и 126.50 ± 1.83 г/л соответственно. Изменения количества эритроцитов у леченых крыс не имели различий с группой биологического контроля. Концентрация гемоглобина у леченых животных снижалась до 14-х суток исследований. Начиная с 21-х суток опыта у леченых животных концентрация гемоглобина в крови возрастала, но исходного уровня не достигала.

Показатель гематокрита у крыс группы контроля облучения в период с 3-х сут по 14-е сутки опыта достоверно снижался, с небольшим повышением на 7-е сутки. Этот показатель у леченых животных незначительно снижался на 14-е сутки в сравнении с уровнем биологического контроля. Минимальное

значение этого показателя в группе контроля облучения отмечено на 14-е сутки после облучения и составило $28.17 \pm 0.66\%$ при $36.17 \pm 0.72\%$ в биологическом контроле, а в группе с применением лечебного средства на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр, этот показатель составлял

Таблица 5. Показатели крови белых крыс в разные сроки после γ -облучения и лечения, $n = 6$

Table 5. Blood parameters 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	123.67 ± 3.51	6.72 ± 0.36	$4.28 \pm 0.23^{***}$	35.83 ± 0.82	$66.33 \pm 0.23^{**}$
	2	125.33 ± 3.56	6.77 ± 0.38	$4.47 \pm 0.29^{***}$	$35.50 \pm 0.47^*$	$65.95 \pm 0.52^{**}$
	3	$121.60 \pm 2.53^*$	6.70 ± 0.35	$4.12 \pm 0.22^{***}$	$35.50 \pm 0.47^*$	$66.02 \pm 0.28^{***}$
	4	$119.40 \pm 3.14^{**}$	6.67 ± 0.37	$3.67 \pm 0.37^{***}$	$33.33 \pm 0.73^{***}$	$63.12 \pm 0.31^{***}$
	5	128.83 ± 2.27	6.83 ± 0.52	9.67 ± 0.37	36.67 ± 0.23	69.83 ± 0.87
7	1	$116.00 \pm 5.51^*$	6.88 ± 0.42	$4.33 \pm 0.30^{***}$	36.67 ± 0.46	69.50 ± 0.47
	2	$116.83 \pm 4.27^*$	7.00 ± 0.43	$4.50 \pm 0.31^{***}$	36.83 ± 0.44	69.85 ± 0.34
	3	$115.50 \pm 4.21^{**}$	6.83 ± 0.42	$4.18 \pm 0.38^{***}$	36.17 ± 0.66	68.28 ± 0.93
	4	$110.50 \pm 4.99^{**}$	6.45 ± 0.56	$3.72 \pm 0.37^{***}$	$34.17 \pm 0.44^{**}$	$61.28 \pm 0.74^{***}$
	5	129.67 ± 2.59	7.00 ± 0.40	9.83 ± 0.44	36.33 ± 0.37	69.50 ± 1.29
14	1	$113.83 \pm 4.28^*$	6.41 ± 0.31	$3.93 \pm 0.22^{***}$	$32.50 \pm 0.47^{***}$	$66.98 \pm 0.74^{***}$
	2	$114.67 \pm 3.09^{**}$	6.65 ± 0.41	$4.13 \pm 0.09^{***}$	$32.83 \pm 0.34^{***}$	$67.02 \pm 0.58^{***}$
	3	$113.67 \pm 3.47^{**}$	6.20 ± 0.33	$3.80 \pm 0.19^{***}$	$32.17 \pm 0.34^{***}$	$66.95 \pm 0.85^{**}$
	4	$109.17 \pm 2.03^{***}$	$6.03 \pm 0.35^*$	$3.05 \pm 0.42^{***}$	$28.17 \pm 0.66^{***}$	$58.78 \pm 0.52^{***}$
	5	126.50 ± 1.83	7.17 ± 0.34	10.50 ± 0.24	36.17 ± 0.72	70.67 ± 0.54
21	1	$114.00 \pm 2.48^{***}$	6.67 ± 0.39	$5.87 \pm 0.23^{***}$	36.83 ± 0.44	69.15 ± 0.34
	2	$114.83 \pm 2.37^{**}$	6.72 ± 0.38	$5.92 \pm 0.24^{***}$	36.92 ± 0.50	69.52 ± 0.47
	3	$113.87 \pm 1.51^{***}$	6.48 ± 0.43	$5.70 \pm 0.38^{***}$	36.50 ± 0.47	68.78 ± 0.50
	4	—	—	—	—	—
	5	129.00 ± 2.81	6.83 ± 0.44	10.33 ± 0.37	36.50 ± 0.68	70.02 ± 0.94
28	1	$117.17 \pm 1.43^{**}$	6.74 ± 0.46	$7.00 \pm 0.43^{***}$	36.05 ± 0.29	69.28 ± 0.41
	2	117.50 ± 2.35	6.92 ± 0.43	$7.07 \pm 0.45^{***}$	36.13 ± 0.59	69.67 ± 0.48
	3	$116.50 \pm 1.74^{**}$	6.66 ± 0.39	$6.93 \pm 0.38^{***}$	35.83 ± 0.52	69.25 ± 0.68
	4	—	—	—	—	—
	5	128.67 ± 3.16	7.00 ± 0.40	10.17 ± 0.44	36.17 ± 0.34	70.25 ± 0.34

Примечание. Данные представлены в виде: среднее арифметическое $\pm$ средняя квадратическая ошибка ($M \pm m$). Статистически значимое различие по отношению к контрольной 5 группе при * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$ по критерию Стьюдента; 1-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр и через 3 сут после воздействия однократно подкожно в дозе 2×10^9 м.к./особь (в объеме 2.0 см³) введение культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6” облученной в дозе 30 кГр; 2-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия однократно подкожно в дозе 2×10^9 м.к./особь (в объеме 2.0 см³) введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “КВ-1”; 3-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия подкожное введение противолучевой сыворотки (ПРЛС) в дозе 10 мг/особь (в объеме 1.0 см³); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

32.50 ± 0.47 %, лечебного средства на основе *E. coli* шт. “КВ-1” облученного в дозе 30 кГр — 32.83 ± 0.34%, контрольное лечебное средство ПРЛС — 32.17 ± 0.34%.

Содержание общего белка в сыворотке крови животных в группе контроля облучения в течение первых трех суток достоверно снижалось 63.12 ± 0.31 г/л ($p < 0,001$) с минимальным значением на 14-е сутки после γ -воздействия 58.78 ± 0.52 г/л ($p < 0.001$) по сравнению с группой биологического контроля

70.67 ± 0.54 г/л. У леченых животных эти показатели были выше, чем в группе контроля облучения, и на указанный срок составляли в 1-й группе 66.98 ± 0.74 г/л, во 2-й — 67.02 ± 0.58 г/л, в 3-й — 66.95 ± 0.85 г/л.

Таким образом, изменения морфологического состава периферической крови γ -облученных крыс характеризовались развитием выраженной лейкопении и анемии. У леченых животных изменения показателей эритроцитов были менее выраженными.

Таблица 6. Показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов у белых крыс при облучении и применении лечебных средств, $n = 6$

Table 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	14.17 ± 0.44***	5.55 ± 0.53***	7.15 ± 0.61×	8.05 ± 0.47
	2	14.50 ± 0.24***	5.75 ± 0.33***	7.07 ± 0.76*	8.00 ± 0.75
	3	13.88 ± 0.15***	5.23 ± 0.34***	7.18 ± 0.64*	8.10 ± 0.40
	4	11.62 ± 0.56***	4.40 ± 0.40***	7.55 ± 0.67**	8.18 ± 0.34
	5	28.67 ± 0.46	9.67 ± 0.43	5.05 ± 0.43	6.88 ± 0.53
7	1	14.95 ± 0.55***	4.88 ± 0.66***	6.08 ± 0.64	8.55 ± 0.36*
	2	15.00 ± 0.35***	4.95 ± 0.5***	6.03 ± 0.77	8.52 ± 0.62
	3	14.12 ± 0.26***	4.73 ± 0.39***	6.07 ± 0.61	8.60 ± 0.53
	4	11.73 ± 0.5***	3.73 ± 0.34***	7.88 ± 0.42*	9.02 ± 0.56*
	5	28.17 ± 0.34	9.50 ± 0.84	5.43 ± 0.75	7.02 ± 0.61
14	1	13.45 ± 0.69***	4.38 ± 0.84***	6.58 ± 0.83	8.92 ± 0.29**
	2	13.38 ± 0.48***	4.45 ± 0.71***	6.70 ± 0.69	8.88 ± 0.7*
	3	13.28 ± 0.68***	4.23 ± 0.6***	6.57 ± 0.81	8.95 ± 0.48*
	4	9.40 ± 0.25***	2.90 ± 0.35***	8.05 ± 0.37**	9.68 ± 0.68**
	5	28.50 ± 0.55	9.92 ± 0.44	5.15 ± 0.70	6.98 ± 0.51
21	1	17.62 ± 0.32***	5.25 ± 0.49***	5.92 ± 0.64	8.62 ± 0.72
	2	17.80 ± 0.43***	5.45 ± 0.21***	5.75 ± 0.77	8.42 ± 0.60
	3	17.28 ± 0.25***	5.30 ± 0.19***	5.90 ± 0.67	8.65 ± 0.90
	4	—	—	—	—
	5	28.17 ± 0.34	9.83 ± 0.82	5.12 ± 0.87	6.93 ± 0.79
28	1	20.50 ± 0.42***	7.45 ± 0.39*	5.75 ± 0.74	6.92 ± 0.76
	2	20.80 ± 0.49***	7.80 ± 0.32*	5.57 ± 0.78	6.90 ± 0.70
	3	20.12 ± 0.34***	7.22 ± 0.50*	5.50 ± 0.84	6.95 ± 0.54
	4	—	—	—	—
	5	28.57 ± 0.33	9.77 ± 0.75	5.33 ± 0.78	7.03 ± 0.46

Примечание. Условные обозначения согласно табл. 5.

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 леченых белых крыс представлены в табл. 6.

Из данных таблицы видно, что у облученных белых крыс группы контроля облучения происходит резкое снижение количества Т- и В-лимфоцитов, максимальное снижение зарегистрировано на 14-е сут исследований и составляло $9.40 \pm 0.25\%$ против $28.50 \pm 0.55\%$ 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-м суткам и составлял $13.45 \pm 0.69\%$, $13.38 \pm 0.48\%$, $13.28 \pm 0.68\%$, что на 47.2, 46.9 и 46.6% ниже значения интактных животных. В дальнейшем происходило восстановление количества Т-лимфоцитов, но даже к концу срока исследований (28 сут) в этих группах уровень Т-клеток полностью не восстанавливался до уровня биологического контроля. Количество В-лимфоцитов поражалось аналогично Т-лимфоцитам. Минимум количества В-лимфоцитов в опытных группах отмечен на 14-е 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 восстанавливалась.

Результаты исследований интенсивности процесса перекисного окисления липидов по содержанию в периферической крови у подвергнутых воздействию γ -излучения и интактных крыс малонового диальдегида, показали, что в группе облученного контроля происходит достоверное возрастание показателя перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови, начиная с первых суток в плазме 8.18 ± 0.34 нмоль/мл при 6.88 ± 0.53 нмоль/мл в исходке, в гемолизате — 7.55 ± 0.67 нмоль/мл ($p < 0.01$) при 5.05 ± 0.43 нмоль/мл в группе биологического контроля. На 7-е сутки эксперимента количество малонового диальдегида возросло: значительное повышение отмечено на 14–21-е сутки опыта. Максимальное повышение этого пока-

зателя в группе облученного контроля приходило на 14-е сутки и составило в плазме крови 9.68 ± 0.68 нмоль/мл ($p < 0.01$) при 6.98 ± 0.51 нмоль/мл в группе биологического контроля, в гемолизате эритроцитов — 8.05 ± 0.37 нмоль/мл ($p < 0.01$) при 5.15 ± 0.70 нмоль/мл в контрольной группе.

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 лечеными животными наблюдались определенные различия, проявлявшиеся в меньшем снижении количества лейкоцитов и других показателей крови и более раннем и выраженном восстановлении их у леченых 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 ЛД_{83.3–100} гибели в группе контроля облучения.

Таким образом, проведенными исследованиями на лабораторных животных установлено, что наиболее высокой противорадиационной эффективностью обладает разработанное лечебное средство микробного происхождения на основе *E. coli* шт. “КВ-1”, облученного в дозе 30 кГр, обеспечивающий 83.3 %-ную выживаемость против 66.6 %, лечебного средства *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр, регламентированного средства (ПРЛС) — 66.6% и контроля облучения — 16.7%. При этом СПЖ животных увеличивалось до 14 сут (лечебное средство на основе *E. coli* шт. “КВ-1”, облученный в дозе 30 кГр) против 6.4 — у контроля облучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

При получении бактериальных радиозащитных средств руководствовались ранее использованными нами методами и приемами выращивания и инактивации биологического материала [25].

Оценку радиозащитной эффективности изучали на лабораторных животных (белых мышах и крысах). При выборе дозы внешнего γ -облучения, вызывающей лучевую болезнь тяжелой степени, руководствовались результатами предыдущих собственных исследований [11, 25], а также литературными данными [26].

Проведенными экспериментами установлено, что подкожное введение радиозащитных инактивированных γ -облучением средств микробного происхождения наиболее эффективно при

условии инъекции их через 3 сут после радиационного воздействия. Наши данные, касающиеся сроков введения радиопротективных средств, отчасти согласуются с литературными данными [27–29].

Изучение противолучевой эффективности испытуемых инактивированных γ -облучением средств микробного происхождения показало, что они обладают высокими терапевтическими свойствами. Введение радиоинактивированных культур *E. coli* шт. “КВ-1” предотвращало гибель до 80% всех облученных мышей и до 60% — при условии инъекции им инактивированной культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6”.

Полученные данные по выживаемости вполне согласуются с результатами исследований по оценке радиозащитной эффективности инактивированных культур микроорганизмов [28, 30].

В опытах на белых мышах и белых крысах по определению эффективности испытуемых противолучевых средств при радиационном поражении показано, что испытуемые образцы микробного происхождения *E. coli* шт. “КВ-1”, *E. coli* шт. “ПЛ-6”, подвергнутые воздействию γ -излучения в дозе 30 кГр, обладают высокими лечебными свойствами при условии парентерального введения их через 3 сут после радиационного воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено, что инактивация микроорганизмов *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1” γ -излучением приводит к снижению вирулентности, токсичности штаммов и повышению радиозащитной активности. Введение инактивированных γ -излучением культур микроорганизмов *E. coli* штаммов “КВ-1”, “ПЛ-6” через 3 сут после внешнего радиационного воздействия восстанавливало гематологические, биохимические и иммунные показатели, что способствовало сохранению от 66.7 до 83.3% облученных лабораторных животных (белых мышей и белых крыс) в ЛД_{83,3–100}, что дает основание для его дальнейшего использования как средства терапии острой лучевой болезни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) (The work was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership

Program of Kazan (Volga Region) Federal University (PRIORITY-2030)).

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи (The authors declare no conflicts of interests).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ” для выполнения научно-исследовательской работы, государственная регистрация № 01200202604 (The work was carried out at the expense of the funds of the subsidy allocated by the Federal State Budgetary Institution “FCTRБ-VNIVI” for the performance of research work, state registration No. 01200202604).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайнутдинов Т.Р., Вагин К.Н., Рыжкин С.А. Способ лечения радиационно-термических ожогов. *Радиация и риск*. 2023;32(1):108–117. [Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Ryzhkin S.A. Method of treatment of radiation-thermal burns. *Radiation and risk*. 2023;32(1):108–117 (In Russ.)] <http://doi.org/10.21870/0131-3878-2023-32-1-108-117>
2. Islam M.T. Radiation interactions with biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.* 2017;93(5):487–493. <http://doi.org/10.1080/095533002.2017.1286050>
3. Воронцова З.А., Зюзина В.В. Иммунные эффекты на воздействие малых доз — облучения в эксперименте. Материалы конференции. Фундаментальные и прикладные исследования в медицине. Франция, Париж, 15–22 октября 2011 г. 2011;11:80–81. [Vorontsova Z.A., Zyuzina V.V. Immune effects on the effect of small doses of radiation in an experiment. Conference proceedings. Fundamental and applied research in medicine. France, Paris, October 15–22, 2011. 2011;11:80–81 (In Russ.)]
4. Аклеев А.А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2020;65(4):29–35. [Akleev A.A. Human immune status in the long-term period of chronic radiation exposure. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(4):29–35. (In Russ.)]. <http://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35>
5. Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M. et al. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa riverside residents ¹³⁷Cs. *Health Phys.* 2013;104(5):481–498. <http://doi.org/10.1097/HP.0b013e318285bb7a>
6. Слюсарева О.А., Воронцова З.А. Доза–эффекты однократного облучения и состояние гомеостаза слизистой оболочки тощей кишки в динамике пролонгированности сроков наблюдения. *Вестн. новых мед. технологий*. 2010;17(2):39–41. [Slyusareva O.A., Vorontsova Z.A. Dose–effects of single-dose irradiation and the state of homeostasis of the jejunum mucosa in the dynamics of prolonged follow-up periods. *Bull. New Med. Technols.* 2010;17(2):39–41. (In Russ.)]

7. Засухина Г.Д. Адаптивный ответ — общебиологическая закономерность: факты, гипотезы, вопросы. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008;48(4):464–473. [Zasukhina G.D. Adaptive Response — the General Biological Tendency: Facts, Hypothesis, Questions. *Radiation Biology. Radioecology*. 2008;48(4):464–473 (In Russ.)]
8. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток. *Экол. генетика*. 2006; 4(3):7–19. [Ingel F.I. Perspectives of micronuclear test in human lymphocytes cultivated in cytogenetic block conditions. Part 1: cell proliferation. *Ecological genetics*. 2006;4(3):7–19. (In Russ.)].
9. Kuruba V., Gollapalli, P. Natural radioprotectors and their impact on cancer drug discovery. *Radia. Oncol. J*. 2018;36(4):265–275.
<http://doi.org/10.3857/roj.2018.00381>
10. Smith T.A., Kirkpatrick D.R., Smith S. et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *J. Translat. Med*. 2017;15(1):232.
<http://doi.org/10.1186/s12967-017-1338-x>.
11. Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Nizamov R.N. et al. Radioprotective activity of gamma-irradiated *St. aureus* variants. *Linguistica Antverpiensia*. 2021;2:1176–1193.
12. Bin Qiu, Abudureyimujiang Aili, Lixiang Xue, et al. Advances in Radiobiology of Stereotactic Ablative Radiotherapy. *Front. Oncol*. 2020;10:1165.
<http://doi.org/10.3389/fonc.2020.01165>
13. Leblanc J., Burt J. Radiation Biology and Its Role in the Canadian Radiation Protection Framework. *Health Physics*. 2019;3(117):319–329.
<http://doi.org/10.1097/HP.0000000000001060>
14. Smolen J.S., Aletaha D., Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nature Rev. Rheumatol*. 2012;8:235–243.
<http://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.23>
15. Yarilina, A. Kai Xu, Chunhin Chan, Lionel B Ivashkiv. Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor-activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by JAK inhibitors. *Arthritis Rheum*. 2012;64(12):3856–3866.
<http://doi.org/10.1002/art.37691>
16. Гайнутдинов Т.Р. Оценка противорадиационной эффективности препаратов, полученных на основе веществ микробного происхождения. *Вет. врач*. 2024;1:52–57. [Gaynutdinov T.R. Evaluation of the anti-radiation effectiveness of drugs derived from substances of microbial origin. *Veterinarian*. 2024;1:52–57. (In Russ.)].
http://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_1_52
17. 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. Prospects for the use of cytokines and cytokine synthesis inducers as radioprotective drugs. *Radiation Biology. Radioecology*. 2019;59(2):170–176. (In Russ.)].
<http://doi.org/10.1134/S0869803119020164>
18. Vagin K.N., Gaynutdinov T.R., Nizamov R.N. et al. Obtaining and application of a radioprotective preparation of microbial origin. *Linguistica Antverpiensia*. 2021;2:1156–1175.
19. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы бактериологического контроля стерильности: межгосударственный стандарт Российской Федерации: издание официальное. Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П): введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 319-ст: введен взамен ГОСТ 28085-89: дата введения 2014-07-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов” (ФГБУ “ВГНКИ”). Техэксперт: офиц. сайт. — URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200104835> (дата обращения: 30.09.2022). [GOST 28085-2013. Biological medicinal products for veterinary use. Methods of bacteriological sterility control: Interstate Standard of the Russian Federation: official publication: adopted by the Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Protocol No. 55-P of March 25, 2013): put into effect by order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of June 28, 2013. No. 319-st: introduced instead of GOST 28085-89: date of introduction 2014-07-01 / developed by the Federal State Budgetary Institution “All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines and Feed” (FGBI “VGNKI”). Techexpert: ofic. website. — URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200104835> (accessed: 30.09.2022). (In Russ.)]
20. ГОСТ 31926-2013. Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности: межгосударственный стандарт Российской Федерации: издание официальное: принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол 7 мая 2013 г. № 43): введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 243-ст: введен впервые: дата введения 2014-07-01 / подготовлен Федеральным государственным бюджетным учреждением “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов” (ФГБУ “ВГНКИ”). Техэксперт: офиц. сайт. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200103451> (дата обращения: 30.09.2022). [GOST 31926-2013. Medicinal products for veterinary use. Methods for determining harmlessness: Interstate Standard of the Russian Federation: official publication: adopted by the Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Protocol No. 43 of May 07, 2013): put into effect by order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of June 27, 2013. No. 243-st: introduced for the first time: date of introduction 2014-07-01 / prepared by the Federal State Budgetary Institution “All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines and Feed” (FGBI “VGNKI”). Techexpert: ofic. website. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200103451> (accessed: 30.09.2022). (In Russ.)]
21. Авилов В.М., Равилов А.З., Киришин В.А. и др. Патент № 2169572 С2 Российская Федерация, МПК

- A61K 35/28, 35/78. Способ лечения радиационных поражений организма и способ получения препарата для лечения радиационных поражений организма. № 97113199/14, заявл. 31.07.1997, опубл. 27.06.2001. 7 с. [Avilov V.M., Ravilov A.Z., Kirshin V.A. et al. Patent No. 2169572 C2 Russian Federation, IPC A61K 35/28, 35/78. A method for the treatment of radiation damage to the body and a method for obtaining a drug for the treatment of radiation damage to the body. No 97113199/14, declared on 31.07.1997, publ. 27.06.2001. 7 p. (In Russ.)]
22. Фримель Г. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля; Перевод с немецкого А.П. Тарасова. М.: Медицина, 1987. 472 с. [Frimel G. Immunological methods / Ed. G. Frimel; Translated from the German by A.P. Tarasov. M.: Publishing House of Medicine. 1987. 472 p. (In Russ.)]
 23. Гончаренко М.С., Латина А.М. Метод перекисного окисления липидов. *Лаб. дело*. 1985;1:60–61. [Goncharenko M.S., Latinova A.M. Method of lipid peroxidation. *Laboratory business*. 1985;1:60–61. (In Russ.)]
 24. Гурьянова В.А., Трошин Е.И. Изучение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях крыс при облучении: Материалы республиканской научно-производственной конференции: “Актуальность проблемы ветеринарии и зоотехнии”. Казань, 1996. С. 97. [Guryanova V.A., Troshin E.I. Studying the level of lipid peroxidation (POL) in rat tissues under irradiation: Materials of the Republican scientific and industrial conference: “Relevance of the problem of veterinary medicine and animal science”. Kazan, 1996. P. 97. (In Russ.)]
 25. Гайнутдинов Т.Р., Идрисов А.М., Фролов А.В. и др. Определение радиозащитной эффективности инактивированных γ -облучением штаммов микроорганизмов. *Вет. врач*. 2022;2:13–20. [Gaynutdinov T.R., Idrisov A.M., Frolov A.V. et al. Determination of the radioprotective effectiveness of inactivated gamma-irradiated strains of microorganisms. *Veterinarian*. 2022;2:13–20. (In Russ.)]. http://doi.org/10.33632/1998-698X.2022_13_20
 26. Reisz J.A., Bansal N., Qian J. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(2):260–292. <http://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>
 27. Raviraj J., Bokkasam V.K., Kumar V.S., Reddy U.S., Suman V. Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. *Ind. J. Dental Res.* 2014;25(1): 83–90. <http://doi.org/10.4103/0970-9290.131142>
 28. Kumar Raj, Singh Shravan Kumar. Exploitation of microbial resources for radioprotector development: current status at Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences. *J. Radiat. Cancer Res*. 2016;7(1):38.
 29. Wang, W., Xue C., Mao X. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol*. 2020;153:373–384. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203>
 30. Shuryak I., Matrosova V.Y., Gaidamakova E.K. et al. Microbial cells can cooperate to resist high-level chronic ionizing radiation. *PloS One*. 2017;12(12):e0189261. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189261>

Development of a Therapeutic Agent Based on *Escherichia coli*, Assessment of Harmlessness and Anti-Radiation Activity

T. R. Gaynutdinov^{1,2*}, K. N. Vagin^{1,2}

¹Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Center for Toxicological,
Radiation and Biological Safety”, Kazan, Russia

²Kazan Federal University, Kazan, Russia

*E-mail: grt_timur@mail.ru

The paper presents the development, assessment of the safety and antiradiation activity of a therapeutic agent based on the culture of *Escherichia coli* strains “PL-6” and “KV-1”. To obtain the antiradiation agent, the causative agent of colibacillosis was grown in meat-peptone broth in a thermostat at a temperature of 37°C for 3 days. The grown suspension was centrifuged at 3000 rpm for 50 min, the supernatant was decanted. The sediment was brought to 1 billion cm³ with distilled water. Smears were prepared from the grown cultures and stained according to Gram to determine the purity and species of the grown culture. The prepared suspension was poured into sterile vials of 10, 50 or 100 cm³, sealed with rubber stoppers and rolled with aluminum caps, labeling with an indication of the strain, radiation dose and date. Irradiation of the microbial material was carried out on the γ -installation “Issledovatel”, source ⁶⁰Co, absorbed dose rate of 1.028 Gy/sec, in the ranges of absorbed doses from 7.5 to 30.0 kGy with interdose intervals of 2.5 and 5.0 kGy. The degree of inactivation of γ -irradiated *E. coli* cultures was determined by seeding them on meat-peptone agar and thermostating for 168 hours, recording the presence or absence of microorganism growth. The studies have established that the timing and degree of growth of irradiated *E. coli* cultures of the “PL-6” and “KV-1” strains are directly dependent on the radiation dose, their complete inactivation occurs with irradiation at a dose of 25.0 kGy. Further studies have shown that the developed biopreparation obtained on the basis of *E. coli* is sterile, areactogenic, non-toxic and harmless. The mechanism of formation of radioresistance of the organism against the background of application of antiradiation agents based on *E. coli* strains “PL-6” and “KV-1” consisted in restoration of hematological, biochemical and immune parameters, which contributed to preservation of 66.7 to 83.3% of lethally irradiated animals.

Keywords: microorganism, white mice, rats, irradiation, acute radiation sickness, biopreparation, therapy, efficiency, body resistance

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гайнутдинов Тимур Рафкатович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ “Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности” (ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”), Казань, Россия; ст. науч. сотр. ФГАОУВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” (ФГАОУВО «КФУ»), Казань, Россия. gtr_timur@mail.ru; +7 (950) 948-54-09 <https://orcid.org/0000-0003-3832-883X>

Вагин Константин Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб., вед. науч. сотр. ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”, Казань, Россия; ст. науч. сотр. ФГАОУВО “КФУ”, Казань, Россия. kostya9938@yandex.ru; +7 (927) 433-33-55 <https://orcid.org/0000-0003-4396-614X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gaynutdinov Timur Rafkatovich, PhD. Biol. nauk, ved. nauk. sotr. Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological

Safety” (FSBSI “FCTRBS-ARRVI”), Kazan, Russia; art. scientific. sotr. Kazan Federal University (KFU), Kazan, Russia; gtr_timur@mail.ru; +7 (950) 948-54-09 <https://orcid.org/0000-0003-3832-883X>

Vagin Konstantin Nikolaevich, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Ved. sci. FSBSI “FCTRBS-ARRVI”, Kazan, Russia; art. scientific. sotr. KFU, Kazan, Russia; kostya9938@yandex.ru; 8927433-33-55; <https://orcid.org/0000-0003-4396-614X>

Вклад авторов: Т.Р. Гайнутдинов — проведен литературный обзор по теме статьи, выполнена экспериментальная часть работы, обработан полученный материал, отредактирован текст, подготовлена рукопись; К.Н. Вагин — научное редактирование текста.

Authors contribution: TR. 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; K.N. Vagin — scientific text editing.