

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет»
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

На правах рукописи

Вагин Константин Николаевич



**РАЗРАБОТКА ПРОТИВОРАДИАЦИОННОГО ЗАЩИТНОГО ПРЕПАРАТА НА
ОСНОВЕ ВЕЩЕСТВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-
санитарная экспертиза

03.01.01 - радиобиология

Диссертация

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:

заслуженный деятель науки Чувашской Республики,

доктор биологических наук, профессор

В.Г. Семенов

заслуженный деятель науки Республики Татарстан,

доктор ветеринарных наук, профессор

Р.Н. Низамов

Чебоксары - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Роль аутофлоры в изменении реактивности организма под воздействием экологических агентов	14
1.2 Разработка и использование радиовакцин для профилактики болезней, индуцированных агентами бактериальной и вирусной природы	24
1.3 Использование веществ растительного, животного и микробного происхождения в качестве радиопротекторов	42
1.4 Микроорганизмы – продуценты биологически активных метаболитов и биосурфактантов	44
2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	
2.1 Материалы и методы исследований	52
2.2 Результаты исследований	
2.2.1. Подготовка и получение технологического сырья из веществ микробного происхождения (ВМП) для конструирования на их основе биологических радиопротекторов	77
2.2.2 Скрининг и отбор наиболее активных веществ микробного происхождения в <i>in vitro</i> тест–системе	84
2.2.3 Изучение возможности повышения радиозащитной активности отобранных веществ микробного происхождения	100
2.2.4 Конструирование радиозащитных препаратов на основе веществ микробного, минерального и зоогенного происхождения, обладающих бифункциональными свойствами	112
2.3 Изучение влияния радиозащитной композиции на организм интактных животных	125
2.3.1 Оценка безвредности и токсичности радиозащитной композиции на интактных животных	126
2.3.2 Влияние композиционного препарата на неспецифическую резистентность организма (НРО)	130
2.3.3 Влияние РЗК на систему иммуногемопоеза лабораторных животных	132
2.3.4 Изучение химического и биологического состава поликомпонентной радиозащитной композиции	138
2.3.5 Изучение возможности усиления синтеза антирадикальных ферментов использованными в работе тест-микробами	146

2.4	Изучение радиозащитных свойств РЗК на лабораторных животных	153
2.4.1	Оценка радиозащитных свойств комплексного препарата РЗК на белых мышах	153
2.4.2	Оценка радиозащитной эффективности композиционного препарата РЗК на белых крысах	158
2.4.3	Оценка радиозащитной активности композиционного препарата на кроликах	160
2.5	Изучение механизма формирования радиорезистентности у животных на фоне применения композиционного радиозащитного препарата РЗК	165
2.6	Изучение влияния композиционного препарата РЗК на летально облученных овец	177
2.6.1	Модификация острой лучевой болезни (ОЛБ) овец на фоне применения композиционного препарата РЗК	178
2.6.2	Изучение длительности формирования радиорезистентности овец после профилактического применения композиционного препарата РЗК	198
2.6.3	Изучение влияния РЗК на предубойное состояние, санитарно-гигиенические показатели мяса облученных животных.	207
3	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	219
4	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	222
5	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	224
6	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	226
7	СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА	259
	ПРИЛОЖЕНИЯ	265

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Неблагоприятная экологическая обстановка обуславливает резкое возрастание техногенной нагрузки на биосферу и определяет условия существования на планете. В ряде регионов России содержание радиоактивных и химических токсичных веществ в компонентах природной среды превышает безопасные пределы (Ильязов Р.Г. и др., 2006). Установлено, что облучение живого организма даже в сравнительно небольших дозах вызывает нарушение метаболизма, влияет на иммунную реактивность, синтез ДНК и др. (Белов А.Д., 1999; Киршин В.А., 2002). Результаты проведенных в последние годы исследований в радиобиологии показали, что вещества микробного происхождения обладают радиозащитным действием. Одним из ведущих механизмов противолучевого действия средств микробного происхождения признается усиление эндогенной продукции одного или нескольких цитокинов, (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), колониестимулирующего фактора (КСФ), туморнекротического фактора (ТНФ- α) и др. (Антипов В.В., 1973; Vallabhapurapu S., 2009; Bluml S., 2012; Ivashkiv L.B., 2013; Leblanc, J. 2019; Qiu, B. 2020). Цитокины, в свою очередь, оказывают регулирующее влияние на гомопозз, обеспечивают преодоление миелосупрессии, повышают выживаемость животных (Михайленко Е.В., 2000; Yarilina A., 2012; Smolen J.S., 2012).

Отечественными и зарубежными исследователями при изучении различных аспектов механизма противолучевого действия накоплен новый экспериментальный материал, свидетельствующий о способности веществ микробного происхождения (ВМП) повышать радиорезистентность млекопитающих к облучению (Мальцев В.Н. и др., 1978; Иванов А.А. и др., 1991; Андрущенко В.Н. и др., 1996; Агиров, А.Х. 2008; Bleddyn, J. 2020). Использование средств микробного происхождения в целях повышения радиорезистентности организма и эффективности лечения лучевой болезни актуально в связи с

проблемами радиоактивного загрязнения и опасности техногенных катастроф. Особенностью этих средств является широкий спектр действия в сочетании с отсутствием выраженной токсичности. Различные микробные антигены обладают способностью снижать смертность облученных животных и выраженность проявлений экспериментальной острой лучевой болезни за счет активизации фагоцитарной функции клеток системы мононуклеаров в крови и тканях, повышения устойчивости к экзогенным инфекциям, способности к образованию антител за счет увеличения числа антителопродуцирующих клеток (Мальцев, В.Н. 1994). В связи с этим поиск веществ микробного происхождения для повышения радиорезистентности животных является одним из важнейших направлений решения проблемы профилактики и терапии острой лучевой болезни.

Степень разработанности темы. Сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана технология изготовления радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения – микробного полиантигена (Мухаметшин И.Р., 2002; Равилов А.З., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В. и др., 2004; Рахматуллина Г.И., 2012). Хотя он и обеспечивает достаточно высокую радиорезистентность организма (65-70%-ную защиту летально облученных животных при использовании препарата за 30 сут до облучения), однако применение его с лечебной целью усугубляет течение острой лучевой болезни (ОЛБ), что связано с наличием в ее составе живых микробных клеток, а также высокотоксичного формалина, используемого в препарате в качестве детоксиканта для инактивации эндотоксина *E.coli*.

Вместе с тем из данных литературы известно, что микроорганизмы в процессе роста на жидких питательных средах экспрессируют уникальный набор биологически активных веществ (Ткаченко Е.И. и др., 2005).

Так, *E.coli* в процессе жизнедеятельности продуцирует антибактериальные субстанции, ферменты, антигены, энтеро- и экзотоксины (Зароза В.Г., 1991), цитокины (Пепоян А.З и др., 2001, 2015; Кигур, А. 2020), которые в отдельности и в сочетании друг с другом обладают радиозащитными свойствами (Диковенко

Е.А. и др 1971; Дуда В.И. и др., 1980; Мальцев В.Н. и др., 1994; Konijnenberg, M. 2020; Hughes, J. 2020). Следовательно, получение продуктов метаболизма *E. coli* и применение их в качестве радиозащитных средств, является перспективным направлением в области разработки современных биологических радиопротекторов.

В связи с этим разработка, создание и применение новых экономических и экологических приемов и методов получения продуктов метаболизма *E.coli* и использование их как для профилактики, так и для лечения радиационных поражений организма, являются одной из важнейших проблем промышленной биотехнологии и получения радиозащитных средств двойного назначения.

Цель и задачи исследований. Цель исследований - разработка радиозащитных препаратов на основе веществ микробного происхождения. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Отобрать потенциальные компоненты из веществ микробного происхождения для конструирования радиозащитного препарата.
2. Провести скрининг отобранных компонентов веществ микробного происхождения с использованием *in vitro* тест-системы.
3. Сконструировать радиозащитный препарат на основе отобранных веществ микробного происхождения.
4. Изучить возможность повышения радиозащитной активности препарата.
5. Изучить биологическое действие препарата на интактных животных (токсичность, безвредность, алергизирующие свойства).
6. Испытать радиозащитную активность препарата на лабораторных и сельскохозяйственных животных.
7. Изучить механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения препарата РЗК.

Научная новизна. Впервые научно обоснована и экспериментально подтверждена возможность получения и целесообразность использования радиозащитного препарата на основе продуктов метаболизма *E. coli*, *B. bifidum* и

B. subtilis экспрессируемых микроорганизмом в культуральную жидкость в процессе его жизнедеятельности.

С учетом биологического действия активных субстанций – микробных метаболитов штаммов - продуцентов сконструирован радиозащитный препарат нового поколения, обладающий бифункциональными свойствами, обеспечивая радиозащиту облученного организма как при профилактическом, так и лечебном применении в условиях радиационного стресса.

Установлено, что формирование радиорезистентности организма на фоне применения биорадиопротектора реализуется путем ингибирования синтеза радиотоксинов, радиосенсибилизаторов, активации синтеза иммуноглобулинов, цитокинов, коррекции системы иммуногемопоза и антиоксидантной системы, обеспечивающие повышение выживаемости летально облученных гамма-лучами животных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представление о ведущих механизмах противолучевого действия препаратов, содержащих продукты микробного синтеза (метаболизма), которые будут востребованы при создании более совершенных радиофармакологических средств, в полной мере отвечающих требованиям фармакотерапии и позволяющих продемонстрировать потенциальные последствия радиотоксинеми, радиосенсибилизации и радиоиндуцированного апоптоза стволовых клеток системы иммуногемопоза - основных детерминантов выживаемости организма при радиотоксинеми.

Практическая значимость работы определяется тем, что для специфической профилактики и лечения радиационных поражений предложен препарат на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов. Результаты исследований использованы при составлении нормативных документов: «Методические рекомендации по использованию ионизирующего излучения для инактивации возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 26

декабря 2019 г.; «Способ получения препарата для профилактики и лечения радиационных поражений организма животных и способ профилактики и лечения радиационных поражений организма животных» Патент на изобретение RU 2697828 C1, 21 августа 2019 г. заявка № 2019117190 от 03 июня 2019 г.; «Методические рекомендации по лечению и профилактике комбинированных поражений животных ионизирующим излучением, микотоксинами и химическими агентами», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 25 октября 2018 года; «Методические рекомендации по профилактике и лечению радиационных поражений», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 25 октября 2018 года; «Рекомендации по применению радиозащитного препарата на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов (ПМЕС)», утвержденные директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 10 июня 2010 г., лабораторный регламент «Лечебно-профилактический лиофилизированный радиозащитный препарат на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов», утвержден директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 9 ноября 2011 г. и лабораторный регламент «Трехкомпонентный радиозащитный препарат «ФЗМ» на основе метаболитов бактерий *Bifidobacterium bifidum*, фитопрепарата куркумы и биологической кормовой добавки «Вита-Форце М» утвержден директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 8 сентября 2020 г.

Методология и методы диссертационного исследования. Методологические подходы в решении задач диссертационного исследования основаны на литературном поиске, посвященном обоснованию актуальности, цели и задачам исследований, анализе данных отечественных и зарубежных публикаций по тематике исследования, разработке и изучению радиозащитного действия препарата на основе веществ микробного происхождения в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения основной цели диссертационной работы, теоретического обоснования возможности и целесообразности конструирования радиопротектора

использовали совокупность адекватных методологических приемов, доступные и сертифицированные методы исследований:

- скрининговые - предварительное определение биологической активности компонентов радиоконструктора (потенциального радиопротектора) в условиях *in vitro*;

- токсикологические - определение токсичности радиопротектора согласно «Руководству по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ (Руководство..., 2005);

- фармакологические - определение оптимальной лечебной дозы устанавливали экспериментальным путем;

- клинические - внешний осмотр животных, оценка состояния волосяного покрова, кожи и слизистых оболочек, определение живой массы по результатам массометрических исследований;

- морфо-биохимические - взятие крови от подопытных животных: у мышей, крыс и морских свинок методом декапитации; у кроликов - из ушной вены; Морфологические исследования крови проводили общепринятыми в радиационной гематологии методами. Активность антирадикальных ферментов (каталазы -КАТ; супероксиддисмутазы- СОД) определяли на биохимическом анализаторе «Microlab 200» и «Biochem-SA»;

- иммунологические - определяли концентрацию иммуноглобулинов, бласттрансформированных лимфоцитов (Т-хелперов и Т-супрессоров) согласно разработанной в отделе радиобиологии методике «Иммуноферментная тест-система для оценки влияния ионизирующей радиации на организм» - М.; ФГБНУ «Росцифарматех» 2006;

- радиобиологические — моделирование радиационного стресса осуществляли путем облучения животных гамма-лучами ^{60}Co на установке «Пума», а радиомодификацию метаболизма тест-микробов - на гамма-установке «Исследователь», течение и исход острой лучевой болезни на фоне применения сконструированного радиопротектора на основе веществ микробного

происхождения (ВМП);

- математические - обработка цифрового материала, изученного в ходе экспериментов, проведенных на персональном компьютере. Результаты и достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента и описывали с помощью программы «Microsoft Excel 2016», входящих в пакет программ «Microsoft Office 2016». Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке на компьютерной программе «Statistika 6».

Основные положения, выносимые на защиту:

- технология получения радиозащитного препарата на основе продуктов метаболизма *E. coli*, *B. bifidum* и *B. subtilis*;
- зависимость радиозащитной активности композиционного препарата от концентрации антирадикального фермента пероксидазы в продуктах микробного метаболизма;
- возможность усиления радиозащитной активности препарата путем добавления продуктов метаболизма *E. coli*, *B. bifidum* и *B. subtilis*;
- результаты испытания радиозащитной активности препарата на летально облученных лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Степень достоверности результатов. Высокая степень достоверности результатов обеспечена использованием стандартных биологических, радиобиологических, микробиологических, молекулярно-генетических, клиничко-лабораторных методов исследований, методов статистической и математической обработки данных. Все исследования выполнены на современном оборудовании отдела радиобиологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Специальности, которым соответствует диссертация. Представляющаяся диссертационная работа соответствует паспорту специальности 06.02.05 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза. Работа посвящена разработке средств профилактики и лечения радиоиндуцированной экпатологии с использованием радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения – РЗК. Разработанный препарат

оказывает радиопротекторное действие путем ингибирования синтеза радиоиндуцированных иммуотоксических агентов – радиотоксинов, блокировании их доступа к клеткам – мишеням (лимфоцитам и лейкоцитам–детерминантам выживаемости при радиопатологии, усиление синтеза медиаторов иммуногемопоза – цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α), сохранение активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ), обеспечивающих повышение выживаемости летально пораженных животных. Результаты научного исследования соответствуют следующим пунктам паспорта специальности: п. 2 «Организация и проведение исследования по влиянию природных и антропогенных загрязнителей на состояние здоровья животных, качество и безопасность продуктов питания животного происхождения»; п. 10 «Изучение эмбриотоксического, гонадотоксического, тератогенного и мутагенного действия биоцидов»; п. 12 «Разработка средств и способов дезактивации объектов ветеринарного надзора, контаминированных радионуклидами»; п. 17 «Разработка системы ведения животноводства в регионах с повышенным уровнем загрязнения опасными контаминантами окружающей среды и объектов ветеринарного надзора».

По специальности 03.01.01 Радиобиология, результаты научного исследования соответствуют следующим пунктам паспорта специальности: п. 3 «Молекулярно-клеточные и биохимические механизмы лучевого поражения»; п. 9 «Последствия ядерных катастроф. Синдром Чернобыля. Радиоэкология»; п. 10 «Принципы и методы радиационного мониторинга. Проблемы радиационной безопасности. Химическая защита от облучений и радиосенсибилизация»; п. 11 «Отдаленные последствия действия излучений. Хроническое действие радиации. Основы радиационной генетики, радиационной иммунологии. Особенности биологического действия малых доз облучения».

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены, доложены, обсуждены и опубликованы на следующих конференциях и съездах: научно-практической конференции ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань, 2001-2011),

2 съезде ветеринарных фармакологов и токсикологов (Казань, 2009), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» (Москва, 2011), на 3 съезде ветеринарных фармакологов и токсикологов России (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (Екатеринбург, 2017); Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы военной теории и практики, результаты исследований по важнейшим проблемам военной науки в области радиационной, химической и биологической безопасности» (Кострома, 2017); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина (Казань, 2018); Международной молодежной конференции «Современные проблемы радиобиологии, радиозэкологии и агроэкологии» (г. Обнинск 2019 г.).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по итогам НИР за 2016-2019 гг., а также на заседаниях кафедры морфологии, акушерства и терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет».

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 45 научных работ, в том числе 16 - в научных журналах из перечня ВАК, 4 - в журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus) и 5 патентах Российской Федерации на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 286 страницах компьютерного текста и включает общую характеристику работы, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, заключение, приложение.

Личный вклад автора заключается в формировании и разработке основных положений диссертации, постановке цели и задач исследований,

методологическом обосновании путей решения поставленных задач, иллюстрировании экспериментов и непосредственном выполнении исследований, анализе и обосновании полученных результатов, проводимых лично автором, и их оформлении в виде литературных публикаций и нормативной документации.

Полученные результаты расширяют представление о ведущих механизмах противолучевого действия препаратов, содержащих продукты микробного синтеза, которые будут востребованы при создании более совершенных радиофармакологических средств, в полной мере отвечающих требованиям фармакотерапии и позволяющих продемонстрировать потенциальные последствия радиотоксичности, радиосенсибилизации и радиоиндуцированного апоптоза стволовых клеток системы иммуногемопозиса - основных детерминантов выживаемости организма при летальном облучении. Практическая значимость работы определяется тем, что полученный по вышеуказанному способу радиозащитный препарат, позволяет использовать его как профилактическое, так и лечебное средство на облученных в летальных дозах лабораторных и сельскохозяйственных животных. Сценарий применения данного средства актуален для военных, спецподразделений, спасателей, сотрудников атомных объектов на случай необходимости устранения аварийных ситуаций, для оказания экстренной помощи пострадавшим животным в результате этих аварий.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль аутофлоры в изменении реактивности организма под воздействием экологических агентов

Важную роль в защите организма от патогенных бактерий играет нормальная микрофлора. Целенаправленное изучение этого вопроса началось во второй половине XIX века, когда исследовалась бактерицидная роль слюны, изучались роль эпителиальных клеток, значение pH, разрушение бактериальных токсинов ферментами. Признанным основоположником этого учения был И.И.Мечников и его последователи. Обычно, когда говорят о взаимоотношениях макро- и микроорганизмов, в первую очередь подразумевают микробов, способных при внедрении в организм вызвать инфекционное заболевание.

Успехи отечественного здравоохранения привели к исчезновению многих заразных заболеваний и к значительному снижению ряда инфекций, еще встречающихся в отдельных местностях. Однако, не следует забывать о том, что есть микробы, от которых организм животных и человека избавиться не в состоянии, с которыми он всегда находится в контакте в результате симбиоза, выработавшегося в процессе эволюции. Это микробы, вегетирующие на нашей коже, слизистой оболочке глаз, дыхательных путях, кишечнике и мочеполовом тракте. Их называют микробами аутофлоры организма (Парахонский А.П., 2006; Великов, В.А. 2012). Микроэкологическая характеристика их, естественно, различна, как и различны уровни этих систем: верхние (отделы дыхательных путей) и нижние (желудок, тонкий и толстый кишечник и т.д.). Влияние на такое перераспределение оказывают многие факторы: степень аэрации, воздействие pH среды, различных физико-химических условий, социально-гигиенические факторы, состояние неспецифической резистентности организма, в частности, механизмы защиты кожи и слизистых, а также иммунитета в целом (Калмыкова

А.И., 2001; Чубенко Г.И., 2005). Здоровый организм не ощущает присутствия нормальной микрофлоры, и в определенном отношении эти микробы даже полезны для своего хозяина. Но так обстоит дело только до тех пор, пока он здоров. Самые незначительные воздействия, понижающие жизнедеятельность и приносящие вред человеку или животному, нарушают это равновесие, создавая благоприятные условия для активации микробной аутофлоры. Увеличивается ее количество, появляются более активные в патогенном влиянии на человека и животное формы. Именно эти, казалось бы, безвредные микробы - наши постоянные сожители - являются возбудителями болезней зубов, воспаления легких, аппендицита, ангины, отита, воспаления кишечного тракта и мочевых путей, нагноительных процессов на коже и слизистых оболочках (Зароза В.Г., 1991; Ткаченко Е.И. и др., 2005) - болезни, обусловленными эндогенной инфекцией. Микрофлору макроорганизма подразделяют на две основные группы: 1) микрофлора (микробиоценоз), характерная для данного вида (эндогенная, аутохтонная, облигатная, резидентная) и 2) микрофлора случайная (временная, транзиторная, факультативная, экзогенная) (Ленцнер А.А., 1987).

Если в борьбе с экзогенной инфекцией, вызванной заражением патогенными микробами, в последние десятилетия достигнуты большие успехи (применение вакцин, сывороток, антибиотиков и химиотерапевтических препаратов), то для ликвидации заболеваний, обусловленных эндогенной инфекцией, средств значительно меньше и эффективность их гораздо ниже (Димов С.К., 1993; Игнатов П.Е., 1994; Димова А.С., 2003; Dudzinski, S. 2019; Mendez, R. 2020).

Объясняется это тем, что возбудители инфекционных заболеваний являются отдельными видами с хорошо выраженными антигенными особенностями, что позволяет проводить профилактическую иммунизацию против этих заболеваний и лечить их специфическими сыворотками.

Возбудителей же эндогенной инфекции очень много видов, образующих различные ассоциации. Провести профилактическую иммунизацию против них

невозможно. Она затруднена не только разнообразием отдельных видов микробов, но и их изменчивостью и своеобразием ассоциаций у различных организмов (Петровская В.Г., 1990; Хмелевская Г.В., 1990; Kemp A. et al., 1990; McClatchy, D. et al., 2020). Кроме того, следует учесть, что активная иммунизация действенна только против микробов, внедряющихся во внутреннюю среду организма, и бессильна против микробов, вегетирующих, подобно аутофлоре, на поверхности слизистых оболочек. Доказательством этого является безуспешность борьбы с бациллоносительством патогенных микробов (брюшной тиф, дифтерия, дизентерия и т.п.) путем вакцинации.

Также неэффективными являются и попытки применения серотерапии для лечения болезней, вызванных микробами аутофлоры. Эти возбудители не образуют экзотоксинов, против которых медицина располагает активными антитоксическими сыворотками (Таршис М.Г., 1997; Калмыков В.В., 2000; Denisov A.A., 2010). Антибактериальный эффект серотерапии невелик даже в борьбе с заразными болезнями, вызываемыми каким-либо одним видом микробов. Такие сыворотки, как известно, почти не нашли практического применения. Остается одно средство воздействия на инфекции, вызванные аутофлорой - это химиотерапевтические препараты, антибиотики наряду с проведением необходимого хирургического, физиотерапевтического и общеукрепляющего лечения (Степин В.С., 1986; Касылов Т.К., 2002).

Требуют дальнейшего изучения закономерности, определяющие активацию аутофлоры и развитие патологических процессов, обусловленных ею, с целью разработки эффективных профилактических и лечебных мероприятий.

Особое значение имеет исследование состояния аутофлоры и динамики ее изменения под действием ионизирующей радиации. Иммунодепрессивное действие радиации общеизвестно (Грибова И.А., 1963; Антипкин Ю.Г., 2001; Орадовская И.В., 2001; Florian, P. 2020). Наблюдение за экспериментальными животными в ходе развития острой лучевой болезни убедительно продемонстрировало увеличение уровня микрофлоры кожи, а также изменение

качественного состава микробов – появление гемолитических и коагулазопозитивных форм микроорганизмов в разгаре острой лучевой болезни (Клемперская Н.Н., Алексеева О.Г., 1989; Клемперская Н.Н., 1959; Hosoki, A. 2020).

Аутофлора является первым врагом облученного организма. Если бы организм животных и человека не имел собственной микробной флоры, течение лучевых поражений носило бы совсем иной характер. В этом убеждают эксперименты, выполненные на стерильно выращенных безмикробных животных (Бебешко В.Г., 2001; Чумак А.А., 2001, 2002; Верещагина А.О., 2005).

Каждому облученному организму угрожает обсеменение внутренних органов микробами его же аутофлоры, т.е. развитие эндогенной инфекции. Интенсивность ее весьма велика: в посевах-отпечатках из органов нелеченых животных, убитых в разгар лучевой болезни, как правило, наблюдается сплошной рост бактериальной флоры без наличия каких бы то ни было реакций со стороны ткани. Облученный организм, имеющий повышенную чувствительность к микробным ядам, буквально наводняется миллиардами бактерий и отравляется их эндотоксинами и продуктами жизнедеятельности (Чуешов В.И., 2002; Симонян А.В., 2002; Тихонов И.В., 2005).

Одной из главных особенностей аутофлоры организма животных является относительная стабильность характерного для каждой области тела микробного пейзажа. Усложнение в процессе эволюции строения живых организмов привело к созданию определенных, различных для каждого органа, условий его нормальной деятельности в соответствии с функцией и структурой. К этим условиям постепенно адаптировались и микробы аутофлоры, которые питались экскретами желез данного органа и остатками пищевых масс.

Симбиоз микробов с макроорганизмом приносит определенную пользу. В этом убеждают нас данные опытов на выращенных в стерильных условиях безмикробных животных (Госманов Р.Г., 2017). Оказалось, что такие стерильные животные имеют низкие титры нормальных антител, малое количество

глобулинов в сыворотке крови, легко заболевают при контакте с патогенными микробами и на этих молодых безмикробных животных не проявляется стимулирующее рост животных влияние антибиотиков.

Таким образом, было показано, что микробы нормальной аутофлоры как бы стимулируют формирование неспецифической резистентности организма, увеличивают способность к активной иммунизации, усиливают развитие лимфоидной ткани. При ослаблении резистентности аутофлора всегда является потенциальным источником эндогенной инфекции, которая представляет серьезную опасность для организма. Бактерии аутофлоры должны были выработать определенную степень резистентности к весьма разнообразным защитным факторам различных областей тела. Этот длительный процесс приспособления к существованию в живом организме «хозяина» привел к известной специализации микробов аутофлоры и к созданию своеобразного, специфического для каждой области тела, микробного населения.

Перенос микробов аутофлоры из одной области тела в другую, к жизни в которой они не адаптированы, ведет к быстрому отмиранию неприспособленных видов. Примером может служить быстрое отмирание кишечных бактерий при нанесении их на кожные покровы, где длительно сохраняют жизнеспособность кокковые формы, дифтероиды и некоторые грибки.

Хорошо известно, что любые изменения в состоянии реактивности организма часто приводят к изменению микробного пейзажа. Например, общеизвестно, что характер диеты определяет состав микрофлоры кишечника. Обзор ряда работ по вопросу влияния характера диеты на состав кишечной флоры приводит в своей монографии Перетц Л.Г. (1955). Показано, что полноценная диета обеспечивает нормальный состав кишечной флоры. Установлена тесная связь между особенностями питания и характером кишечной флоры (Чичерин И.Ю., 2013). Признанием важнейшей роли желудочно-кишечного тракта является создание Международного общества микробной экологии и заболеваний (Старовойтова С.А., 2012; Сафронова Л.А., 2012). Следует подчеркнуть, что

кишечная микрoэкологическая система является частью гомеостатической системы организма. Сложность функционирования желудочно-кишечного тракта в режиме общей гомеостатической системы объясняется во многом тем, что сюда включены не только клетки хозяина, секреты различных желез, антитела, рецепторы, клеточные механизмы иммунитета, но и пища, продукты ее переваривания, различные микроорганизмы (бактерии, грибы, вирусы), продукты их распада (эндо- и экзотоксины и др.) (Хавкин А.И., 2003; Александров В.А., 2006; Pedrosa-Rivera, M. 2020; Petragnano, F.2020). Признано, что экологическая система желудочно-кишечного тракта является одной из систем защиты организма, а при ее нарушении в количественно-качественном отношении она становится источником (резервуаром) возбудителей инфекционных процессов, инфекционных болезней, в т.ч. и с эпидемическим характером распространения.

Нормальная кишечная микрофлора располагает многими механизмами, обеспечивающими подавление патогенной микрофлоры (стимуляция перистальтики, конкуренция за места адгезии к эпителию кишечника, выработка антибиотикоподобных веществ, индукция иммунологических механизмов защиты и др.). Однако, несмотря на значительную стабильность нормального микробиоценоза пищеварительной системы, ее адаптационные возможности достаточно ограничены и границы так называемой нормы и патологии могут быть недостаточно четкими. Хорошо известно дестабилизирующее дисбиотическое влияние на кишечную микрофлору антибактериальных веществ (антибиотиков), особенно при нерациональном их применении. Вслед за подавлением отдельных видов нормальной микрофлоры они нарушают печеночно-кишечную циркуляцию лекарств: эстрогенов, фолиевой кислоты и других витаминов, желчных кислот, оказывают модулирующее воздействие на защитные механизмы макроорганизма, в т.ч. и депрессивное на иммунитет. Достаточно полный обзор по этой проблеме изложен в монографии Кашкина К.П. и Караева З.О. (1984). Авторы подчеркивают, что с увеличением концентрации и продолжительности использования антибиотиков затрагивается все большее число метаболитических

процессов как в микробной, так и в животной клетке, что может привести к цепной реакции нарушения обмена веществ в последней. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о серьезном влиянии антибиотиков на функцию и структуру многих отделов желудочно-кишечного тракта, особенно при пероральном применении: изменение проницаемости слизистой, подавление барьерных функций лимфатических узлов, нарушение эндокринного обмена, раздражающее действие на слизистые оболочки, аллергизирующее действие и т.д. Известна также проблема лекарственной устойчивости возбудителей к антибиотикам и активизация при этом условно-патогенной флоры. Описаны случаи усиления действия некоторых токсинов под влиянием антибиотиков.

Для микробов аутофлоры организм человека или животных является внешней средой, определяющей условия их существования. В быстро возникающих изменениях в составе аутофлоры при колебаниях физиологического состояния макроорганизма проявляется неоспоримость тезиса мичуринской биологии о тесной связи организма и среды.

Воздействие неблагоприятных метеорологических факторов на организм может приводить не только к увеличению числа бактерий на слизистых оболочках, но и способствовать внедрению бактерий - комменсалов во внутренние органы, т.е. вызывать явления аутоинфекции. Экспериментально это показано в работе Троп И.Е. (1954). Так, например, перегревание крыс, мышей, морских свинок и котят способствовало внедрению бактерий кишечной группы и кокков в печень и селезенку (у перегретых животных было 20 положительных анализов из 22, а у контрольных - только 6 из 23). Переохлаждение мышей привело к обсеменению легких, почек и печени кишечными и паракишечными бактериями (Саноцкий И.В., 1970; Patel, Rutulkumar et al, 2020). Большая проницаемость кишечника мышей, подвергнутых температурным влияниям, выразилась и в более частом проникновении перорально введенной культуры чудесной палочки во внутренние органы (в 100 % у перегретых или

охлажденных и в 36% - у контрольных). Отмечены и качественные отличия по характеру флоры органов подопытных животных - у них больше гемолитических форм, кишечных палочек и образующих гиалуронидазу видов. Автор не только изучал внедрение бактерий аутофлоры во внутреннюю среду организма, но и отметил изменение состава кишечной флоры и связь этих изменений с сезонными факторами. Таким образом, имеются и теоретические предпосылки, и фактические данные о возможности использования учета характера аутофлоры как индикатора изменения общей реактивности организма (Сергиев В.П., 2000; Бондаренко В.М., 2011).

Большим количеством радиобиологических исследований показано, что ионизирующая радиация вызывает разрушение многих клеточных структур и изменяет деятельность почти всех физиологических систем организма. В результате этого нарушаются взаимоотношения между организмом и населяющей его микрофлорой, что приводит к развитию инфекционных процессов, обусловленных внедрением и размножением микробов аутофлоры, т. е. явлению эндогенной инфекции.

Сведения о том, что в облученном организме изменяется состав аутофлоры и что бактерии начинают проникать во внутренние органы появились еще в 30-х годах XX века. За прошедшие годы отечественными и зарубежными учеными опубликовано много работ по изучению явления развития эндогенной инфекции при лучевой болезни. Работы эти вызывались настоятельной необходимостью разработки мер борьбы с грозными осложнениями лучевых поражений.

Для изыскания способов предотвращения развития аутоинфекции при лучевой болезни необходимо было иметь сведения о сроках ее появления и видовом составе вызывающей ее микрофлоры. Эти данные позволили бы выбрать момент для применения средств антимикробной терапии, а учет микробного пейзажа определил бы выбор тех или иных лекарственных веществ.

Радиоактивные вещества, попадая в организм, концентрируются в определенных органах и системах. У животных, облученных рентгеновыми

лучами или гамма-лучами Co^{60} , ряд авторов описал развитие эндогенной инфекции, обусловленной распространением по организму микрофлоры, обитающей в кишечном тракте (Троицкий В.Л., 1958; Belyaev I., 2014; Blakely E. A. 2020). Показано, что если гибель животных при воздействии больших доз радиации наступает в первые 3-4 дня, то эндогенная инфекция не успевает развиться и микробов аутофлоры не находят в крови и внутренних органах. Проникновение бактерий из кишечного тракта во внутреннюю среду организма развивается при лучевой болезни постепенно, начиная с конца первой недели после облучения, и связано с развитием нарушений функции барьерных органов и общей иммунологической реактивности (Яблокова А.В., 2000; Александров Ю.А., 2007; Овсянников В.Г., 2014; Abdus, S. 2020).

Много внимания уделялось изучению особенностей течения экспериментально вызванной инфекции у облученных животных (Ярмоненко С.П., 2004). Показано, что заражение животных после облучения как патогенными, так и условно патогенными микробами вызывает более тяжелый инфекционный процесс, чем у необлученных организмов, чаще заканчивающийся летальным исходом и сопровождающийся накоплением огромных масс микробов в тканях.

Отмечено и наличие качественных особенностей у микробов, обитающих в тканях облученного организма и на его покровах, наличие у них более выраженной биохимической активности, более высокой вирулентности и меньшей антагонистической активности (Клемперская Н.Н., 1959). Таким образом, облученный и зараженный организм представляет гораздо большую опасность в эпидемиологическом отношении, чем необлученный (Клемперская Н.Н., 1958; Покровский В.И. 2009; Амиреев С.В. 2014).

Известно, что развитие эндогенной инфекции наблюдается не только при лучевых поражениях, но и при других разнообразных повреждающих воздействиях, нарушающих состояние антимикробной резистентности организма: после перегрева и охлаждения, после изменения диеты, при воздействии

электрического тока и вегетативных ядов (Литвицкий П.Ф., 1995; Зайко Н.Н., 1996; Сергеев О.С., 2004; Овсянников В.Г., 2014).

Таким образом, наличие микробов аутофлоры представляет для животных источник развития аутоинфекции в случае ослабления функции защитных факторов, обеспечивающих естественную устойчивость организма к инфекции.

Подробный анализ литературных данных о экзогенной и эндогенной инфекциях при облучении, наряду с обсуждением материалов собственных исследований, представлен в монографиях Клемпарской Н.Н., Алексеевой О.Г., Петрова Р.В. и Сосовой В.Ф. (1958), Троицкого В.Л. и Туманян М.А. (1958), в Многотомном руководстве по микробиологии (Клемпарская Н.Н., 1982), в работах Куценко, С.А. (2004), Гребенюка, А. Н. (2012), Машковского М. Д. (2012), Джойнера, М.С. (2015) и других ученых.

1.2 Использование радиовакцин для профилактики болезней, индуцированных агентами бактериальной и вирусной природы

История получения радиовакцин связана с первой работой в области радиомикробиологии Minch F. (1896), в которой на бактериальной модели (возбудителе брюшного тифа) автор установил, что рентгеновы лучи, в зависимости от дозы воздействия на микроорганизмы, могут оказывать «ослабляющий» или летальный эффекты. Так была установлена возможность получения как ослабленных (живых), так и убитых (радиоинактивированных) вариантов возбудителей инфекционных болезней. Последующие исследования, проведенные на бактериофагах (Greco M., 2001; Coordell A.R., 2002; Rappuoli R., 2002; Holst J., 2003; Martineau, B., 2004; Sheridan C., 2005; Ribot W.J., 2006), растительных (Belshe R., 2004; Tacket C.O., 2005; Langermans J.A., 2005; Buonagurio D.A., 2006;) и животных вирусах (Ильичева Т.Н., 2012; Halperin S.A., 2002; Rottinghaus S.T., 2003; Nicolson C., 2005; Neumann G., 2005; Zacks M.A., 2010), а также на различных видах бактерий (Супотницкий М.В., 2013; McConkey S.J., 2003; McShane H., 2004; Hoare, M., 2005; Ulmer J.B., 2006; Harper D.M., 2006), показали, что не только рентгеновы, но и α -, β - и γ -лучи, а также нейтроны и ультрафиолетовые лучи способны вызывать лучевую инактивацию, оказывая фаголитическую, вирулицидную, бактерицидную и спороцидную активность. При этом, независимо от вида и формы бактерий (фаги, вирусы, вегетативные и споровые формы бактерий), гибель микроорганизмов под воздействием летальных доз ионизирующей радиации происходит без существенных структурных изменений бактериальной клетки и вирионов, повреждая, в основном, генетическую субстанцию (летальные хромосомные aberrации ДНК с последующей ее деградацией).

Установленные выше цитированными исследователями антимикробные

эффекты ионизирующего излучения позволили постулировать важнейшие для радиомикробиологии и радиовирусологии положения, которые составляют основу современной радиационной генетики микроорганизмов и млекопитающих и, в частности, при получении и конструировании радиовакцин и радиоантигенов (Сафин, М.А. 2001; Цыбульский, А.П. 2001; Porras, I. 2020). Первое сообщение о получении радиовирусвакцины появилось в печати в 1938 году (Parker R.F., 1938; Манухов, И.В. 2014), в котором автор изучал инфекционность противооспенной вирус-вакцины после воздействия на вирионы рентгеновыми лучами в летальных дозах. Повторение этих опытов на других видах животных показало полную воспроизводимость полученных автором данных по лучевой инаktivации отобранной модели и приложимость этих параметров инаktivации для других вирусвакцин. При этом было установлено, что лучевое воздействие на вирусвакцины не сопровождалось структурными изменениями вирионов с одновременным сохранением антигенной структуры вирионов и иммуногенности этих вакцин.

Так, в результате радиовирусологических и радиомикробиологических исследований, проведенных Lea D.E. и его соратниками в 1940-1942 годы, были заложены теоретические основы получения радиоинаktivированных вирус- и бактериальных вакцин, получены экспериментальные серии первых радиовакцин. В дальнейшем эти исследования успешно были продолжены отечественными микробиологами, работающими в области радиобиологии, т.е. радиомикробиологами (Троицкий В.Л. и др., 1958; Туманян М.А. и др., 1974 и др.). При этом велика заслуга сотрудников Института экспериментальной микробиологии им. Н.Ф.Гамалея, которые, начиная с 1957 года и на протяжении последующих лет, вплотную занимались получением радиовакцин и радиоантигенов и оценкой токсичности, безвредности и иммуногенности этих препаратов (Драновская Е.А. и др., 1972; Павлов Е.П., 1978, 1992; Бижокас, В.А., 2001; Ушакова, И.Б. 2004; Сосюкин, А. Е. 2008).

Результаты опытов, проведенных Кашкиным К.П. (1984) и Туманян М.А. (1974) показали, что для приготовления радиовакцины прежде всего необходимо определить чувствительность микроорганизмов к ионизирующему излучению. У различных видов бактерий радиочувствительность варьирует в значительных пределах. Различна радиочувствительность и у разных штаммов одного и того же вида бактерий и даже у различных клеток одной и той же популяции бактерий (Вальдштейн Э.А., 1962; Туманян М.А., 1974; Жестяников В.Д., 1977; J. Shi et al, 2020; Palmer, Joshua D. et al, 2020; Minnix, M. et al, 2020; Seibold, P. et al, 2020).

На радиочувствительность микроорганизмов могут влиять многие факторы: в каком состоянии облучаются бактерии - в виде высушенной бактериальной массы или в виде суспензии бактериальных клеток, их концентрация, состав и свойства среды, в которой суспендированы бактерии; наличие радиопротекторов; температура; присутствие кислорода; фаза роста культуры микроорганизмов; мощность дозы, при которой проводится облучение и др. (Жестяников В.Д., 1977; Туманян М.А. и др., 1989). Популяция клеток или бактериальная культура, из которой готовят вакцину, состоит обычно из клеток с различной радиочувствительностью, предетерминированной генетически. Поэтому в ней могут присутствовать клетки с особо высокой резистентностью к ионизирующему излучению. Для того чтобы инактивировать эти клетки, которых может быть единицы, потребуются значительно более высокие дозы, чем те, при которых погибает основная масса клеток (Туманян М.А., 1991; Mathieu, S. et al, 2020).

Концентрация бактерий играет существенную роль при определении радиочувствительности популяции клеток. Было установлено, что 10 клеток в 1 мл является оптимальной концентрацией, при которой действие ионизирующего излучения наиболее эффективно. Для получения бактерицидного эффекта имеет значение среда, в которой облучают бактерии. Большей частью для приготовления вакцины используется либо взвесь в физиологическом растворе, либо в бульоне. В первом случае доза радиации, убивающая 100 % бактерий стандартной взвеси, содержащей 10^9 клеток в 1 мл, приближается к 100 Гр, а во

втором - к 5,0 кГр (Першин З.Г. и др., 1962; Zhong, Y. 2020).

Поскольку иммуногенность брюшнотифозной вакцины связана с наличием О-, Н-, и Ви-антигенов, радиовакцины необходимо готовить из штаммов, содержащих все три антигена. В настоящее время установлено, что облучение рентгеновыми и гамма-лучами в дозе до 3 Мрад не разрушает О- и Ви-антигены и мало влияет на Н-антигены (Агеева В.А., 1991; Бурлакова Е.Б., 2001; Гусаров И.И., 2001; Бондарчук И.А., 2002; Бычковская И.Б., 2002; Гончарова Р.И., 2002). Поэтому для приготовления брюшнотифозной корпускулярной радиовакцины наиболее подходящим является штамм *S.typhi* 2. Используют 18-часовую культуру бактерий. Облучают стандартную взвесь бактерий в физиологическом растворе - 10^9 бактериальных клеток в 1 мл, в дозе 1-1,5 Мрад (Мазурик В.К., 2002; Пелевина И.И., 2003). Эта доза гарантирует надежную инактивацию стандартной взвеси брюшнотифозных бактерий и стерильность вакцины. Для приготовления химической радиовакцины из облученных бактерий известными методами (по Вестфалю, воднофеноловым методом по Буавену и др.) извлекают различные антигены и конструируют вакцину, которая содержала бы антигены, ответственные за образование в организме полноценного иммунитета. Химическая вакцина против брюшного тифа, как и корпускулярная, должна содержать О-, Н- и Ви-антигены (Степанова Л.К. и др., 1977). Для получения этих антигенов можно пользоваться разными штаммами брюшнотифозных бактерий, выбирая такие, в которых тот или другой антиген содержится в наибольшем количестве. Так, для получения О-антигена целесообразно использовать штамм *S. typhi* 0-901; для получения Ви-антигена следует брать *S.typhi* 2. После облучения бактерий и приготовления радиовакцины производится обязательный контроль как корпускулярной, так и химической вакцин на стерильность и токсичность, определяются антигенные свойства препарата и его иммуногенность.

Токсичность вакцины, ее антигенные и иммуногенные свойства проверяют на животных. Обычно проводят сравнение с эталонным препаратом. Например, для брюшнотифозной вакцины таким эталонным препаратом служит гретая

вакцина. Исследования, проведенные на экспериментальных животных, и при разных путях введения вакцин, показали, что радиовакцины, как корпускулярная, так и химическая, менее токсичны, чем гретая брюшнотифозная вакцина. При приготовлении химической вакцины из бактерий брюшного тифа, убитых облучением, были получены данные о значительном снижении токсичности антигенов, извлекаемых из бактериальной клетки, облученной в дозе выше 2 Мрад (Туманян М.А., 1974). Токсичность антигенов (Ви-, по Буавену и липополисахаридов) снижалась с увеличением дозы облучения бактерий, из которых эти антигены извлекались.

При облучении бактерий в дозах 2,5 и 5 Мрад токсичность извлеченных из этих бактерий антигенов снижалась при любом пути введения (iv, ip, sc) различным видам животных в 2-5 раз для Ви-радиоантигенов, для липополисахаридов - в 2-4 раза, для антигенов по Буавену - в 3-10 раз (Дуплищева А.П., Синилова Н.Г., 1972; Мещерякова И.С., 1972; Иванов К.К. и др., 1972, Лысак В.В., 2015). Пока еще трудно объяснить, чем обусловлено наблюдаемое снижение токсичности антигенов под влиянием бактерий, из которых их извлекают. Можно думать, что это снижение токсичности обусловлено уменьшением липидного компонента в антигенах, извлеченных из облученных бактерий. Имеются данные, подтверждающие существенную роль липидного компонента эндотоксина в проявлении им токсических свойств (Синилова Н.Г. и др., 1977). Описанное снижение токсичности антигенов, извлекаемых из облученных бактерий, может иметь большое значение для приготовления малотоксичных химических вакцин.

При облучении брюшнотифозных бактерий в дозах 1,5-2 Мрад и применении на их основе вакцин в организме не снижается способность к образованию антител. Титры антител в сыворотке крови иммунизированных радиовакцинами животных не отличаются от титров антител в сыворотке крови животных, иммунизированных гретой вакциной. И корпускулярные, и химические радиовакцины, приготовленные из бактерий, убитых облучением в

дозах 1,5-2,0 Мрад, обладают высокой иммуногенностью и не уступают по этим свойствам эталонной вакцине (Николаева Л.А., Синилова Г.Н., 1972; Kusliy A.G, 2002).

Большинство используемых для профилактики инфекционных заболеваний вакцин вводят в организм парентерально. Как всякий препарат, особенно вводимый в организм парентерально, вакцина должна быть стерильной. Термостерилизация в данном случае не может быть использована, т.к. нагревание до температур, стерилизующих препараты, разрушает антигены и полностью лишает вакцину иммуногенных свойств. Для получения стерильных вакцин их готовят в специальных условиях с соблюдением правил асептики, подвергают фильтрации через бактериальные фильтры и ампулируют в специальных боксах. Все это удорожает препарат и снижает его качества. Облучение позволяет производить стерилизацию вакцины уже в готовом и расфасованном виде, что исключает возможность обсеменения продукта вовремя ампулирования и фасовки. Радиационная стерилизация вакцин так же, как и стерилизация другой медицинской продукции, требует облучения в дозах, которые убивали бы высокорезистентные споры и виды бактерий. При радиационной стерилизации корпускулярные и химические вакцины можно облучать в дозах выше 2,5 Мрад. Облучение в дозах до 10 Мрад не снижает иммуногенных свойств вакцины против брюшного тифа, делая ее малотоксичной по сравнению с вакцинами, не подвергавшимися облучению (Туманян М.А., 1974).

В связи с тем, что готовые вакцины можно облучать большими дозами, нет необходимости определять инициальную контаминированность их для выбора эффективной стерилизующей дозы радиации. Кроме того, технология приготовления вакцин, как химических, так и корпускулярных, исключает возможность большого обсеменения препаратов из внешней среды. Поэтому одно из основных условий гарантии стерильности - выбор эффективной стерилизующей дозы - может быть выполнено без определения степени инициальной контаминации препарата.

Таким образом, облучение вакцин против кишечных инфекций с целью стерилизации уже готовых и расфасованных препаратов не ухудшает их качества и может быть использовано как метод снижения их токсичности. Хотя стерилизация питательных сред, на которых выращиваются микроорганизмы, скорее относится к изучению влияния ионизирующего излучения на пищевые продукты и на белковые растворы, разработкой этого вопроса следует заниматься одновременно с исследованиями по использованию радиации для приготовления вакцин.

С учетом важности роли и значения питательных сред при изготовлении вакцинных препаратов, в частности, радиовакцин, рядом авторов были проведены детальные исследования по изучению влияния ионизирующего излучения на питательные среды, используемые для изготовления радиоантигенов и радиовакцин. Так, Дуплищева А.П. и др. (1972), Иванов К.К. и др. (1972), Туманян М.А. (1977), Синилова Н.Г. и др. (1977) установили, что гамма-облучение водных растворов соматических О-антигенов брюшнотифозных бактерий может быть использовано в пределах 0,1-3 Мрад включительно. По мере увеличения дозы облучения (от 10 до 50 Мрад) происходит значительное разрушение первичной и вторичной структуры антигена, выявившееся как химическим, так и биологическими тестами. Для стерилизации водных растворов авторы рекомендуют дозу облучения, не превышающую 3 Мрад.

Доза радиации в 1,5 Мрад повышает питательные свойства бульона Хоттингера, а антигенные и иммуногенные свойства корпускулярных вакцин и антигенов не изменяются. Туманян М.А. и др. (1971) отмечают, что вакцина из убитых гамма-облучением дизентерийных и брюшнотифозных микробов по своим свойствам почти ничем не отличаются от приготовленных обычным способом.

Каулен Д.В. (1966) стерилизовал питательные среды гамма-лучами, а затем на таких средах получал дифтерийный токсин. Стерилизация питательных сред достигалась при облучении в дозе в 6×10^5 - $1,5 \times 10^6$ Р. Полученный дифтерийный

токсин на жидкой среде (Мартена; Попе) был не худшим, чем на контрольных средах, а часто даже лучшим. Экспериментальные данные свидетельствуют о возможности использования лучевой стерилизации в производстве некоторых бактериальных препаратов (Леви М.И., 1998; Kornev I.I., 2000; Драбкин Ю.А., 2004; Калашников В.В., 2014; Гордеев А.В., 2016).

В институте микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалея проводили стерилизацию сухих сред и растворов с помощью гамма-излучения (Калашников В.В., 2012). В опытах были использованы сухие питательные среды, изготовленные в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, среда 199, среда Игла с 0,5% гидролизата лактоальбулина (ГЛА), с 0,25% ГЛА и 50% среды Игла (ГЛАИ), версен 0,02% в буфере Дульбекко (БД), трипсин 0,25% в БД и на румынском буфере (РБ), сухой препарат бикарбоната натрия. Стерилизацию сред проводили в дозах 1,5-6,5 Мрад. Установлено, что сухие порошки сохраняли стерильность при всех указанных дозах облучения, кроме дозы 1,5 Мрад. При контроле жидких сред было выявлено, что полная стерилизация происходит при обработке сред гамма-излучением в дозе не ниже 2,5 Мрад. Показано, что питательные среды 199, Игла, ГЛА, простерилизованные гамма-излучением, при дозе 2,5-6,5 Мрад не утрачивали биологические свойства, необходимые для культур клеток. Сухие стерильные питательные среды можно хранить в обычных условиях при комнатной температуре в течение одного года. Протеолитическое действие растворов трипсина после гамма-излучения не снижалось. Раствор версена, простерилизованный гамма-излучением, не был токсичным для клеток и не снижал его пролиферативную активность. Сухой стерильный раствор версена можно хранить в течение года (период наблюдения), а раствор трипсина, облученный в дозе 3-4 Мрад, - не более 1 месяца (Пелевина И.И., 2003).

Таким образом, обработка сухих питательных сред гамма-излучением в дозах 3-6 Мрад полностью стерилизует препараты и не ухудшает их качества. Оптимальная доза облучения - 3-4 Мрад.

Иначе обстоит дело с адсорбированным анатоксином, где уже макроскопически устанавливаются изменения: белоснежный осадок адсорбированных анатоксинов под воздействием излучения приобретал стойкую коричневую окраску. Сильно изменяются иммуногенные и антигенные свойства анатоксина - морские свинки вырабатывают иммунитет, в 2-3 раза уступающий по напряженности по сравнению с иммунитетом у контрольных животных.

Гамма-лучи в дозах 5×10^5 - 6×10^5 Р используются также при стерилизации лечебных сывороток, вакцин и др. (Грачев С.А., 1999, Котов, Ю.А. 2004). При воздействии в дозе 5×10^5 Р достигается почти полная очистка сывороток от микрофлоры, при этом титры не страдают. Отмечены незначительные изменения сыворотки, в частности, удлинилось время флоккуляции и др.

В настоящее время ведутся исследования и уже имеются ощутимые успехи при стерилизации плазмы крови и некоторых ее препаратов (фибриногена очищенного, гамма-глобулина, альбумина, протромбина) радиационным способом (Ragimov, A.A.2012, Bertolini, J. 2013). Трудности связаны с относительно высокой радиочувствительностью белков. Облучение препаратов крови или плазмы в дозах от 2 до 3 Мрад, обеспечивающих стерилизующий эффект, изменяет и физико-химические свойства, и биологическую активность препаратов (Шангараева Р.Ф., 2002). Меньшего повреждения химической структуры белковых препаратов и их биологических свойств можно добиться при облучении их в высушенном виде. По предварительным данным, облучение лиофилизированной плазмы, инфицированной различными микроорганизмами и вирусами, обеспечивало стерильность при дозе 2 Мрад. Облучение замороженной и высушенной плазмы гамма-излучением в дозах от 0,2 до 5 Мрад никогда полностью не инактивировало изогемагглютинины. Альфа-изогемагглютинины инактивировались облучением легче, чем бета-изогемагглютинины. Облучение плазмы или ее фракций, предварительно замороженных и высушенных, повышало их радиорезистентность и способствовало сохранению свойств и биологической активности препаратов (Goes E.G., 2006; Karapiperis, C. 2020).

Облучение замороженной и высушенной сыворотки, содержащей гамма-глобулин, в дозах 1,5-2,5 Мрад, снижало активность иммунного гамма-глобулина. Облучение делало нерастворимым протеины и агрегировало гамма-глобулин (Hansen E, 2002). При облучении плазмы крови и отдельных ее фракций ускоренными электронами в дозе 1 Мфэр было показано, что эта доза убивает вирус гепатита, если он содержится в крови в небольшой концентрации (Трофимов В.И., 1995, Гребенюк, А. Н. 2012). Облучение замороженной плазмы крови влияло на соотношение белковых фракций, уменьшая концентрацию альбумина и увеличивая концентрацию гамма глобулина. Облучение снижало и концентрацию фибриногена. Радиационное воздействие в дозе 2 кГр инактивировало специфические антитела плазмы крови иммунизированных людей. Радиационная стерилизация плазмы в дозах 1-2 кГр значительно снижала содержание комплемента (титр снижался на 30%) и на 43% увеличивала протромбиновое время (Trofimov V.I., 2003).

При облучении фибриногена в дозе 500000 рад и выше наблюдается снижение растворимости и активности по мере увеличения дозы. Свертывающаяся активность тромбина начинает снижаться при облучении в дозе 1-1,5 Мрад. Облучение фибриновой губки в дозах до 5 Мрад не изменяло их гемостатических свойств (Weisbach V., 2004).

С влиянием ионизирующей радиации на активность антител связана возможность радиационной стерилизации лечебных, профилактических и диагностических сывороток крови. По данным Каулена Д.Р. и Чахава О.В. (1958), исследовавших влияние облучения в дозах 0,6 и 1,5 Мрад на антитоксические, анафилактические и электрофоретические свойства противодифтерийных сывороток, облучение частично денатурировало сывороточные белки, снижало анафилактические свойства сыворотки и заметно снижало титр антитоксина. На денатурацию сывороточных белков указывало увеличение вязкости, изменение процентного соотношения белковых фракций и изменение электрофоретической характеристики сыворотки. Облучение с целью стерилизации диагностических

сывороток несколько снижало титр антител (агглютининов) (Краснюк И.И., 2004). Иммунные сыворотки не теряли превентивных свойств после лучевого воздействия. При облучении лиофильно высушенных сывороток все изменения были выражены значительно меньше. Такие же результаты были получены и другими исследователями при облучении лиофильно высушенных сывороток. По-видимому, с уменьшением стерилизующей дозы изменения, вызываемые в белковых растворах, в сыворотке и в плазме крови, в препаратах крови, могут быть гораздо менее выраженными. Однако уменьшение стерилизующей дозы не может гарантировать стерильности препаратов, подвергающихся радиационной обработке. Поэтому для стерилизации препаратов крови и сыворотки следует применять комбинированные способы, которые при снижении дозы облучения не уменьшали бы бактерицидного эффекта ионизирующего излучения. Это условие можно соблюсти при использовании комбинированного терморadiационного способа стерилизации, когда производится одновременное прогревание и облучение. При терморadiационном способе стерилизации предусматривается прогревание до 50-55°C и облучение в дозах менее 1,5-2 Мрад, т.е. при таких условиях, когда тепловое и радиационное воздействия сами по себе не вызывают изменений или эти изменения незначительны и мало влияют на качество и биологическую активность препарата.

В качестве лечебных препаратов могут использоваться высушенные и растертые в порошок ткани или органы животных, например, щитовидная железа. Понятно, что при стерилизации такой «пудры» важнее всего сохранить ее основное действующее начало - тиреоидин. Оказалось, что облучение в дозе 2 Мрад не оказывает существенного влияния на свойства препарата и стерилизует его, если количество микроорганизмов не превышает 100 на 1 г препарата.

Одна из наиболее распространенных в медицинской бактериологии питательных сред - агар Хоттингера, основой которого являются продукты триптического переваривания мяса. Приготовленная среда была разделена на три части: одна из них подвергалась обычной стерилизации в автоклаве при 120°C,

другая после автоклавирования была облучена в дозе 1,5 млн Р, третья была стерилизована облучением в дозе 1,5 млн Р. У облученных сред отмечался неприятный гнилостный запах, который постепенно исчезал в течение последующих дней. Среды испытывались через 1, 7, 14 суток после стерилизации. На среды, разлитые в чашки Петри, производился посев культур: были испытаны два штамма брюшнотифозных бактерий и два штамма дизентерийных бактерий Флекснера. Во всех четырех опытах при испытании сред в разные сроки после стерилизации количество колоний, вырастающих на облученных средах, всегда превосходило количество колоний, вырастающих на среде, стерилизованной автоклавированием. В некоторых случаях это превышение было весьма значительным - 180-200%. Таким образом, облучение не только не понижало питательных свойств мясных сред для бактерий кишечной группы, но даже в той или иной степени повышало эти питательные свойства (Троицкий В.Л., Каулен Д.Р. и др., 1958; Валеева, Р.Т. 2014). В дозах от 0,6 до 2 Мрад с целью стерилизации облучали также такие среды, как агар и бульон Мартена, бульон Поппе, среды для получения дифтерийного токсина и казеиново-растительные среды для получения столбнячного токсина. Свойства питательных сред после облучения не ухудшались, а полученные на облученных питательных средах вакцины, токсины или анатоксины не уступали, а в ряде случаев превосходили по своим антигенным и иммуногенным свойствам соответствующие препараты, полученные из бактерий, выращенных на автоклавированных питательных средах. Важно знать о возможности стерилизации питательных сред радиационным способом при приготовлении анатоксинов - препаратов, используемых для иммунизации против инфекций, возбудителями которых являются микроорганизмы, продуцирующие экзотоксины.

Троицкий В.Л. (1957) и Каулен Д.Р. (1958, 1966) показали возможность использования ионизирующей радиации для приготовления анатоксинов и стерилизации их облучением. Облучению в дозах 1,5 и 2 Мрад подвергали дифтерийный и столбнячный анатоксины как нативные, так и адсорбированные.

Облучение не изменило иммуногенных свойств нативного дифтерийного анатоксина, но значительно понизило иммуногенные свойства адсорбированного препарата. Менее чувствительным к облучению оказался столбнячный анатоксин. При облучении как нативного препарата, так и адсорбированного анатоксина иммуногенные свойства их почти не отличались от иммуногенных свойств исходного необлученного анатоксина. Таким образом, нативные анатоксины могут быть подвергнуты стерилизации радиационным способом и при этом их иммуногенные свойства мало или совсем не нарушаются. Такой вывод пока еще нельзя сделать для адсорбированных препаратов.

Ионизирующее излучение с успехом может быть использовано и для приготовления вирусных вакцин. Первая вирусная радиовакцина была получена против бешенства (Traub F.B. et al., 1966). По антигенным свойствам радиовакцина была лучше обычных формализированных вакцин или полученных с помощью ультрафиолета. В настоящее время имеется достаточно публикаций о возможности инактивации многих известных вирусов и имеются данные о необходимых дозах облучения, убивающих вирусы, выделенные из тканей или находящиеся в тканях. К числу вирусов, которые были убиты гамма- или рентгеновским излучением, относятся вирусы полиомы (Logen D.M., Whitmore G.F., 1965), западного энцефалита *St. Louis* (Jordan R.T., Kempe L.L., 1956), герпеса (Bellamy W.D. et al., 1966), везикулярного стоматита, паротита, оспы (Aibara K. et al., 1969; Sundaram K., 1969). Для приготовления противовирусных радиовакцин против гриппа и паротита проводили облучение в дозе 1 Мрад. Эта доза сохраняла антигенные свойства препарата и гарантировала полный инактивирующий эффект. К числу радиовакцин, полученных за рубежом (вирусвакцина пробешенства, Traub F.B., 1951), в нашей стране были получены радиовирусвакцины против гриппа (Мигулов А.И. и др., 1986) и ящура (Патрикеев В.Г. и др., 1995).

«Ослабленные» радиацией вирусы и бактерии могут реверсировать в организме и восстановить исходные свойства, что может привести к

возникновению заболевания. Поэтому для изготовления живых вакцин следует использовать мутанты микроорганизмов с хорошо закрепленными наследственно свойствами как, например, БЦЖ. Получение радиационных мутантов с целью использования их при конструировании живой вакцины против определенного инфекционного заболевания требует длительного времени. Более перспективно использование живых радиовакцин против глистных заболеваний. Такие радиовакцины готовят из яиц глист или из личинок определенной стадии развития червей. Уже нашли практическое применение в ветеринарии вакцины для крупного рогатого скота, овец и собак (Varrett W.F. et al., 1959, 1960; Engelbrecht H.J., 1961; Gligorijevic J. Et al., 1962; Stoll N.R., 1964; Miller T.A., 1967; Фомин А.М. 1984; Дю Паске, Л.1988; Плотникова Э.М. 2002; Ильясовой Г.Ф. 2002; Гафарова А.З. 2003).

Яйца глист или личинки на определенной стадии развития облучают в дозах, не вызывающих их гибели. Дозы облучения различны для разных видов глист и разных стадий развития личинок червей одного и того же вида. Эффективная доза облучения, которая подавляет патогенность и частично инактивирует паразита, в то же время сохраняет его способность образовывать в организме иммунитет к заболеванию, должна быть определена экспериментально. Miller T.A. (1967), исследуя радиочувствительность различных классов паразитарных червей, показал, что оптимальная доза радиации, сохраняющая иммуногенность вакцины против глистных заболеваний для трематод колеблется от 2 до 3 Мрад, для нематод - от 40 до 60 крад. Такие вакцины вызывали в организме иммунизированных животных хороший иммунитет, предохранявший от заболевания.

Таким образом, в результате радиомикробиологических и радиовирусологических исследований, проведенных отечественными радиобиологами и микробиологами, были получены принципиально новые препараты для профилактики инфекционных болезней человека и животных: радиоантигены бруцелл (Драновская Е.А., 1977), энтеробактерий (Иванов К.К. и

др., 1972; Дуплищева А.П., Синилова Н.Г., 1972), брюшнотифозных бактерий (Синилова Н.Г. и др., 1977), липополисахариды бруцелл (Драновская Е.А. и др., 1972); анатоксины: столбнячный (Шибаета И.В. и др., 1972); дифтерийный (Каулен Д.Р., 1966); холерный экзотоксин (Малофеева Н.Б. и др., 1977); туберкулезные препараты (Архипов В.В., Ничаева Л.А., 1972); бактериальные препараты (Калинина Е.Ф., Абидов А.З., 1963); радиовакцины против брюшного тифа (Николаева Л.А. и др., 1972), тифа и паратифа (Седова Т.С., 1964; Мещерякова И.С., 1972; Степанова Л.К. и др., 1977), гриппа (Мигулов А.И. и др., 1986), пуллороза - тифа птиц (Архипов В.В., Богданова К.С., 1972) и против ящура (Мигулов А.И. и др., 1986).

Как видно из краткого обзора литературы по получению и применению радиовакцин и радиоантигенов, они в основном были проведены в 1960-1980 годы медицинскими радиомикробиологами и радиовирусологами в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея.

Работы по радиационной биотехнологии – стерилизации объектов ветеринарного надзора и изготовление радиовакцин проводились в последующем во ВНИВИ (г. Казань). Проведено огромное количество исследований по конструированию и испытанию радиоантигенов и радиовакцин. Одним из первых во ВНИВИ в этом направлении работал Фомин А.М. (1984), которым впервые в ветеринарной практике подвергнут лучевой обработке вакцинный штамм возбудителя бруцеллеза *B. abortus*-82 с целью изготовления бруцеллезного антигена для проведения серологических исследований при бруцеллезе. Показано, что облучение эндотоксина бруцелл приводит к разрушению полисахоридного компонента в разной степени. Обозначено, что для детоксикации антигенов бруцелл, содержащих эндотоксин, может быть использована доза облучения 3 Мрад. Для стерилизации, при сохранении выраженных защитных свойств против бруцеллезной инфекции, оптимальной оказалась доза облучения 1 Мрад. Изучена активность и специфичность полученных различными методами антигенов вакцинных и вирулентных штаммов бруцелл. Установлено, что наиболее

высокую серологическую активность и специфичность проявляли радиоантигены, полученные при обработке их гамма-лучами. Полученные данные послужили основанием для конструирования радиовакцин (Киршиным В.А. и др., 1990). В результате проведенных исследований впервые была получена противобруцеллезная радиовакцина путем облучения вакцинного штамма *B.abortus* 82 в дозе $2,5 \times 10^4$ Гр. При этом радиоинактивированные бруцеллы полностью сохраняли антигенные и иммуногенные свойства, отличаясь от неблагополучного аналога ареактогенностью и безвредностью (Шевцова, Э.В., 1960; Иванов А.В. 2007). В 2002 году сотрудником Казанской государственной медицинской академии Ильясовой Г.Ф. были проведены исследования по конструированию радиовакцины против псевдобешенства. Автор установила, что облучение живой вирус вакцины из штамма ВУК-628 в дозе 25-30 кГр приводит к полной инаktivации вирионов с сохранением антигенности и иммуногенности вируса.

Радиовирусологические исследования, проведенные в Казанской академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана Гафаровой А.З. (2003) показали, что применение радиовирусвакцины псевдобешенства с тимо- и лиолизатами приводило к существенному увеличению титров поствакцинальных специфических антител. Результаты испытаний полученной по вышеуказанной схеме радиовакцины против псевдобешенства на разных видах с.-х. животных (мелкий, крупный рогатый скот; свиньи) легли в основу разработанной технологии по изготовлению и применению радиовакцины против псевдобешенства (Сафин, М.В., 2000, 2002; Угрюмова, В.С., 2002; Макзумов, Р.З., 2003, 2004;).

Следующая серия радиовирусологических исследований, проводимой Насыровым Ш.М. (1996-2001), была посвящена разработке технологии изготовления радиовирусвакцины против классической чумы свиней (КЧС). В результате проведенных исследований разработана технология изготовления радиовакцины против КЧС. Радиоантиген на основе радиоактивированного

вируса КЧС был использован в хозяйствах Тукаевского, Бугульминского районов РТ в РНГА-, ИФА- и РВН-тест-системах, установлена высокая чувствительность и иммунологическая компетентность при проведении иммуномониторинга на фоне вакцинации животных вышеуказанной радиовакциной против КЧС.

Продолжая исследования по получению радиовакцин, Косаревым М.А. (2007-2011) и Хабибуллиным Р.А. (2011-2013) была проведена серия исследований по изготовлению гамма-инактивированных противобруцеллезных вакцин для мелкого рогатого скота. В результате проведения исследований авторами впервые получены гамма-инактивированные вакцины из штаммов бруцелл *B. abortus*-82, *B. melitensis* Rev-1 и вирулентного штамма *B. suis*-86. Установлено, что наиболее высокоиммунной оказалась радиовакцина из штамма *B. abortus*-82.

Учитывая слабую разработанность вопроса индикации возбудителя сапа и значительный риск в работе с возбудителем этого зооантропоноза, следующая серия экспериментов по получению сапного радиоантигена выполнена Зинатуллиным Р.Р. (2000, 2001, 2002) в соавторстве с Мельниковой Л.А. и Зайнеевым Н.Ш. под руководством Галиуллина А.К. для создания иммуноферментной тест-системы с целью индикации возбудителя в объектах ветеринарного надзора. При этом авторы использовали 8 штаммов возбудителя сапа и 4 штамма гетерологичных культур микроорганизмов, имеющих общегрупповые антигены с возбудителем инфекции.

В результате проведенного исследования авторами установлено, что антиген возбудителя сапа, полученный путем воздействия гамма-излучения в дозе 2,5 КГр на бактериальную клетку, обладает высокой серологической и специфической активностью в иммуноферментном анализе. Разработка убитых вакцин или бактериальных субстанций при сибирской язве является важным аргументом для предотвращения недостатков живых вакцинных препаратов. Поэтому целью предпринятых Мустафиной Э.Н. (1999-2005) и Панковым Я.Г. (2011-2012) исследований являлась разработка щадящих иммуногенных

препаратов для вакцинации против сибирской язвы молодняка, ослабленных и беременных с.-х. животных независимо от зоны угрозы, а также определение иммунологического статуса у крупного рогатого скота привитых моновакцинами и в сочетании со средствами иммунокоррекции. В результате проведенных исследований авторами разработаны технология получения и режим применения сибиреязвенной вакцины из вегетативных клеток исходного штамма 55, стабилизированной формалином (0,4% к общему объему) и инактивированной гамма-лучами в течение 18 часов при дозе 2,5 кГр, которая защищает подопытных животных (морские свинки, кролики) от заражения возбудителем сибирской язвы в 80-100 % случаев в первые 3-5 суток и продолжается до 6 месяцев (срок наблюдения). Результаты проведенных исследований позволили рекомендовать радиоинактивированную вакцину для иммунопрофилактики сибирской язвы, получение и применение которой регламентируются нормативными документами.

Таким образом, в результате проведенных учеными радиомикробиологических и радиовирусологических исследований были получены радиовирусвакцины, которые были использованы по прямому назначению, а именно – для серодиагностики и иммунопрофилактики соответствующих перечисленных особо опасных болезней человека и животных. При этом ни одна из полученных радиовакцин не была испытана в качестве радиозащитного препарата.

1.3 Использование веществ растительного, животного и микробного происхождения в качестве радиопротекторов

Полувековые исследования в области разработки методов и средств противорадиационной защиты привели к созданию лишь несколько разрешенных медициной и ветеринарией препаратов от острой лучевой болезни (ОЛБ) (Владимиров В.Г. с соавт., 1997; Васин М.В. соавт., 2008; Киршин В.А., Бударков В.А., 1990). В последние годы при изучении различных аспектов механизма противолучевого действия наметились новые перспективы в области терапии и профилактики радиационных поражений с использованием препаратов из веществ зоогенной, фитогенной и микробной природы (Патент РФ № 216950., 2001, Киршин В.А. и др., 2001; Низамов Р.Н., Тарасова Н.Б., 2001; Конюхов Г.В. и др., 2005). При этом было установлено, что одним из ключевых звеньев многочисленных составляющих патогенеза ОЛБ является нарушение функции антиоксидантной защиты (АОЗ) (Кудряшов Ю.Б., Гончаренко Е.Н., 1999; Лысенко Н.П. и др. 2012), для коррекции которой предложены многокомпонентные смеси растительного происхождения (Бураев М.Э и др., 2005; Иванов А.В., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В., 2008). Реакция организма на действие ионизирующего излучения представляет собой сложный комплекс разнообразных структурных и функциональных изменений, приводящий к развитию острой и хронической лучевой болезни. Установлен факт циркуляции в облученном организме радиоиндуцированных антигенов и токсических субстанций, проведены исследования по изучению их радиозащитных свойств - получен положительный эффект при иммунизации животных тканевыми препаратами облученных животных (Мальцев В.Н. и др., 1978; Иванов А.А. и др., 1991; Андрущенко В.Н. и др., 1996).

Различные микробные антигены обладают способностью снижать смертность облученных животных и выраженность проявлений экспериментальной острой лучевой болезни за счет активизации фагоцитарной функции клеток системы мононуклеаров в крови и тканях, повышения устойчивости к экзогенным инфекциям, способности к образованию антител за счет увеличения числа антителопродуцирующих клеток. Проведены работы по поиску веществ микробного происхождения для повышения радиорезистентности организма, направлений решения проблемы профилактики и терапии острой лучевой болезни. (Мухаметшин И.Р., 2002; Нигматуллин И.Н., 2006; Хафизов А.И., 2007; Иванов А.В., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В., 2008; Вагин К.Н., 2011). Учитывая, что радиозащитный эффект (РЗЭ) у сложных многокомпонентных препаратов из растительных, животных и микробных клеток значительно выше, чем у отдельных компонентов смеси (Кудряшов Ю.Б., Гончаренко Е.Н., 1999), установлено, что сочетанное применение препаратов крови (сыворотка, глобулин) с фитоэкстрактами (Тарасова Н.Б., Нигматуллин И.Н., 2005), веществами микробного происхождения приводит к повышению их радиозащитной активности. Однако, при этом остаются окончательно нерешенные вопросы, касающиеся оптимальных соотношений компонентов, их совместимость при одновременном или раздельном применении.

1.4 Микроорганизмы – продуценты биологически активных метаболитов и биосурфактантов

В настоящее время заметно устойчивое повышение интереса к поверхностно-активным веществам биогенного происхождения (биоПАВ, биосурфактантам) как экологически безопасным и экономически эффективным поверхностно-активным агентам многоцелевого назначения с эмульгирующей, солюбилизирующей, антиадгезивной, детергентной активностью (Шишов, В.А., 2010). Это обусловлено требованиями экологической безопасности, которые предусматривают постепенное выведение из промышленных производств высокотоксичных химических препаратов (Экологическая доктрина РФ, 2002; Design for the Environment, 1998), в частности, сурфактантов - как правило, продуктов нефтеоргсинтеза, а также сурфактантов микробного происхождения. Особенно активно исследования в этом направлении проводятся в США и Канаде (Auger R.L., 1995; Banat I.M., 2000; Beal R., 2000; Moran A.C., 2000; Nicolas J.P., 2003; Cameotra S.S., 2004; Mulligan C.N., 2016). В России работы по использованию биосурфактантов в процессах биоремедиации сравнительно немногочисленны и ограничены лабораторными экспериментами (Елисеев С.А., 1991; Ланге К., 2004; Пирог Т.П., 2004; Костина Л., 2010; Ившина И.Б., 2012).

Огромное внимание уделяется изучению возможности получения новейших соединений на основе биологического синтеза. Однако для защищенности человека и животных в сфере биотехнологии требуется обширное изучение как биологических агентов, так и продуктов биосинтеза (Шевелуха, 2002, 2003; Renault P., 2002; Parales et al., 2002; Walsh D. et al., 2007).

Биосурфактанты отличаются от синтетических сурфактантов, например, низкой токсичностью, высокой биodeградебельностью, устойчивой активностью в условиях эксперимента среды, имеют улучшенные функциональные

характеристики, возможность получения на возобновляемых источниках сырья (Desai J., 1997; Makkar, Cameotra, 2002; Камышников, В.С.2004). Среди множества биосурфактантов, продукты микробного синтеза, имеют большие перспективы в плане биотехнологического применения; это связано с тем, что для культивирования продуцентов используются относительно простые по составу минеральные среды и доступные источники углерода. Существует возможность управления ферментационным процессом биосинтеза, позволяющая увеличивать выход продукта без значительных материальных и энергетических затрат (Елисеев С.А., 1991; Kosaric N., 1992). Возможность *in situ* продуцирования биосурфактантов микроорганизмами важна для биотехнологии защиты окружающей среды, например, в процессах ремедиации почв и вод, загрязненных органическими поллютантами и тяжелыми металлами (Christofi N., 2002). Биосурфактанты используются в качестве эмульгаторов и солюбилизаторов гидрофобных веществ, как возможные агенты биомедицины, обладающие выраженной физиологической активностью, при этом имея огромный потенциал для дальнейшего возможного использования в других разнообразных сферах (Kitamoto D., et al., 2002; Cameotra S.S., 2006; Алексеев, К. В. 2014; Краснюк, И.И. 2016).

Продуценты биосурфактантов обнаруживаются среди представителей трех доменов *Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya* и выделяются из различных природных источников (почв, кернов, морской и пресной воды, донных отложений). По данным Maier R.M. (2000), биосурфактанты филогенетически отдаленных микроорганизмов функционально конвергентны, что свидетельствует об их существенной роли в жизнедеятельности продуцентов. Отсутствие генетического (структурно регуляторного) и фенотипического (по молекулярному строению) родства биосурфактантов указывает на независимое эволюционное развитие данного признака (Bodour A.A. et al., 2003). Биосурфактанты, синтезируемые бактериями разных видов в пределах одного рода, часто несхожи в структурном и функциональном отношении (Nielsen T.N. et al., 1999; Maier R.M. et al., 2000). Все

это значительно затрудняет направленный поиск новых продуцентов по их таксономической принадлежности или на основании использования молекулярно-генетических методов. Расшифрованы генетические детерминанты синтеза отдельных биосурфактантов (Sullivan, 1998; Долбнев, Д.В. 2010), однако пока не созданы молекулярные маркеры для их *in situ* детекции. В связи с этим, безальтернативным остается функциональный подход к поиску продуцентов биосурфактантов, который предусматривает скрининг поверхностной активности выделенных чистых культур. Появляются все новые данные о микроорганизмах, обладающих сурфактантной способностью (Турковская О. и др., 2001; Denger K. et al., 1995; Deziel E. et al., 1996; Kim H.S. et al., 1997; Haubler S. et al., 1998; Gunther N. et al., 2005; Quan, C. et al., 2019). Однако до сих пор не разработан методологический подход к осуществлению направленного поиска продуцентов биосурфактантов; не определены четкие критерии оценки их функциональной активности, физико-химических и биологических свойств; не решены проблемы моделирования ферментационного процесса получения биосурфактантов с заданными свойствами; недостаточно изучены особенности физиологии продуцентов и механизмы синтеза поверхностно-активных метаболитов.

Биосурфактанты характеризуются высоким структурным разнообразием - от низкомолекулярных глико- и фосфолипидов до сложных высокомолекулярных биополимеров полисахаридной, липидной и белковой природы, что обуславливает широкий спектр их функциональных особенностей (Rosenberg E., Ron E., 1999). В плане практического применения интенсивно изучаются гликолипидные биосурфактанты, представляющие собой комплексы на основе моно- и дисахаров, соединенных посредством сложноэфирной связи с жирными кислотами (рамнолипиды псевдомонад, маннозилэритритол- и софоролипиды дрожжей) (Lang S., Wullbrandt D., 1999; Spoehner S. et al., 1999; Maier R.M. 2003, Nunez A. et al., 2004). Известно, что клетки коринеформных и нокардиоформных актинобактерий характеризуются повышенным (30-60%-ным) содержанием липидов, преимущественно высокомолекулярных α -разветвленных р-

гидроксированных жирных (миколовых) кислот, которые присутствуют в свободном состоянии и входят в состав гликолипидов клеточной оболочки. Детально изучены поверхностные трегалозокориномиколаты, известные как «корд-фактор» и «лизо-корд-фактор», впервые обнаруженные в 1930-х годах в клетках *Mycobacterium tuberculosis* (Noll H. et al., 1956). Ди- и монокориномиколаты трегалозы позднее обнаружены у других патогенных микобактерий (включая так называемых «мягких» оппортунистических патогенов группы *M. avium* - *M. intracellulare*), нокардий (*Nocardia asteroides*) и коринебактерий (*Corynebacterium diphtheriae*, *C. matruchotii*, *C. xerosis*) (Margaritis A. et al., 1979; Cooper D.G., Zajic J.E., 1980; Retzinger G.S. et al., 1981, Fujita Y. et al., 2005). Выявленная сурфактантная активность данных гликолипидов свидетельствует об их практической значимости, однако явная или потенциальная патогенность штаммов-продуцентов и высокая токсичность синтезируемых гликолипидов ограничивают их применение (Watanabe M. et al., 1992). В этой связи актуален поиск продуцентов гликолипидных сурфактантов среди представителей непатогенных актинобактерий.

До настоящего времени оставался мало изученным вопрос о возможности применения ВМП в качестве средств раннего лечения острой лучевой болезни. Имеющиеся в литературе данные указывают на невысокую эффективность при пероральном назначении их облученным мышам и крысам (Мальцев В.Н. и др., 1978; Баранов А.Е., 2007; Fajardo L.F., 2001, Погова, Л.Н.2011; Durante, M. et al., 2019; Hou X. et al., 2020; Hualin, Z. et al., 2020). Однако эффективность применения ВМП может быть повышена при использовании парентерального пути введения. Возражением против данного предложения может быть то, что бактериальные препараты состоят из живых микробов и их введение будет отягощать течение лучевого поражения. Однако эта закономерность установлена только для патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Её нельзя автоматически переносить на представителей нормальной микрофлоры

кишечника, которые обеспечивают колонизационную резистентность кишечной стенки за счёт своего антагонизма к патогенным микробам.

Значительное влияние на гемопоэз оказывают макрофаги, которые, активно отвечая на различные антигенные раздражители, в т.ч. и бактериального происхождения, выделяют целый комплекс биологически активных соединений, среди которых большое место занимают вещества, регулирующие клеточную активность и колониестимулирующие факторы (КСФ) - цитокины (Тряпицына, Г.А., 2001; Пелевина И.И. и др., 2003; Хаитов Р.М., 2009; Ярилин А.А., 2010).

В литературе имеются сведения о радиозащитных свойствах бификола, бифидумбактерина и биоспорина при их подкожном применении (Алешкин В.А., 2006; Бондаренко В.М., 2006; Евлашкина В.Ф., 2009).

Осуществляя целенаправленный поиск противолучевых средств, учеными в последние годы проведены широкомасштабные исследования по оценке радиозащитной эффективности ВМП. При оценке их защитных свойств выявлены основные компоненты: эндотоксины, протективный антиген и радиотоксин *E.coli*, проявившихся как в отдельности, так и в сочетании перечисленных компонентов, защищая летально облученных животных в 50-60 % случаев. С учетом радиозащитной активности отдельных компонентов, Конюховым Г.В., Низамовым Р.Н., Мухаметшиным И.Р. и др. была составлена композиция из соматических клеток *E.coli* и продуктов ее метаболизма (анатоксин, протективный антиген, радиотоксин), которая при однократном подкожном введении животным за 1-90 суток до облучения предохраняла от радиационной гибели до 70 % животных (Патент РФ № 2226106 от 2001 г.). Однако, несмотря на высокий радиозащитный эффект, применение ВМП из *E. coli* с лечебной целью противопоказано, поскольку введение препарата через 1-10 суток после облучения усугубляет течение ОЛБ, приводя к противоположному эффекту (Мухаметшин И.Р., 2004), что связано с наличием в препарате живых микробных клеток. Вместе с тем, из данных радиационной микробиологии известно, что введение в организм продуктов метаболизма *E. coli* (термоэкстракта кишечной

палочки, белковополисахаридного комплекса эндотоксина, липида А) после облучения обеспечивало выживаемость летально облученных белых мышей до 80 % при 100 % гибели контрольных животных (Андрущенко В.Н. и др., 1996). При этом сочетание этих компонентов и продуктов метаболизма *E. coli* с антибиотиками и тромбоцитами значительно усиливало лечебный эффект препаратов (Торхова О.А., 2004).

Решающее значение в механизме действия ВМП имеет активация процессов регенерации кроветворной ткани в облученном организме. Это проявляется в меньшей панцитопении в разгар заболевания, быстром нарастании числа гранулоцитов и тромбоцитов, высоком содержании гемоглобина и эритроцитов в период восстановления, усилении пролиферации и миграции стволовых клеток костного мозга, ускорении дифференцировки клеточных элементов, увеличении числа эндо- и экзогенных очагов кроветворения в селезенке и костном мозге (Диковенко Е.А., 1971; Tovar, I. 2020). При объяснении положительного влияния ВМП на гемопоэз нельзя не учитывать их иммуностропность. В современной иммунологии накоплен значительный фактический материал о влиянии гуморальных и клеточных компонентов иммунитета на гемопоэз и, в частности, на стволовую кроветворную клетку, которая определяет выживаемость организма после облучения в определенном диапазоне доз (Каулен Д.Р., 1966; Мальцев В.Н. и др., 1994; Клемпарская Н.Н. и др., 1978, 1981, 1982; Иванов А.А. и др., 1991; Иванов А.В., Конюхов Г.В., 2008). Все это дает основание сделать вывод, что ряд вакцин при определенных условиях их применения обладает противолучевой эффективностью и поиск протекторов среди микробных антигенов целесообразен. Поэтому использование веществ микробного происхождения и биосурфактантов для повышения радиорезистентности является одним из важных направлений решения проблемы профилактики и терапии острой лучевой болезни. Это обусловлено тем, что вещества, выделенные из микроорганизмов, характеризуются высокой биологической активностью. Введение их в организм может приводить к изменению функции ряда органов и систем. Результатом

такой перестройки является повышение резистентности организма к инфекционному заражению и другим экзогенным факторам, оказывающим неблагоприятное воздействие.

Последующие исследования ученых, в том числе сотрудников ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань), в области радиационной микробиологии показали, что ряд пробиотиков и продуктов метаболизма пробиотических микроорганизмов, кроме перечисленных свойств, обладают еще одним важным качеством - радиомодифицирующим действием (Хафизов А.Ш., 2007; Юнусов И.Р., 2009, Bonomini, F.). Бижановым Б.Р. (1991) установлено, что применение бификола через 24 ч после облучения овец в дозе ЛД_{60-80/30} оказывало радиозащитный эффект, повышая выживаемость животных на 50 % по сравнению с контролем. Аналогичный лечебный эффект был достигнут на летально облученных лабораторных животных при курсовом применении препарата «Биоспорин» (Степанов А.В. и др., 1997).

Наиболее убедительные и интересные данные получены Хафизовым А.Ш. (2007), который разработал технологию изготовления радиомодифицированного препарата «Бифидумбактерин» путем облучения исходного штамма гамма-лучами в дозе 40,0 Гр с целью увеличения синтеза микробом бифидогенных факторов, экспрессируемых в питательную среду. Однократно подкожное введение облученного варианта бифидумбактерина в дозе $1,438 \times 10^6$ КОЕ/кг за 1-11 сут до облучения (ЛД_{100/30}) предохраняло от гибели 80 % летально облученных лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Учитывая, что радиозащитный эффект у сложных многокомпонентных препаратов фитогенного, зоогенного и микробного происхождения значительно выше, чем у отдельных компонентов смеси, Юнусовым И.Р. (2009) были проведены исследования по конструированию многокомпонентной радиозащитной композиции, состоящей из 4 частей апипрепарата «Вита-Форце», 2 частей травяной муки, 2 частей кровяной муки, 1 части бентонита, 0,6 частей стерилизованной культуральной жидкости *B.bifidum* и 0,4 частей продуктов

метаболизма *Bac.subtilis*. При однократном введении инъекционной формы препарата в дозе 25 мг/кг за 24 часа до и через 24 часа после летального облучения обеспечивало выживаемость 75% и 80 % животных при 100 % гибели контрольных.

Однако исследования проведены только на лабораторных животных и проведены в весьма короткие сроки до и после облучения. Сказанное свидетельствует о перспективности применения продуктов метаболизма микроорганизмов как с профилактической, так и с лечебной целями, однако исследования по этому вопросу весьма ограничены, хотя использование ВМП, экспрессирующихся в культуральную жидкость, для повышения радиорезистентности организма является одним из важных направлений решения проблемы профилактики и лечения ОЛБ. Это обусловлено тем, что эти вещества характеризуются высокой биологической активностью благодаря наличию в их составе растворимых антигенов, ферментов, аминокислот, микроэлементов, антибиотиков и т.д. С учетом перспективности применения микробных метаболитов в качестве радиозащитных средств и актуальности данной проблемы нами предполагается проведение настоящих исследований.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследований

Материалы исследований Работа выполнена на кафедре морфологии, акушерства и терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет» и в отделении радиобиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

Диссертационная работа является разделом комплексной темы НИР отдела радиобиологии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (№ государственной регистрации 01200202604).

В опытах было использовано 785 животных, в т.ч. 514 белых мышей живой массой 18-20 г, 152 белые крысы живой массой 180-200 г, 20 морских свинок живой массой 300-400 г и 99 кроликов и 24 овцы, 5737 проб и исследований.

Направление и объем исследований, а так же условия опытов представлены на Схемах 1 и 2.

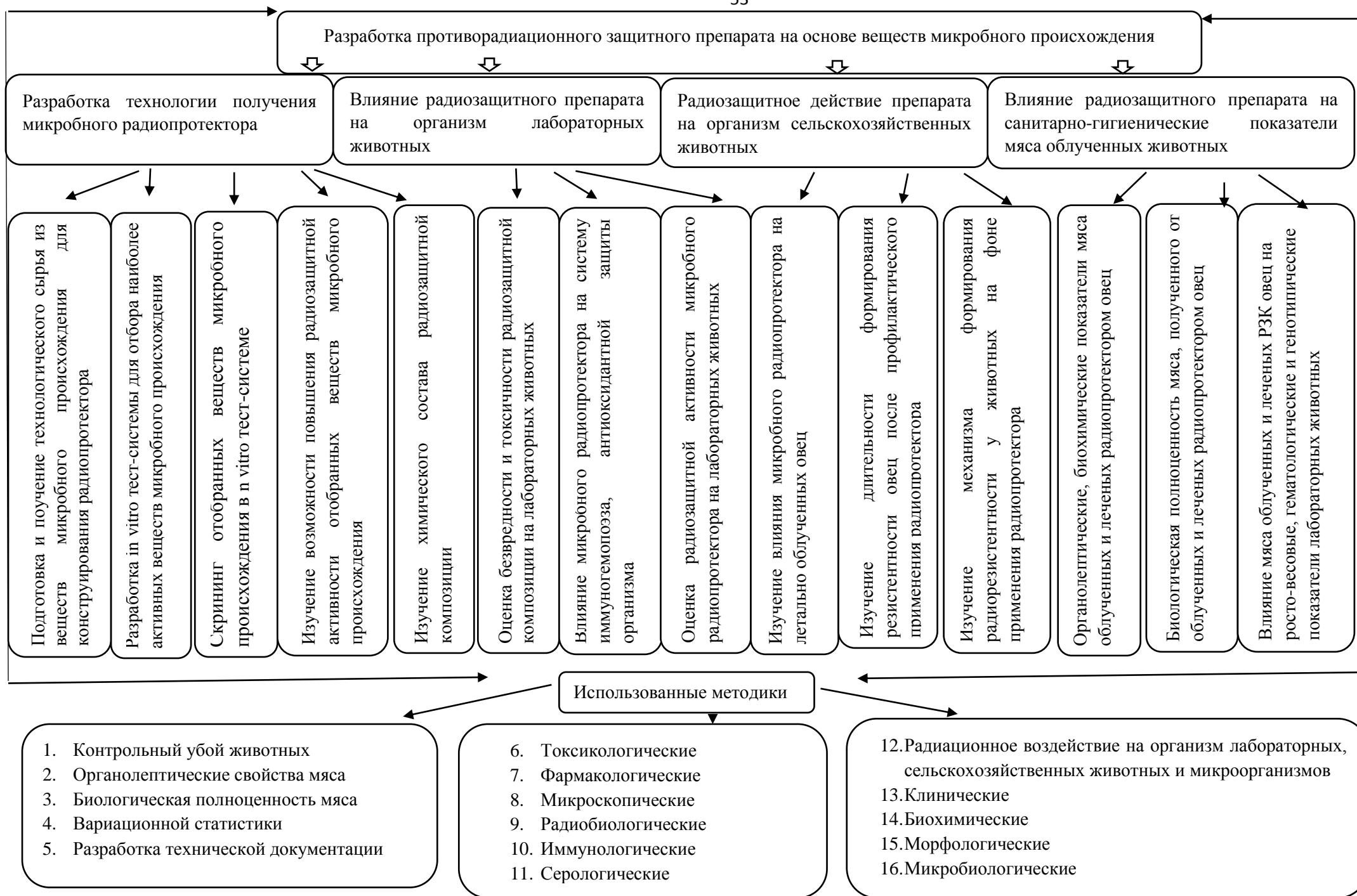


Схема 2 Условия опытов

Группа животных	Количество животных	Продолжительность, сут.	Условия подбора и подготовки сырья
РАЗДЕЛ 1. Подготовка и получение технологического сырья из веществ микробного происхождения (ВМП) для конструирования биорадиопротектора Опыт №1(поисковый) -Тестирование радиочувствительности различных видов микроорганизмов к γ -лучам ^{60}Co -Получение структурных компонентов микроорганизмов (антигенов, анатоксинов, полисахаридов, ДНК, РНК, НК) -Использование физических (термо-, радио-), химических (этаноловое, формализирование, трихлоруксусное экстрагирование) методов инактивации вирулентных патогенных микроорганизмов, вакцинных препаратов для получения радиоантигенов и радиовакцин -Тестирование микроорганизмов на радиоащитную активность в <i>in vitro</i> тест-системе для предварительного отбора из них наиболее активных вариантов и компонентов микроорганизмов.			

Опыт №2 (поисковый) Скрининг и отбор наиболее активных веществ микробного происхождения в <i>in vitro</i> тест-системе				
				РЗЭ, %
I	вакцины	57	Совместное инкубирование испытуемых ВМП с летально облученными лимфоцитами и оценка радиозащитной активности (РЗЭ) в %	6 (51,5-68,3)
II	пробиотики	22		5 (51,9-69,5)
III	патогенные и условно-патогенные микроорганизмы	26		6 (51,3-63,1)
IV	спорообразующие	20		1 (51,3)
V	Структурные компоненты микробных клеток	55		10 (59,9-74,5)
	Всего:	180		
Опыт №3 Изучение возможности повышения радиозащитной активности отобранных веществ микробного происхождения				
I -0	4	24	ПМЕс (98%) + ОМЕс ($2 \cdot 10^9$ м.к./мл) + ВДФБ (2%)	
II-0	4	24	ПМВb (98%) + ОМВb ($2 \cdot 10^9$ м.к./мл) + АПЗ (0,5%)	
III-0	4	24	ПМВs (98%) + ОМВs ($2 \cdot 10^9$ м.к./мл) + ВДФБ (2%)	
IV-0	4	24	ПМВs (50%) + ОМВb (49,5%) + АПЗ (0,5%)	

Опыт №4 (поисковый)**Конструирование радиозащитного препарата (РЗК) на основе веществ микробного, минерального и зоогенного происхождения, обладающего бифункциональными свойствами**

1 стадия – посев штаммов – продуцентов на питательную среду (МПБ) и среду Блаурокка, культивирование при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

2 стадия – определение концентрации микробов в биомассе спектрофотометрически и по выходу биомассы.

3 стадия – смешивание 0,5 частей культуральной жидкости (КЖ) *E. coli*; 0,2 частей *B. bifidum* и 0,2 частей *B. subtilis*, содержащих $1,5 \cdot 10^9$ м.к./мл, $0,6 \cdot 10^9$ м.к./мл и $0,4 \cdot 10^9$ м.к./мл микробной биомассы в соответствующих КЖ.

4 стадия – гомогенизация смеси микробов и их метаболитов на шуттель – аппарате в течение 30 мин при 80 качаниях/мин, розлив во флаконы емкостью 100-200 см³, радиостерилизация на гамма-установке «Исследователь» в дозе $2 \cdot 10^4$ Гр.

5 стадия – составление композиции на основе соматических клеток и продуктов метаболизма тест-микробов, включающий 0,5 частей КЖ *E. coli* (ПМЕе), 0,2 частей *B. subtilis* (ПМВс), в эту смесь вносят $1,5 \cdot 10^9$ м.к./мл *E. coli*; $0,4 \cdot 10^9$ м.к./мл *B. bifidum* и $0,4 \cdot 10^9$ м.к./мл *B. subtilis* и 0,1% биополимера (апизана).

Опыт 5 (научно-экспериментальный)**Оценка безвредности и токсичности радиозащитной композиции на лабораторных животных**

Определение острой парентеральной токсичности РЗК на белых мышах.

I -0	10	10	однократно-подкожно 300 мг/кг живой массы
II-0	10	10	однократно-подкожно 600 мг/кг живой массы
III-0	10	10	однократно-подкожно 1200 мг/кг живой массы
IV-0	10	10	однократно-подкожно 1600 мг/кг живой массы
V-0	10	10	однократно-подкожно 2200 мг/кг живой массы
VI-0	10	10	однократно-подкожно 2500 мг/кг живой массы
VII-0	10	10	однократно-подкожно 3200 мг/кг живой массы
VIII-0	10	10	однократно-подкожно 4000 мг/кг живой массы
IX-0	10	10	однократно-подкожно 4500 мг/кг живой массы
X-K	10	10	однократно-подкожно дистиллированная вода 0,1 см ³

Опыт №6 (научно-экспериментальный)
Определение безвредности радиозащитной композиции
Биотестирование на кроликах

I -К	0	28	Однократно внутрибрюшинно 5,0мл дистиллированной воды
II-О	0	28	Однократно внутрибрюшинно РЗК 5,0 мл

Опыт №7 (научно-экспериментальный)
Определение кожно-раздражающее действие РЗК

I -К		1 4	Аппликация на кожу дистиллированная вода 1мл/см ²
II-О		1 4	РЗК 11,59 см ²

Опыт №8 (научно-экспериментальный)
Гистаминный тест

I -К	0	32	Однократное подкожное введение дистиллированной воды 1 мг/кг
II-О	0	32	Однократное подкожное введение раствора гистамина 5 мг/кг

Опыт №9 (научно-экспериментальный)
Определение эмбриотоксического и тератогенного действия РЗК
на белых крысах

I -К	1 0	20	Трехкратное внутрибрюшинное введение физиологического раствора 1,0 см ³
II-О	1 0	20	Трехкратное внутрибрюшинное введение РЗК в дозе 11,59 мг/кг живой массы

РАЗДЕЛ II. ВЛИЯНИЕ РЗК НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ

Опыт 10 (научно-производственный)
Влияние препарата РЗК на неспецифическую резистентность
организма (НРО), систему иммуногемопоеза, систему крови
белых крыс

I -К	20	30	Однократно подкожно физиологический раствор 1см ³
II-О	20	30	Однократно подкожно раствор РЗК в дозе 11,59 мг/кг

Опыт №11 (научно-производственный)
Радиозащитное свойство РЗК (опыт на белых мышах).

I -К	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + п/к ф/р 1 см ³
II-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл РЗК за 24 ч. д/о
III-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 2,8 мл МПАГ за 24 ч. д/о
IV-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл РЗК через 24 ч. п/о
V-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл МПАГ через 24 ч. д/о
VI-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл РЗК за 3 сут. д/о
VII-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл МПАГ за 3 сут. д/о
VIII-о	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл РЗК через 3 сут. п/о
IX-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + 0,1 мл МПАГ через 3 сут. п/о
X-О	10	30	облучение в дозе 7,7Гр + однократ. введение РЗК за 5 сут. д/о
XI-О	10	30	однократное п/к введение МПАГ за 5 сут. д/о
XII-О	10	30	однократное п/к введение РЗК за 5 сут. п/о
XIII-О	10	30	однократное п/к введение МПАГ через 5 сут. п/о
XIV-О	10	30	однократное п/к введение РЗК за 10 сут. д/о
XV-О	10	30	однократное п/к введение МПАГ за 10 сут. д/о
XVI-О	10	30	однократное п/к введение РЗК через 10 сут. п/о
XVII-О	10	30	однократное п/к введение МПАГ через 10 сут. п/о

д/о - до облучения; п/о – после облучения

Опыт №12 (научно-производственный)
Радиозащитные свойства РЗК (опыт на белых крысах), обл. 9,0 Гр.

I -О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ РЗК за 5 сут д/о
II-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ РЗК за 10 сут д/о
III-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ МПАГ за 5 сут д/о
IV-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ МПАГ за 10 сут д/о
V-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ РЗК за 15 сут д/о
VI-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ МПАГ за 15 сут д/о
VII-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ РЗК за 30 сут д/о
VIII-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ МПАГ за 30 сут д/о
IX-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ РЗК через 5 сут п/о
X-О	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ МПАГ через 5 сут п/о
XI-К	10	30	однократное п/к введение 0,5 см ³ физ. раствора

Опыт №13 (научно-производственный)

Влияние РЗК на радиорезистентность летально-облученных (11,0 Гр) кроликов

I -O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл РЗК за 5 сут д/о
II-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл МПАГ за 5 сут д/о
III-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл РЗК за 10 сут д/о
IV-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл МПАГ за 10 сут д/о
V-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл РЗК за 15 сут д/о
VI-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл МПАГ за 15 сут д/о
VII-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл РЗК за 20 сут д/о
VIII-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл МПАГ за 20 сут д/о
IX-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл РЗК за 30 сут д/о
X-O	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл МПАГ за 30 сут д/о
XI-K	6	30	однократное п/к введение 1,0 мл физ. раствора

д/о - до облучения; п/о – после облучения

Опыт №14 (научно-производственный)

Влияние препарата РЗК на формирование радиорезистентности у облученных и леченых животных, включающих гемопротекторное, антиоксидантное, радиотоксин нейтрализующее, иммунорегулирующее действие (опыты на белых мышах, белых крысах, кроликах)

Опыты на белых мышах

I -K	12	24	однократное п/к введение 0,1 мл физ. раствора
II-O	12	24	однократное облучение в дозе 7,7 Гр
III-O	12	24	однократное п/к введение РЗК 0,1 мл (20 мг по сухому веществу) через 24 ч п/о

Опыты на белых крысах

I -K	9	24	однократное п/к введение 0,5 мл физ. раствора
II-O	9	24	однократное облучение в дозе 9,0 Гр
III-O	9	24	однократное п/к введение РЗК 0,5 мл (20 мг по сухому веществу) через 24 ч п/о

Опыты на кроликах

I -K	5	24	однократное п/к введение 1,0 см ³ физ. раствора
II-O	5	24	однократное облучение в дозе 11 Гр
III-O	5	24	однократное п/к введение РЗК 1,0 см ³ (20 мг по сухому веществу) через 24 ч п/о

Опыт № 15 (научно-экспериментальный)

Влияние РЗК на выживаемость летально облученных овец, системы крови, кинетику обмена радиотоксинов и функциональную активность иммунокомпетентных клеток системы иммунитета

I -K ₁	3	60	п/к введение 5,0 см ³ физ. раствора
II-K ₂	3	60	облучение в дозе 6,0 Гр + физ. раствор
III-O	6	60	облучение в дозе 6,0 Гр + однократное п/к РЗК 5,0 см ³ (ИД ₅₀ =2,5·10 ⁹ м.к./мл)
IV-O	6	60	облучение в дозе 6,0 Гр + однократное п/к МПАГ в той же дозе

Опыт № 16 (научно-экспериментальный)

Изучение длительности формирования радиорезистентности у овец после профилактического применения РЗК

I -K ₁	3	90	биологический контроль
II-K ₂	3	90	облучение в дозе 6,0 Гр без иммунизации
III-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец РЗК за 30 сут д/о (5 см ³ / ИД ₅₀ =2,5·10 ⁹ м.к./мл)
IV-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец РЗК за 60 сут д/о (5 см ³ / ИД ₅₀ =2,5·10 ⁹ м.к./мл)
V-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец РЗК за 90 сут д/о и обл. в дозе 6,0 Гр
VI-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец МПАГ в дозе 5 см ³ и облучение в дозе 6,0 Гр за 30 сут д/о
VII-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец МПАГ в дозе 5 см ³ и облучение в дозе 6,0 Гр
VIII-O	5	90	однократное п/к иммунизация овец МПАГ в дозе 5 см ³ и облучение в дозе 6,0 Гр

Опыт № 17 (научно-экспериментальный)

Оценка влияния РЗК на санитарно-гигиенические показатели мяса облученных овец (предубойное состояние облученных леченых РЗК животных, выход продуктов убоя, показатели подкожного и внутреннего жира, химический состав и энергетическая ценность, биохимические показатели мяса, изменение массы, гематологические показатели, воспроизводительные функции, крысят и мышей получавших в рационе мяса облученных и леченных РЗК овец, а также оценка генетического эффекта образцов мяса на крысят и мышей, получавших в рацион мяса от облученных и леченных РЗК овец)

I -к	6	30	Санитарно-гигиенические показатели мяса интактных овец
II-о	6	30	Санитарно-гигиенические показатели мяса облученных 6,0 Гр овец
III-о	6	30	Санитарно-гигиенические показатели мяса облученных и леченых РЗК овец

к - контроль; о - опытные группы; п/к – подкожное, в/м – внутримышечное, в/б – внутрибрюшинное, п/э – парентеральное введение; ИД₅₀ – иммунизирующая доза; МПАГ – микробный полиантиген

Для отбора веществ микробного происхождения (ВМП) исследовали применяемые в ветеринарной и медицинской практике вакцины бактериальной и вирусной природы, изготовленные отечественной биопромышленностью и «ФГБНУ ФЦТРБ ВНИВИ» (г. Казань): против сибирской язвы (шт. 55), бруцеллеза (шт. К2, R-1098; 82-ПЧ; Rev-1), рожи свиней, сальмонеллеза (шт.ТС-177), дизентерии, паратифа, колибактериоза, агалактии мелкого рогатого скота, листериоза, вирус вакцины против бешенства, псевдобешенства (болезнь Ауески), инфекционного ринотрахеита («ТКА-ВИЕВ-В2»). Использовали группы веществ микробного происхождения: включая пробиотические препараты, бифилакт, родафен, ветом, цилобактерин, блокарин пионер, юнибактерин, лактобактерин. В эту группу вошли мощные разрешенные ксенобиотики и токсины, в том числе радиотоксины, дрожжи, *Sacchanonyces cerevisiae* шт.230.

Кроме вакцинных и пробиотических препаратов, в работе испытывали патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, которые были использованы после соответствующей термо-, и радиоинактивации: *Escherichia coli* 0:151, сероварианта №60, 888, симбиотический штамм K-12 MC4100 - продуцент генноинженерных продуктов (интерфероны, цитокины и др.), стафилококки, клостридии, протей, стрептококки, непатогенные штаммы сальмонелл (*Sal.typhiriurium* um.370,371; *Sal.enteritidus* um.418).

Использовали также спорообразующие микроорганизмы-бациллы: *B.cerus* (фактор порчи пищевых продуктов), *B.megaterium*, *B.subtilis* (шт.1,168,20-31, JH64,), *B.mesentericus*, *B.pumilus* KM62, *B.thuringensis* (var.subtoxicus), *B.polimixa*, *B.circulaus*, *R.intermedius* (шт. 7p и 3-19) обитающие в организме животных, растениях и почве.

Вышеперечисленные вакцинные препараты бактериальной и вирусной природы были получены в системе «Зооветснаб», из музейных штаммов лаборатории вирусологии и производства бактериальных препаратов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»(Казань), компоненты соответствующих микроорганизмов были получены в Казанском институте экспериментальной иммунологии (КИЭИ),

а так же, в системе «Биопром» МСХ РФ ВГНКИ Горьковском НИИ вакцин и сывороток ИЭМ им.Н.Ф. Гамалеи и в Центре военно-технических проблем биологической защиты НИИ микробиологии (-экзо-, эндотоксины, полисахариды, соматические и протективные антигены, анатоксины).

В экспериментальных исследованиях по культивированию и изучению ферментативных свойств штаммов-продуцентов использовали: жидкие (МПБ, бульон Хоттингера, среда ГПЭМ) и плотные (МПА, кровяной агар, набор питательных сред с лактозой, маннитом, глюкозой, сахарозой, желатином, цитратно-аммонийную среду и среду Симмонса, агар с сернокислым железом) питательные среды, рекомендованные Государственной Фармакопеей XI издания (1990) и Руководством по доклиническим методам исследования фармакологических веществ (2000); мясопептонную среду с 2% лактозы; 20% нормальную лошадиную сыворотку и 10% дрожжевой экстракт, в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата-плацентарной эмбриональной маточной массы (ФГПЭМ) с добавлением 0,5% глюкозы и 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС); дрожжевые грибы *Sacchanonyces cerevisiae* на агаре Сабура.

В качестве структурных компонентов отдельных микроорганизмов (протективный антиген, анатоксин, радиотоксин, экзо- и эндотоксин, полисахариды *E.coli*, листерии (шт.799)), использовали препараты собственного изготовления. Как специальные структурные компоненты микробных клеток, использовались полисахариды (полисахаридно-пептидные комплексы), полученные из кишечной палочки, сальмонелл.

Для моделирования радиационных поражений животных использовали гамма-установку «Пума», ведомственная принадлежность гамма-установки ГУБ-20 «Пума» - Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, с источником излучения ^{137}Cs с мощностью экспозиционной дозы излучения $3,13 \times 10^{-5}$ Кл(кг*с). С целью индуцирования радиотоксинов микробные клетки облучали на гамма-установке «Исследователь», изготовлена на заводе «Балтиец»

(г. Нарва), ведомственная принадлежность гамма-установки «Исследователь» - Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, в диапазоне доз 110 до 150 Гр (в зависимости от видовой и штаммовой радиочувствительности микроорганизмов).

В микробиологических и иммунологических исследованиях применяли стандартные растворы, необходимые химические реактивы, сыворотки, антисыворотки, антигены, приборы и оборудование (холодильники, термостаты, водяные бани, центрифуги, спектрофотометры и т.д.).

Методы исследований Получение протективных антигенов, анотоксинов и радиотоксинов *E.coli*, *Sal.typhimurium* осуществляли по методикам, описанными Мухаметшиным И.Р. (2002). Для получения протективного антигена, *E.coli* «ПЛ-6» выращивали на МПА при температуре 37⁰С в течение 24 часов, затем биомассу смывали стерильным 0,85%-ным раствором хлорида натрия, готовили микробную суспензию в концентрации $1,2 \times 10^{10}$ м.к./см³ по оптическому стандарту мутности ГИСК им.Тарасевича и после проверки на чистоту, морфологическую и серологическую типичность проводили в соответствии с общепринятыми в микробиологической практике методами. К бактериальной суспензии добавляли (из расчета 0,5%) порошок гексаметилентетрамина (или формальдегида), тщательно перемешивали и термостатировали при 37⁰С в течение 42 часов с последующей инаktivацией токсина в условиях холодильника при 6±2⁰С в течение 12 суток. По истечении указанной экспозиции, микробную взвесь разводили 0,2 М раствором NaCl до концентрации 30×10^9 м.к./см³ и использовали в качестве протективного антигена *E.coli*.

Для получения анатоксина *E.coli* микроорганизм выращивали в бульоне Хоттингера и на среде со стимулятором токсинообразования - 1,4 бензоксинонгуанилгидразон-токсимикарбазона, предложенной сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ ВНИВИ» проф. Садыковым Н.С. и Низамовым Р.Н. (А.с. SU №1682394, А.с. 12 Q1/04 от 07.10.91, Бюлл. №37).

Посевы выращивали при 37⁰С в течение 5-7 суток, затем к культуре для перевода токсина в анатоксин добавляли формалин или гексаметиленetetрамин, смесь термостатировали в течение 10-12 дней. По истечении указанной экспозиции из смеси осаждали анатоксин путем добавления 10%-ного раствора алюминиевых квасцов из расчета 1% к общему объему, оставляли смесь в течение 2-3 суток, затем супернатант декантировали, а остаток использовали как анатоксин.

Для получения радиотоксина *E.coli*, микроорганизм высевали на твердую питательную среду (МПА) и термостатировали посев при 37⁰С в течение 48 часов, биомассу смывали 0,85%-ным раствором хлорида натрия с рН 7,2. Микробную суспензию трехкратно отмывали центрифугированием, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, доводя концентрацию микробов до $1,2 \times 10^{10}$ м.к./см³, микробную суспензию облучали на гамма-установке «Исследователь» с источником излучения кобальт-60 при мощности экспозиционной дозы 3,11 кГр/ч в дозе 150 Гр с последующим термостатированием облученной культуры. Этаноловое экстрагирование хиноидного радиотоксина (ХТР) из *E.coli* проводили путем добавления в микробную суспензию 75%-ного подкисленного этанола при соотношении компонентов 1:3 и экспозиции 3 часа. Для полного экстрагирования радиотоксина описанную процедуру повторяли три раза. Для деалкоголизации экстракта, полученный материал упаривали на вакуумном испарителе до постоянного объема (например, 1000 см³ смеси микробной суспензии и экстрагента, объем экстрагента составляет 8 ± 2 см³). Деалкоголизированный радиотоксинсодержащий экстракт кашицеобразной консистенции нейтрализовали 0,1 н КОН до нейтрального значения (рН 7.2-7.4).

Для идентификации хиноидного радиотоксина из *E.coli*, деалкоголизированный экстракт подвергали физико-химическому анализу с использованием инфракрасной спектromетрии (ИФК СФМ). Измерения проводили инфракрасным спектрофотометром UR-10 (Польша). Результаты ИФК-анализа показали, что в исходном экстракте содержится бензольное кольцо и

орто-расположенные карбольные группы. Так, спектр в УФ-области деалкаголизированного экстракта – радиотоксина показывает, что в его структуре имеются ароматические кольца (максимум поглощения 265 и 275 нм) и карбольные группы (макс. 305-310 нм). Спектр инфракрасной области указывает на наличие гидроксильных (3410 см^{-1}), карбонильных в ароматическом ядре (хиноны: 2865 см^{-1} ; 1745 см^{-1} ; 1658 см^{-1} ;) и связей C-H и C=O (980 см^{-1} ; 2935 см^{-1}). Качественная реакция на хиноны (йодкрахмальная с флюороглюцином, 2,4-динитрофенилгидразином) была положительной. Результаты сопоставительного анализа химического состава полученного этанолового экстракта и стандартных растворов химического соединения позволили идентифицировать, что полученный продукт представляет собой комплекс глутаминполипептида и хлораминовой кислоты (О-хинонов) - фенолоно-хиноидный радиотоксин (ФХРТ).

Инактивацию бактериальных вакцинных препаратов проводили путем нагревания при 65°C в течение 30 минут, а споровых форм – путем гидробаротермического воздействия (автоклавирувания) при температуре 120°C и давлении 1,5 атм в течение 1 часа. Радиоинактивацию вакцин, патогенных и условно патогенных штаммов микроорганизмов проводили на гамма-установке «Исследователь» с источником излучения кобальт-60 при мощности экспозиционной дозы 3,11 Гр/ч и неравномерности дозного поля не более 10%.

Неспорообразующие и спорообразующие микроорганизмы культивировали при 37°C на твердой питательной среде (МПА), *B.cereus* - при 30°C на богатой среде Сабуро; дрожжи при 32°C на антигенной сахарозно-аммонийной среде. Выросшие культуры смывали и разводили физиологическим раствором до концентрации 1×10^9 м.к./мл. Работу с микроорганизмами проводили по стандартам метода (Биргер М.С., 1982).

Для извлечения полисахаридно-пептидных комплексов тест-микробы после 20-часового выращивания на соответствующих питательных средах (агаровые культуры), смывали и несколько раз промывали дистиллированной водой или физиологическим раствором с последующим центрифугированием, после чего

микробную массу центрифугировали в десятикратном (по весу) количестве 0,25н раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Суспензию оставляли на месте в течение 3 часов, затем центрифугировали при 8000-10000 об/мин в течение 30-45 минут, что является вполне достаточным, чтобы получить жидкость, лишенную взвешенных частиц. Полученную жидкость нейтрализовали добавлением углекислого натрия с применением фильтрата в качестве индикатора. Образовавшийся небольшой осадок щелочноземельных солей отделяли центрифугированием и получали слегка желтоватую опалесцирующую жидкость. Очистку экстракта от растворителя и других макромолекулярных органических и минеральных примесей осуществляли путем диализа через коллоидную мембрану. Диализ проводили против проточной водопроводной воды - в течение 2 суток, а затем против дистиллированной воды в течении 1 суток. Из отдиализированного раствора полисахаридный комплекс (антиген) осаждали спиртом (3-5 объемов) или ацетоном. Жидкость (супернатант) удаляли центрифугированием, а осадок (центрифугат) промывали спиртом, затем эфиром и высушивали в вакууме.

Для выделения ДНК, соответствующие штаммы-продуценты микроорганизмов выращивали на питательных средах (эшерихии, сальмонеллы - на обычном МПА и МПБ, микоплазмы - на среде Мартена с добавлением 20% нормальной лошадиной сыворотки, 10% дрожжевого экстракта и 100 Ед/мл пенициллина). Выделение ДНК из клеток штаммов-продуцентов осуществляли в соответствии с «Методическими указаниями МУК 4.1./4.2.588-96» «Выделение ДНК из клеток штаммов-продуцентов» (утв. МЗ РФ 31 октября 1986 г.). Для этого 1 г биомассы клеток-продуцентов суспендировали в 20 мл буфера ТЕ (раствор трисс-НСl+раствор трилон- Б), добавляли 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS) до конечной концентрации 1%, лизировали в течение 15 минут, перемешивая. К полученному лизату добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1). Смесь встряхивали в течение 15 минут, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 минут, собирали верхний слой (без интерфазы) и

повторяли экстракцию фенол-хлороформом еще дважды. Собирали верхний слой, добавляли раствор 5 моль/л ацетата аммония до конечной концентрации 2,2 моль/л и 2-2,5 объема охлажденного до -20°C этилового спирта, затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 минут. Этиловый спирт сливали, осадок высушивали на воздухе и растворяли в 1,5 мл буфера TE. К раствору ДНК добавляли раствор РНКазы (10 мг/мл) до конечной концентрации 50 мкг/мл. Смесь выдерживали при термодинамическом помешивании в течение одного часа при 37°C , после чего добавляли сухую лиофилизированную протелиазу К до конечной концентрации 100 мкг/мл. Смесь инкубировали, периодически помешивая, в течение 30 мин при 37°C , затем депротеинизировали равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1) и далее равным объемом хлороформа. К водной дозе добавляли раствор 5 моль/л ацетата аммония до конечной концентрации 0,25 моль/л и 2 объема охлажденного до -20°C этилового спирта. Выпавший осадок ДНК собирали центрифугированием, промывали при комнатной температуре для удаления осадков этанола и растворяли в 2 мл буфера TE. Буферный раствор TE готовили путем внесения 1,0 мл раствора трисс-НСI при концентрации 1 моль/л рН 8,0 в градуированный химический стакан, прибавления 0,2 мл буферного раствора трилона-Б в концентрации 0,5 моль/л с рН 8,0 и добавления дистиллированной воды до 100,0 мл; раствор хранили в течение одного месяца при $4-6^{\circ}\text{C}$.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически при длине волны 256 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. 30 мл раствора ДНК разводили буфером TE до 3,0 мл, помещали в кювету спектрофотометра и определяли оптическую плотность раствора. В качестве контроля использовали буфер TE. Концентрацию полученного раствора ДНК (СДНК, мкг/мл) вычисляли по формуле:

$$\text{ДНК(СДНК)} = A \times \varepsilon \times P \quad (1) \text{ где:}$$

A - оптическая плотность раствора при длине волны 256 нм;

Э - 50мкг/мл (при такой концентрации оптическая плотность раствора ДНК при 256 нм равна одной оптической единице)

Р - кратность разведения исследуемого раствора, в данном случае равна 100.

Пример расчета: в результате спектрофотометрического анализа раствора ДНК установлено, что оптическая плотность раствора при 256 нм составляет 0,2 оптические единицы. Тогда: $С_{ДНК} = 0,2 \times 50 \times 100 = 1000$ мкг/мл (1 мг/мл).

Содержание нуклеиновых кислот (НК) определяли по методу Спирина. Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности гидролизатов препарата, характеризующий содержание фосфора нуклеиновых кислот.

Для определения содержания нуклеиновых кислот в гидролизатах клеток вышеперечисленных микроорганизмов к 1 мл препарата (15-20 мкг нуклеиновых кислот) прибавляют 5 мл 0,5 моль/л раствора хлорной кислоты. Смесь нагревали в водяной бане в течение 20 минут. После охлаждения пробы центрифугировали в течение 20 минут при 2000 об/мин. Измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете толщиной слоя 10 мм при длинах волн 270 нм и 290 нм по сравнению с контрольным раствором, которым служил раствор хлорной кислоты в концентрации 0,5 моль/л.

Содержание нуклеиновых кислот в микроорганизмах на 1 мл вычисляли по формуле:

$$x = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} 10,3 \times 6 \quad (2) \quad , \text{ где}$$

D_{270} и D_{290} - значения оптической плотности при соответствующей длине волны;

0,19 - удельная экстинкция;

10,3 - коэффициент пересчета количества фосфора на нуклеиновые кислоты;

6 - разведение препарата.

Метод применим при выполнении условия: D_{270} и D_{290} не должны отличаться более чем на 15%.

Оптическую плотность определяли в кювете толщиной слоя 10 мм на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 625 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 2 мл антронового реактива и 1 мл растворителя, используемого для приготовления исследуемого препарата. По калибровочному графику находили содержание сахаров в препарате. Для построения калибровочного графика брали 0,01 г (точная навеска) глюкозы, растворяли его в мерной колбе емкостью 100 мл в воде и доводили объем раствора водой до метки (0,01%-ный раствор). К 0,1-0,5 мл полученного раствора (10-50 мкг глюкозы) с интервалом 0,1 мл прибавляли воду до 1 мл. Далее анализ проводили, как указано выше.

Содержание углеводов определяли с использованием антронового метода.

Метод основан на способности углеводов после дегидратации образовывать производные фурфурола, которые дают цветную реакцию с антроном (Методические указания МУК 1.1/4.2.588-96). Для этого к 1 мл испытуемого препарата, предварительно охлажденного в бане со льдом, приливали 2 мл свежеприготовленного антронового реактива (0,2 %-ный раствор антрона в концентрированной серной кислоте х.ч.). Смесь тщательно перемешивали и нагревали в кипящей водяной бане в течение 15 минут с последующим охлаждением.

Для индикации колицинов в препарате использовали метод Аббата и Шейлона (Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г., 1966) с использованием эталонных (индикаторных) штаммов *E.coli* K12ROW и JK116. Для этого в экспоненциальной фазе роста бульонной культуры вышеуказанных колициногенных штаммов *E.coli* центрифугировали и растворяли в 5 мл культуральной жидкости изучаемого потенциального радиозащитного препарата и выращивали при 37°C. Через различные промежутки времени пробы центрифугировали и определяли содержание колицина в супернатанте. За единицу колицина принимали то

количество, содержащее в 1 мл максимального разведения центрифугата, задерживающего рост штамма *E.coli* K12ROW на твердой питательной среде. Оптимальную плотность проб определяли до центрифугирования при помощи спектрофотометра СФ-46.

Извлечение эндо- и экзотоксинов из микробов осуществляли по методике Огоняева М.А. (2002). Для получения эндо- и экзотоксинов тест-микробы выращивали на соответствующих жидких питательных средах в течение 10 суток. По истечении указанной экспозиции, биомассу из выросших культур подвергали фракционированию путем центрифугирования бульонных культур, получая при этом фильтраты (супернатант), центрифугат (осадок) и гомогенат (отмытая и разрушенная клеточная биомасса). Эндо- и экзотоксины соответствующих тест-микробов (кишечная палочка, сальмонеллы, микоплазмы) подвергали инактивации (детоксикации) путем добавления в полученные субстраты 0,3% формалина из расчета 0,5% к общему объему.

Полученные вышеуказанным способом и инактивированные формалином эндо- и экзотоксины (анатоксины) использовали в дальнейшем в качестве потенциальных радиопротекторов микробного происхождения.

Предварительную оценку радиозащитной эффективности отобранных ВМП проводили с помощью лимфоцитов, в качестве скринингового инструмента или модели *in vitro*. Выделение лимфоцитов осуществляли согласно модифицированной методике Гайзатуллина Р.Р. (2012). В качестве доноров периферической крови использовали взрослых кроликов. Для выделения лимфоцитов у животных кровь брали из ушной вены в объеме 15-25 см³, смешивали ее с 27% раствором ЭДТА в соотношении 20:1 и центрифугировали на градиенте плотности фиколл-верографин при 700 g в течение 25 минут при комнатной температуре, предварительно осадив эритроциты 4,5% раствором декстрана Т-300. Мононуклеары (центрифугат) дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), не содержащим ионы Ca²⁺ и Mg²⁺. Содержание лимфоцитов в центрифугате варьировало в пределах от 83 до 95%.

Жизнеспособность клеток оценивали по включению флюоресцирующего красителя - 0,01-0,02%-ного эритрозина с последующей оценкой методом световой и флюороресцентной микроскопии.

Для имитации радиационного поражения лимфоциты облучали на гамма-установке «Пума» в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 Гр и инкубировали в течение 24 часов, фиксировали в 70%-но этаноле с последующим микроскопическим цитометрированием.

Для оценки радиозащитной активности применяемых в ветеринарной практике испытуемых препаратов (54 варианта), последние вносили в инкубационные среды с лимфоцитами в оттитрованных количествах (от 0,04 до 0,22 мг/мл, инкубировали в течение 1 часа и подвергали облучению в дозе 5,0 Гр). Далее делали мазки из культуры лимфоцитов, которые после фиксации в трихлоруксусной кислоте окрашивали эритрозином и микроскопировали, определяя количество окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток. Радиозащитную активность испытуемых препаратов определяли по количеству живых лимфоцитов из 100 посчитанных клеток, результаты выражали в процентах (процент выживаемости).

Для получения продуктов метаболизма *E.coli* (шт. ПЛ-6), *B.bifidum* (шт. 1), *B.subtilis* (шт. ВКПМ №2335(3)), *Sal.typhimurium* (шт. 370) культивировали на жидких питательных средах (МПБ и среде Блаурокка) в соответствии с общепринятой в микробиологической практике методом (Справочник ..., 1982).

Для получения продуктов метаболизма *B.bifidum* исходную культуру высевали в анаэробных условиях при 37⁰С в течение 4 суток, определяя в динамике концентрацию бифидобактерий. По достижении максимальной концентрации микробных клеток (2×10^9 КОЕ/мл) и сухого вещества (275 ± 23 мг/мл) в культуральной жидкости, полученную биомассу фракционировали на 3 фракции: нативная культура бифидобактерий (смесь микробов и культуральной жидкости), центрифугат (осадок бифидобактерий после центрифугирования) и

супернатант (надосадочная жидкость после центрифугирования нативной культуры).

Для получения продуктов метаболизма *E.coli* и *Sal.typhimurium* микробы культивировали в аналогичных условиях в МПБ с последующей обработкой их по вышеуказанной схеме, получая по 3 фракции на каждую тест-культуру. При этом плотность культур в стационарной фазе роста (24 ч) составляла $2,05 \times 10^9$ м.к./мл (*E.coli*) и $2,11 \times 10^9$ м.к./мл (*Sal.typhimurium*), содержание сухого вещества в культуральной жидкости - $69,7 \pm 1,7$ мг/мл и $81,5 \pm 2,3$ мг/мл соответственно.

Клетки микроорганизмов отделяли центрифугированием в течение 15 минут при 5000 g. Супернатант культуральной жидкости собирали для определения содержания биологически активных веществ.

Биомассу суспендировали в дистиллированной воде, после чего вновь центрифугировали в течение 13 минут при 5000 g для отмывания компонентов КЖ.

Данная методика обеспечивала получение очищенного и достаточно плотного осадка биомассы влажностью 80-90%. Биомассу охлаждали до 0 °С и далее разрушали ультразвуковой обработкой (22 кГц) в течение 25 минут, после чего отделяли разрушившиеся клетки и фрагменты клеток центрифугированием в течение 15 мин при 1000 g, полноту разрушения клеток контролировали микроскопическим методом. В полученном супернатанте определяли содержание антиоксидантного фермента - пероксидазы как оценочного критерия биологической активности КЖ.

Активацию бентонита проводили путем его селективного фракционирования по Пручковой З.В. и др. (1982). Для этого бентонит подвергали специальной обработке соляной кислотой с целью разрушения карбонатов, содержащихся в составе глины. Для разрушения карбонатов глину обрабатывали в течение 40 мин 1н HCl, затем супернатант удаляли, заливали 0,1н HCl, периодически перемешивали. Обработку проводили в течение 35 минут. Супернатант декантировали, образовавшиеся растворимые соли и кварц удаляли

отмыванием дистиллированной водой. Для этого глину с помощью воды переносили в вегетационные стаканы (20x12 см), на которые наносили метки: первая на высоте 3 см от дна, вторая - на 7 см выше, третья - на 7 см выше второй. Дистиллированную воду доливали до третьей метки, диспергировали в ней бентонит и ставили на 12 ч для отстаивания. После осаждения твердой части глины и образования над ней прозрачной жидкости последнюю удаляли и вновь заливали дистиллированной водой до верхней метки. Когда суспензия оставалась во взвешенном состоянии, приступали к отмыванию частиц величиной 0,0006-0,0009 мм (60-90 мкм). Для этого в стакан наливали дистиллированную воду до верхней метки, содержимое перемешивали, через 24 часа погружали споры на глубину 7 см и с помощью воды суспензию переливали в стакан-приемник. Отмывание продолжали до просветления суспензии, затем высушивали на водяной бане. Таким образом получали очищенную фракцию бентонита.

Для получения апизана собирали свежепогибших, сухих, без признаков разложения пчел. Сырье пересевали через сито с крупными ячейками, чтобы отделить его от мелкого мусора. После этого подмор высушивали до влажности 3-4 %. Сухой материал подвергали гомогенизации на шаровой мельнице до размера частиц 3-4 мм. Степень дискретности контролировали микроскопически. В полученный порошок добавляли 30% ный раствор NaOH в соотношении 1:3 по массе и проводили дезацетилирование при 75⁰С в закрытом сосуде без доступа воздуха в течение 6 часов, проводили фильтрацию смеси, фильтрат промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH. Перед фильтрацией смеси проводили активацию хитина путем радиационной обработки хитинсодержащего продукта с целью радиолиза хитина. Радиолиз хитина осуществляли путем облучения депротеинированного и дезацетилированного хитиносодержащего продукта гамма-лучами ¹³⁷Cs на гамма-установке «Пума» в дозе 10,0 Гр при мощности экспозиционной дозы 3,13x10⁻⁵Кл/кг.с. Облученный продукт после фильтрации промывали дистиллированной водой и подвергали лиофилизации. Полученный продукт представлял собой порошок светло-коричневого цвета,

растворимый в воде и содержащий 40-43% белка, 20-22% хитина, 2-3% минеральных веществ, 1-2% золы, вязкость 9-60 с ПЭ и степенью деацетилирования 80-85%.

Идентификацию хитозана и его химических компонентов проводили по Погарской Н.В. (2008) методом ИК-спектроскопии на комплексе ИК-Фурье спектрометра Scimitar 800 (Польша) с инфракрасной приставкой Miracle в диапазоне волновых чисел 4000-500 см^{-1} . Интерпретация ИК-спектров полученного ализана, на которых регистрировались полосы поглощения сопряженных углеродных связей при 1650 см^{-1} , карбоксильных – при 1736 см^{-1} и 1712 см^{-1} , гидроксильных – при 3288 см^{-1} и 1170 см^{-1} , валентных колебаний метильных и метиленовых групп в области 2900-2810 см^{-1} , деформационных колебаний аминогруппы – при 1600 см^{-1} , подтвердила их групповую принадлежность к полимерам - хитозану животного происхождения. Определение острой токсичности полученного препарата проводили на белых мышах по ГОСТ 12.1.007-76. По результатам опыта определили LD_{50} по формуле Кербера.

Токсичность, безвредность, раздражающее действие и энтеротоксичность продуктов метаболизма *E.coli* определяли согласно методическим рекомендациям Першина Г.Н. (1971), «Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы», утвержденные Начальником Департамента ветеринарии Минсельхозпрода Российской Федерации. 17.10.1997 №13-5- 2/1062.

Морфологические исследования периферической крови и костного мозга проводили общепринятыми в радиационной гематологии методиками (Жербин Е.А., Чухловин А.Б., 1989).

При проведении радиоинактивации вакцинных, непатогенных и патогенных штаммов микроорганизмов руководствовались Правилами радиационной микробиологии, разработанными ИЭМ им. Н.Ф.Гамалея АМН СССР.

Радиочувствительность микроорганизмов к ионизирующему излучению варьирует в значительных пределах у различных видов бактерий, у разных штаммов одного и того же вида и зависит от их концентрации, наличия белковой

защиты в среде суспендирования бактериальных клеток и химических компонентов. Используемые в опытах микроорганизмы (вакцинные штаммы, патогенные и условно патогенные бактерии, вирусы, пробиотики) подвергали воздействию гамма-лучей в широком диапазоне доз от 1,0 до 30,0 кГр. При изготовлении радиоантигенов придерживались указанных условий облучения.

Послеубойный ветеринарно-санитарный осмотр осуществляли в соответствии с «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов» (1988). При ветеринарно-санитарной экспертизе туш и продуктов убоя определяли выход мяса и внутренних органов. Определение свежести мяса и мясопродуктов проводили по органолептическим, биохимическим и бактериологическим показателям согласно ГОСТ 21237-75, ГОСТ 23392-78, ГОСТ 7269-79 и «Правил ветсанэкспертизы мяса и мясопродуктов» (1988) и СанПиН 2.3.2.1078-01.

Степень обескровливания туш определяли по Загаевскому, концентрацию водородных ионов на иономере универсальном ЭВ-74.

В мышечной ткани определяли содержание общего азота по Кьельдалю, жира - жироскопом, воды, минеральных и сухих веществ, калорийность - общепринятыми методами (В.Г. Колоболоцкий 1966).

Биологическую ценность мяса, полученного от облученных и иммунизированных до облучения животных, определяли в опытах на растущих крысах-самцах, мышах, скармливая им испытуемое мясо в течение 28 дней в соответствии с рекомендациями ВАСХНИЛ (1977). При оценке биологической полноценности испытуемых образцов мяса у подопытных животных учитывали общее состояние и росто-весовые показатели, выживаемость, гематологические показатели, а у мышей и воспроизводительную функцию, определяли плодовитость, жизнеспособность, оплодотворяемость, тератогенность. Оценку генетических эффектов от длительного скармливания мяса облученных и иммунизированных до

облучения животных проводили методом изучения хромосом клеток периферической крови в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке отдалённых последствий ионизирующих излучений» (2000).

Полученный цифровой материал подвергали статистической обработки на компьютерной программе «Statistika 6».

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Подготовка и получение технологического сырья из веществ микробного происхождения (ВМП) для конструирования на их основе биологических радиопротекторов

Вышеперечисленные вещества микробного происхождения (вакцины, пробиотики, антигены, целые и разрушенные клетки микроорганизмов, их компоненты и метаболиты) были испытаны как в нативном (живые), так и убитом (баротермическая инаktivация вегетативных, споровых и вирусных форм микроорганизмов, радиоинаktivация гамма-лучами с последующим получением радиоантигенов и радиовакцин) виде.

Результаты радиомикробиологических исследований показали, что полная инаktivация использованных в опытах вакцинных штаммов и вегетативных форм бактерий, имеющих концентрацию 1×10^9 м.к./мл, наступала в диапазоне доз гамма-лучей от $0,25 \times 10^4$ до $3,2 \times 10^4$ Гр. Эти же дозы были применены для детоксикации радиоантигенов, приготовленных из вегетативных форм микроорганизмов вакцинных и сопрофитных штаммов; эффективными оказалась доза гамма-лучей кобальта-60 от $3,5 \times 10^4$ Гр до $10,5 \times 10^4$ Гр.

Для полной гарантии инаktivации использованные в опытах вегетативные формы вакцинных, патогенных штаммов микроорганизмов и извлекаемых из них радиоантигенов облучали в дозах от $0,25 \times 10^4$ Гр до $3,2 \times 10^4$ Гр, а споровые формы - в дозах от $3,5 \times 10^4$ Гр до $10,5 \times 10^4$ Гр.

Были проведены исследования по получению протективных веществ микробного происхождения. Часть из них (полисахарид сальмонелл паратифа Б, простой полисахарид, полисахарид дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, брюшнотифозный Ви-антиген, антиген шигелл, О-антигены кишечной группы, брюшно-тифозный эндотоксин, протейной эндотоксин, липид *Salmonella*

minnesota, липид А из кишечной палочки в липосомах) были приобретены в коммерческой системе «Медбиопроба» НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.И.Габричевского.

В качестве структурных компонентов отдельных микроорганизмов (протективный антиген, анатоксин, радиотоксин, экзо- и эндотоксин, полисахариды *E.coli*, полисахарид, эндотоксин листерии (шт.799)) использовали препараты собственного изготовления, методы и способы получения которых изложены выше.

Получение протективных антигенов, анатоксинов и радиотоксинов *E.coli*, *Sal. typhimurium* осуществляли по методикам, описанными Мухаметшиным И.Р. (2002).

Полученный по вышеуказанной методике препарат разводили физиологическим раствором с рН 7,2 до 10%-ной концентрации и использовали в дальнейшей работе в качестве хиноидного радиотоксина (ХТР).

В соответствии с вышеописанной методикой, параллельно получали протективный антиген, антитоксины и радиотоксины из дрожжей, сальмонелл, листерий, фузобактерий с той лишь разницей, что для выращивания перечисленных микроорганизмов и получения биомассы использовали соответствующие питательные среды. Так, для выращивания сальмонелл использовали бульон (МПБ, ГОСТ 24730-75) и мясопептонный агар (МПА, ТУ 46-12-252-78), листерий-МПБ и бульон Хоттингера, дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* - агар Сабуро.

Выращенные на питательных средах микроорганизмы после суспендирования в физиологическом растворе (рН 7,2), с целью индуцирования радиотоксинов облучали на гамма-установке «Исследователь» в диапазоне доз 110 до 150 Гр (в зависимости от видовой и штаммовой радиочувствительности микроорганизмов). Указанные дозы облучения, обеспечивающие максимальный синтез радиотоксина, были предварительно установлены экспериментальным путем.

С использованием вышеприведенной методики получения радиотоксинов, из тест-микроорганизмов были изготовлены 6 видов хиноидных радиотоксинов из кишечной палочки, сальмонелл, микоплазм, листерий, фузобактерий и дрожжей, которые были испытаны в качестве потенциальных радиозащитных препаратов.

В качестве структурных компонентов веществ микробного происхождения, в работе использовали эндо- и экзотоксины эшерихий, сальмонелл, листерий, микоплазм, которые длительно (в течение 10 суток) выращивали на соответствующих питательных средах (бульонные культуры). Извлечение эндо- и экзотоксинов осуществляли по методике Луипольда Г., модифицированной Григоряном С.Л. и Огонясяном М.А. (2002). В качестве источников эндо- и экзотоксинсодержащих материалов использовали супернатанты и центрифугаты культур испытуемых видов микроорганизмов.

Полученные эндо- и экзотоксины (анатоксины) использовали в дальнейшем в качестве потенциальных радиопротекторов микробного происхождения.

В качестве специальных структурных компонентов микробных клеток, обладающих радиопротекторными свойствами, использовали полисахариды (полисахаридно-пептидные комплексы), полученные из кишечной палочки, сальмонелл и микоплазм.

С учетом литературных данных о том, что из многих существующих методов извлечения полисахаридных комплексов из микроорганизмов, разведенной трихлоруксусной кислотой, нейтральным органическим растворителем - диэтиленгликолем, раствором глюкозы, раствором фенола, ферментативным расщеплением трипсином, воздействием ультразвука, методом электролиза), наиболее оптимальным является экстрагирование комплексных полисахаридно-пептидных комплексов трихлоруксусной кислотой по Буавену (Стручкова, И.В. 2012).

Для извлечения полисахаридно-пептидных комплексов тест-микробы выращивали на соответствующих питательных средах используя вышеописанную методику.

Были получены 8 образцов полисахаридных комплексов из микробных клеток эшерихий (*E.coli* «ПЛ-6»); сальмонелл (*Sal. typhimurium* шт. 370, 371; *Sal. enteritidis* шт. 418), листерий (*L.monocytogenes*, шт. 799 I серотипа), микоплазм (*M.agalactiae*, шт. А-319М, аттенуированная вакцина, выпускаемая АзНиВи, ТУ 10.07.107-89).

С учетом литературных данных о том, что одним из важнейших структурных компонентов микроорганизмов, обладающих радиозащитным эффектом, являются нуклеиновые кислоты (НК), ДНК и РНК, проводили опыты по выделению ДНК из клеток эшерихий (*E.coli* «ПЛ-6»); сальмонелл (*Sal. Typhimurium*, шт. 370, 371; *Sal. enteritidis* шт. 418), микоплазм (*M. agalactiae*, шт. А-319М, аттенуированный вакцинный). Выделение ДНК из клеток штаммов-продуцентов осуществляли в соответствии с «Методическими указаниями МУК 4.1./4.2.588-96» «Выделение ДНК из клеток штаммов-продуцентов».

С использованием вышеуказанной методики, были получены 5 видов ДНК из клеток эшерихий, сальмонелл, листерий, фузобактерий и микоплазм.

В гидролизатах из микроорганизмов проводили определение содержания нуклеиновых кислот (НК) по методу Спирина (Методические указания МУК 4.1/4.2.511-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям», утв.МЗ РФ 31.10.1996г., п.6. «Контроль содержания примесей клеточных ДНК в биологических препаратах»).

С использованием вышеприведенной методики было проведено определение содержания нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в гидролизатах из бактериальных клеток эшерихий, сальмонелл, листерий, фузобактерий и микоплазм. На основании сопоставительного анализа содержания нуклеиновых кислот и радиозащитной активности препаратов из указанных микроорганизмов проводили отбор компонентов из указанных микроорганизмов в качестве потенциальных радиопротекторов.

В результате проведенных на первом этапе исследований были получены вещества микробного происхождения; источники, условия получения и количество использованного материала представлены в таблице 1.

Из представленных в таблице 1 данных видно, что в результате проведенной работы были получены 180 видов ВМП, из которых 57 представлены в виде антибактериальных и противолучевых нативных (19), термоинактивированных (19) и радиоинактивированных вакцин (19), нативного (11) и радиомодифицированного (11) пробиотика, 26 термоинактивированных (13) и радиоинактивированных (13) условно патогенных микроорганизмов, 20 нативных (10) и радиомодифицированных (10) и собственного изготовления (45), включающих полисахариды, Ви-, О-антигены, эндо-, экзотоксины, нуклеиновые кислоты, ДНК, радиотоксины, протективные антигены, липиды.

Полученные вещества микробного происхождения на следующем этапе были подвергнуты скрининговым исследованиям с целью выявления из них наиболее активных радиозащитных структурных компонентов микроорганизмов.

Таблица 1 - Виды, условия получения и количество веществ микробного происхождения, использованных в качестве исходного материала для конструирования биопрепаратов

Технологический материал на основе ВМП	Способ получения и обработки технологического сырья						Кол-во ВМП
	нативные	термоинактивация	радиоинактивация	этаноловое экстрагирование	формализирование	экстрагирование трихлоруксусной кислотой	
Вакцины	19	19	19				57
Пробиотики	11		11				22
Патогенные и условнопатогенные микроорганизмы		13	13				26
Спорообразующие бациллы-сапрофиты	10		10				20
Структурные компоненты микробных клеток (полисахариды, Ви-антиген, О-антиген, эндотоксин, липид) - коммерческие	10						10
Структурные компоненты микробных клеток (нуклеиновые	18		6	7	6	8	45

продолжение таблицы 1

кислоты, ДНК, полисахариды, эндо-, экзотоксины, радио- токсины, протективные антигены - препараты собственного изготовления							
ИТОГО	68	32	26	7	6	8	180

2.2.2 Скрининг и отбор наиболее активных веществ микробного происхождения в *in vitro* тест–системе

Полученные вещества микробного происхождения на втором этапе были подвергнуты предварительному (скрининговому) исследованию с использованием модельной *in vitro* тест-системы- культивирование лимфоцитов периферической крови животных совместно с испытуемыми агентами.

Выбор *in vitro* модели для скрининговых исследований был обусловлен тем, что, во-первых, для предварительной оценки радиозащитной активности 180 препаратов в *in vivo* тест-системе потребовалось бы использование дефицитных и дорогостоящих 540 белых мышей или белых крыс (из расчета минимум 3 животных на каждый препарат) и, во-вторых, согласно данным зарубежных исследований (Паске Л.Д. и др., 1988), лимфоциты являются наиболее доступным и адекватным материалом в клинике и эксперименте для оценки эффективности тестируемых лекарственных фармакологических препаратов.

Поэтому в скрининговых исследованиях для предварительной оценки радиозащитной эффективности отобранных ВМП использовались лимфоциты в качестве скринингового инструмента или модели *in vitro*.

Выделение лимфоцитов (смешанную культуру лимфоцитов - СКЛ) осуществляли согласно методике Schutt Ch., Wegener S. (1980) в модификации Гайзатуллина Р.Р. (2012). В качестве доноров периферической крови использовали взрослых кроликов.

Результаты цитометрии мазков с облученными в различных дозах лимфоцитами показали, что при облучении испытуемых культур в дозе 5,0 Гр наступила 100% ная (99,9%) гибель клеток - в исследуемых мазках обнаруживали нежизнеспособные клетки, о чем свидетельствовало наличие окрашенных эритрозином лимфоцитов.

Установленная экспериментальным путем летальная доза гамма-лучей для тест-культуры (лимфоцитов) в скрининговых исследованиях была использована для моделирования радиационных поражений *in vitro* тест-системы и определения выживаемости летально облученных при инкубировании их в присутствии испытываемых потенциальных радиопротекторов - веществ микробного происхождения.

Перед началом модельных скрининговых опытов предварительно изучали влияние испытываемых средств - компонентов потенциальных биорадиопротекторов на жизнеспособность лимфоцитов и экспериментально определяли оптимальные концентрации, не оказывающие угнетающего действия на метаболизм клеток в условиях культивирования в присутствии испытываемых веществ микробного происхождения.

Поскольку испытываемые препараты имели различное физическое состояние (жидкие, лиофилизированные вакцины, растворы и порошки структурных компонентов микробных клеток: токсины, радиотоксины, полисахариды, липиды), с целью унифицирования физического состояния вносимых в инкубированные культуры клеток испытываемых средств, их переводили в единую – твердую - форму. Перевод жидких вакцин и растворов структурных компонентов клеток микроорганизмов в твердую (порошковую) форму осуществляли путем лиофилизации или подсушивания испытываемых ВМП известными общедоступными методами.

Количество вносимых в суспензию инкубируемых культур клеток (лимфоцитов) при этом составляло от 0,1 до 0,32 мг/мл. Использование указанных концентраций вносимых в инкубированные среды веществ микробного происхождения обусловлено тем, что концентрация микробных клеток в жидких вакцинах колеблется, в зависимости от вида вакцин, от 5×10^9 до 20×10^9 м.к./мл, а содержание сухого вещества в бактериальных клетках с концентрацией 1 млрд.кл/мл составляет, в зависимости от размера клеток, от 0,11 до 0,32 мг, количество вносимых вакцинных препаратов в инкубационные среды составляло в среднем $0,22 \pm 0,03$ мг/мл.

Что касается количества вносимых в инкубационные среды структурных компонентов и метаболитов микроорганизмов (полисахариды, экзо- и эндотоксины, радиотоксины, липиды, нуклеиновые кислоты), расчет вносимых количеств этих субстанций проводили исходя из токсичности указанных веществ для лабораторных животных. Согласно соответствующим инструкциям, ЛД₅₀ экзо- и эндотоксинов, радиотоксинов, микробов кишечного-паратифозной группы, составляет $0,44 \pm 0,07$ мг/кг, поэтому использовали для экзо- и эндотоксинов и радиотоксинов концентрацию в пределах от 0,04 до 0,09 мг/мл, т.е. 1/10 часть токсичной дозы.

Что касается атоксичных структурных компонентов микробных клеток (анатоксинов, полисахаридов, ДНК, НК, липидов, О-, Ви-антигенов), то вносимые в инкубационные среды количества составляли в среднем $0,20 \pm 0,05$ мг/мл.

С учетом вышеприведенных расчетов, проводили опыты по изучению возможного токсического влияния испытуемых веществ микробного происхождения на инкубируемые культуры клеток (лимфоцитов) путем внесения их в среду инкубирования в концентрациях от 0,04 до 0,22 мг/мл и инкубирования клеток в течение 4, 24 и 48 часов. Результаты динамических цитологических исследований показали, что внесение вышеуказанных количеств испытуемых агентов в среду культивирования лимфоцитов токсического влияния не оказывало, в мазках, окрашенных эритрозин, достоверного увеличения количества нежизнеспособных клеток по сравнению с контролем не обнаружено.

Следовательно, концентрации вносимых в инкубационные среды испытуемых веществ микробного происхождения, в зависимости от свойств биопрепаратов (вакцина, микробные клетки, патогенные и условно патогенные микроорганизмы, пробиотики, структурные компоненты микроорганизмов), составляли от 0,04 до 0,22 мг/мл.

Полученные в предварительных опытах данные по определению оптимальной концентрации вносимых в инкубационную среду культивирования лимфоцитов тестируемых агентов и установлению их токсичности (анатоксичности) для клеток *in vitro* тест-системы послужили основанием для

проведения скрининговых исследований по отбору наиболее активных веществ микробного происхождения с целью конструирования на их основе микробного биопрепарата.

В соответствии с алгоритмом исследований, в первой серии опытов данного этапа работы проводили скрининговые исследования по оценке радиозащитной активности применяемых в ветеринарной практике 54 вариантов противобактерийных и противовирусных вакцин: против сибирской язвы, бруцеллеза (3 шт.), рожи свиней, сальмонеллеза, дизентерии, паратифа, колибактериоза, туляремии, агалактии мелкого рогатого скота, гриппа, бешенства, псевдобешенства (болезнь Ауески), инфекционного ринотрахеита, 19 из которых представляют собой нативные (живые), 19 - термоинактивированные и 19 - радиоинактивированные варианты вакцин.

Результаты проведенных исследований показали, что из исходных 54 вариантов вакцин, 6 препаратов (сальмонеллезная, туляремиальная, дезинтерийная, паратифозная, колибактериозная и вирус-вакцина против гриппа) обладали радиозащитными свойствами (табл. 2).

Таблица 2 - Радиозащитная активность вакцинных препаратов в in vitro тест-системе (инкубируемых облученных лимфоцитов)

№ п/ п	Вакцина	Воздействие на вакцину и выживаемость лимфоцитов, %.					
		живые	% защиты	термо- инактиви- рованные	% защиты	радио- инактиви- рованные	% защиты
1	Туляремиальная	+	59,7	+	54,1	+	51,5
2	Гриппозная	+	57,3	+	56,1	+	55,7
3	Дизентерийная	+	50,1	+	48,7	+	56,3
4	Паратифозная	+	51,9	+	59,5	+	67,9
5	Колибактериозная	+	57,8	+	54,3	+	68,3
6	Сальмонеллезная	+	53,7	+	49,9	+	59,9

Из представленных в таблице 2 данных видно, что испытанные вакцинные препараты обладали достаточно высокой радиозащитной активностью (выше 50%-ной защиты, что соответствует техническим требованиям - ВТТ по поиску радиозащитных препаратов). При этом установлено, что физическое воздействие (термическое и радиационное) по-разному влияет на вакцинные штаммы микроорганизмов. Так, из живых вакцин высокой радиозащитной активностью обладали туляреминая (59,7%), гриппозная (57,3%) и колибakterиозная (57,8%) вакцины, термическое воздействие вызывало, в основном, снижение радиозащитной активности, за исключением паратифозной вакцины, которая по радиозащитной активности превышала исходный вариант (живые вакцины) в 1,13 раза. В отличие от термического фактора, радиационное воздействие на вакцинные штаммы микроорганизмов оказывало, в основном, стимулирующее действие - радиозащитная активность облученных дизентерийной, паратифозной, колибakterиозной и сальмонеллезной вакцин была выше в 1,12; 1,31; 1,18 и 1,12 раза соответственно по сравнению с исходным уровнем (применение живых вакцин).

Таким образом, из испытанных 54 вариантов вакцинных препаратов 6 обладали достаточно высокой радиозащитной активностью, обеспечивая выживаемость 50,1-68,5% летально облученных лимфоцитов. При этом установлено, что из живых вакцин 3 препарата (туляреминая, гриппозная и колибakterиозная) оказались наиболее активными, защищая от радиационной гибели 59,7%; 57,3% и 57,8% летально облученных лимфоцитов соответственно. Термическое воздействие на испытываемые вакцинные штаммы оказывало отрицательное воздействие, снижая уровень защиты облученных лимфоцитов в 1,01-1,09 раза. Исключение составляла термоактивированная паратифозная вакцина, которая проявляла максимальную радиозащитную активность (59,5%), которая была выше в 1,13 раза по сравнению живых вариантов микроорганизма.

Радиационное воздействие на испытываемые микроорганизмы сопровождалось модификацией радиозащитной активности, обеспечивая

максимальный уровень защиты облученных лимфоцитов до 68,5% (колибактериозная) и 67,9% (паратифозная вакцина).

Параллельно изучали возможность и эффективность лечебного варианта применения испытуемых вакцинных препаратов путем пострadiaционного внесения ВМП в культуру клеток. Моделирование лечебного варианта испытания препаратов предполагает внесение их в инкубационную среду после облучения лимфоцитов через определенный промежуток времени. Учитывая физиологические особенности биологической модели – лимфоцитов, испытуемые агенты в лечебном варианте применения вносили через 1 час после пострadiaционного инкубирования культур клеток в вышеуказанных количествах. Результаты диагностического цитометрирования мазков лимфоцитов через 4; 24 и 48 часов культивирования с испытуемыми агентами показали, что пострadiaционное внесение препаратов из вакцинных штаммов не оказывало лечебного действия- процент гибели лимфоцитов не имел достоверных отличий от контрольных (облученных) культур клеток.

Во второй серии опытов изучали радиозащитную активность другой группы веществ микробного происхождения - структурных компонентов микроорганизмов. Были испытаны 55 видов структурных компонентов микробных клеток биофабричного (10) и собственного (45) изготовления, включающих полисахариды, Ви-, О-антигены, эндо- и экзотоксины, нуклеиновые кислоты, ДНК, радиоантигены, радиотоксины, протективные антигены, липиды.

Радиозащитную активность антигенных структурных компонентов микроорганизмов испытывали в двух вариантах применения: профилактическом (прединкубационное инкубирование ВМП до летального облучения - предрадиационное инкубирование в течение 1 часа до облучения) и лечебном (пострадиационное внесение ВМП через 1 час после облучения лимфоцитов).

Подвергнутые лечебному и профилактическому воздействию испытуемых средств облученные в летальной дозе лимфоциты инкубировали в течение 4; 24 и 48 часов, в динамике брали пробы из соответствующей культуральной среды и

готовили мазки лимфоцитов на предмет изучения выживаемости клеток на фоне применения испытуемых структурных компонентов микроорганизмов.

Результаты динамических исследований мазков инкубируемых лимфоцитов в присутствии испытуемых средств представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Радиозащитная активность структурных компонентов микроорганизмов в *in vitro* тест-системе

№ n/n	Структурный компонент микроорганизмов	Доза вносимого ВМП в инкубационную среду, мг/мл	Выживаемость клеток, %
1	Полисахарид сальмонелл паратифа Б	0,22	63,3±3,3
2	Полисахарид дрожжей	0,18	59,7±1,7
3	О-антиген микробов кишечной группы	0,09	67,7±2,3
4	Брюшнотифозный эндотоксин	0,05	59,9±1,1
5	Эндотоксин кишечной палочки	0,04	73,9±1,7
6	Протективный радиотоксин кишечной палочки	0,11	74,5±2,5
7	Липиды сальмонелл	0,20	63,9±1,5
8	Липиды из кишечной палочки	0,22	73,3±3,1
9	ДНК из кишечной палочки	0,17	67,5±1,9
10	Радиотоксин из кишечной палочки	0,04	74,1±2,7

Из представленных в таблице 3 данных видно, что из 55 видов структурных компонентов микроорганизмов 10 обладали достаточно высокой радиозащитной активностью, обеспечивая 59,9-74,5%-ную выживаемость подвергнутых прединкубации лимфоцитов в присутствии 0,04-0,22 мг/мл ВМП. При этом высокую радиозащитную активность из испытанных средств проявляли протективный радиоантиген и радиотоксин кишечной палочки (процент защиты – 74,5; 74,1%), эндотоксин кишечной палочки (73,3%). Вторую позицию по степени

радиозащиты занимал О-антиген микробов кишечной группы, который обеспечивал 69,7%-ную защиту летально облученных лимфоцитов от радиационной гибели. Аналогичную степень защиты проявляла ДНК из кишечной палочки, которая обеспечивала 67,5%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов, что уступает предыдущему препарату только в 1,03 раза ($P > 0,05$). Третью позицию по степени радиозащитной активности из испытанных средств занимали полисахариды сальмонелл паратифа Б и липиды сальмонелл, которые обеспечивали 63,3-63,9%-ную защиту летально облученных лимфоцитов от радиационной гибели.

Полисахарид дрожжей и брюшнотифозный эндотоксин по степени радиозащиты занимали последнюю позицию, защищая от радиационной гибели 59,7-59,9% летально облученных лимфоцитов. Однако, несмотря на занимаемую последнюю позицию по степени радиозащиты, указанные препараты, согласно классификации ВТТ (ветеринарно-технические требования) к потенциальным радиозащитным препаратам, обладали достаточно высоким радиозащитным эффектом, поскольку, согласно требованиям ВТТ, испытываемые средства, обладающие 50%-ной активностью, являются пригодными для включения их в список потенциальных радиопротекторов. Учитывая литературные данные о том, что структурные компоненты микроорганизмов, наряду с профилактической радиозащитной активностью, одновременно обладают и лечебными свойствами, были продолжены опыты по изучению лечебного действия структурных компонентов вышеперечисленных микроорганизмов.

Результаты лечебного (пострадиационного, постинкубационного) применения структурных компонентов (внесение испытываемых средств через 1 час после летального облучения лимфоцитов периферической крови) микроорганизмов представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Лечебная активность структурных компонентов микроорганизмов в *in vitro* тест-системе

№ n/n	Структурный компонент микроорганизма	Доза вносимого компонента в инкубационную среду, мг/мл	Выживаемость лимфоцитов, %
1	Эндотоксин сальмонелл	0,06	64,9±2,3
2	Эндотоксин кишечной палочки	0,04	76,1±1,9
3	ДНК кишечной палочки	0,17	67,3±1,5
4	Нуклеиновые кислоты кишечной палочки	0,18	66,5±2,1

Из представленных в таблице 4 данных видно, что из испытываемых 55 видов структурных компонентов микроорганизмов, 4 препарата обладали лечебной эффективностью, которые после внесения в инкубационную среду с летально облученными лимфоцитами в дозе 0,04-0,18 мг/мл через 1 час после облучения клеток в дозе 5,0 Гр (летальная доза для лимфоцитов) обеспечивали выживаемость 64,9-76,1 % иммуноцитов периферической крови. При этом, высокий лечебный эффект из отобранных средств проявлял эндотоксин кишечной палочки, который обеспечивал 76,1%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов от радиационной гибели. Достаточно высокий лечебный эффект из структурных компонентов микроорганизмов проявляли также ДНК и нуклеиновые кислоты (НК) из кишечной палочки, которые при пострadiационном внесении в культуру облученных лимфоцитов в количестве 0,17-0,18 мг/мл обеспечивали 67,3-66,5%-ную выживаемость пораженных ионизирующей радиацией иммуноцитов. Хотя из отобранных структурных компонентов микроорганизмов эндотоксин сальмонелл по степени лечебного действия занимал последнее место в ряду активности (степень защиты 64,9%), этот показатель по критерию ВТТ является достаточно высоким (превышение предусмотренного ВТТ уровня защиты в 1,3 раза, $P < 0,01$), что является весьма важным компонентом микроорганизмов, участвующих в создании устойчивости к ионизирующей радиации. Следовательно, наличие в составе веществ микробного происхождения таких структурных компонентов микроорганизмов, как ДНК и

НК, обуславливает формирование радиорезистентности организма к воздействию ионизирующего излучения, что является обоснованием для включения их в состав потенциального радиопротектора.

Продолжая скрининговые исследования по экспресс-оценке радиозащитной активности полученных веществ микробного происхождения, в следующей серии опытов изучали радиопротекторные свойства пробиотиков. При этом исследованию подвергнуто 11 видов нативных и 11 видов радиомодифицированных вариантов пробиотиков, включающих биолакт, родлафен, ветом, целлобактерин, бикорм пионер, колибактерин, лактобактерин.

Испытание радиозащитной активности вышеуказанных пробиотиков проводили в двух вариантах применения: профилактический (прединкубационный) и лечебный (постинкубационный, пострадационный). Как в профилактическом, так и в лечебном вариантах испытаний, испытуемые пробиотики вносили в инкубационную среду в количестве от 1×10^8 до 4×10^8 КОЕ/мл, что в пересчете на сухое вещество составляет 0,03-0,128 мг/мл.

Прединкубационное (профилактический вариант) и постинкубационное (лечебный вариант) внесение испытуемых ВМП, учитывая инкубирование, взятие проб для цитометрического анализа и оценку результатов цитометрии лимфоцитов в исследуемых мазках из культуральных клеток в присутствии изучаемого агента осуществляли согласно вышеописанным методам проведения *in vitro* тест-системы оценки противорадиационной эффективности испытуемых ВМП.

Цитометрический анализ мазков облученных лимфоцитов, инкубированных в присутствии испытуемых ВМП, показали, что из испытанных 22 видов активных и радиомодифицированных пробиотиков 5 обладали радиозащитной и лечебной активностью, обеспечивая 40,1-50,3%-ную защиту при профилактическом и 50,3-77,6%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов при лечебном варианте применения (таблица 5).

Таблица 5 - Радиозащитная и лечебная эффективность пробиотиков в *in vitro* тест-системе

№ n/n	Пробиотик	Выживаемость лимфоцитов, %	
		профилактика	лечение
1	Колибактерин	50,3±1,9	67,7±2,5
2	Бифидобактерин	51,7±2,5	77,6±3,1
3	Бификол	40,1±1,5	51,9±1,9
4	Биоспорин	39,3±1,1	50,3±2,3
5	Лактобактерин	48,3±1,7	69,5±1,7

Из представленных в таблице 5 данных видно, что все отобранные пробиотики оказались эффективными при лечебном варианте применения, значительно превышая по этому показателю в профилактическом варианте.

Из отобранных пробиотиков наиболее высокой лечебной эффективностью обладал модифицированный бифидобактерин, обеспечивая 77,6%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов периферической крови. Вторую позицию по степени лечебной эффективности занимал лактобактерин, внесение которого в инкубационную среду оказывало противорадиационное действие, защищая от радиационной гибели 69,5% летально облученных лимфоцитов. По этому показателю пробиотик колибактерин незначительно (в 1,02 раза) уступал лактобактерину, обеспечивая выживаемость 67,7% летально облученных лимфоцитов против 69,5% у лактобактерина. По степени лечебного действия пробиотики бификол и биоспорин занимали последнюю позицию, защищая от радиационной гибели 51,9% и 50,3% летально облученных лимфоцитов. Хотя из отобранных препаратов они имели наименьшую лечебную активность, однако согласно требованиям ВТТ, они вполне удовлетворяют предусмотренным указанным документом требованиям, ($ПЗ \geq 50\%$), что дает основание отнести их к потенциальным радиозащитным препаратам.

Результаты параллельных скрининговых исследований показали, что профилактическая эффективность отобранных пробиотиков оказалась менее

эффективной – процент защиты летально облученных лимфоцитов при прединкубационном (перед облучением) внесении препаратов колеблется в пределах от 39,3 (биоспорин) до 51,7 % (радиобиридумбактерин).

Кроме вакцинных штаммов, пробиотиков и структурных компонентов макроорганизмов, были изучены радиозащитные свойства 10 видов спорообразующих аэробных бацилл (почвенных сапрофитов) и 13 патогенных и условно патогенных штаммов микроорганизмов, выделенных от животных, павших от инфекционных болезней в неблагополучных хозяйствах РТ. При этом условно патогенные и патогенные микроорганизмы были использованы в виде радиоинактивированных вариантов, а почвенные сапрофиты (аэробные спорообразующие бациллы) - в нативном и радиоинактивированном вариантах.

Указанная группа микроорганизмов была испытана в *in vitro* тест-системе при тех же условиях, вариантах, схемах, описанных выше, при испытании радиозащитной активности вакцинных препаратов, пробиотиков и структурных компонентов микроорганизмов. Не прибегая к повторному изложению условий постановки опытов из-за их идентичности, вкратце излагаем результаты проведенных скрининговых исследований по оценке радиозащитной активности испытуемых микроорганизмов (патогенных, условно патогенных микробов и почвенных аэробных бацилл). В результате проведенных скрининговых исследований по оценке радиозащитной и лечебной эффективности 23 видов микроорганизмов установлено, что 6 видов (протей, стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, сальмонеллы и *B.subtilis*) обладали радиозащитной активностью (табл. 6).

Из данных таблицы 6 видно, что испытанные микроорганизмы проявляли достаточно высокую радиозащитную активность, обеспечивая 51,3-63,1%-ную защиту летально облученных лимфоцитов. При этом следует отметить, что высокую радиозащитную активность проявляли радиоинактивированные варианты стафилококков (ПЗ=62,5%), кишечной палочки (ПЗ=63,1%) и сальмонелл (ПЗ=62,7%).

Таблица 6 - Радиозащитная активность радиомодифицированных патогенных, условно патогенных и нативных аэробных бацилл in vitro тест-системе

№ n/n	Микроорганизм	Выживаемость лимфоцитов, %	
		профилактика	лечение
1	Протей	53,5±2,5	-
2	Стрептококки	51,6±1,7	-
3	Стафилококки радиоинактивированные	62,5±3,5	-
4	Кишечная палочка радиоинактивированная	63,1±2,3	-
5	Сальмонеллы радиоинактивированные	62,7±1,9	-
6	<i>B.subtilis</i>	51,3±2,1	-

Радиозащитная активность нативных вариантов микробов была ниже, чем у радиоинактивированных вариантов. Испытанные микроорганизмы лечебной эффективностью не обладали.

Следовательно, условно патогенные и патогенные микроорганизмы по радиозащитной активности не имели преимущества по сравнению с вакцинными штаммами изученных микроорганизмов (патогенные и вакцинные штаммы кишечной палочки, сальмонелл), что является основанием для использования в дальнейшем вакцинных штаммов микроорганизмов в качестве одного из компонентов потенциальных радиозащитных средств на основе веществ микробного происхождения. При этом важным условием является радиационное воздействие на микроорганизмы в инактивирующих и (или) модифицирующих дозах.

Таким образом, из испытанных 180 видов веществ микробного происхождения, 6 вакцинных препаратов (туляремиальная, гриппозная, дезинтерийная, паратифозная, колибактериозная, сальмонеллезная), 10

структурных компонентов (полисахарид сальмонелл, полисахарид дрожжей, О-антиген микробов кишечной группы, брюшнотифозный эндотоксин, эндотоксин кишечной палочки, протективный радиотоксин кишечной палочки, липид сальмонелл, липид кишечной палочки, ДНК из кишечной палочки и радиотоксин из кишечной палочки), 5 пробиотиков (радиомодифицированный бифидумбактерин, бификол, биоспорин, лактобактерин) проявляли достаточно высокую радиозащитную активность, защищая летально облученные лимфоциты в *in vitro* тест-системе в 50-74% случаев.

Высокой радиозащитной активностью из вышеуказанных препаратов обладали радиоинактивированные паратифозная и колибактериозная вакцины (ПЗ=67,9 и ПЗ=68,5% соответственно), из структурных компонентов, микроорганизмов - эндотоксин кишечной палочки (ПЗ=73,9%), липид кишечной палочки (ПЗ=73,3%), протективный радиоантиген кишечной палочки (74,5%), радиотоксин из кишечной палочки (74,1%), О-антиген микробов кишечной группы (69,7%) и ДНК из кишечной палочки (67,5%), из пробиотиков – биоспорин (ПЗ=50,3%), бификол (ПЗ=51,9%), колибактерин (ПЗ=67,7%), лактобактерин (ПЗ=69,5%) и радиомодифицированный бифидобактерин (ПЗ=77,6%). Установлено, что вышеперечисленные вещества микробного происхождения, в зависимости от физико-химического и биологического состояния (живые, инактивированные, радиомодифицированные) и варианта применения (профилактическое - внесение ВМП в инкубационную среду до облучения лимфоцитов и лечебное - внесение их после облучения лимфоцитов) имели разную степень радиозащиты, что иллюстрируется данными таблицы 7.

Как видно из данных таблицы 7, максимальную радиозащитную (профилактическую) эффективность проявляли колибактерийная радиоинактивированная вакцина (ПЗ=68,8%), эндотоксин (ПЗ=73,3%), протективный радиоантиген (ПЗ=74,5%), радиотоксин (ПЗ=74,1%), липид (ПЗ=73,3%) и ДНК *E.coli* (ПЗ=67,5%).

Таблица 7 - Радиозащитная и лечебная эффективности наиболее активных ВМП в in vitro тест-системе

№ n/n	Вещество микробного происхождения	Радиозащитная активность %	
		профилактическом	лечебном
1	Вакцина		
	Колибактериозная живая	57,8±2,7	<20
	Колибактериозная радиомодифицированная	68,5±2,5	<30
2	Структурный компонент микроорганизма		
	Эндотоксин <i>E.coli</i>	73,9±3,1	76,1±1,9
	Протективный антиген <i>E.coli</i>	74,5±2,3	78,9±3,5
	Липид из <i>E.coli</i>	73,3±2,7	74,1±1,9
	ДНК из <i>E.coli</i>	67,5±1,5	69,8±1,5
	Радиотоксин из <i>E.coli</i>	74,1±2,3	77,8±1,7
	Нуклеиновые кислоты <i>E.coli</i>	59,7±1,7	66,5±2,1
3	Пробиотик		
	Колибактерин	50,3±1,9	67,7±2,5
	Бификол	40,1±1,5	51,9±1,9
	Бифидобактерин радиомодифицированный	51,7±2,5	77,6±3,1
	Лактобактерин	48,3±1,7	69,5±1,9

Максимальную радиотерапевтическую активность из отобранных ВМП имели эндотоксин (ПЗ=76,1%), протективный антиген (ПЗ=78,9%), липид (ПЗ=74,1%), радиотоксин (77,8%), ДНК (ПЗ=69,3%) и нуклеиновые кислоты *E.coli* (ПЗ=66,5%), а из пробиотиков – радиобифидумбактерин (ПЗ=77,6%), лактобактерин (ПЗ=69,5%) и колибактерин (ПЗ=67,7%). Установлено, что как живые, так и радиоинактивированные вакцинные препараты лечебным действием не обладали - выживаемость летально облученных лимфоцитов на фоне пострadiационных вакцинных препаратов в in vitro тест-систему не превышала 30%, что, согласно ВТТ, не отвечает требованиям, предъявляемым к потенциальным радиопротекторам.

В отличие от живых и инактивированных вакцин, структурные компоненты микробов и пробиотики обладали бифункциональным действием, обеспечивая

достаточно высокую выживаемость лимфоцитов как при профилактическом, так и лечебном применении препаратов.

Следовательно, при конструировании радиопротекторов на основе веществ микробного происхождения, в состав радиозащитных и радиотерапевтических препаратов необходимо включать как цельные микробные клетки из вакцинных штаммов кишечного паратифозной группы, так и структурные компоненты указанных микроорганизмов (эндо- и экзотоксины, протективный и соматические антигены, липиды, ДНК и нуклеиновые кислоты), которые при культивировании в жидких питательных средах выделяются в культуральную жидкость.

Важнейшим итогом данного этапа скрининговых исследований является то, что во-первых, как соматические клетки микроорганизмов, так и их структурные компоненты, при воздействии на них ионизирующих излучений (γ -лучей), претерпевают значительные изменения, приобретая более высокую радиозащитную и радиотерапевтическую эффективность, и, во-вторых, использованные композиции из различных компонентов микробных клеток (соматических, растворимых антигенов, эндо- и экзотоксинов, ДНК, НК и т.д.) различных групп (кишечного паратифозная, пробиотики), может существенно повысить как профилактическую так и терапевтическую эффективность препаратов и, в-третьих, применение ионизирующих излучений (в нашем случае γ -лучей) может существенно изменить метаболизм микроорганизмов, переключая его на синтез биологически активных веществ, сурфактантов, обладающих радиопротекторными свойствами (витаминов, ДНК, НК, аминокислот, антирадикальных ферментов и т.д.).

Поэтому на следующем этапе работы проводили исследования по возможности усиления радиозащитных и радиотерапевтических свойств веществ микробного происхождения и конструирование на основе биорадиопротекторов нового поколения.

2.2.3. Изучение возможности повышения радиозащитной активности отобранных веществ микробного происхождения

С учетом данных литературы о том, что многокомпонентные смеси на основе структурных компонентов микроорганизмов или смеси разных штаммов и веществ микроорганизмов обладают более высокой радиозащитной и радиотерапевтической активностью (Андрущенко В.Н. и др.; 1996), на следующем этапе работы проводили исследования по изучению возможности повышения радиозащитной активности ВМП.

При этом алгоритм исследований предполагал следующие варианты опытов:

- включение в состав радиозащитного препарата соматических клеток и структурных компонентов (протективного антигена и радиотоксина);
- включение в состав радиозащитного препарата соматических клеток и продуктов метаболизма, экспрессируемых в культуральную жидкость при выращивании тест-штаммов на жидких питательных средах;
- совместное выращивание различных видов микроорганизмов в жидкой питательной среде и их влияние на радиозащитную активность многокомпонентной системы метаболитов микроорганизмов;
- возможность направленного изменения метаболизма клеток тест-микроба путем радиационного воздействия и получения мутантов, обладающих усиленным синтезом антирадикальных ферментов, обеспечивающих формирование радиорезистентности.

В соответствии с представленным алгоритмом исследований, изучали возможность усиления радиозащитной активности ВМП при использовании композиции, включающей в состав соматические клетки и их структурные компоненты.

Для получения радиозащитной композиции использовали протективный антиген, анатоксин и радиотоксин, полученные по ранее описанной методике из производственного штамма *E.coli* ПЛ-6. При этом в качестве базового компонента композиции брали 9 частей (90%) протективного антигена, 0,5 частей (5%) радиотоксина и 0,5 частей (5%) анатоксина кишечной палочки из расчета на 100 мл композиционного препарата. Указанные соотношения компонентов базируются на том, что количество включенного в состав радиотоксина взято из расчета $1/10$ ЛД₅₀, терапевтическая (биостимулирующая) доза препарата, доза анатоксина и протективного антигена – на основании литературных данных по применению кишечных анатоксинов и колибактериозной вакцины ($2,5 \times 10^9$ м.к./мл) для профилактики кишечной инфекции у животных.

Для оценки радиозащитной и лечебной эффективности полученный композиционный препарат испытывали в экспресс *in vitro* тест-системе с использованием культивируемых летально облученных лимфоцитов периферической крови животных. Испытания радиозащитных свойств композиции проводили в двух (профилактическом и лечебном) вариантах применения. При этом условия проведения опытов были аналогичны таковым, описанным в разделе 2.2.1 диссертации.

При обоих вариантах испытания препараты вносили в инкубационную среду с лимфоцитами из расчета 0,22 мг/мл по сухому веществу как до (прединкубационное воздействие), так и после (постинкубационное пострадиационное воздействие) облучения культур клеток (иммуноцитов).

Результаты микроцитометрирования тест-клеток в динамике (через 4, 24 и 48 часов после начала инкубирования облученных и подвергнутых воздействию испытуемого препарата лимфоцитов) показали, что предварительное (до облучения) внесение препарата в инкубационную среду обеспечивало 69,5%-ную защиту летально облученных лимфоцитов от радиационной гибели. При постинкубационном (постлучевом) варианте применения, т.е. внесения композиционного препарата в тест-систему (инкубационную среду с

облученными лимфоцитами), выживаемость лимфоцитов не превышала контрольных значений, т.е. лечебный эффект отсутствовал.

Следовательно, трехкомпонентный композиционный полиантигенный препарат с полиантигеном в составе соматических микробных клеток *E.coli* в количестве $2,5 \times 10^9$ м.к./мл при наличии достаточно высоких радиозащитных (радиофилактических) свойств лечебным действием не обладал, что явилось основанием для проведения исследований по изучению возможности повышения радиозащитной активности веществ микробного происхождения и расширения их функциональных возможностей.

Теоретической основой дальнейших наших исследований в направлении повышения радиозащитной активности веществ микробного происхождения послужили сообщения о том, что микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают и выделяют (экспрессируют) в окружающую среду, в частности, в культуральную жидкость при выращивании на жидких питательных средах биологически активные вещества (БАВ): растворимые антигены, экзо-, эндотоксины, лизоцимы, бактериоцины, ферменты, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, полисахариды, которые, как показали предыдущие исследования (раздел 2.2.1 диссертации), обладают лечебно-профилактическим действием при радиационном поражении организма.

Вместе с этим из данных литературы известно, что композиция, составленная на основе культуральной жидкости *B.subtilis* ВКПМ № В-2335(3) и цеолита (Бактистатин), оказывала не только бактериостатическое, бактерицидное действия на патогенные и условно патогенные организмы при ряде инфекционных болезней, но и детоксицирующее, декорпорирующее (выведение токсинов, тяжелых металлов и радионуклидов) действие при поражении токсикантами и ионизирующей радиацией (Ткаченко Е.И. и др., 2005).

По аналогичному же принципу сконструирован препарат Биоспорин на основе продуктов метаболизма *B.subtilis* и *B.licheniformis*, обладающий радиотерапевтическим действием, обеспечивая 70%-ную защиту животных, облученных в дозе ЛД₅₀ (Степанов А.В. и др., 1997).

Как следует из наших скрининговых исследований, из испытанных пробиотиков высокой радиозащитной активностью в условиях *in vitro* обладал бифидумбактерин, а именно его модифицированный вариант, производственный штамм кишечной палочки - *E.coli* ПЛ-6. Поэтому в дальнейших исследованиях по изучению возможности повышения радиозащитной активности веществ микробного происхождения в качестве основных тест-микробов мы использовали *E.coli*, *B.subtilis* и *B.bifidum*, их продукты метаболизма в составе культуральной жидкости, а также иммуномодуляторы и сорбенты: гидроокись алюминия (ГОВА), высокодисперсную фракцию гидроокиси алюминия (ГСА) и природные биополимеры из подмора пчел.

Были получены продукты метаболизма *E.coli* (шт. ПЛ-6), *B.bifidum* (шт. 1), *B.subtilis* (шт. ВКПМ №2335(3)), *Sal.typhimurium* (шт. 370) в соответствии с общепринятым в микробиологической практике методом, описанным ранее.

С учетом литературных данных о том, что продукты метаболизма ряда микроорганизмов, в частности, бифидогенные факторы пробиотиков *B.bifidum* и антибактериальные факторы *B.subtilis*, обладают резко выраженными антагонистическими свойствами по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, включают витамины, минеральные соли, аминокислоты, оказывая в сочетании с природными минералами (бентонит, цеолит) антибактериальное, антиоксидантное, токсиннейтрализующее, декорпорирующее, противолучевое, иммуностимулирующее, метаболizmстимулирующее действия, и потенциальную возможность усиления радиозащитных свойств биорадиопротектора на основе ВМП, нами использовались продукты метаболизма *B.bifidum*.

В результате проведенных в этой серии исследований нами были получены 4 образца КЖ, 4 – осадочной биомассы и 4 - нативной нефракционированной массы клеток и культуральной жидкости на основе *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium*.

С учетом литературных данных о том, что природные гидросиликаты, в частности, бентониты, обладают более высокой сорбционной и депонирующей

активностью, проводили исследования по оптимизации условий по подготовке получения и применения природных минералов с использованием их в дальнейшем в качестве иммуносорбента и депонирующего агента.

С целью повышения адсорбционной активности гидросиликатов алюминия (бентонита) проводили его активацию путем селективного фракционирования по Пручковой З.В. и др. (1982). Полученный препарат - очищенную фракцию бентонита (ОФБТ) использовали в качестве одного из компонентов радиозащитных композиций на основе веществ микробного происхождения. Параллельно проводили исследования по получению более активных иммуномодуляторов и активаторов микробного метаболизма и потенциальных усилителей биологической и радиозащитной активности радиопротекторов на основе аписана. Получение аписана осуществляли согласно разработанной Немцовым С.В. и др. (2001) методике в нашей модификации.

Установлено, что полученный по вышеописанной методике препарат (аписан) из подмора пчел в соответствии с вышеуказанным ГОСТом, является малотоксичным и относится к 4-му классу веществ по степени опасности и токсичности и к малотоксичным веществам в соответствии с общепринятой классификацией.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены 4 варианта культуральных жидкостей при культивировании в жидких питательных средах *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium*, 4 вида осажденной после центрифугирования микроба биомассы, 4 вида дезинтеграта (разрушенные клетки соответствующих тест-микробов), иммуносорбент (активированная фракция бентонита-ОФБТ) и природный биополимер - аписан.

На основе продуктов метаболизма (культуральная жидкость) вышеуказанных микроорганизмов, цельных (осажденная биомасса-центрифугат) и разрушенных клеток (дезинтеграт), высокодисперсной активированной фракции природного минерального сорбента-бентонита и иммуномодулятора нового поколения - аписана были составлены композиции с включением в состав указанных компонентов. При составлении этих композиций исходили из того,

что, во-первых, использование продуктов метаболизма, содержащих в составе биологически активные вещества (ферменты, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, ДНК, эндо- и экзотоксины, растворимые соматические и протективные антигены) должно индуцировать полифункциональность препарата, обладая одновременно как лечебной, так и профилактической активностью, что должно отличать его от разработанного в отделе радиопрофилактического полиантигена. Во-вторых, включение в состав композиции природного биополимера – хитозана из подмора пчел (апизана) должно усиливать свойства препарата, поскольку указанный биополимер обладает высокими антиоксидантными и радиопротективными свойствами. В третьих, включение в состав радиозащитной композиции природного сорбента - высокодисперсной фракции бентонита, должно придать препарату детоксицирующий и декорпорирующий эффекты, нейтрализуя радиоиндуцированные токсические метаболиты, радиотоксины, а также при комбинированном поражении внешними (гамма-, рентгеновское, нейтронное излучения) и инкорпорированном (^{137}Cs , ^{90}Sr , и др.) радионуклидами. Исходя из выше перечисленного были составлены потенциальные радиозащитные композиции из микробных клеток и продуктов метаболизма *E.coli*: (I группа композиций), *B.bifidum* (II группа композиций), *B.subtilis* (III группа композиций), *Sal.typhimurium* (IV группа композиций) с включением в их состав активаторов радиозащитных и радиотерапевтических свойств основных компонентов композиций.

На основе продуктов метаболизма (ПМЕ.с) *E.coli*, высокодисперсной фракции бентонита (ВДФБ) и природного биополимера из подмора пчел апизана (АПЗ) составили I группу композиций при следующем соотношении компонентов:

- 1) супернатант (ПМЕ.с, 98%) + центрифугат (ОБМЕс, 2×10^9 м.к./мл) + высокодисперсная фракция бентонита (ВДФБ, 2%);
- 2) ПМЕ.с (99,5%) + ОБМЕс, (2×10^9 м.к./мл) + АПЗ (0,5%)
- 3) ПМЕ.с (99,5%) + АПЗ (0,5%)
- 4) ПМЕ.с (50,0%) + ПМВб (49,5%) + АПЗ (0,5%)

На основе *B.bifidum*, активированного бентонита и биополимера составили II группу композиций при следующем соотношении и сочетании компонентов:

- 1) супернатант (ПМВв, 98%) + центрифферат (ОМВв, 2×10^9 м.к./мл) + сорбент (ВДФБ, 2%);
- 2) ПМВв (99,5%) + ОМВв (2×10^9 м.к./мл) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 3) супернатант (ПМВв, 99,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 4) супернатант *E.coli* (ПМЕ.с, 50%) + супернатант *B.bifidum* (ПМВс, 49,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);

На основе ВМП *B.subtilis*, активированного бентонита и биополимера составили III группу композиций при следующем соотношении и сочетании компонентов:

- 1) супернатант (ПМВс, 98%) + центрифферат (ОМВс, 2×10^9 м.к./мл) + сорбент (ВДФБ, 2%);
- 2) ПМВс (99,5%) + ОМВс (2×10^9 м.к./мл) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 3) супернатант (ПМВс, 99,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 4) ПМВс, (99,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 5) ПМВс, (50,0%) + ПМВв (49,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);

Четвертая группа потенциальных радиозащитных композиций на основе ВМП *Sal.typhimurium* включает следующие варианты:

- 1) супернатант (ПМСт, 98%) + центрифферат (ОМСт, 2×10^9 м.к./мл) + сорбент (ВДФБ, 2%);
- 2) ПМСт (99,5%) + ОМСт (2×10^9 м.к./мл) + биополимер (АПЗ, 0,5%);
- 3) супернатант (ПМСт, 99,5%) + биополимер (АПЗ 0,5%);
- 4) ПМСт (50%) + ПМВв (49,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%);

Таким образом, предполагая возможность усиления радиозащитной и радиотерапевтической активности ВМП при различном количественном соотношении клеточных, структурных компонентов клеток и их метаболитов *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium* в сочетании с потенциальными активаторами (усилителями) метаболизма клеток-природного минерального сорбента - гидросиликата алюминия (бентонита) и природного биополимера-

хитозана пчел (апизана), были составлены композиции на основе ВМП 4 группы вышеперечисленных микроорганизмов. Полученные композиции ВМП 4 видов микроорганизмов из кишечного-тифозной и пробиотической групп были испытаны на радиозащитную и радиотерапевтическую активность в скрининговой *in vitro* тест-системе путем совместного инкубирования лимфоцитов крови в присутствии испытуемых композиционных препаратов. Испытуемые препараты вносили в инкубационные среды до и после облучения лимфоцитов из расчета 20-22 мг по сухому веществу на 1 мл инкубационной среды с лимфоцитами. Сроки, условия культивирования и методы оценки результатов исследования были аналогичны таковым изложенным в разделе 2.2.1.

Результаты скрининговых исследований по оценке радиозащитной активности композиций в *in vitro* тест-системе представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Радиозащитная активность композиций ВМП на основе различных групп микроорганизмов *in vitro*

Группа композиций	№ п/п	Композиция ВМП на основе микроорганизмов	Выживаемость лимфоцитов (%)	
			профилактика	лечение
1	2	3	4	5
I	1.1	ПМЕ.с(98%)+ОБМЕс (2×10^9 м.к./мл)+ВДФБ (2%);	76,9±2,1	61,2±1,7
	1.2	ПМЕ.с (99,5%) + ОБМЕс (2×10^9 м.к./мл) + АПЗ (0,5%)	66,3±1,7	73,7±2,1
	1.3	ПМЕ.с (99,5%) + АПЗ (0,5%)	59,7±1,9	63,5±1,7
	1.4	ПМЕ.с (50,0%) + ПМВб (49,5%) + АПЗ (0,5%)	58,9±2,3	75,7±2,7
II	2.1	ПМВв (98%) + ОМВв (2×10^9 м.к./мл) + ВДФБ (2%)	75,5±1,3	57,5±1,3
	2.2	ПМВв (99,5%) + ОМВв (2×10^9 м.к./мл) + АПЗ (0,5%);	59,5±2,1	71,5±2,1
	2.3	ПМВв (99,5%) + АПЗ (0,5%);	51,7±1,9	59,9±1,5

	2.4	ПМЕ.с (50%) + ПМВs (49,5%) + АПЗ (0,5%)	51,9±2,3	75,9±1,7
1	2	3	4	5
III	3.1	ПМВs (98%) + ОМВs (2x10 ⁹ м.к./мл) + ВДФБ (2%)	65,7±2,5	56,5±1,3
	3.2	ПМВs (99,5%) + ОМВs (2x10 ⁹ м.к./мл) + АПЗ (0,5%)	56,9±1,9	59,5±2,1
	3.3	Супернатант (ПМSt, 99,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%)	76,9±2,1	76,9±2,1
	3.4	ПМВs (50,0%) + ПМВв (49,5%) + биополимер	57,5±1,5	76,7±1,5
IV	4.1	ПМSt (98%) + ОМSt (2x10 ⁹ м.к./мл) + ВДФБ (2%)	65,5±2,1	66,3±2,3
	4.2	ПМSt (99,5%) + ОМSt (2x10 ⁹ м.к./мл) + АПЗ (0,5%)	59,7±2,5	64,1±1,5
	4.3	ПМSt (99,5%) + АПЗ (0,5%)	46,9±1,3	69,7±2,1
	4.4	ПМSt (50%) + ПМВв (49,5%) + АПЗ (0,5%)	49,5±1,7	69,9±2,7

Примечание: ПМЕ.с - продукт метаболизма *E.coli*; ОБМЕс - осажденная биомасса *E.coli*; ВДФБ - высокодисперсная фракция бентонита; АПЗ - аписан; ПМВв - продукты метаболизма *B.bifidum*; ПМВs - продукты метаболизма *B.subtilis*; ПМSt - продукты метаболизма *Sal.typhimurium*.

Из представленных в таблице 8 данных видно, что введение в состав ВМП на основе микробов *E.coli* высокодисперсной фракции гидросиликата алюминия (бентонита) из расчета 2% к объему оказывало потенцирующее действие на радиозащитную активность кишечной палочки, предотвращая у 76,9% лимфоцитов пострadiационную гибель при профилактическом действии препарата (вариант 1.1. табл. 8). Аналогичное усиливающее действие бентонита на радиозащитную активность просматривается и при сочетанном применении продуктов метаболизма и микробной биомассы *B.bifidum*, обеспечивая 75,5%-ную

выживаемость летально облученных лимфоцитов при профилактическом применении препарата (вариант опыта 2.1 табл. 8).

Использование продуктов метаболизма и микробной биомассы *B.subtilis* в сочетании с 2% высокодисперсной (активированной) фракции бентонита (ВДФБ) также обеспечивало высокую степень радиозащиты, предохраняя 65,7% лимфоцитов от радиационной гибели при профилактическом применении препарата (прединкубационное, предрадиационное введение использование ВМП в среду инкубирования лимфоцитов). Почти аналогичную степень защиты (ПЗ=65,5%) проявляли продукты метаболизма ПМSt и микробная биомасса *Sal.typhimurium* (ОМSt) в сочетании с 2% активированного бентонита (ВДФБ) при профилактическом применении IV-й группы композиции (вариант 4.1 табл. 8).

Из данных таблицы 8 видно, что введение в состав композиции природного биополимера из подмора пчел - аписана, продукты метаболизма и соматических клеток всех 4 групп микроорганизмов, проявляли менее выраженную радиозащитную активность при прединкубационном (профилактическом) применении ВМП из использованных групп микроорганизмов.

При параллельном изучении терапевтической активности составленных композиций на основе ВМП из 4 групп микроорганизмов установлено, что в этом варианте применения препаратов наблюдалась противоположная тенденция - сочетание продуктов метаболизма *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium* с аписаном выживаемость инкубационно облученных лимфоцитов была значительно выше, чем у препаратов, содержащих природный минеральный сорбент - активированную фракцию гидросиликата алюминия (бентонит).

Из данных таблицы 8 видно, что наиболее высокую лечебную эффективность проявляла композиция на основе продуктов метаболизма *E.coli* (ПМЕс), *B.bifidum* (ПМВв) и *B.subtilis* (ПМВс), которые в сочетании с аписаном, обеспечивали выживаемость 75,7% (I группа ВМП, вариант 1.4 табл. 8), 75,9% (II группа ВМП, вариант 2.4 табл. 8), 76,7% (III группа ВМП, вариант 3.4 табл. 8) летально облученных лимфоцитов от радиационной гибели.

Введение в состав композиции на основе продуктов метаболизма и микробных клеток *Sal.typhimurium* указанного биополимера также оказывало потенцирующее действие на лечебные свойства этого класса ВМП, обеспечивая 66,3%-69,9%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов при лечебном применении препарата (вариант 4.1 и 4.4, IV группа композиций по табл. 8).

Таким образом, использование продуктов метаболизма и микробной биомассы *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium* в сочетании с природным минералом (бентонитом) приводит к усилению радиозащитной активности ВМП: колибактериозной радиовакцины- в 1,12 раза (ПЗ=75,9% против 68,5%), у радиоинактивированной колибактериозной вакцины в 1,08 раза (ПЗ=75,9%) против 70,0% у известного радиозащитного полиантигена на основе протективного антигена, анатоксина и радиотоксина *E.coli* - регламентированного для профилактики ОЛБ (радиозащитный препарат МПАГ).

При этом следует отметить, что известный радиопрофилактический препарат - микробный полиантиген на основе протективного антигена, анатоксина и радиотоксина обладал достаточно высокой радиозащитной активностью (ПЗ=70,0%), однако лечебным эффектом не обладал, усугубляя, наоборот, развитие течение ОЛБ при пострadiaционном применении препарата.

В отличие от корпускулярных антигенов (цельные микробные клетки *E.coli*, обработанные формалином), известного радиозащитного препарата МПАГ, структурные компоненты микробных клеток (эндотоксин, липид, нуклеиновые кислоты, растворимые антигены, ДНК и т.д. *E.coli*), обладали бифункциональным действием, обеспечивая выживаемость летально облученных лимфоцитов как при профилактическом, так и при лечебном вариантах применения (варианты II, III, табл. 7).

Указанные структурные компоненты микробных клеток при культивировании в жидких средах экспрессируются в культуральную жидкость, которые составляют основу биологически активных веществ. При этом установлено, что в составе культуральной жидкости содержатся органические и неорганические кислоты, аминокислоты, сульфгидрильные, антирадикальные

ферменты, токсины, полисахариды, антибиотики, витамины, липиды, микро- и макроэлементы, цитокины, интерфероны, экзо- и эндотоксины (Иерусалимский Н.Д., 1963; Ткаченко Е.И. и др., 2005; Шилов В.А., 2010; Маликина К.Д. 2010; Муравьев А.А., 2017).

Поэтому композиция на основе продуктов метаболизма *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium*, в сочетании с микробной биомассой, природным биополимером апизаном, активированным гидросиликатом алюминия (бентонитом), обладает бифункциональными свойствами, повышая выживаемость летально облученных лимфоцитов как при прединкубационном (профилактическом), так и постинкубационном (лечебном) применении указанных композиций.

Полученные экспериментальные данные дают основание для проведения дальнейших исследований по конструированию радиозащитных препаратов на основе микробной биомассы, продуктов метаболизма использованных микроорганизмов в сочетании с природными минералами (сорбентами, детоксикантами, адьювантами) и природным биополимером (апизаном).

2.2.4 Конструирование радиозащитных препаратов на основе веществ микробного, минерального и зоогенного происхождения, обладающих бифункциональными свойствами

В результате проведенных на предыдущем этапе исследований по изучению возможности усиления радиозащитного действия веществ микробного происхождения было установлено, что введение в состав экспериментальных серий композиций из продуктов метаболизма и соматических микробных клеток, минерального сорбента (активированного бентонита) и природного биополимера-апизана приводило не только к усилению радиозащитной (профилактической), но и лечебной активности композиций. Наиболее перспективным направлением в конструировании радиозащитных препаратов является введение в состав радиозащитных радиопрофилактических композиций соматических клеток и продуктов метаболизма *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и их метаболитов, бентонита и апизана. При этом 76,9%-ную радиозащитную активность проявляла композиция, состоящая из 98% продуктов метаболизма *E.coli* (ПМЕс) + осажденные клетки *E.coli* (ОБМЕс, 2×10^9 КОЕ/мл) + высокодисперсная фракция бентонита (ВДФБ, 2% по объему). Почти аналогичную же степень защиты (ПЗ=75,5%) проявляла композиция, состоящая из 98% продуктов метаболизма и соматических клеток *B.bifidum* (2×10^9 КОЕ/мл) в сочетании с 2% высокодисперсной фракцией бентонита (ВДФБ).

Введение в состав композиции из соматических клеток *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* апизана приводило к усилению лечебных свойств ВМП. При этом установлено, что композиция, состоящая из 99,5% продуктов метаболизма и 2×10^9 КОЕ/мл соматических клеток *E.coli* с включением в состав 0,5% апизана обеспечивало выживаемость 73,7% летально облученных лимфоцитов при пострadiaционном (постинкубационном) внесении препарата в инкубационную среду с облученными лимфоцитами. Введение в состав композиции 50%

продуктов метаболизма *E.coli* и 49,5% продуктов метаболизма *B.bifidum* в сочетании с 0,5% аписана увеличивало лечебную активность композиции, обеспечивая 75,7%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов. Использование в тех же соотношениях продуктов метаболизма *E.coli* и *B.bifidum* в сочетании с 0,5% аписана приводило к усилению радиозащитной активности композиции, обеспечивая 75,9%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов. Максимальную радиозащитную активность при лечебном варианте применения оказывала композиция, включающая 50% продуктов метаболизма *B.subtilis* (ПМВs) + 49,5% продуктов метаболизма *B.bifidum* (ПМВb) + 0,5% аписана, которая обеспечивала 76,7%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов.

Сопоставительный анализ полученных результатов по изучению радиозащитной (профилактической) и радиотерапевтической активности композиции позволяет прийти к заключению о том, что общим для обоих вариантов их применения является присутствие как соматических клеток *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum*, так и продуктов метаболизма указанных микроорганизмов. Отличительным признаком, определяющим лечебный или профилактический эффект вышеуказанных композиций, является наличие в их составе природного биополимера – аписана (для лечебных композиций) или высокодисперсной фракции природного минерального сорбента - бентонита.

Следовательно, потенциальная композиция, включающая в оптимальных соотношениях как продукты метаболизма, так и соматические клетки *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* в сочетании с сорбентом бентонитом или биополимером-аписаном может обладать бифункциональным свойством, проявляя одновременно как лечебное, так и профилактическое противорадиационное действие.

Исходя из этого принципиального положения, считаем, что этим требованиям отвечают компоненты, представленные в таблице 8, а именно вариант 1.1 (1 группа композиций), предполагающий использование продуктов метаболизма *E.coli* (ПМЕс, 98%), осажденных микробных клеток (2×10^9 КОЕ/мл), высокодисперсной фракции бентонита (ВДФБ, 2%), сочетание которых в

композиции обеспечивает 76,9%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов при профилактическом (предынкубационном) применении препарата.

Почти аналогичную степень защиты облученных лимфоцитов (ПЗ 79, 5%) проявляла композиция 2.1 (2 группа композиций, табл. 8), состоящая из 98% ПМВв (98%) + ОМВв (2×10^9 м.к./мл) + ВДФБ (2%). Замена минерального сорбента в указанной композиции (вариант 1.1. табл. 8) на природный биополимер- апизан (вариант 1.2, табл. 8, 0,5 масс.%) индуцировало усиление лечебного эффекта препарата, обеспечивая 73,7%-ную выживаемость летально облученных лимфоцитов.

Еще более выраженное усиление лечебного эффекта радиозащитных композиций наблюдалось при сочетании ПМЕ.с (50,0%) + ПМВb (49,5%) + АПЗ (0,5%) (ПЗ=75,7%), вариант 1.4 (табл. 8), а при сочетании ПМЕ.с (50%) + ПМВs (49,5%) + АПЗ (0,5%) лечебный эффект достиг максимальных значений -75,9% (вариант 2.4, табл. 8). Наивысшую степень защиты летально облученных лимфоцитов при лечебном применении проявляла композиция по варианту 3.4 (III группа композиций по табл. 8), состоящая из ПМВs (50,0%) + ПМВв (49,5%) + биополимер (АПЗ, 0,5%), обеспечивая 76,6%-ную защиту летально облученных лимфоцитов при постинкубационном (пострадиационном) внесении препарата в инкубационную среду культивирования лимфоцитов.

С учетом вышеизложенного, можно предположить, что включение компонентов ВМП по вариантам 1.1; 2.1; 2.4 и 3.4 по таблице 8 в потенциальную радиозащитную композицию могло бы придать разрабатываемому поликомпонентному монопрепарату бифункциональные свойства - проявлять как лечебное, так и профилактическое действие при воздействии на организм ионизирующей радиации.

Поэтому, исходя из высказанного предположения и реализуя поставленную задачу, дальнейшие исследования были направлены на конструирование многокомпонентного радиозащитного монопрепарата бифункционального назначения – биорадиопротектора на основе ВМП. При этом в качестве основных

компонентов потенциального биорадиопротектора на основе ВМП на основе данных, приведенных в таблице 8, были отобраны продукты метаболизма *E.coli* - ПМЕс (компонент I), микробные клетки (осажденная микробная масса) *E.coli* - ОБМЕс (компонент II), микробные клетки *B.bifidum* - ОМВ.б (компонент III), продукты метаболизма *B.bifidum* ПМВб (компонент IV), продукты метаболизма В.С-ПМВс (компонент V), высокодисперсная фракция природного минерального сорбента бентонита -ВДФБ (компонент VI) и природного биополимера аписана - АПЗ (компонент VII).

Алгоритм конструирования полифункционального композиционного монопрепарата предполагал:

- 1) включение вышеуказанных компонентов в состав композиций;
- 2) подбор оптимальных соотношений компонентов;
- 3) оценку радиозащитных свойств композиций в условиях *in vitro* тест-системы;
- 4) оценку радиозащитных свойств композиций в условиях *in vivo* тест-системы.

В соответствии с принятым алгоритмом исследований по конструированию бифункционального радиозащитного поликомпонентного монопрепарата, определяли различные соотношения компонентов из микробных клеток *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum*. Для этого из осажденной биомассы микробов названных тест-штаммов готовили суспензии концентрацией по 1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 ; 1×10^8 ; 1×10^9 КОЕ/мл соответственно для каждого вида вышеназванных микроорганизмов. Затем с каждым разведением микробных клеток *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* составляли объемные соотношения микробных суспензий: 0,33:0,33:0,33; 0,4:0,3:0,3; 0,4:0,4:0,2; 0,1:0,2:0,7; 0,1:0,1:0,8; 0,5:0,3:0,2; 0,6:0,1:0,3; 0,6:0,2:0,2; 0,7:0,1:0,1; 0,1:0,1:0,1.

Составленные по вышеописанной схеме микробные суспензии – смеси трех тест-микробов были тестированы на радиозащитную активность в *in vitro* тест-системе с использованием лимфоцитов периферической крови. Результаты тестирования радиозащитной активности испытуемых суспензий показали, что

наиболее высокой радиозащитной активностью обладали суспензия *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* с объемным соотношением 0,5:0,3:0,2 соответственно при концентрации микробов в суспензии 1×10^9 КОЕ/мл. Следовательно, суспензия смеси используемых микроорганизмов содержит $0,5 \times 10^9$ КОЕ/мл *E.coli*; $0,3 \times 10^9$ КОЕ/мл *B.bifidum* и $0,2 \times 10^9$ КОЕ/мл *B.subtilis*. Представленные в таблице 8 диссертации данные свидетельствуют о том, что оптимальное содержание микробных клеток в полученной биомассе составляло $2,5 \times 10^9$ КОЕ/мл, поэтому вышеуказанные соотношения объемов суспензий должны иметь окончательные значения этих соотношений $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл *E.coli*; $0,6 \times 10^9$ КОЕ/мл *B.bifidum* и $0,4 \times 10^9$ КОЕ/мл *B.subtilis*.

Микробные суспензии использованных тест - штаммов с указанными концентрациями микробных клеток, перед внесением в культуральные жидкости - продукты метаболизма соответствующих микроорганизмов - центрифугировали и центрифугат (осажденную микробную биомассу ОМБМ) из трех видов тест-штаммов растворяли в смеси трех культуральных жидкостей, полученных на основе соответствующих тест-штаммов.

Полученную согласно вышеописанной схеме микробную биомассу из трех тест-штаммов условно обозначали компонент 1.

Для получения второго (II) компонента потенциального унифицированного бифункционального биорадиопротектора на основе ВМП на следующем этапе проводили исследования по определению оптимальных соотношений продуктов метаболизма *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* - ПМЕс; ПМВв; ПМВs. Для этой цели готовили следующие объемные соотношения культуральных жидкостей, получаемых при выращивании указанных тест-штаммов (продуцентов продуктов метаболизма микроорганизмов: 0,5:0,4:0,1; 0,5:0,3:0,2; 0,4:0,4:0,2; 0,3:0,5:0,3; 0,2:0,6:0,2; 0,1:0,7:0,2; 0,6:0,3:0,1; 0,7:0,2:0,1; 0,8:0,1:0,1; 0,9:0,5:0,5 .

Результаты тестирования вышеуказанных соотношений компонентов из метаболитов использованных штаммов-продуцентов в in vitro тест - системе с использованием облученных лимфоцитов периферической крови показали, что из 10 вариантов соотношений компонентов метаболитов микроорганизмов наиболее

высокой радиозащитной активностью обладали продукты метаболизма *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* в соотношении компонентов 0,5:0,3:0,2 соответственно при постинкубационном (лечебном) варианте применения.

Следовательно, базовый компонент (жидкая часть) потенциального унифицированного бифункционального биорадиопротектора на основе ВМП должен содержать по объему 0,5 частей продуктов метаболизма (культуральной жидкости) *E.coli* (ПМЕс), 0,3 части - продуктов метаболизма *B.bifidum* (ПМВв) и 0,2 части – продуктов метаболизма *B.subtilis* (ПМВс).

Полученная трехкомпонентная смесь метаболитов (культуральных сред) из использованных в работе штаммов-продуцентов была использована в качестве основного (базового) компонента потенциального бифункционального биорадиопротектора на основе ВМП и условно обозначена нами как «компонент II».

В качестве третьего компонента потенциального микробного биорадиопротектора использовали порошки очищенной фракции бентонита (ВДФБ) и биополимера аписана (АПЗ) в количествах, установленных экспериментальным путем, которые составляли 2% и 0,5% к объему смеси компонентов I и II. Исходя из вышеуказанных расчетов по определению оптимальных соотношений компонентов при составлении бифункциональной радиозащитной композиции (БРК) на основе микробной биомассы (ОМЕс; ОМВв; ОМВс) продуктов метаболизма микроорганизмов (ПМЕс; ПМВв; ПМВс) и усилителей радиозащиты (бентонит, аписан), принцип конструирования препарата предусматривает вышеуказанную схему.

Для получения микробной биомассы и продуктов метаболизма микроорганизмов тест-штаммы *E.coli* шт. ПЛ-6, *B.bifidum* шт. 1 и *B.subtilis* шт. В-2335, высевали на мясопептонный бульон, посеvy инкубировали при температуре 37⁰С в течение 18-24 часов. Для всех объектов были исследованы биотехнологические параметры :1) оптическая плотность; 2) вес плотного осадка биомассы; 3) вес (концентрация) биологически активных веществ в культуральной жидкости. По достижении стационарной фазы роста

соответствующей культуры клетки всех использованных микроорганизмов отделяли центрифугированием при 5000g в течение 15 минут, в центрифугате определяли вес плотного осадка биомассы. Концентрацию микробных клеток в биомассе определяли спектрофотометрически по оптической плотности.

Установлено, что выход биомассы (вес плотного осадка) *E.coli* и *B.subtilis* при указанных условиях культивирования колебался в диапазоне $0,31 \pm 0,05$ мг/мл ($1-1,5 \times 10^9$ м.к./мл) и *B.subtilis* $0,53 \pm 0,07$ мг/мл ($1,6-2,1 \times 10^9$ м.к./мл). При параллельном спектрофотометрическом исследовании установлено, что указанная концентрация микроорганизмов в культуральных жидкостях имеет коэффициент экстинкции в диапазоне от 0,4 до 0,8 при длине волны 450 мкм соответственно.

Одновременно определяли содержание биологически активных веществ в культуральной жидкости без микробной биомассы. Для этого супернатант (надосадочную жидкость) культуральной жидкости подвергали спектрофотометрированию и параллельному определению сухого вещества в культуральной жидкости путем лиофилизации или высушивания в сушильном шкафу. Результаты опытов показали, что содержание сухого вещества в культуральной жидкости *E.coli* составляло $0,003 \pm 0,0001$ мг/мл, *B.bifidum* - $0,004 \pm 0,0005$ мг/мл и *B.subtilis* - $0,002 \pm 0,0007$ мг/мл супернатанта.

Следовательно, содержание сухого вещества в культуральной жидкости с микробной биомассой *E.coli*, исходя из результатов, представленных в этих исследованиях, составлял $0,313 \pm 0,05$ мг/мл, *B.bifidum* - $0,534 \pm 0,07$ мг/мл и *B.subtilis* - 0,312 мг/мл.

Полученные по вышеописанной методике культуральные жидкости, содержащие биомассу из трех видов микроорганизмов, после определения концентрации микробов и содержания сухого вещества, использовали для составления радиозащитной композиции. Для этого в качестве базового компонента брали 0,5 частей культуральной жидкости *E.coli* (ПМЕс); 0,3 части КЖ *B.bifidum* (ПМВв) и 0,2 части КЖ *B.subtilis* (ПМВс) (компонент II); затем в эту смесь вносили микробные клетки (осажденную биомассу) указанных тест-микробов в количестве $1,5 \times 10^9$ м.к/мл *E.coli*, $0,6 \times 10^9$ КОЕ/мл *B.bifidum* и $0,4 \times 10^9$

КОЕ/мл *B.subtilis* (компонент I). При этом общее содержание микробов трех видов в смеси культуральной жидкости составляло $2,5 \times 10^9$ КОЕ/мл. После смешивания микроорганизмов и культуральной жидкости в нее вносили высокодисперсную фракцию бентонита из расчета 2% общего объема и биополимер апизан – 0,5% к общему объему (компонент III).

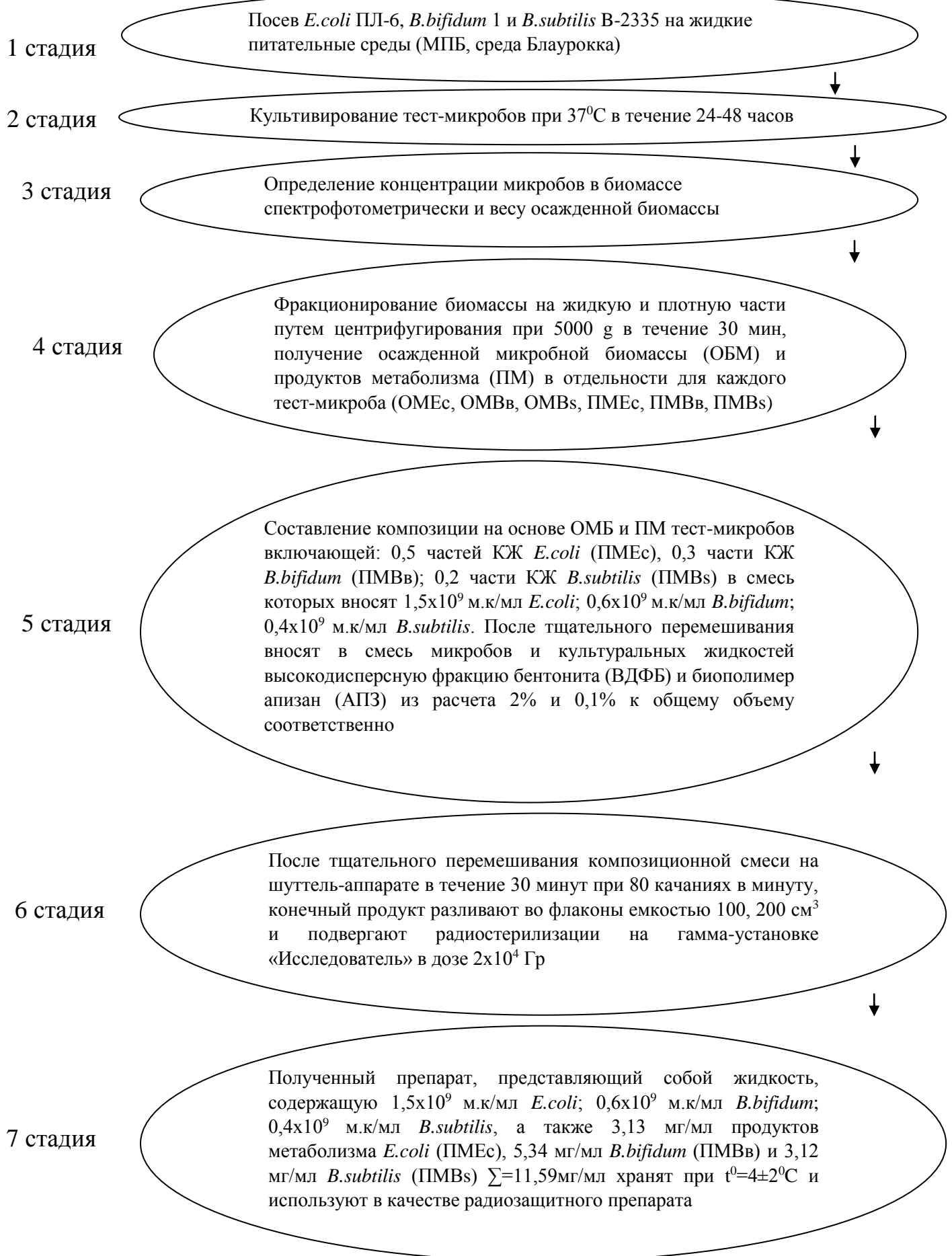
Смесь компонентов I, II и III перемешивали на шуттель-аппарате при 80 качаниях в минуту в течение 30 минут при комнатной температуре, затем разливали во флаконы емкостью 100, 200 см³ и подвергали лучевой стерилизации на гамма-установке «Исследователь» (Россия) с источником излучения ⁶⁰Со при мощности дозы излучения $1,24 \times 10^{-2}$ Кл/кг*с и поглощенной дозе излучения 20 кГр.

Подвергая препарат радиационной обработке, преследовали три цели:

- 1) надежную стерилизацию конечного продукта;
- 2) индукцию радиотоксина, индуцирующего антирадиотоксический и метаболизмстимулирующий эффект в микробной биомассе;
- 3) радиоактивацию продукта.

При применении лучевой стерилизации достигается, во-первых, полная стерильность, во-вторых, снижается возможная анафилактическая активность из-за наличия в продукте гетерогенных белков питательной (культуральной) среды, в-третьих, при радиационной обработке хитин- и хитозанполисахаридных субстанций происходит их активация путем действия на указанные объекты активных радикалов, индуцированных при радиолизе, которые, взаимодействуют с полисахаридами с отрывом водорода от С-Н-связей, в результате чего образуются вторичные углеродные радикалы на полимерной цепи, обладающие более высокой биологической активностью. Кроме того, установлено, что при облучении культуральной среды в ней увеличивается количество рибофлавина и активация аминокислот, экспрессируемых микроорганизмами в культуральную жидкость (Кобякова В.И. и др., 1989). Таким образом, принципиальная схема получения полифункционального радиозащитного препарата на основе ВМП включает 7 стадий, которые представлены на схеме 1.

**Схема 1 - Получение полифункционального радиозащитного препарата
на основе веществ микробного происхождения (РЗК)**



Анализируя представленные на схеме операции и стадии получения радиозащитного препарата на основе ВМП можно заключить, что наиболее сложной и трудоемкой являются стадии 3 и 4, которые предусматривают фракционирование выращенной биомассы каждой культуры в отдельности на плотный осадок (центрифугат) и супернатант (культуральная жидкость), определение веса плотного осадка и содержания сухого вещества в культуральной жидкости.

Для того, чтобы упростить такую длительную и сложную процедуру получения компонентов потенциального полифункционального радиопротектора, считаем логичным и целесообразным внести модификацию в технологию получения препарата. Для этого были проведены специальные исследования по экспресс-оценке концентрации микробных клеток и продуктов метаболизма микробов (метаболитов) в культуральной жидкости, содержащей как соматические клетки, так и продукты метаболизма. Сначала определяли оптическую плотность самой питательной среды (МПА, среда Блаурокка) без присутствия тест-микробов (До). Затем в этих средах выращивали тест-микробы и в динамике определяли в них оптическую плотность через 24-48 часов роста культур при концентрации микробов 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; $2,7 \times 10^9$ м.к./мл и определяли оптическую плотность биомассы в культуральной жидкости путем динамического спектрофотометрирования, т.е. составляли калибровочные кривые оптической плотности культуры в зависимости от концентрации культуры в биомассе (культуральной жидкости).

Результаты спектрофотометрирования культуральной жидкости с выращенными в них микробами (*E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum*) в стационарной фазе роста (через 48 ч) показали, что оптическая плотность культуральной жидкости с содержанием в ней биомассы *E.coli* ПЛ-6 *B.bifidum* или *B.subtilis* с концентрацией микробных клеток 2×10^9 м.к./мл составляла $D=1,04 \pm 0,007$. Показатель включает как концентрацию микробов в культуральной жидкости (D_1), так и содержание биологически активных веществ - продуктов метаболизма тест – микробов (D_2).

Результаты спектрофотометрирования культуральной жидкости безмикробной биомассы, но с продуктами метаболизма микробов показали, что коэффициент экстинкции КЖ (D_2), содержащей ($0,31 \pm 0,05$ мг/мл) сухого вещества имеет показатель $0,03 \pm 0,007$ ($D_2 = 0,03$).

Полученные в экспериментах данные дают основание исключить из технологического процесса (см. технологическую схему получения полифункционального радиозащитного препарата) длительные и сложные стадии 3 и 4, предусматривающие фракционирование микробной биомассы на жидкую и плотную части с последующим определением в них концентрации микробных клеток и содержания сухого вещества путем массометрического изменения веса плотного осадка микробов и продуктов метаболизма в культуральной жидкости, полученной из использованных видов тест-микробов.

На основании представленных исследований, стадии 3 и 4 схемы предусматривают спектрофотометрическое определение концентрации микробов в культуральной жидкости и содержание в ней микробных метаболитов в стационарной фазе (48 ч) роста тест-микробов в среде культивирования по оптической плотности (D) биомассы и метаболитов при значении коэффициента экстинкции $1,04 \pm 0,007$ при длине волны 450 мкм.

Экспериментально установлено, что указанные значения коэффициента экстинкции ($D = 1,04 \pm 0,007$) культуральной жидкости с накопленной в ней биомассой соответствуют содержанию $2,5 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^2$ микробных клеток/мл и $0,03 \pm 0,007$ мг/мл.

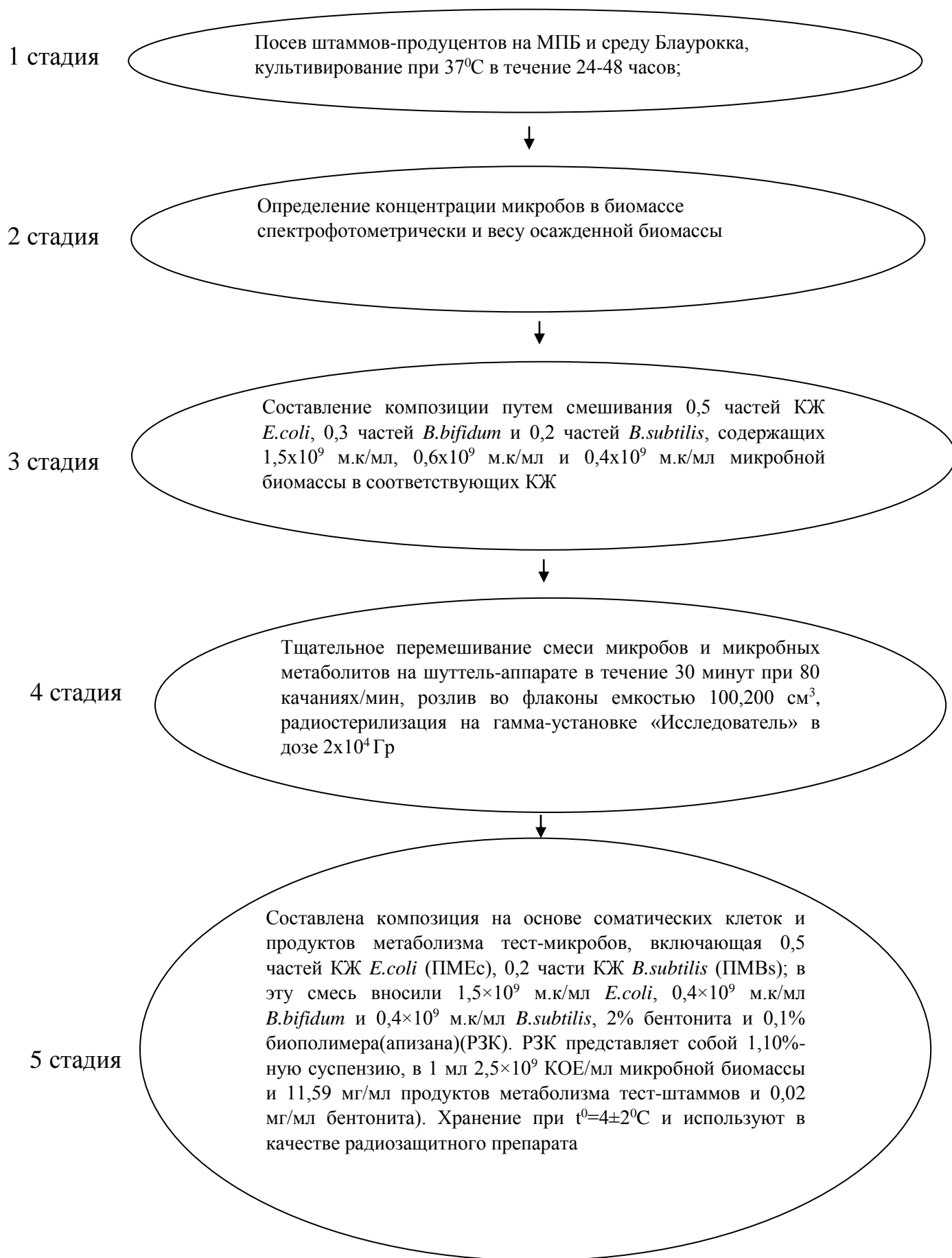
Использование указанного критерия экспресс-оценки концентрации микробной биомассы и содержания микробных метаболитов в культуральной жидкости позволяет упростить пятую стадию технологической схемы получения препарата.

При составлении радиозащитной композиции, согласно вышеуказанной унификации технологического процесса, отпадает необходимость внесения в культуральную жидкость осажденной микробной биомассы тест-микробов

(ОМЕс; ОМВв; ОМВs), полученной согласно известной технологии (1-й вариант технологической схемы конструирования РЗК).

Окончательная (усовершенствованная) схема получения разрабатываемого препарата включает следующие стадии: 1) посев штаммов-продуцентов на МПБ и среду Блаурокка, культивирование при 37⁰С в течение 24-48 часов; 2) спектрофотометрическое определение концентрации (плотности биомассы) микробов и их метаболитов с использованием оценочного критерия – коэффициента экстинкции (оптической плотности) $D=1,04\pm0,007$, что соответствует плотности микробной биомассы $2,5\times10^9$ м.к./мл и продуктов метаболизма $11,59\pm0,007$ мг/мл; 3) составление композиции путем смешивания 0,5 частей КЖ *E.coli*, 0,3 частей *B.bifidum* и 0,2 частей *B.subtilis*, содержащих $1,5\times10^9$ м.к/мл, $0,6\times10^9$ м.к/мл и $0,4\times10^9$ м.к/мл микробной биомассы в соответствующих КЖ; 4) тщательное перемешивание смеси микробов и микробных метаболитов на шуттель-аппарате в течение 30 минут при 80 качаниях/мин, розлив во флаконы емкостью 100, 200 см³, радиостерилизация на гамма-установке «Исследователь» (Россия) в дозе 2×10^4 Гр; 5) хранение при $t=4\pm2^0$ С и использование по назначению в качестве радиозащитного препарата.

Схема 2 – Усовершенствованная схема получения полифункционального радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения (РЗК)



2.3 Изучение влияния радиозащитной композиции на организм интактных животных

Учитывая, что нами получена многокомпонентная композиция с участием микробных клеток, их структурных компонентов и метаболитов (антигены, экзо- и эндотоксины, ферменты и другие сурфактанты), а также природных минеральных сорбента и биополимера, которые при совместном применении могут проявлять токсический эффект и в соответствии с требованиями Фармакологического комитета МЗ РФ, перед испытанием препарата на радиозащитную активность *in vivo*, проводили исследования по оценке его безвредности и токсичности для теплокровных животных.

2.3.1 Оценка безвредности и токсичности радиозащитной композиции на интактных животных

Определение острой токсичности полученного препарата проводили по ГОСТ 12.1.007-76 на 100 белых мышах массой тела 18-20 г., разделенных на 10 групп по 10 животных в каждой путем подкожного введения 6%-ного раствора препарата, приготовленного из центрифугата, осажденного путем центрифугирования при 5000 g в течение 30 минут. Полученный осадок (смесь микробов трех штаммов-продуцентов и продуктов метаболизма) в количестве 6000 мг сухого вещества из 500 мл культуральной жидкости с микробной биомассой разводили физиологическим раствором в 6%-ной концентрации (6000 мг на 100 мл) и использовали в качестве испытуемого препарата.

Из 10 групп белых мышей первые 9 групп являлись опытными: мышам 1-й группы препарат вводили подкожно в дозе 300 мг/кг; 2-й – 600 мг/кг; 3-й – 1200 мг/кг; 4-й - 1600 мг/кг; 5-й - 2200 мг/кг; 6-й - 2600 мг/кг; 7-й - 3200 мг/кг; 8-й - 4000 мг/кг; 9 - й- 4500 мг/кг; 10-я группа служила контролем. Результаты динамических наблюдений за животными показали, что в первых пяти группах гибель животных не наблюдалась, а в группе мышей, получавших 2600 мг/кг препарата (6 группа), наблюдали гибель двух животных из 10. Проведенные по Першину Г.Н. расчеты показали, что ЛД₅₀ для белых мышей при подкожном введении препарата составляла 2390 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о низкой токсичности испытуемого средства и согласно ГОСТу 12.1.00.7-76 он соответствует IV классу опасности.

Безвредность полученного биологически активного композиционного препарата определяли путем однократного введения максимально допустимой дозы (5,0 мл) композиции кроликам (n=10) внутрибрюшинно согласно методическим указаниям (МУ 2.1.5.720-98) с последующим наблюдением за состоянием животных в течение 28 дней. Результаты опытов показали, что

смертность животных после введения испытуемого препарата не наблюдалась, общее состояние животных на протяжении всего опыта оставалось удовлетворительным и отличалось от такового контрольных животных, получивших аналогичное количество физиологического раствора.

Параллельные гематологические исследования, проведенные в динамике (на 3, 6, 12, 18 и 23 сутки после инъекции препарата), включающие определение количества лейкоцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов и базофилов, показали, что данные показатели на протяжении всего опыта не имели достоверных отличий от таковых контрольных животных. Следовательно, однократное введение испытуемого препарата в максимально допустимой дозе не оказывало токсического действия на организм животных, что дает основание считать его безвредным.

В соответствии с требованиями Фармакологического комитета МЗ РФ, предъявляемыми к биологическим препаратам, проводили изучение аллергизирующих свойств препарата. В опытах использовали 10 морских свинок массой 280-300 г. В качестве оценочной модели использовали гистаминный тест - введение раствора гистамина в дозе 5 мг/кг через 1, 2 и 3 ч после подкожного введения животным терапевтической (11,59 мг/кг) дозы испытуемого препарата. Аллергизирующие свойства композиции оценивали по развитию гистаминного шока на фоне применения испытуемой композиции. Результаты гистаминного теста показали, что при введении гистамина получавшим испытуемое композиционное средство животным изменения общего состояния и явлений токсикоза не возникало, гибели животных от гистаминного шока или ускорения ее не наступало. Полученные результаты дают основание считать, что испытуемое композиционное средство аллергизирующими свойствами не обладает.

В следующей серии опытов изучали раздражающее действие сконструированного композиционного потенциального биорадиопротектора на основе веществ микробного происхождения путем втирания последнего в кожу

кроликов ($n=5$) в течение 14 дней из расчета 11,59 мг/см² площади втираемого участка кожи (7х8 см²).

Результаты ежедневного наблюдения показали, что после втирания препарата в кожу толщина кожной складки не изменялась, кожа оставалась гладкой, эластичной, безболезненной и подвижной. К концу опыта (через 14 дней) шерстный покров полностью восстанавливался, общее состояние оставалось удовлетворительным, что свидетельствует об отсутствии раздражающего действия у испытуемого препарата.

Продолжая исследования по оценке токсичности композиционного радиозащитного препарата, изучали его эмбриотоксическое и тератогенное действия на 20 самках белых крыс, разделенных на 2 группы по 10 животных в каждой. Животным 1-й группы испытуемый препарат вводили внутривентрально трехкратно с интервалом 5 дней между введениями (1, 5, 10 дней) в виде 1%-ного раствора (микробные клетки, продукты метаболизма, минеральный сорбент и биополимер апизан), полученный путем центрифугирования культуральной жидкости с выращенной в ней микробной биомассой из расчета 11,59 мг/кг живой массы. Животным 2-й группы (контроль) в аналогичных условиях внутривентрально вводили физиологический раствор в объеме 1,0 мл.

Эмбриотоксическое действие испытуемого препарата устанавливали после убоя крыс на 20-й день беременности путем подсчета в матке живых и мертвых плодов, а в яичнике - желтых тел. Плоды и плаценты взвешивали, оценивали наличие кровоизлияний, аномалий, определяли размеры плодов. Результаты изучения эмбриотоксичности вновь сконструированного радиозащитного препарата представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Эмбриотоксическое действие радиозащитной композиции на белых крысах

Показатель	Группа (n=10)	
	опытная	контрольная
Количество желтых тел	12,27±9,23	12,35±0,17
Количество мест имплантации	11,10±0,19	11,21±0,25
Количество живых плодов	9,97±0,11	10,13±0,31
Количество мертвых плодов	0,96±0,21	1,03±0,17
Доинплантационная гибель	9,93±0,33	10,07±0,43
Постинплантационная гибель	8,81±0,51	8,93±0,25
Общая эмбриональная смертность	17,05±0,27	17,43±0,45
Выживаемость, %	81,17±1,09	80,91±1,33
Краниокаудальный размер плода, см	3,05±0,13	2,97±0,21
Масса плода, г	2,92±0,07	2,90±0,13
Дефекты развития	нет	нет
Масса матки, г	5,43±0,75	5,38±0,19
Масса плодных оболочек, г	0,82±0,07	0,80±0,27
Объем околоплодных вод, мл	3,70±0,25	3,63±0,15

Из представленных в таблице 9 данных видно, что трехкратное внутрибрюшинное введение испытуемого препарата белым крысам в терапевтической дозе (11,59 мг/кг) в течение 10 суток отрицательного влияния на клиническое состояние и эмбриогенез животных не оказывало. Различия сравниваемых показателей животных опытной и контрольной групп были недостоверны.

2.3.2 Влияние композиционного препарата на неспецифическую резистентность организма (НРО)

Учитывая, что одним из важных факторов защиты организма от воздействия патологических агентов, в т.ч. и ионизирующего излучения, является состояние факторов неспецифической резистентности (ФНР) и способы ее стимуляции с помощью биоактиваторов, проводили опыты по изучению влияния испытуемого препарата на ФНР.

Опыты проводили на 20 белых крысах массой 180-200 г, разделенных на 2 группы по 10 животных в каждой. Животным 1-й группы однократно подкожно вводили испытуемый препарат в дозе 11,59 мг/кг в объеме 1,0 мл. Животным 2-й группы в аналогичных условиях вводили физиологический раствор, и она служила контролем. Через 10, 20 и 30 суток после введения препарата брали пробы крови и изучали содержание в ней общего белка, альбуминов, λ -, β - и γ -глобулинов, бактерицидной, лизоцимной активности сыворотки крови, функциональную активность перитониальных макрофагов и нейтрофилов. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10 -Влияние радиозащитной композиции на ФНР белых крыс

Показатель	Значение ФНС на срок исследования, сут.					
	10		20		30	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
1	2	3	4	5	6	7
Общий белок, г/л	5,93±	5,45±	5,99±	5,51±	6,15±	5,59±
	0,01	0,05	0,03	0,02	0,01	0,03
Альбумины, г/л	2,25±	2,00±	2,33±	2,0±1	2,37±	2,11±
	0,05	0,07	0,01	0,03	0,05	0,01

1	2	3	4	5	6	7
λ –глобулины, г/л	1,69± 0,07	1,47± 0,03	1,71± 0,01	1,53± 0,05	1,73± 0,06	1,54± 0,09
β -глобулины, г/л	1,15± 0,03	0,97± 0,01	1,17± 0,05	0,95± 0,01	1,18± 0,07	0,98± 0,09
γ -глобулины, г/л	1,09± 0,07	0,98± 0,03	1,10± 0,01	0,96± 0,05	1,12± 0,09	0,95± 0,01
БАСК, %	49,5± 2,09	46,9± 0,31	49,9± 1,35	48,1± 0,61	50,9± 1,37	48,01± 0,59
Лизоцимная активность, отн./ед	15,0± 0,47	14,9± 0,53	15,2± 0,35	14,5± 0,58	15,7± 0,39	14,7± 1,03
ФАН, %	60,0± 0,45	58,1± 0,37	61,1± 0,73	58,7± 0,13	61,5± 0,49	58,3± 0,31
ФЦ, ед	2,19± 0,01	2,07± 0,03	2,21± 0,05	2,17± 0,09	2,27± 0,03	2,15± 0,09
ФИ, ед	3,70± 0,09	3,59± 0,05	3,72± 0,03	3,66± 0,07	3,72± 0,05	3,66± 0,09

Примечание: ФНР-фактор неспецифической резистентности; ФАН-фагоцитарная активность нейтрофилов; ФЦ-фагоцитарное число; ФИ-фагоцитарный индекс

Из данных таблицы 10 видно, что однократное поступление в организм композиционного радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения в дозе 11,59 мг/кг оказывало стимулирующее действие на факторы неспецифической защиты, увеличивая содержание общего белка на 10%; альбуминов - на 12 %, λ - глобулинов - на 12,3%, β -глобулинов - на 12,04%, γ - глобулинов - на 11,79%, ФАН - на 14,55%, ФЦ - на 10,61%, ФИ - на 10,2% по сравнению с контролем.

2.3.3 Влияние РЗК на систему иммуногемопоза лабораторных животных

Продолжая исследования по изучению влияния потенциального композиционного радиозащитного препарата на организм интактных животных и учитывая, что полученный препарат относится к средствам иммуотропного действия, в следующей серии опытов изучали влияние испытуемого препарата на систему иммуногемопоза лабораторных животных.

Опыты проводили на тех белых крысах, которые были использованы при изучении влияния испытуемого препарата на факторы неспецифической резистентности организма (ФНР).

Для изучения влияния испытуемого препарата на систему крови, у животных через 5 и 10 дней брали пробы крови из хвостовой вены и определяли содержание эритроцитов, лейкоцитов путем подсчета их количества в камере Горяева и качественную характеристику клеток путем анализа окрашенных мазков по Романовскому-Гимза. Результаты гематологических исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Влияние радиозащитного препарата на систему крови интактных белых крыс

Показатель	Содержание клеток крови, сут		
	исход	5	10
Эритроциты, $10^{12}/л$	$5,98 \pm 0,21$	$6,1 \pm 0,3$	$6,21 \pm 0,7$
Гемоглобин, г/л	$94,1 \pm 0,5$	$96,7 \pm 2,3$	$103,5 \pm 1,9$
Цветной показатель	$0,74 \pm 0,1$	$0,69 \pm 0,9$	$0,65 \pm 0,5$
Лейкоциты, $10^9/л$	$15,0 \pm 0,3$	$15,7 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,9$
Лимфоциты, %	$68,0 \pm 1,9$	$70,3 \pm 0,3$	$71,9 \pm 0,5$
ПЯН, $10^9/л$	$4,9 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,7$	$6,7 \pm 1,1$
СЯН, $10^9/л$	$22,1 \pm 1,3$	$21,3 \pm 2,5$	$19,9 \pm 1,9$
ЮН, $10^9/л$	$1,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,03$
Эозинофилы, %	$1,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,1$
Базофилы, %	$0,25 \pm 0,03$	-	-
Моноциты, %	$0,7 \pm 0,09$	$1,09 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,5$

Примечание: ПЯН-палочкоядерные нейтрофилы, СЯН-сегментоядерные нейтрофилы, ЮН-юные нейтрофилы

Из представленных в таблице 11 данных видно, что поступление в организм интактных животных композиционного препарата на основе веществ микробного происхождения оказывало положительное влияние на систему гемопоеза, характеризующееся увеличением содержания эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, лимфоцитов и уменьшением юных форм нейтрофилов, эозинофилов и базофилов, что свидетельствует о стимулировании влияния препарата на костномозговое кроветворение, ускорение созревания клеток как эритроцитов, так и лимфоидного и грануляцитарного ряда.

Исходя из общепризнанного в иммунологии постулата, что препараты бактериального происхождения являются иммуотропными агентами, в следующей серии опытов изучали влияние композиции на основе ВМП на систему иммунитета у белых крыс, использованных для изучения состояния

периферической крови на фоне применения испытуемого потенциального радиозащитного препарата.

Для изучения влияния указанного препарата на систему клеточного иммунитета, у крыс, получивших однократно подкожно радиозащитную композицию в дозе 11,59 мг/кг, в динамике брали пробы периферической крови (1, 5 и 10 дни после применения препарата) и определяли содержание иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов и их популяций). Результаты изучения влияния испытуемого препарата на иммунокомпетентные клетки организма представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Влияние композиционного препарата на основе ВМП на иммунологические показатели белых крыс

Иммунокомпетентные клетки	Значения иммунологических показателей, сут		
	исход	5	10
Т-лимфоциты, %	58,1±3,3	62,3±2,5	64,1±2,1
T _х (T _{тр}), %	18,3±2,9	21,1±3,5	23,9±1,9
T _с (TТ ₂), %	14,1±2,3	14,9±2,7	15,3±2,3
В-лимфоциты, %	12,09±1,70	14,2±0,9	15,5±2,7
T _{акт} (ЕА-РОК)	22,3±2,5	23,1±3,5	23,9±3,1
T _{абс.} , x10 ⁹ /л	5,87±1,90	6,93±2,90	7,1±1,5
R _{абс.} , x10 ⁹ /л	1,19±0,90	1,81±0,70	2,0±0,5
ИИ	1,28	1,42	1,53

Примечание: T_х-хелперы, T_с-супрессоры, T_{акт}-активированные лимфоциты, T_{абс}-абсолютное количество В-лимфоцитов, ИИ-иммунорегуляторный индекс (T_х/T_с).

Из данных таблицы 12 видно, что испытуемый препарат обладает иммуностропным действием, усиливая созревание иммунокомпетентных клеток в центральных и периферических органах иммунной системы с последующим поступлением их в периферическую кровь. О высоком уровне активности

иммунной системы под воздействием испытуемого препарата свидетельствует важнейший показатель состояние системы иммунитета - иммунорегуляторный индекс (ИИ), выражающий соотношение Т-хелперов (T_H) и Т-супрессоров (T_S), которое имело тенденцию к увеличению. Как известно, при радиационном поражении организма в первую очередь реагирует система иммуногемопоза с преимущественной гибелью В-лимфоцитов, Т-хелперов и преобладанием Т-супрессоров. Следовательно, применение композиционного препарата на основе веществ микробного происхождения, обладающего иммуностропным действием при радиоиммунном иммунодефиците, вполне логично, оправдано и целесообразно.

Поскольку разрабатываемый нами препарат предполагает использование его, прежде всего, в качестве радиопрофилактического препарата (вакцины), представляет практический интерес наличие в его составе специфических антигенов, индуцирующих синтез антирадиотоксических антител.

Наличие в композиционном препарате адгезивного антигена К88 определяли в РА-тесте на стекле с известной положительной моновалентной антиадгезивной сывороткой К88. Образование хлопьев различной величины в смеси культуральной жидкости с микробной биомассой и антиадгезивной сывороткой свидетельствовало о наличии в исследуемой пробе специфического адгезивного антигена К88, синтезирующего в организме антиэшерихиозные антитела.

Наличие протективного антигена и анатоксина в полученном препарате определяли методом диффузионной преципитации (РДП-тест). Для постановки реакции, чашки Петри покрывали тонким слоем 1%-ного агара в физиологическом растворе. Затем вырезали центральную лунку и на равном расстоянии – периферические лунки. В центральную лунку первых трех чашек вносили неразведенную моноспецифическую антипротективную сыворотку (против К99) с титрами 1:64, а в периферические лунки - разведенную культуральную жидкость (антигенсодержащего материала). В центральные лунки остальных 3 чашек вносили моноспецифическую антитоксическую сыворотку с

титром 1:32, а в периферические лунки – различные разведения испытуемой культуральной жидкости с биомассой; чашки термостатировали 24 часа при 37°C и учитывали наличие или отсутствие линий преципитации против соответствующих разведений токсиносодержащего материала.

Установлено, что во всех вариантах опыта обнаруживаются линии преципитации как с антитоксической, так и с антипротективной сыворотками, использованными для выявления специфических антигенов в пробах из испытуемых композиций.

Наличие радиотоксина в составе разработанной композиции радиозащитного микробного полиантигена (РЗК) определяли в реакции не прямой гемагглютинации (РНГА) с использованием антительного варианта антирадиотоксического эритроцитарного диагностикума (АТЭД), изготовленного сотрудниками отдела радиобиологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Патент RU №2324176 С1 GO1№33/02 //Иванов А.В., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В., Курбангалеев Я.М., Гайнуллин Р.Р. Опубл. 10.05.2008. Бюлл. №13). Для этого культуральную жидкость, содержащую тест-микробы, вносили в иммунологический планшет, делая двукратные разведения (1:2; 1:4; 1:16; 1:32; 1:64 и др.), далее в каждую лунку вносили по 1 капле сенсibilизированных антирадиотоксической сывороткой эритроцитов барана (АТЭД), смесь гомогенизировали и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. Оценку результатов РНГА проводили по форме осаждения сенсibilизированных эритроцитов на дно лунок: осадок в виде зонтов принимали за положительную реакцию с оценкой 3+, 4+, а осаждение их на дно в виде пуговок - за отрицательную.

Результаты серологического анализа культуральной жидкости с биомассой тест-штаммов, составляющей основу потенциальной радиозащитной композиции, показали, что исследуемый препарат обладает полным антигенным набором, представленным адгезивным К88-антигеном, протективным антигеном, анатоксином и радиотоксином, титры которых составляли $3,49 \pm 0,7 \log_2$ (К-88-

антиген), $3,57 \pm 0,5 \log_2$ (протективный антиген); $2,45 \pm 0,7 \log_2$ (энтеротоксин) и $3,9 \log_2$ (радиотоксин) соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная микробная композиция обладает полным набором специфических антигенов, способных синтезировать полноценные антитела, обладающие как антиинфекционным, так и радиозащитным свойствами при профилактическом применении препарата.

2.3.4 Изучение химического и биологического состава поликомпонентной радиозащитной композиции

В следующей серии опытов проведены исследования по определению химического и биохимического состава разработанной поликомпонентной бифункциональной композиции на основе веществ микробного происхождения. В разработанном препарате определяли содержание белка по методу Лоури, основанному на реакции белков с реактивом Фолина, дающей синее окрашивание. Для этого к $0,4 \text{ см}^3$ культуральной жидкости (композиционного испытуемого препарата) добавляли 2 см^3 раствора (смесь 50 мл раствора А и 1 мл раствора В). Смесь перемешивали и через 10 минут приливали к ней $0,2 \text{ см}^3$ рабочего раствора Фолина (100 г вольфрата натрия - $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Через 30 минут смесь подвергали спектрофотометрированию на СФ-46 при длине волны 750 нм . Количество белка находили по калибровочной кривой.

С учетом важности нуклеиновых кислот в формировании радиорезистентности на фоне воздействия на организм ионизирующей радиации, представлялось логичным определение содержания указанных субстратов в составе композиционного препарата. Исходя из этого тезиса, были проведены исследования по определению содержания нуклеиновых кислот в испытуемом препарате, которое проводили с использованием метода Спирина (Методические указания МУК 4./4.2.588-96, утв. зам. гл. гос. сан. врача РФ 31 октября 1996 г.), который основан на измерении разности показателей оптической плотности препарата при спектрофотометрическом анализе. Содержание нуклеиновых кислот (X) в мкг/мл вычисляли по соответствующей формуле, данный метод и формула приведена на стр. 61 настоящей диссертации.

Определение в исследуемой КЖ содержания РНК проводили по аналогичной методике с той разницей, что при этом для расчета использовали

калибровочную кривую, выведенную с использованием в качестве стандарта с разницей концентрации значения РНК.

Результаты спектрометрического анализа проб из КЖ и микробной биомассы испытуемой композиции показали, что 11,59 мг сухого вещества препарата содержит 0,21 мг/мл (1,81%) ДНК и 0,84 мг/мл (7,24%) РНК.

Продолжая изучение состава культуральной жидкости используемых тест-микробов для создания композиционного радиозащитного препарата, в следующей серии опытов определяли в указанном субстрате содержание углеводов с использованием антронового метода.

Результаты спектрофотометрического анализа проб продуктов метаболизма в культуральной жидкости, полученной путем выращивания тест-штаммом трех видов микроорганизмов, составляющих основу композиционного препарата, показали, что содержание углеводов в препарате составляет 2,5% от сухого вещества.

Учитывая, что ряд микроорганизмов (*E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и др.) в процессе жизнедеятельности синтезируют и экспрессируют в окружающую среду антибактериальные (антибиотические) вещества (бактериоцины, колицины), в следующей серии опытов изучали наличие и содержание колицинов в ассоциации из биомассы и культуральной жидкости, составляющих основу композиционного радиозащитного препарата.

Для индикации колицинов в препарате использовали метод Аббата и Шейлона (Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г., 1966) с использованием эталонных (индикаторных) штаммов *E.coli* K12ROW и JK116.

Установлено, что в культуральной жидкости, полученной при центрифугировании *E.coli* ПЛ-6, обнаружены антибактериальные субстраты - колицины, количество которых составляло $100,5 \pm 2,7$ условных единиц.

Учитывая, что одним из важнейших культуральных компонентов бактериальных клеток, обладающих значительным радиозащитным эффектом, являются полисахариды, которые в процессе жизнедеятельности микроба экспрессируются в окружающую среду в качестве сурфактантов, в следующей

серии опытов изучали наличие в ассоциированной культуральной жидкости биомассы тест-штаммов полисахаридов.

Содержание полисахаридов *E.coli* в изучаемом объекте определяли серологическим методом в реакции непрямой гемагглютинации (ПРНГА). Для проведения серологического анализа (РНГА) использовали антительный вариант эритроцитарного диагностикума - сенсibilизированные антиполисахаридной сывороткой эритроциты барана, которые по 1 капле вносили в иммуноположительные планшеты с различным разведением исследуемой культуральной жидкости потенциального радиозащитного препарата.

Результаты идентификации полисахаридов в РНГА показали, что культуральная жидкость, полученная при инкубировании тест-штаммов *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* в жидкой питательной среде, содержит полисахариды, вступающие в реакцию гемагглютинации с сенсibilизированной антиполисахаридной сывороткой *E.coli* в титрах РНГА 1:32-1:64 ($5,25 \pm 0,5 \log$).

С учетом данных литературы о том, что в механизме радиозащиты организма существенную роль играют окислительно-восстановительные (оксидоредуктазы), сульфгидрильные и антиокислительные (антирадикальные) ферменты, в разрабатываемом препарате (в культуральной жидкости с ассоциацией биомассы тест-штаммов) определяли ферменты указанных штаммов.

К классу оксидоредуктаз относятся окислительно-восстановительные ферменты: дегидрогеназы, пероксидазы, каталаза. Аэробные дегидрогеназы переносят водород от окислительного субстрата непосредственно на молекулярный кислород, в следствие чего образуется перекись водорода. Анаэробные дегидрогеназы переносят водород от окисляемого вещества на другое вещество, которое восстанавливается в лейкосоединение. Пероксидаза переносит водород вещества на перекись водорода. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и минеральный кислород.

Несмотря на то, что имеется ряд методов определения ферментов (монометрические методы с использованием аппарата Варбурга, метод непрерывного титрования с помощью специального устройства, рН

инкубационной смеси автоматически поддерживается на постоянном уровне путем добавления щелочи, принцип амперометрического титрования с использованием капельно-ртутного электрода, спектрометрические методы). Хотя из вышеуказанных методов самым эффективным остается спектрофотометрический метод, однако он предполагает использование во многих случаях нескольких сопряженных ферментов (коферментов), в частности никотиноидные коферменты НАД и НАДФ, к которым предъявляются особые требования - они должны быть высокой степени чистоты. Если в определенном объекте имеется смесь ферментов (например, в культуральной жидкости), то наличие сопутствующих активностей может искажать полученные результаты. Поэтому использование спектрофотометрического метода в нашем случае является нецелесообразным и неадекватным.

По мнению Першина Б.Б. (1971), самым простым, объективным и удобным является метод Тунберга, основанный на определении скорости реакции индикатора ферментации-метиленовой сини на фоне добавления в инкубационную смесь субстратов дыхания (сукцината, глюкозы, этанола, лактата, формиата и др.).

С учетом роли и важности отдельных ферментов в радиационной патологии, профилактике и терапии радиационных поражений, в потенциальном радиозащитном препарате на основе веществ микробного происхождения, проводили биохимические исследования культуральной жидкости на определение в ней содержания ферментов, относящихся к классу оксидаз-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ), сульфгидрильных ферментов (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы - ГЛАДГ), лактатдегидрогеназы - (ЛДГ); алкогольдегидрогеназы (АДГ); антиоксидантного фермента - формиатдегидрогеназы (ФДГ).

Для определения содержания в культуральной жидкости исследуемого препарата вышеназванных ферментов, в инкубационные среды трубок Тунберга вносили по 0,5 мл культуральной жидкости и субстраты дыхания: 0,5 мл 0,02 М раствора натриевой соли глюкозо-6-фосфата (1 трубка), 0,003 М раствора

бариевой соли глицераль-3-фосфата (2-я трубка), 0,5 М раствора натриевой соли D,L-молочной кислоты (3-я трубка), 96%-ного раствора этанола (4-я трубка), 0,01 М раствора натриевой соли муравьиной кислоты (5 трубка Тунберга). После внесения компонентов в трубки Тунберга проводили эвакуацию воздуха из трубок с помощью насоса Комовского и содержимое трубок инкубировали в водяной бане 30 минут при 37°C, после чего проводили слияние инкубационной смеси с индикаторным ферментом - метиленовой синью, которая предварительно была внесена в боковую трубку (пробку) Тунберга. После слияния инкубационной смеси и индикатора реакции смесь инкубировали до обесцвечивания, фиксируя при этом секундомером время обесцвечивания индикатора (метиленовая синь).

Результаты определения содержания различных классов дегидрогеназ в культуральной жидкости разрабатываемого радиозащитного препарата представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Содержание оксидоредуктаз, антиоксидантных ферментов - дегидрогеназ в культуральной жидкости радиозащитной композиции

Фермент	Класс	Активность дегидрогеназ по времени обесцвечивания индикатора ферментации (мин)
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ)	оксидоредуктазы	8,71±0,53
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГЛАФДГ)	сульфгидрильные	10,91±0,77
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	оксидоредуктазы	8,97±0,45
Алкогольдегидрогеназа (АДГ)	сульфгидрильные	9,74±0,63
Формиатдегидрогеназа (ФДГ)	антикоагулянты	10,53±0,57
Контроль	-	8,67±0,33

Из данных таблицы 13 видно, что в исследуемой пробе – культуральной жидкости разработанной композиции содержатся ферменты классов оксидоредуктаз (ГФДГ), сульфгидрильных (ГЛАФДГ, ЛДГ, АДГ) и антикоагуляционных (ФДГ) дегидрогеназ. При этом обнаружено, что наиболее высокую активность в культуральной жидкости проявляли глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Активность сульфгидрильного фермента – алкогольдегидрогеназы была незначительной (в 1,11 раза, $P \geq 0,05$) и она уступала таковой ГФДГ и ЛДГ. Содержание ферментов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГЛАФДГ) и формиатдегидрогеназы (ФДГ) в культуральной жидкости изучаемого препарата было менее выражено-уступало таковому ГФДГ и ЛДГ в 1,18 раза и 1,25 раза соответственно.

Таким образом, в культуральной жидкости разрабатываемого потенциального радиозащитного препарата содержатся окислительно-восстановительные ферменты классов оксидоредуктаз, сульфгидрильные и антиоксидантные ферменты, которые играют важную роль в формировании радиорезистентности и проявлении радиотерапевтического эффекта препарата.

Учитывая, что аминокислоты, витамины, микро- и макроэлементы играют важную роль в проявлении радиозащитного эффекта, представлял интерес изучение наличия указанных биологически активных веществ в составе разрабатываемого радиозащитного препарата.

В связи с тем, что определение аминокислот, витаминов микроэлементов предполагает использование специального оборудования (аминокислотного анализатора, фотометров, труднодоступных дорогостоящих растворов), эти исследования были проведены в аккредитованном испытательном центре (химико-аналитическая лаборатория) Всероссийского государственного научно-исследовательского института животноводства (ВГНИЖ) РАСХН под руководством проф. Фомичева Ю.П.

Согласно протоколу испытаний АКНЦ №РОСС RU.0001/21 Г 84 от 29.12.99 г. в культуральной жидкости препарата РЗК от 10 апреля 2015 г., испытуемый препарат в сухом остатке содержит следующие аминокислоты (%): лизина - 2,01;

гистидина - 1,75; аргинина - 2,05; аспарагиновой кислоты - 3,94; трионина - 1,39; серина - 1,41; глутаминовой кислоты - 3,53; пралина - 1,96; аргинина - 1,98; цистина - 0,22; валина - 1,72; метионина - 0,46; изолейцина - 1,45; лейцина - 2,25; тирозина - 1,24; фенилаланина - 1,91.

Химический состав культуральной жидкости препарата включает органические кислоты: глюкуроновую (5,7-6,9 мг/л); щавелевую в (0,3-0,6); пировиноградную (3,9-5,1); лимонную (0,75-1,3); яблочную (0,53-1,1); молочную (0,41-0,65); янтарную (0,31-0,55).

Содержание микроэлементов в сухом веществе культуральной жидкости составляет (мг/л): калий - 14,02; натрий - 5,7935; магний - 1,3835; железо - 1,02; медь - 0,32; цинк - 0,7135; марганец - 3,4235; хром - 0,11; калий - 4,35; фосфор - 4,71.

Исходя из данных литературы о том, что кишечная палочка является активным продуцентом ряда витаминов, особенно группы В, в вышеуказанной лаборатории были проведены исследования по определению содержания витаминов в культуральной жидкости испытуемого препарата. Результаты химических исследований показали, что в культуральной жидкости препарата РЗК содержатся следующие витамины (мкг/мл): В₁ – 5; В₂ - 0,5; В₃ - 20; В₅ - 0,9; В₆ - 3; В₇ - 0,2; В₉ - 0,3; В₁₀ - 0,1; В₁₂ - 0,7; витамин К - 0,9; витамин Е - 15.

Таким образом, результаты биохимических, спектрофотометрических, серологических и иммунохимических исследований с использованием современных сертифицированных методов показали, что культуральная жидкость потенциального радиозащитного композиционного препарата, будучи продуктом метаболизма трех видов микроорганизмов (*E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum*), обладает широким набором биологически активных веществ, представленных экзо- и эндотоксинами, соматическими антигенами, моно- и полисахаридами, нуклеиновыми (ДНК, РНК) кислотами, аминокислотами; окислительно-восстановительными, сульфгидрильными и антиокислительными ферментами (дегидрогеназами), антибактериальными (колицины, субтилины) веществами, макро- и микроэлементами и витаминами группы В, К, Е.

Полученные данные химического, серологического, иммунохимического и токсикологического анализа состава препарата дают основание считать, что, благодаря поликомпонентному составу препарата и взаимоусиливающему действию этих компонентов в условиях *in vivo*, он может обеспечить формирование радиорезистентности при предварительном (профилактическом) и пострadiационном (лечебном) применении.

Несмотря на широкий спектр биологически активных веществ в разрабатываемом поликомпонентном препарате, при анализе таблицы 13 диссертации видно, что в составе культуральной жидкости обнаруживается относительно низкое содержание антиоксидантных ферментов (формиатдегидрогеназа, катализирующая процесс дисмутации токсических продуктов радиолитического альдегидов, образующихся в результате деградации липидов в облученном организме). При этом в культуральной жидкости не были выявлены ключевые антирадикальные ферменты, такие, как каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза из-за низкого содержания их в исследуемом объекте или использовании неадекватных методов исследования ферментов. Поэтому были продолжены исследования по изучению возможности усиления синтеза антирадикальных ферментов тест-штаммов, используемых в качестве основных компонентов радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения.

2.3.5 Изучение возможности усиления синтеза антирадикальных ферментов использованными в работе тест-микробами

При выполнении исследований исходили из того, что одним из ключевых механизмов поражения организма ионизирующей радиацией является развитие свободнорадикальной патологии, сопровождающейся активацией или избытком свободных радикалов и конечных токсичных продуктов - альдегидов (малондиальдегида), кетонов, окисленных ненасыщенных жирных кислот, эпоксидов. Следовательно, введение в организм фармакологических средств, нейтрализующих или дисмутирующих токсичные радикалы, является одним из эффективных методов и средств защиты облученного организма от радиационной гибели.

Одними из ключевых антирадикальных ферментов являются пероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза, важнейшей функцией которых являются разрушение опасных для жизнедеятельности клеток пероксидных радикалов (HO^\cdot , HOO^\cdot , H_2O_2 , H_3O^\cdot), вызывающих гибель клеток костного мозга, селезенки, тимуса, лимфатических узлов, т.е. органов иммуногемопоеза (Королюк, М.А.1988).

С учетом этого, были продолжены эксперименты по возможности усиления тест-штаммом (*E.coli* ПЛ-6) синтеза антирадикальных ферментов в процессе адаптации микроба к повышенным дозам ионизирующей радиации и приобретению им радиорезистентности. Для этого *E.coli* «ПЛ-6» выращивали на МПБ и МПА в течение 2-4 суток в термостате при 37°C. Выращенные культуры разводили физиологическим раствором до концентрации 1×10^9 м.к./мл и подвергали однократному облучению гамма-лучами на установке «Исследователь» с источником излучения ^{60}Co . При этом использовали различные дозы радиационного воздействия, которые колебались в диапазоне 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 3,5, 4,0 кГр. Для определения числа выживших микробных клеток во взвеси до и после облучения 0,1 мл различных разведений осторожно

наносили на поверхность питательной среды и растирали шпателем. Учет результатов проводили после инкубации посевов в термостате при 37°C в течение 24 и 48 часов.

Установлено, что доза облучения, понижающая число микробов в 10 раз, составляла 0,31Гр; D_{60} - 2,0; D_{90} - 3,0; D_{99} - 3,5 кГр. Полная инаktivация и прекращение роста испытуемой культуры наступали при дозе 3,5 кГр.

Для проверки эффективности белковой защиты при действии летальных доз гамма-лучей на тест-культуру, последнюю вносили в МПБ в концентрации 1×10^9 м.к./мл и подвергали облучению в дозе 3,5 кГр. Затем культуру пересеивали на МПА. При просмотре посевов через 24 часа установили, что выживали лишь отдельные колонии исходной культуры. На пятом пересеве облученных вариантов тест-культуры наблюдали сплошной рост на МПА, что свидетельствовало об адаптации ее к летальной дозе гамма-лучей. В последующем тест-культуру, адаптированную к летальной дозе гамма-лучей, подвергали повторному облучению увеличивающимися дозами - 3,8; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5, 8,0 кГр. После облучения культуру пересеивали на МПА; выросшую культуру вновь подвергали облучению в возрастающих дозах.

При детальном и регулярном визуальном просматривании посевов и мазков было выявлено, что, начиная с 6-й генерации, окрашенных по Граму мазков, начали обнаруживаться признаки модификации штамма *E.coli*, которые отличались от исходных удлинением клеток. В начальные периоды облучения число таких клеток было незначительным, а в последующих генерациях, с возрастанием дозы облучения, число таких клеток резко увеличивалось, и при увеличении летальной дозы до 7,5 кГр количество модифицированных микробных клеток было уже подавляющим.

Таким образом, в результате лучевого воздействия на исходный штамм *E.coli* увеличивающимися дозами гамма-лучей получен стабильный радиорезистентный вариант кишечной палочки, отличающийся от исходного высокой радиорезистентностью, и выживающий при дозе 7,5 кГр, что превышает исходный уровень в 2,14 раза. При этом отмечали одновременное изменение

морфологических свойств в виде значительного (до 7 раз) увеличения длины клеток.

Исходя из известного постулата радиационной генетики о том, что увеличение содержания ДНК в клетках служит одним из факторов развития радиорезистентности, у исходного и полученного радиорезистентного мутанта *E.coli* (R₇) изучали содержание нуклеиновой кислоты в клетке. Установлено, что содержание ДНК у исходной культуры составляло $8,5 \pm 0,99$ мкг, а у радиорезистентного мутанта - $15,3 \pm 0,17$ мкг на $0,32 \pm 0,07$ мг бактериальной биомассы 1×10^9 мк/мл *E.coli*.

Результаты биохимических исследований как клеточной суспензии и клеточного экстракта, так и культуральной жидкости, полученной при выращивании исходной и радиомодифицированной культуры *E.coli*, показали, что радиоиндуцированная резистентность микроорганизма сопровождалась изменением клеточного метаболизма с приобретением способности синтезировать ключевые антиоксидантные ферменты: каталазу, пероксидазу и супероксиддисмутазу.

Содержание антиоксидантного фермента каталазы в суспензии и клеточном экстракте определяли наиболее простым и доступным методом - путем нанесения на предметное стекло капли 3%-ного раствора перекиси водорода и испытуемых культур (*E. coli* ПЛ-6 и *E. coli* ПЛ-6(R₇)). Наличие каталазы в культуральной жидкости определяли полиграфическим путем измерения активности контрольных и опытных проб. Активность фермента определяли по формуле:

$$E = (A_{хол} - A_{оп}) \times V \times t \times K \text{ (мкат/л/кг)}, \quad (3) \text{ где:}$$

E – активность каталазы (в мкат/л),

$A_{хол}$ и $A_{оп}$ – экстинкция холостой и опытной проб,

V – объём вносимой пробы - 0,1 мл,

t – время инкубации - 600 с,

К – коэффициент миллимолярной экстракции перекиси водорода, равный $22,2 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

В клеточной суспензии опытного экстракта и культуральной жидкости опытного (*E.coli* ПЛ-6) и радиомодифицированного мутанта *E.coli* ПЛ-6(R₇) определяли важный фермент антиоксидантной защиты - пероксидазу по методу Кушмановой О.Д. (1983). В качестве окисляемого субстрата использовали пирогаллол, который окислялся в пурпурогалин с максимумом поглощения 430 нм. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-46.

Исследуемый раствор содержал 0,8 мл 0,006 М натрий-фосфатного буфера рН=6,8; 0,12 мл ферментной вытяжки (суспензия, экстракт или культуральная жидкость); 0,5 мл 0,15 %-ной H₂O₂, 1,1 мл H₂O и 0,5 мл 0,003 М пирогаллола. В контроле вместо H₂O₂ добавляли 0,5 мл H₂O. Активность фермента определяли по формуле:

$$A = (Dt_2 - Dt_1) / (t_2 - t_1) \cdot c, \quad (4) \text{ где:}$$

A - активность фермента;

D - оптическая плотность;

t - время (с);

C - концентрация.

Измерение проводили в течение 2-3 минут.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали спектрофотометрический метод Костюка В.А. и др. (1990), основанный на способности тормозить реакцию автоокисления кверцетина при рН=10 в присутствии N-N-N-N-тетраметилэтилендиамина (ТЭМЕДА). За единицу активности СОД принимали количество белка, вызывающее 50%-ное ингибирование окисления кверцетина (ед/мг).

Результаты биохимических исследований клеточной суспензии, клеточного экстракта и культуральной жидкости *E.coli* ПЛ-6 и *E.coli* ПЛ-6(R₇) представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Содержание ДНК, ферментов каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы в клеточной суспензии, клеточном экстракте и культуральной жидкости *E.coli* ПЛ-6 и *E.coli* ПЛ-6(R₇)

Штамм	Объект исследований	Содержание и активность фермента			
		ДНК, мкг/10 ⁹ мл	КАТ, мкат/мл	СОД, мкМ/г	ПА, с ⁻¹ м ⁻¹
<i>E.coli</i> ПЛ-6	Клеточная суспензия	8,5±0,09	-	-	0,11x10 ⁻³ ±0,01
	Клеточный экстракт	7,9±0,03	-	-	0,09x10 ⁻³ ±0,01
	Культуральная жидкость	3,3±0,01	-	-	0,03x10 ⁻³ ±0,01
<i>E.coli</i> ПЛ-6(R ₇)	Клеточная суспензия	15,3±0,17	8,5±0,03	1,93±0,15	0,24x10 ⁻³ ±0,01
	Клеточный экстракт	13,1±0,33	8,5±0,03	1,49±0,21	0,19x10 ⁻³ ±0,01
	Культуральная жидкость	8,7±0,06	8,5±0,03	0,97±0,09	0,05x10 ⁻³ ±0,01

Примечание: КАТ - каталаза; СОД - супероксиддисмутаза; ПА - пероксидаза; ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота.

Из представленных в таблице 14 данных видно, что приобретенное в результате длительного и многократного воздействия на *E.coli* гамма-лучей в возрастающих дозах стимулирует у тест-микроба развитие радиорезистентности с изменением клеточного метаболизма, что сопровождается усилением синтеза нуклеиновых кислот (ДНК) и ферментов антиоксидантной защиты, а именно каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутаза. Так, если у исходного тест-штамма *E.coli* ПЛ-6 содержание ДНК в клеточной суспензии, клеточном экстракте и культуральной жидкости составляло 8,5±0,09 мкг/10⁹ мл; 7,9±0,03 и 3,3±0,01 мкг/10⁹ мл, то у радиорезистентного мутанта эти значения были в 1,8;

1,66 и 2,64 раза выше, чем у исходного штамма. Антиоксидантные ферменты каталаза и супероксиддисмутаза ни в суспензии, ни в культуральном экстракте и культуральной жидкости у исходного штамма не выявлены. В отличие от исходного штамма, у радиомутанта *E.coli* ПЛ-6(R₇) обнаружены оба этих фермента как в клеточной суспензии, так и клеточном экстракте и культуральной жидкости в количестве от $21,4 \pm 0,60$ до $27,51 \pm 0,75$ мкат/мл (каталаза) и от $0,97 \pm 0,09$ до $1,93 \pm 0,15$ мкМ/г (супероксиддисмутаза).

Индукция радиорезистентности у *E.coli* оказывала существенное влияние и на синтез глутатионпероксидазы. У исходного штамма *E.coli* активность изучаемого фермента в исследуемых фракциях биомассы (суспензия, экстракт и культуральная жидкость) колебалась в пределах от $0,03 \times 10^{-3} \pm 0,01$ с⁻¹м⁻¹ до $0,11 \times 10^{-3} \pm 0,01$ с⁻¹м⁻¹, то у радиорезистентного мутанта эти значения были выше в 2,18; 2,11 и 1,67 раза по сравнению с исходным штаммом.

Следовательно, в результате многократного радиационного воздействия, тест-штамм *E.coli* ПЛ-6(R₇) приобрел свойство синтезировать антирадикальные ферменты, придающие тест-микробу радиопротекторные свойства.

Усиление синтеза нуклеиновых кислот, в частности, ДНК под воздействием гамма-лучей, как видно из вышеприведенных данных, наводит на мысль о том, что повышение радиорезистентных свойств тест-штамма *E.coli* в процессе радиомутации может осуществляться за счет изменения синтеза тиоловых (сульфгидрильных) групп белков, в частности, важнейшей аминокислоты - цистеина, синтез и взаимопревращение которого находится под контролем генетического аппарата клеток - РНК, ДНК.

Исходя из вышесказанного предположения о том, что приобретенная в результате многократного радиационного воздействия на тест-микроб радиомодификация вполне может отразиться на метаболизме аминокислот, в т.ч. и тиоловых (серосодержащих) соединений, проводили исследования по изучению метаболизма одной из ключевых серосодержащих аминокислот - цистеина. Для этой цели пробы сухой биомассы исходного (*E.coli* ПЛ-6) и радиорезистентного (*E.coli* ПЛ-6(R₇)) варианта тест-микроба навеской 100 мг ($3,18 \times 10^{11}$ м.к./мл)

подвергали кислотному гидролизу (6 н раствор HCl 1:200) при 105⁰С в течение 24 ч с последующим хроматографированием определяемой аминокислоты на специальной бумаге (№2, сорт 1, «быстрая», 1992) отечественного производства в соответствии с методическими рекомендациями Зайцевой Т.Н. и Ткачевой Н.Г. (1958). Испытуемые гидролизаты исходного и радиорезистентного вариантов *E.coli* наносили на бумагу пипеткой на одно и то же место. Таким же способом наносили раствор смеси аминокислот. Разгонку проводили трехкратно по 6 часов. Расчеты по определению содержания аминокислот производили по калибровочным кривым для аминокислот по L-аминому азоту.

Результаты биохимических исследований показали, то радиомодификация исходного штамма *E.coli* сопровождается активацией метаболизма аминокислот, характеризующимся 2-кратным усилением синтеза серосодержащей аминокислоты - цистеина из ее предшественников – серина и глицина.

Таким образом, в результате радиомикробиологических исследований, получен радиорезистентный (радиомодифицированный) вариант *E.coli* ПЛ-6(R₇), отличающийся от исходного штамма *E.coli* ПЛ-6 цитологическими (удлинение размеров микробной клетки) и биохимическими (1,18-кратное увеличение синтеза ДНК, приобретение свойства активизировать ключевые ферменты антирадикальной защиты, супероксиддисмутаза, каталазы, глутатионпероксидазы, а также серосодержащей аминокислоты - цистеина, обладающих радиопротекторными свойствами).

Полученный в результате многократного воздействия на исходный штамм *E.coli* ПЛ-6 гамма-лучами вариант *E.coli* ПЛ-6(R₇) в дальнейшем был использован в качестве одного из основных компонентов - микробной биомассы в многокомпонентном композиционном препарате РЗК.

2.4 Изучение радиозащитных свойств РЗК на лабораторных животных

2.4.1 Оценка радиозащитных свойств комплексного препарата РЗК на белых мышах

Результаты скрининговых исследований с использованием *in vitro* тест-системы (инкубация летально облученных лимфоцитов в присутствии композиционного препарата РЗК) показали радиопротекторное действие препарата как при профилактическом, так и лечебном применении. С учетом полученных данных были проведены опыты по оценке радиозащитной активности препарата в условиях *in vivo*-на лабораторных животных. Первую серию опытов проводили на 170 белых мышах живой массы 18-20 г, разделенных на 17 групп по 10 животных в каждой. Животным 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 групп однократно подкожно за 1, 3, 5 и 10 суток до и через 1, 3, 5 и 10 суток после летального облучения (7,7 Гр) вводили композиционный радиозащитный препарат на основе веществ микробного происхождения в дозе 0,1 мл (11,59 мг/мл сухого вещества). Животным 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 16 групп в аналогичных условиях - радиозащитный полиантиген - МПАГ. Облученным животным 17 группы препараты не вводили, они служили контролем облучения. Животных содержали на обычном рационе в идентичных условиях, вели наблюдение, следя за клиническим состоянием, регистрируя число павших и выживших животных. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Влияние препаратов РЗК и МПАГ на течение, исход ОЛБ и выживаемость летально облученных животных

Вариант опыта	Применение препарата	Количество животных, гол	Результат опыта		
			пало	выжило	% выживаемости
1	2	3	4	5	6
1	Однократное п/к введение РЗК за 24 ч до облучения в дозе 0,1 мл	10	2	8	80
2	Однократное п/к введение МПАГ за 24 ч до облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
3	Однократное п/к введение РЗК через 24 ч после облучения в дозе 0,1 мл	10	3	7	70
4	Однократное п/к введение МПАГ через 24 ч после облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
5	Однократное п/к введение РЗК за 3 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	2	8	80
6	Однократное п/к введение МПАГ за 3 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
7	Однократное п/к введение РЗК через 3 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	3	7	70
8	Однократное п/к введение МПАГ через 3 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
9	Однократное п/к введение РЗК за 5 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	2	8	80
10	Однократное п/к введение МПАГ за 5 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	4	6	60

1	2	3	4	5	6
11	Однократное п/к введение РЗК через 5 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	3	7	70
12	Однократное п/к введение МПАГ через 5 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
13	Однократное п/к введение РЗК за 10 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	3	7	70
14	Однократное п/к введение МПАГ за 10 сут до облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
15	Однократное п/к введение РЗК через 10 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	3	7	70
16	Однократное п/к введение МПАГ через 10 сут после облучения в дозе 0,1 мл	10	5	5	50
17	Контроль облучения	10	6	4	60

Из представленных в таблице 15 данных видно, что препарат РЗК оказывал на организм летально облученных животных радиозащитный эффект как при профилактическом (за 1, 3, 5 и 10 суток до облучения), так и лечебном (через 1, 3, 5 и 10 суток после облучения) применении препарата. Параллельное использование известного радиозащитного препарата – МПАГ, в отличие от сконструированного композиционного препарата на основе веществ микробного происхождения - РЗК, терапевтическим эффектом не обладал - количество павших животных от ОЛБ тяжелой степени достоверно не отличалось от такового животных группы контроля облучения. Поскольку разрабатываемый радиозащитный препарат РЗК, в отличие от контрольного (МПАГ), обладал полифункциональным (радиозащитным и радиотерапевтическим) действием, необходимо было подтвердить терапевтическую активность препарата в сравнении с регламентированным при ОЛБ терапевтическим препаратом – противорадиационным лечебно-профилактическим иммуноглобулином (ПЛПИ).

Для оценки сравнительной радиотерапевтической активности препарата РЗК проводили следующую серию опытов на 60 белых мышах, облученных в дозе 7,7 Гр и подвергнутых лечению препаратом через 3, 5, 7 и 10 суток после летального облучения. В качестве контрольного лечебного препарата применяли регламентированный при ОЛБ противорадиационный лечебно-профилактический иммуноглобулин (ПЛПИ). Результаты изучения радиозащитной активности препаратов представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Течение и исход ОЛБ летально облученных белых мышей на фоне однократного применения лечебных препаратов

	Испытуемый препарат	Доза препарата, мг/кг	Время введения препарата после облучения, сут	Выживаемость, %
1	РЗК	0,12	3	70
2	ПЛПИ	0,5	3	70
3	РЗК	0,12	5	70
4	ПЛПИ	0,5	5	60
5	РЗК	0,12	7	70
6	ПЛПИ	0,5	7	50
7	РЗК	0,12	10	60
8	ПЛПИ	0,5	10	40
9	РЗК	0,12	10	50
10	Контроль	-	-	0

Из данных таблицы 16 видно, что испытуемый препарат РЗК обладает лечебным эффектом, обеспечивая 70%-ную выживаемость летально облученных

животных как при экстренном (3-5 сут после облучения), так и при отсроченном (7-10 сут после облучения) его применении.

На фоне применения противорадиационного лечебно-профилактического иммуноглобулина выживаемость летально облученных животных при экстренном применении (1-3 сут после облучения) сравнивалась с таковой у препарата РЗК (70%-ная защита), а при экстренном применении (7-10 сут после) известного препарата изучаемый показатель уступал таковому в 1,4-1,75 раза.

При этом следует отметить, что 50-60%-ная защита летально облученных животных при применении ПЛПИ достигалась при использовании значительно высокой лечебной дозы препарата - 0,5 мг на мышь (50 мг 1 кг живой массы), в то время как 70%-ный лечебный эффект РЗК проявлялся при дозе препарата 0,12 мг на мышь (12 мг/кг), что превосходит по лечебному эффекту в 4,1 раза известный препарат.

Полученные данные по изучению радиозащитной активности сконструированного препарата РЗК на белых мышах послужили основанием для испытания препарата на белых крысах и кроликах.

2.4.2 Оценка радиозащитной эффективности композиционного препарата РЗК на белых крысах

В опытах использовали белых крыс живой массой 180-200 г, которые были разделены на 10 групп по 10 крыс в каждой. Животным 1, 2, 5, 7 групп за 5, 10, 15 и 30 суток облучения подкожно однократно вводили препарат РЗК в дозе 0,5 мл. Животным за 3, 4, 6, 8 суток до облучения в аналогичных условиях вводили МПАГ. Через 5, 10, 15 и 30 суток после введения животных облучали в дозе 9,5 Гр. Наблюдение за животными вели в течение 30 дней, регистрируя число павших, выживших, а также проводили патологоанатомическое вскрытие павших животных. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Радиозащитная активность препаратов РЗК и МПАГ при однократном подкожном введении крысам за 5-10 суток до облучения в дозе 9,5 Гр

Вариант опыта	Препарат	Количество животных, гол	Результат опыта		
			пало, гол	выжило (гол)	% выживаемости
1	Композиционный препарат РЗК за 5 сут до облучения	10	3	7	70
2	Композиционный препарат РЗК за 10 сут до облучения	10	3	7	70
3	Радиозащитный полиантиген МПАГ за 5 сут до облучения	10	5	5	50
4	Радиозащитный полиантиген МПАГ за 10 сут до облучения	10	4	6	60

5	РЗК за 15 сут до облучения	10	3	7	70
6	МПАГ за 15 сут до облучения	10	3	7	70
7	РЗК за 30 сут до облучения	10	3	7	70
8	МПАГ за 30 сут до облучения	10	3	7	70
9	РЗК через 5 после облучения	10	3	7	70
10	МПАГ через 5 сут после облучения	10	8	2	20

Из данных таблицы 17 видно, что разработанный композиционный препарат РЗК при профилактическом применении за 5, 10, 15 и 30 суток до летального облучения (9,5 Гр) белым крысам обеспечивал 70%-ную защиту животных от радиационной гибели при гибели всех контрольных.

При параллельном применении МПАГ формирование радиорезистентности имело зависимость от срока применения препарата (интервала времени между введениями препарата и облучением животных) - при экстренном применении уровень защиты (введение препарата за 5, 10 суток до облучения) не превышал 50-60%, а защита от тяжелой степени ОЛБ у них наступала при 15-суточном интервале между иммунизацией и облучением, т.е. препарат работает по типу вакцинного препарата.

При параллельном изучении лечебного действия испытуемых препаратов показало (варианты 9, 10 таблица 17), что регламентированный препарат МПАГ лечебным действием не обладает, поскольку при постлучевом применении (через 5 суток после облучения) из 10 облученных животных пали 8 (гибель 80% животных), что свидетельствует об отсутствии лечебного действия препарата.

2.4.3 Оценка радиозащитной активности композиционного препарата на кроликах

Продолжая исследования по изучению радиозащитной активности сконструированного композиционного препарата на основе веществ микробного происхождения в условия *in vivo*, следующую серию опытов проводили на 66 кроликах живой массой 2,0-2,5 кг, разделенных на 11 групп по 6 животных в каждой. Кроликов 1, 3, 5, 7 и 9 групп за 5, 10, 15, 20 и 30 суток до облучения иммунизировали препаратом РЗК однократно подкожно в дозе по 1,0 мл ($0,9 \times 10^9$ КОЕ/кг или 11,6 мг/кг). Животным 2-й; 4-й; 6-й; 8 и 10-й групп в аналогичных условиях и дозах вводили МПАГ за 5, 10, 15, 20 и 30 суток до летального облучения. Облученным в дозе 11,0 Гр животным 11-й группы препараты не вводили (контроль облучения). Через указанные интервалы времени после введения препаратов животных облучали на гамма-установке «Пума» в дозе 11,0 Гр ($LD_{100/30}$). За животными вели наблюдение в течение 30 дней, регистрируя число павших, выживших, устанавливая сроки гибели, изучая клинику и характер патологических изменений в органах и тканях павших животных. Результаты изучения влияния испытуемых препаратов на течение, исход ОЛБ и выживаемость кроликов представлены в таблице 18.

Из данных таблицы видно, что оба препарата оказывали на животных радиозащитный эффект, обеспечивая 66,6-83,3%-ную выживаемость летально облученных кроликов. Однако степень радиозащиты при этом была различной в зависимости от вида и интервала времени между иммунизацией и облучением животных. Как видно из данных таблицы, максимальный уровень защиты животных от радиационной гибели проявляли животные, получившие препарат РЗК за 5, 10 и 15 суток до облучения, выживаемость которых составляла 83,3% при 100%-ной гибели контрольных (только облученных) животных.

Таблица 18 - Влияние препаратов РЗК и МПАГ на выживаемость летально облученных кроликов (11,0 ГР) в зависимости от срока применения препаратов до облучения (n=6)

Вариант опыта	Схема использования препарата	Выживаемость		
		пало, гол	выжило, гол	%
1	Введение препарата РЗК за 5 сут до облучения	1	5	83,3
2	Введение препарата МПАГ за 5 сут до облучения	3	3	50
3	Введение препарата РЗК за 10 сут до облучения	1	5	83,3
4	Введение препарата МПАГ за 10 сут до облучения	2	4	66,6
5	Введение препарата РЗК за 15 сут до облучения	1	5	83,3
6	Введение препарата МПАГ за 15 сут до облучения	1	5	83,3
7	Введение препарата РЗК за 20 сут до облучения	2	4	66,6
8	Введение препарата МПАГ за 20 сут до облучения	2	4	66,6
9	Введение препарата РЗК за 30 сут после облучения	2	4	66,6
10	Введение препарата МПАГ за 30 сут после облучения	2	4	66,6
11	Контроль (облучение кроликов в дозе 11,0 Гр без применения препаратов)	6	0	0

В отличие от предлагаемого, МПАГ обеспечивал высокую степень радиозащиты при иммунизации кроликов за 15 суток до летального облучения. В дальнейшем последовало незначительное снижение радиозащитной активности обоих препаратов, но она стабильно держалась на достаточно высоком уровне (66,6%) в течение 30 дней после иммунизации животных. Для подтверждения результатов проведенных исследований и достоверности результатов проводили третью серию опытов с использованием большого количества лабораторных животных.

В 21 варианте опытов использовали 100 белых мышей живой массой 18-20 г, 82 белые крысы живой массой 180-200 г и 65 кроликов породы «Шиншила» живой массой 2,0-2,5 кг. Животным за 10, 20 и 30 дней до летального облучения в

дозах 7,9 Гр (белые мыши), 9,5 Гр (белые крысы) и 11,0 Гр (кролики) подкожно однократно вводили иммунизирующие дозы препарата РЗК (11,59 мг/кг по сухому веществу) и радиозащитного микробного полиантигена в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мл, что составляет $0,24 \times 10^9$ м.к. на мышь, $1,25 \times 10^9$ м.к. на крысу и $2,5 \times 10^9$ м.к. на кролика соответственно. По истечению указанных промежутков времени после иммунизации опытных и контрольных животных подвергали гамма-облучению на установке «Пума» с источником излучения ^{137}Cs и мощностью экспозиционной дозы 5,24 Р/час. За животными вели наблюдение в течение 30 дней после облучения, регистрируя павших, выживших, подтверждая диагноз на ОЛБ патологоанатомическим вскрытием и изучением патологических изменений в органах и тканях облученных животных.

Результаты испытаний радиозащитной активности разработанного композиционного препарата РЗК и микробного полиантигена представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Радиозащитная активность разработанного композиционного препарата РЗК и регламентированного (контрольного) микробного полиантигена (МПАГ)

Вид животного	Количество животных, гол	Вариант опыта	Испытуемый препарат	Срок иммунизации до облучения, сут	Выживаемость		
					пало, гол	выжило, гол	%
1	2	3	4	5	6	7	8
Белые мыши	15	1	РЗК	10	4	11	73,3
	15	2	РЗК	20	4	11	73,3
	15	3	РЗК	30	4	11	73,3
	15	4	МПАГ	10	5	10	66,7
	15	5	МПАГ	20	4	11	73,3
	15	6	МПАГ	30	4	11	73,3
	10	7	Контроль облучения	-	7	0	0
	12	8	РЗК	10	3	9	75
	12	9	РЗК	20	3	9	75
	12	10	РЗК	30	3	9	75

1	2	3	4	5	6	7	8
Белые крысы	12	11	МПАГ	10	4	8	66,7
	12	12	МПАГ	20	3	9	75
	12	13	МПАГ	30	3	9	75
	10	14	Контроль облучения	-	10	0	0
Кролики	10	15	РЗК	10	3	7	70,0
	10	16	РЗК	20	3	7	70,0
	10	17	РЗК	30	3	7	70,0
	10	18	МПАГ	10	5	5	50,0
	10	19	МПАГ	20	3	7	70,0
	10	20	МПАГ	30	3	7	70,0
	10	21	Контроль облучения	-	10	0	0

Из данных таблицы 19 видно, что оба испытанных препарата на всех трех видах летально облученных лабораторных животных оказывали высокий радиозащитный эффект, обеспечивая 50-75%-ную защиту животных от радиационной гибели.

Однако, несмотря на почти одинаковую выраженность радиозащитного эффекта использованных препаратов, из сопоставительного анализа данных таблицы 19 видно, что разрабатываемый радиозащитный препарат имел определенные преимущества, поскольку, во-первых, в отличие от известного, обладал экстренной (радиозащитный эффект проявляется при экстренном применении - за 1-10 суток до облучения) защитой (70-75%-ная выживаемость); во-вторых, в отличие от МПАГ, препарат способствует формированию радиорезистентности при экстренном и отсроченном (введение препарата за 1-30 суток до облучения) применении; в-третьих, предлагаемая радиозащитная композиция, в отличие от МПАГ, обладает бифункциональным эффектом, обеспечивая достаточно высокую степень защиты от радиационной гибели как при профилактическом (за 1-30 суток до облучения), так и лечебном (через 1-10 суток после облучения) применении; в-четвертых, радиозащитный эффект

предлагаемого препарата, в отличие от МПАГ, не имеет зависимости от срока применения до облучения- процент выживших животных на фоне применения препарата был почти одинаковым независимо от интервала между введением препарата (за 10, 20, 30 суток до облучения) и облучением, в то время как введение МПАГ за 10 суток до облучения создавало радиорезистентность только у 66,7% животных против 73,7-75% при применении предлагаемого препарата. Максимальный уровень защиты при применении МПАГ создавалось только при его применении животным за 20 суток до облучения, что уступает предлагаемому в 2 раза.

2.5 Изучение механизма формирования радиорезистентности у животных на фоне применения композиционного радиозащитного препарата РЗК

Для изучения реакции системы крови под воздействием испытуемого средства опыты проводили на 42 белых мышах, разделенных на 3 группы по 12 животных в каждой. Животным 1-й группы через 24 ч после облучения в дозе 7,7 Гр однократно подкожно вводили препарат РЗК в дозе 0,1 мл (20 мг/кг по сухому веществу), животные 2-й группы служили контролем облучения, белых мышей 3-й группы не облучали и препарат им не вводили - они служили биологическим контролем. Исследования крови проводили через 7, 14, 24 сутки после облучения в период разгара костномозгового синдрома и формирования стадии резистентности у облученных и леченых животных. Исследовали общее количество клеток в костном мозге бедренной кости, массу селезенки и тимуса, содержание колониеобразующих единиц в селезенке КОЕс, число ретикулоцитов, эритроцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в крови. На мазках-отпечатках из косного мозга подсчитывали процентное содержание популяций миелоцитов и затем рассчитывали их абсолютное количество в бедренной кости.

Под воздействием летального облучения отмечали панцитопению, выражавшуюся в существенном снижении уровня лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и эритроцитов (таблица 20).

Таблица 20 - Реакция системы крови мышей, облученных и леченных препаратом РЗК

Показатель	Группа	Исход	Срок исследования, сут		
			9	21	30
1	2	3	4	5	6
Численность клеток в костном мозге бедренной кости, $\times 10^6$	1	24,1 \pm 2,1	19,7 \pm 2,9	20,9 \pm 2,5	29,8 \pm 1,5
	2	23,9 \pm 1,7	3,1 \pm 0,9*	3,2 \pm 0,7*	-
	3	24,0 \pm 2,9	24,1 \pm 3,7	23,9 \pm 3,3	24,2 \pm 3,5
Эритроидные клетки в костном мозге бедренной кости, $\times 10^6$	1	5,59 \pm 0,55	5,45 \pm 0,47	4,33 \pm 2,27	5,51 \pm 0,79
	2	5,55 \pm 0,49	3,15 \pm 0,11*	5,50 \pm 0,59	-
	3	5,61 \pm 0,67	5,59 \pm 0,78	3,09 \pm 0,17*	5,59 \pm 0,53
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1	363,1 \pm 24,3	265,3 \pm 26,5	878,5 \pm 24,7	292,5 \pm 31,3
	2	364,5 \pm 21,9	181,1 \pm 31,3	177,3 \pm 24,9	-
	3	361,0 \pm 32,5	360,3 \pm 29,1	363,0 \pm 29,1	362,3 \pm 31,5
Эритроциты в крови, $\times 10^{12}/\text{л}$	1	8,1 \pm 0,5	7,7 \pm 0,3	7,8 \pm 0,1	7,9 \pm 0,5
	2	8,3 \pm 0,9	6,2 \pm 1,7	6,0 \pm 0,3	-
	3	8,3 \pm 0,8	8,4 \pm 0,5	8,5 \pm 0,7	8,4 \pm 0,9
Гемоглобин, г/л	1	111,5 \pm 3,9	105,1 \pm 2,7	107,9 \pm 3,3	109,1 \pm 3,5
	2	112,3 \pm 4,5	78,9 \pm 3,9*	74,7 \pm 4,5	-
	3	110,9 \pm 4,1	111,5 \pm 0,1	110,1 \pm 5,1	111,9 \pm 7,7
Нейтрофильные клетки в костном мозге бедренной кости, $\times 10^6$	1	10,3 \pm 0,7	6,9 \pm 0,9	7,3 \pm 0,7	8,1 \pm 0,5
	2	10,4 \pm 0,3	4,3 \pm 0,3*	4,1 \pm 0,9*	-
	3	10,5 \pm 0,5	10,3 \pm 0,5	10,1 \pm 0,3	10,4 \pm 0,9
Нейтрофилы в крови, $\times 10^9/\text{л}$	1	1,3 \pm 0,5	0,80 \pm 0,10	0,90 \pm 0,09	1,1 \pm 0,3
	2	1,1 \pm 0,7	0,49 \pm 0,10*	0,57 \pm 0,30*	-
	3	1,4 \pm 0,3	1,20 \pm 0,50	1,10 \pm 0,70	1,3 \pm 0,1
Лимфоидные клетки в костном мозге бедренной кости, $\times 10^6$	1	3,4 \pm 0,5	2,70 \pm 0,60	2,90 \pm 0,90	3,1 \pm 0,7
	2	3,5 \pm 0,7	0,90 \pm 0,10*	0,69 \pm 0,50*	-
	3	3,5 \pm 0,3	3,40 \pm 0,90	3,50 \pm 0,50	3,5 \pm 0,3

1	2	3	4	5	6
Лимфоциты в крови, $\times 10^9/\text{л}$	1	$2,0 \pm 0,5$	$1,20 \pm 0,30$	$1,50 \pm 0,10$	$1,80 \pm 0,30$
	2	$1,8 \pm 0,3$	$0,37 \pm 0,50$	$0,55 \pm 0,09$	-
	3	$1,9 \pm 0,2$	$1,83 \pm 0,30$	$1,90 \pm 0,10$	$1,87 \pm 0,50$
Масса тимуса, мг	1	$20,7 \pm 1,7$	$17,9 \pm 0,1$	$18,1 \pm 0,3$	$18,7 \pm 0,5$
	2	$21,1 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,3$	-
	3	$20,5 \pm 0,1$	$21,0 \pm 0,3$	$20,3 \pm 0,1$	$20,5 \pm 0,5$
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1	$6,50 \pm 0,47$	$4,50 \pm 0,70$	$4,70 \pm 0,90$	$4,90 \pm 0,30$
	2	$6,30 \pm 0,51$	$0,95 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,63$	$0,98 \pm 0,49$
	3	$6,40 \pm 0,58$	$6,10 \pm 0,55$	$6,30 \pm 0,63$	$6,50 \pm 0,49$
Масса селезенки, мг	1	$71,3 \pm 6,7$	$60,3 \pm 3,3$	$63,10 \pm 2,1$	$65,3 \pm 1,9$
	2	$69,5 \pm 7,1$	$28,9 \pm 1,2^*$	$29,1 \pm 1,1$	-
	3	$70,1 \pm 5,9$	$69,5 \pm 3,5$	$70,9 \pm 3,3$	$71,0 \pm 3,9$
Эндогенные КОЕ _с	1	$5,9 \pm 1,7$	$4,8 \pm 0,5^*$	$4,9 \pm 0,1^*$	$5,7 \pm 0,5$
	2	$6,0 \pm 1,3$	$2,1 \pm 0,3^*$	$1,9 \pm 0,1^*$	-
	3	$5,7 \pm 1,5$	$5,9 \pm 1,1$	$6,0 \pm 1,5$	$6,0 \pm 1,7$
Лимфоидные клетки в селезенке, $\times 10^6$	1	351 ± 34	347 ± 35	349 ± 29	350 ± 37
	2	360 ± 29	$94 \pm 11^*$	$91 \pm 15^*$	-
	3	365 ± 31	361 ± 33	363 ± 27	366 ± 21
Тимоциты в тимусе, $\times 10^6$	1	158 ± 25	141 ± 19	143 ± 21	149 ± 15
	2	157 ± 31	$55 \pm 13^*$	52 ± 23	-
	3	155 ± 13	159 ± 31	160 ± 25	161 ± 17

Примечание: $P < 0,01$

Гемотоксический эффект облучения начинал развиваться уже в первые сутки, постепенно нарастал и достигал максимальных значений к периоду разгара косномозгового синдрома (7-9 сутки). Развитие пострadiационной панцитопении привело к нарушению функций центральных и периферических органов гемопоэза: костного мозга, тимуса, селезенки.

Динамика прогрессирующего опустошения костного мозга, тимуса и селезенки, начавшаяся в первые сутки после облучения, достигала максимальных

значений в период разгара острой лучевой болезни (7-9 сутки), когда количество миелокариоцитов, тимоцитов и спленоцитов уступало таковому биологического контроля в 4,5-10,3 раза.

Пострадиационное опустошение органов гемопоэза сопровождалось существенным снижением массы селезенки и тимуса, которая в период разгара острого костномозгового синдрома уступала контролю в 2,5-3,7 раза, а количество эндогенных колоний в селезенке (КОЕ_с) - в 3,3 раза.

Применение композиционного препарата РЗК оказывало гемокорректирующее действие, которое приводило к смягчению процессов радиационного поражения организма. Наряду с повышением выживаемости, у мышей 2-й группы, получавших изучаемый препарат, изменения гематологических показателей были менее выраженными: снижение количества эритроцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в подавляющем большинстве случаев было недостоверным, а процессы восстановления их числа происходили более интенсивно. Например, количество миелокариоцитов в бедренной кости у мышей 2-й группы, получавших препарат, превышало контрольные показатели в 3,2 раза, тромбоцитов – в 1,83; эритроцитов – в 1,69; гемоглобина - в 1,34; нейтрофилов - в 1,49; лимфоидных клеток в костном мозге – в 4,23; содержание КОЕ_с - в 3,1; тимоцитов - в 2,92 раза. У облученных леченых животных в эти сроки масса селезенки, тимуса и клеточность этих органов были значительно выше, чем у только облученных белых мышей.

Таким образом, полученные результаты указывают на способность композиционного препарата РЗК снижать смертность животных при облучении летальными дозами ионизирующего излучения. Использованный препарат при этом уменьшал выраженность депрессии гемопоэза и ускорял восстановление численности как клеток крови, так и костного мозга.

Учитывая, что одним из основных механизмов лечебного действия противолучевых препаратов является антиоксидантный (детоксицирующий) эффект, опыты для его изучения были проведены на 27 белых крысах, разделенных на 3 группы по 9 животных в каждой: 1-я - облучение в дозе 9,0 Гр;

2-я – облучение в дозе 9,0 Гр + через 1 сутки испытуемый препарат в дозе 20 мг/кг (по сухому веществу), 3-я группа - биологический контроль. На 3, 5, 7 и 14 сутки после облучения и лечения у животных брали пробы крови для гематологических исследований, содержания продуктов перекисного окисления липидов- малонового диальдегида, хиноидных радиотоксинов, перекисной устойчивости эритроцитов. Результаты гематологических исследований у белых крыс, облученных и леченных препаратом № 1, представлены в таблице 21. Представлены результаты, полученные на 7 сут исследований, когда наступали наиболее выраженные гематологические изменения у облученных и проявление гемопротективного эффекта у леченных испытуемым препаратом животных.

Таблица 21 - Гематологические показатели у облученных (9,0 Гр) и леченых РЗК белых крыс на 7 сут после облучения

Показатель	Биологический контроль	Облученные	Леченные препаратом № 1
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,71 \pm 0,1	6,1 \pm 0,2	6,3 \pm 0,7
Ретикулоциты, $\times 10^9/л$	156,04 \pm 26,0	67,7 \pm 7,5*	112,4 \pm 30,8
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	470,01 \pm 47,0	353,0 \pm 30,1*	406,0 \pm 30,1
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	5,8 \pm 0,8	1,4 \pm 0,4*	4,5 \pm 0,9
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$	1,66 \pm 0,3	0,88 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	4,4 \pm 0,6	0,71 \pm 0,07	3,5 \pm 0,8

*- $P < 0,05$

Из данных таблицы 21 видно, что облучение белых крыс гамма-лучами в дозе 9,0 Гр вызывало панцитопению с резким снижением количества лимфоцитов (в 3,25 раза), лейкоцитов (в 4,11 раза), нейтрофилов (в 1,75 раза), тромбоцитов (в 1,33 раза), ретикулоцитов (в 2,30 раза) и эритроцитов (в 1,09 раза).

Применение испытуемого препарата с лечебной целью однократно подкожно в дозе 20 мг/кг (на сухое вещество) через 24 ч после облучения оказывало гемопротективный эффект, сохраняя уровень клеток периферической крови в пределах, необходимых для обеспечения выживаемости в условиях летального радиационного поражения, за счет снижения содержания токсических

продуктов оксидативной модификации макромолекул: липидных (МДА), хиноидных (О-хиноны, семихиноны) радиотоксинов и изменения перекисной устойчивости эритроцитов (таблица 22).

Таблица 22 - Содержание хиноидных (РБФ, \log_2), липидных (МДА, мкмоль/мл) радиотоксинов и ПУЭР (мин) у облученных (9,0 Гр) и леченых РЗК белых крыс

Группа	Тест индикации антигена	Показатель			
		до облучения	после облучения и лечения, сут		
			3	5	7
Облучение	РБФ	-	5,01±0,11	6,33±0,09	6,90±0,07
	МДА	5,97±0,41	8,70±0,45	8,91±0,37	9,20±0,57
	ПУЭР	3,10±0,30	1,60±0,10*	1,40±0,50*	1,49±0,3*
Облучение + лечение	РБФ	-	0,90±0,05*	2,11±0,03*	2,01±0,05*
	МДА	6,01±0,47	6,19±0,31	6,51±0,39	6,09±0,41
	ПУЭР	3,0±0,50	2,70±0,3	2,50±0,10	2,70±0,50
Контроль	РБФ	-	-	-	-
	МДА	6,01±0,44	5,97±0,53	6,02±0,47	5,98±0,71
	ПУЭР	3,10±0,29	3,00±0,30	2,90±0,50	3,10±0,10

Примечание: $P < 0,01$

Из анализа представленных в таблице данных видно, что воздействие на животных ионизирующего излучения в летальной дозе сопровождалось появлением и накоплением в организме токсических продуктов оксидативной модификации (окисленных хинонов), которые оказывали гемолитическое воздействие на эритроциты, снижая их устойчивость к перекиси водорода. Динамическое определение концентрации ХРТ с использованием РБФ-теста показало, что уже на 3 сутки после облучения в сыворотке крови животных регистрировалось значительное количество хиноидного радиотоксина (5,01±0,11

\log_2), который постепенно повышался к периоду разгара острой лучевой болезни, достигал максимума к 7 суткам ($6,9 \pm 0,7 \log_2$), удерживаясь на этом уровне до 14 суток, а затем постепенно снижался. Параллельное определение липидных радиотоксинов показало аналогичную тенденцию: на 7 сутки опыта их концентрация превосходила исходный уровень в 1,51 раза ($P < 0,01$). Использование дополнительной тест-системы - ПУЭР, характеризующей состояние гемопатологии при лучевом поражении, подтвердило радиотоксической эффект облучения - наблюдалось резкое снижение резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу - скорость их гемолиза повышалась в 2,05 раза по сравнению с таковой у необлученных животных.

Однократное подкожное введение в облученный организм испытуемого противолучевого средства в дозе 20,0 мг/кг (по сухому веществу) оказывало детоксицирующий эффект, снижая концентрацию ХРТ в 3,0 раза, ЛРТ – в 1,38 раза и восстанавливая скорость гемолиза эритроцитов почти до исходного уровня (2,7 мин против 3,0 в контроле).

Продолжая исследования по формированию радиорезистентности на фоне применения разработанного радиозащитного препарата, следующую серию опытов проводили на кроликах.

Результаты гематологических исследований, представленные в таблице 23, показали, что облучение животных в дозе 11,0 Гр вызывало гемотоксический эффект, который начинал развиваться уже в первые сутки после облучения, достигал максимальных значений к 7 суткам, удерживался на этом уровне до конца опытов и характеризовался панцитопенией и выражался в резком снижении уровня лейкоцитов (в 4,19 раза), лимфоцитов (в 4,31 раза), нейтрофилов (в 4,55 раза), тромбоцитов (в 3,12 раза) и эритроцитов (в 1,36 раза).

Таблица 23 - Гематологические показатели у кроликов, облученных и профилактированных препаратом РЗК

Показатель	Биологический контроль	Облученные	Профилактированные
Миелокариоциты	130,1±7,8	25,3±1,7*	109,6±11,7
Эритроидные клетки, х10 ¹² /л	45,5±3,5	28,7±4,1*	46,0±3,1
Гранулоцитарные клетки, х10 ⁹ /л	63,3±3,8	8,1±0,7	52,3±5,2
Лимфоидные клетки, х10 ⁹ /л	16,9±1,7	1,5±0,3	14,3±3,3
Эритроциты, х10 ¹² /л	5,3±0,8	3,9±0,1*	5,1±0,5
Ретикулоциты, х10 ⁹ /л	125,3±11,9	78,9±7,5*	90,1±10,1
Тромбоциты, х10 ⁹ /л	529,3±31,7	169,3±4,8*	401,3±15,4
Лейкоциты, х10 ⁹ /л	8,0±0,7	3,7±1,1*	7,1±0,3
Нейтрофилы, х10 ⁹ /л	9,3±0,7	1,9±0,5*	3,5±0,5
Лимфоциты, х10 ⁹ /л	4,7±0,3	1,1±0,3*	3,6±0,4

Результаты цитологических исследований косномозгового пунктата у облученных и радиопрофилактированных препаратом РЗК животных показали, что используемое средство препятствовало опустошению костного мозга. Так, если на 7 сутки после облучения общее количество миелокариоцитов снизилось в 5,16 раза, эритроидных клеток - в 1,58, гранулоцитарных - в 7,81 и лимфоидных - в 11,2 раза ($P < 0,001$), то у радиопрофилактированных животных указанные показатели имели более высокие значения, недостоверно отличаясь от таковых необлученных животных. У животных, получавших испытуемый препарат через 24 ч после облучения, происходило ингибирование панцитопении.

Применение препарата оказывало иммуностропное действие, препятствуя резкому снижению количества Т-клеток, участвующих в нормализации гемопоэза

путем синтеза геморегуляторных цитокинов: интерлейкина (ИЛ-1) и колониестимулирующего фактора (КСФ). Известно, что стимулированные продуктами метаболизма *E.coli* Т-лимфоциты вырабатывают ИЛ-1, ИЛ-3, стимулирующие, в свою очередь, рост КОЕ как эритроидного, так и лейкоцитарного ростков.

В связи с этим, были проведены биохимические исследования по определению ключевых геморегуляторных цитокинов - ИЛ-1 и КСФ в сыворотке крови животных, облученных и иммунизированных препаратом РЗК.

Результаты исследований крови кроликов на содержание геморегуляторных цитокинов, тестируемых в непрямом «сэндвич-варианте» с использованием антицитокиновых моноклональных антител, представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Уровни ИЛ-1 и КСФ (нг/мл) в сыворотке крови кроликов в различные сроки после облучения и применения испытуемого препарата

Группа	Время после облучения, сут					
	3		7		9	
	ИЛ-1	КСФ	ИЛ-1	КСФ	ИЛ-1	КСФ
Облученные	4,9±0,7	1,5±0,3	2,1±0,1	0,4±0,09	–	–
Облученные +леченные РЗК	51,7±9,1 *	28,9±4,9*	48,7±7,9*	21,3±5,9*	31,1±3,3	14,1±3,1
Контрольные	23,0±1,9	7,3±1,3	17,5±3,2	9,9±2,1	9,9±2,1	17,3±1,9

Из представленных в таблице данных видно, что однократное подкожное введение испытуемого препарата вызывало повышение концентрации геморегуляторных цитокинов (ИЛ-1, КСФ): во все сроки исследования содержание обоих медиаторов иммуногемопоза было достоверно выше по сравнению с таковыми у облученных животных ($P<0,001$).

Таким образом, введение в облученный организм препарата РЗК оказывало стимулирующее воздействие на цитокиновую систему организма, усиливая выработку геморегулирующих медиаторов иммуногемопоза путем

ингибирования иммунотоксических эффектов облучения - панцитопении и миелопрессии, что коррелировало с большей выживаемостью животных.

Учитывая, что одним из механизмов гемотоксического действия ионизирующей радиации является апоптотическая гибель лимфоцитов под воздействием радиотоксических веществ - хиноидных и липидных радиотоксинов, представляло интерес изучение состояния прооксидантно-антиоксидантной системы организма на фоне применения препарата РЗК у летально облученных животных. При проведении этих исследований исходили из того, что ионизирующая радиация инициирует в облученном организме образование токсических продуктов радиолиза - свободных радикалов (HO^\bullet - гидроксильный радикал, OO^\bullet , O_2^\bullet -пероксидные радикалы, HO^\bullet -радикал хинонов, L^\bullet -липидные радикалы), наиболее опасным из которых является радикал гидроксила (HO^\bullet), запускающий реакцию окисления липидов, приводящую клетки к гибели по пути радиоиндуцированного апоптоза. Для этого определяли содержание липидных радиотоксинов в МДА-тесте и антирадикальных ферментов с использованием спектрофотометрического метода. Результаты проведенных биохимических исследований представлены в таблице 25.

Таблица 25 - Содержание МДА, активность СОД и КАТ в сыворотке крови у кроликов, больных ОЛБ и получавших препарат РЗК через 1 сутки после облучения

Группа	Срок исследования, сут	Показатель		
		МДА, мкмоль/л	КАТ, мкат/л	СОД, Ед/л
1	2	3	4	5
Контрольная	3	5,25±0,57	26,09±1,71	1,69±0,07
	7	5,43±0,59	25,95±0,57	1,70±0,05
	14	5,39±0,51	26,01±0,48	1,68±0,09

1	2	3	4	5
Облучение	3	8,01±0,37*	11,95±0,49*	0,89±0,10*
	7	8,69±0,57	13,11±0,61	0,91±0,05*
	14	9,37±0,53*	14,01±0,43*	0,97±0,09*
Облучение + препарат	3	5,93±0,29*	21,05±1,09	1,25±0,07
	7	6,01±0,35	23,01±0,47	1,33±0,08
	14	5,83±0,21	24,79±0,57	1,41±0,11

*- $P < 0,05$

Из представленных в таблице 25 данных видно, что облучение кроликов в летальной дозе усиливало процессы пероксидации липидов и образование малонового диальдегида. На пике заболевания ОЛБ (14 сут) концентрация МДА у кроликов была увеличена в 1,78 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

Однократное подкожное применение препарата РЗК в дозе 20 мг/кг как при лечебном (через 1 сутки), так и профилактическом (за 1 сутки) вариантах применения ингибировало образование токсических продуктов липопероксидации, снижая их уровень до контрольных значений. Так, содержание МДА в сыворотке крови леченых кроликов на 14 сутки не превышало контрольный уровень и было ниже такового по сравнению с контролем облучения в 1,56 раза ($P < 0,05$).

Установлено, что увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов в облученном организме сопровождалось ингибированием активности каталазы и супероксиддисмутаза. На 14 сутки у облученных кроликов данные показатели были снижены в 1,8 и 1,73 раза. Однократная иммунизация препаратом как до (за 24 ч), так и после (через 24 ч) облучения обеспечивала сохранение антиоксидантных ферментов на уровне значений биологического контроля и превышала таковую у облученных животных по КАТ - в 1,74; по СОД – в 1,46 раза.

Таким образом, использование композиционного препарата РЗК в сочетании с природным минералом – гидросиликатом алюминия модифицирует течение ОЛБ, усиливая систему антиоксидантной защиты путем инактивации супероксидных радикалов с помощью ферментов каталазы и супероксиддисмутазы, что в итоге приводит к повышению выживаемости летально облученных животных.

Полученные на предыдущих этапах работы положительные результаты по изучению радиозащитной активности микробного полиантигена послужили основанием для продолжения дальнейших исследований, целью которых являлась оценка радиозащитной активности препарата на сельскохозяйственных животных, а также определить сроки продолжительности радиорезистентности животных, привитых испытуемым препаратом.

2.6 Изучение влияния композиционного препарата РЗК на летально облученных овец

Для решения поставленной задачи были проведены опыты на овцах. Было использовано 18 овец обоего пола породы «Прекокс» 18-24-месячного возраста средней живой массой 42,5 кг, разделенные на 4 группы по 6 голов в 1-й и 2-й группах и по 3 головы в 3-й и 4-й группах. Животных 1-й группы за 30 суток до облучения подкожно иммунизировали РЗК в оптимальной иммунизирующей дозе ($ID_{50}=2,5 \times 10^9$ м.к./кг), животных 2-й группы в той же дозе иммунизировали МПАГ. Антигены вводили однократно в объеме 5,0 мл, животным 3-й группы в том же объеме вводили физиологический раствор (контроль облучения), овцам 4-й группы указанные средства не вводили - биологический контроль. Через 30 суток после иммунизации животных первых трех групп (1-я, 2-я, 3-я) подвергали тотальному гамма-облучению на установке «Пума» в дозе 6,0 Гр, вызывающей крайне тяжелую степень лучевой болезни. У иммунизированных и облученных животных в динамике изучали клиническое состояние, гематологические показатели (содержание форменных элементов периферической крови, уровень гемоглобина); состояние гуморальных (уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови, содержание аутоантител к лизату собственных эритроцитов, содержание противорадиационных антител, лучевых антигенов - радиотоксинов) и клеточных (содержание Т- и В-лимфоцитов) факторов иммунитета. Кровь для исследований отбирали дважды после иммунизации (15 и 30 сутки) и на 3, 7, 10, 14, 21, 28 и 45 сутки после облучения. Кинетику появления и элиминацию радиотоксинов и противорадиационных антител в сыворотке крови у иммунизированных и облученных животных проводили постановкой реакции непрямой гемагглютинации. Павших в процессе и убитых после завершения опытов животных вскрывали для определения характерных для лучевого поражения изменений органов и тканей.

2.6.1 Модификация острой лучевой болезни (ОЛБ) овец на фоне применения композиционного препарата РЗК

Установлено, что иммунизация животных испытываемыми антигенами оказывала влияние на клинико-гематологические и иммунологические показатели облученных животных. Последовательность изменений указанных показателей после иммунизации представлены в таблицах 26-28.

Таблица 26 - Гематологические показатели иммунизированных испытываемыми препаратами овец в динамике

Группа	Срок исследования, сут	Гемоглобин, г/л	Общий белок, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Лейкоциты, $\times 10^9/л$
1	1	98,0 \pm 4,0	70,0 \pm 1,2	6,20 \pm 0,20	9,60 \pm 0,11
	10	99,0 \pm 4,7	73,0 \pm 2,3	6,23 \pm 0,27	9,91 \pm 0,23
	20	10,1 \pm 0,51	75,0 \pm 3,1	6,19 \pm 0,16	10,13 \pm 0,37
	30	10,9 \pm 0,63	74,0 \pm 3,5	6,21 \pm 0,25	10,29 \pm 0,31
2	1	95,0 \pm 3,5	72,0 \pm 1,9	6,15 \pm 0,19	9,55 \pm 0,17
	10	98,0 \pm 4,3	77,0 \pm 2,7	6,23 \pm 0,21	10,17 \pm 0,25
	20	102,0 \pm 5,8	75,0 \pm 2,5	6,25 \pm 0,29	10,41 \pm 0,3 7
	30	110,0 \pm 6,6	76,0 \pm 3,1	6,27 \pm 0,31	11,23 \pm 0,41
3	1	97,0 \pm 4,1	73,0 \pm 3,3	6,11 \pm 0,15	9,49 \pm 0,19
	10	99,0 \pm 5,3	72,0 \pm 2,9	6,15 \pm 0,18	9,43 \pm 0,17
	20	96,0 \pm 4,9	70,0 \pm 2,1	6,13 \pm 0,19	9,51 \pm 0,21
	30	98,0 \pm 5,1	71,0 \pm 2,3	6,09 \pm 0,13	9,47 \pm 0,25
4	1	96,0 \pm 4,5	71,0 \pm 2,7	6,23 \pm 0,21	9,53 \pm 0,21
	10	97,0 \pm 4,7	73,0 \pm 3,1	6,21 \pm 0,17	9,49 \pm 0,33
	20	95,0 \pm 3,9	72,0 \pm 2,5	6,20 \pm 0,11	9,51 \pm 0,29
	30	96,0 \pm 4,3	71,0 \pm 3,1	6,22 \pm 0,17	9,50 \pm 0,30

Примечание: 1-я - иммунизированная РЗК, 2 - иммунизированная МПАГ, 3-я - неиммунизированная (контроль облучения), 4-я - неиммунизированная (биологический контроль)

Как видно из данных таблицы 26, иммунизация животных микробными антигенами приводила к определенным изменениям картины периферической крови. При этом постиммунизационный период у привитых испытуемыми антигенами животных характеризовался недостоверным увеличением содержания гемоглобина, общего белка, эритроцитов и лейкоцитов, количество которых превышало исходный уровень в среднем в 1,11- 1,13 раза.

Предварительная иммунизация овец испытуемыми радиозащитными антигенами оказывала влияние и на лейкоцитарный профиль животных (таблица 27). При этом отмечалась также тенденция недостоверного увеличения содержания нейтрофилов, базофилов, эозинофилов и моноцитов. Наиболее существенные изменения отмечены со стороны лимфоцитов - у иммунизированных микробным полиантигеном через 20 дней после введения радиопротектора. Количество этих форменных элементов крови увеличивалась на 13 (1-я группа) и на 11% (2-я группа) ($P < 0,05$).

Таблица 27 - Лейкоцитарный профиль в динамике у овец, иммунизированных испытываемыми радиозащитными препаратами

Группа	Срок исследования, сут	Показатель							
		лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	нейтрофилы, %			базофилы, %	эозинофилы, %	моноциты, %	лимфоциты, %
			Ю	П	С				
1	1	9,60 \pm 0,1	6,0 \pm 1,19	4,1 \pm 1,7	32,4 \pm 3,7	0,20 \pm 0,05	0,23 \pm 0,03	1,31 \pm 0,3	61,91 \pm 1,6
	10	9,91 \pm 0,23	5,9 \pm 1,5	4,5 \pm 2,1	37,1 \pm 4,9	0,25 \pm 0,07	0,25 \pm 0,05	1,43 \pm 0,5	68,3 \pm 2,1
	20	10,13 \pm 0,37	6,1 \pm 1,6	4,3 \pm 1,9	39,3 \pm 5,1	0,27 \pm 0,09	0,27 \pm 0,08	1,51 \pm 0,7	70,5 \pm 2,7
	30	10,29 \pm 0,31	6,0 \pm 1,8	4,1 \pm 2,0	37,8 \pm 5,5	0,26 \pm 0,08	0,25 \pm 0,07	1,39 \pm 0,3	69,7 \pm 3,3
2	1	9,53 \pm 0,17	5,9 \pm 1,7	4,3 \pm 0,9	30,5 \pm 2,9	0,29 \pm 0,05	0,21 \pm 0,05	1,5 \pm 0,5	60,8 \pm 1,9
	10	10,17 \pm 0,25	6,2 \pm 2,1	4,5 \pm 1,8	35,1 \pm 3,3	0,31 \pm 0,07	0,27 \pm 0,05	1,7 \pm 0,8	65,1 \pm 2,2
	20	10,41 \pm 0,3 7	6,0 \pm 1,9	4,7 \pm 2,2	36,9 \pm 3,5	0,33 \pm 0,09	0,29 \pm 0,09	1,6 \pm 0,3	66,3 \pm 2,5
	30	11,23 \pm 0,41	6,3 \pm 2,3	4,5 \pm 1,9	37,9 \pm 4,1	0,30 \pm 0,05	0,25 \pm 0,07	1,5 \pm 0,7	63,4 \pm 3,1
3	1	9,49 \pm 0,19	6,1 \pm 1,6	4,5 \pm 1,5	31,7 \pm 3,1	0,11 \pm 0,07	0,19 \pm 0,03	1,1 \pm 0,1	62,1 \pm 2,3
	10	9,43 \pm 0,17	6,0 \pm 1,9	4,1 \pm 1,7	30,9 \pm 3,5	0,13 \pm 0,09	0,20 \pm 0,05	1,0 \pm 0,2	61,7 \pm 3,3
	20	9,51 \pm 0,21	5,9 \pm 1,5	4,3 \pm 1,9	32,3 \pm 2,9	0,15 \pm 0,05	0,18 \pm 0,04	0,9 \pm 0,03	63,2 \pm 2,9
	30	9,47 \pm 0,25	6,1 \pm 1,7	4,0 \pm 1,8	31,5 \pm 3,3	0,14 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03	1,1 \pm 0,2	61,9 \pm 3,5
4	1	9,53 \pm 0,21	5,8 \pm 1,8	4,0 \pm 1,3	33,1 \pm 3,5	0,20 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05	1,0 \pm 0,3	59,7 \pm 2,9
	10	9,49 \pm 0,33	6,0 \pm 2,2	4,1 \pm 1,5	31,5 \pm 2,9	0,21 \pm 0,05	0,19 \pm 0,03	1,1 \pm 0,10	60,3 \pm 2,1
	20	9,51 \pm 0,29	5,9 \pm 1,9	3,9 \pm 1,1	32,7 \pm 2,5	0,19 \pm 0,07	0,21 \pm 0,06	0,9 \pm 0,03	61,1 \pm 2,3
	30	9,50 \pm 0,30	5,7 \pm 1,6	4,1 \pm 1,9	32,9 \pm 2,7	0,22 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	1,0 \pm 0,20	60,5 \pm 3,4

Таблица 28 - Иммунологические показатели в динамике у овец после введения препаратов

Группа	Срок исследования, сут	Показатель							
		кол-во лимфоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	содержание Т-лимфоцитов (%)	содержание В-лимфоцитов (%)	титр ААТ к ЛСЭ (баллы)	титр антирадиотоксических антител в РИГА (lg_2)	иммуноглобулины, мг/мл		
							G	M	A
1	1	61,9 \pm 1,6	43,2 \pm 1,2	24,6 \pm 1,4	0,17 \pm 0,05	-	24,5 \pm 0,08	1,6 \pm 0,03	0,25 \pm 0,01
	10	68,3 \pm 2,1	45,5 \pm 1,9	26,4 \pm 1,9	0,35 \pm 0,1 ^x	3,3 \pm 0,3 ^x	29,3 \pm 0,19	1,9 \pm 0,05	0,21 \pm 0,03
	20	70,5 \pm 2,7	47,1 \pm 2,1	26,9 \pm 2,1	0,41 \pm 0,15 ^x	4,1 \pm 0,5 ^x	31,1 \pm 0,8	2,8 \pm 0,09	0,20 \pm 0,05
	30	69,7 \pm 3,2	46,3 \pm 2,3	26,9 \pm 1,8	0,49 \pm 0,19 ^x	4,4 \pm 0,7 ^x	30,2 \pm 0,9 ^x	2,6 \pm 0,07	0,19 \pm 0,01
2	1	60,8 \pm 1,9	41,9 \pm 1,5	23,9 \pm 1,1	0,17 \pm 0,05	-	23,9 \pm 0,03	1,5 \pm 0,05	0,23 \pm 0,03
	10	65,1 \pm 2,3	44,0 \pm 1,7	24,5 \pm 1,7	0,39 \pm 0,09 ^x	2,1 \pm 0,3	25,7 \pm 0,1	1,7 \pm 0,05	0,20 \pm 0,05
	20	66,3 \pm 2,5	45,7 \pm 1,9	25,3 \pm 1,9	0,51 \pm 0,13 ^x	2,9 \pm 0,7	27,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03
	30	63,4 \pm 3,1	45,9 \pm 2,2	25,2 \pm 1,8	0,59 \pm 0,09 ^x	3,3 \pm 0,9	25,4 \pm 0,5	2,2 \pm 0,08	0,21 \pm 0,07
3	1	62,1 \pm 2,3	42,5 \pm 1,7	24,1 \pm 1,2	0,17 \pm 0,03	-	24,3 \pm 0,07	1,58 \pm 0,1	0,22 \pm 0,05
	10	61,7 \pm 3,3	42,9 \pm 1,9	24,3 \pm 1,5	0,17 \pm 0,03	-	23,9 \pm 0,1	1,53 \pm 0,2	0,21 \pm 0,03
	20	63,2 \pm 2,9	41,8 \pm 2,1	24,0 \pm 1,3	0,17 \pm 0,03	-	24,0 \pm 0,5	1,55 \pm 0,3	0,23 \pm 0,05
	30	61,9 \pm 3,5	42,7 \pm 2,6	24,2 \pm 1,1	0,17 \pm 0,03	-	24,1 \pm 0,3	1,57 \pm 0,4	0,20 \pm 0,01
4	1	59,7 \pm 2,9	41,5 \pm 1,3	24,3 \pm 1,5	0,17 \pm 0,03	-	24,1 \pm 0,09	1,55 \pm 0,3	0,21 \pm 0,07
	10	60,3 \pm 2,1	41,7 \pm 1,5	24,1 \pm 2,1	0,17 \pm 0,03	-	24,0 \pm 0,1	1,51 \pm 0,2	0,23 \pm 0,03
	20	61,1 \pm 2,3	41,3 \pm 1,1	24,0 \pm 1,9	0,17 \pm 0,03	-	24,3 \pm 0,3	1,50 \pm 0,1	0,20 \pm 0,01
	30	60,3 \pm 3,4	41,9 \pm 1,7	24,2 \pm 1,7	0,17 \pm 0,03	-	24,0 \pm 0,1	1,53 \pm 0,3	0,22 \pm 0,05

Предварительная иммунизация овец испытываемыми радиозащитными препаратами оказывала влияние на состояние гуморальных и клеточных факторов иммунитета (таблица 28). Как видно из данных таблицы, через 10 дней после введения испытываемых препаратов последовало увеличение числа лимфоцитов в периферической крови иммунизированных овец. Увеличение лимфоцитов происходило как за счет Т-, так и В-лимфоцитов.

Наряду с изменением факторов клеточного иммунитета, отмечены значительные изменения факторов гуморального иммунитета. Из данных таблицы 28 видно, что оба использованных антигенных препарата индуцировали появление противотканевых аутоантител. Так, титры аутоантител к собственным эритроцитам у привитых МПАГ овец на 10 сутки после иммунизации увеличились в 2,0, на 20 сут - 2,41 и на 30 сут - 2,88 раза ($P < 0,01$). Увеличение аутоантител к собственным эритроцитам у привитых овец было еще более контрастным и составляло соответственно в 2,1 (через 10 суток), 3,0 (через 20 суток) и 3,47 (через 30 суток) по сравнению с исходом ($P < 0,001$).

Результаты определения уровня специфических противорадиационных антител в РНГА с радиотоксином формализированных и танизированных по Чизмесу и Бойдену эритроцитов барана (АГЭД) показали, что хотя оба антигенных препарата индуцировали синтез специфических антител, однако композиционный препарат РЗК оказывал более сильное антигенное раздражение иммунокомпетентных клеток - титры противорадиационных антител у овец 1 -й группы во все сроки исследования были выше, чем у привитых МПАГ животных, превосходя последних в 1,4-1,6 раза ($P < 0,05$).

Сказанное нашло подтверждение в результатах опытов по определению содержания иммуноглобулинов различных классов (G, M, A). Как видно из таблицы 28, иммунизация овец композиционным препаратом обеспечивало усиленный синтез иммуноглобулинов класса G, содержание которых на 30 сутки после иммунизации составляла 30,2 мг/мл против 25,4 мг/мл во 2-й группе, иммунизированной МПАГ ($P < 0,05$). Аналогичная тенденция просматривалась и в

отношении иммуноглобулинов класса М. Что касается иммуноглобулинов класса А, то их количество в обоих случаях имело тенденцию к уменьшению.

Под влиянием антигенной стимуляции с использованием препаратов РЗК и МПАГ происхождения происходило существенное преобразование иммунологических функций одного из основных элементов лимфоидной ткани - лимфоцитов, которые выявили в специальной тест-системе - реакции бласттрансформации лимфоцитов с использованием митогена - фитогемагглютинаина. Результаты изучения бласттрансформации лимфоцитов под воздействием испытуемых препаратов представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Динамика изменений РБТЛ у иммунизированных испытуемыми препаратами овец (%)

Группа	Вид использованного антигена	Кол-во ж-х, гол	Бласттрансформирующая активность лимфоцитов до и после иммунизации, сут			
			исход	10	20	30
1	РЗК	6	34,4±4,2	56,3±4,5	60,1±5,3	61,3±5,7
2	МПАГ	6	56,1±3,8	58,5±3,9	59,7±4,1	59,9±4,7
3	Контроль облучения	3	53,3±4,1	53,7±4,3	54,5±5,3	53,8±4,1
4	Биологический. контроль	3	55,9±5,1	54,9±5,1	55,5±4,7	55,1 ±5,3

Из материалов таблицы 29 видно, что оба использованных препарата оказывали бласттрансформирующий эффект, увеличивая количество бластных клеток в периферической крови обеих групп животных. При этом композиционный препарат РЗК оказывал более выраженный трансформирующий эффект - количество иммунобластов на 30-й день после иммунизации увеличивалось на 6,9% против 3,8% во 2-й группе (МПАГ).

Таким образом, предварительная иммунизация животных РЗК и МПАГ оказывала иммуностимулирующий эффект, характеризующийся недостоверным увеличением количества лейкоцитов, достоверным увеличением общего содержания лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, стимуляцией иммунологической (бласттрансформирующей) функции лимфоцитов, увеличением титра аутоантител, индукцией синтеза противорадиационных (антирадиотоксических) антител, стимуляцией синтеза иммуноглобулинов классов G и M.

Результаты однократного подкожного применения РЗК с профилактической целью за 30 суток до летального облучения овец представлены в таблице 30.

Таблица 30 - Выживаемость овец иммунизированных за 30 сут до облучения в дозе 6,0 Гр РЗК и МПАГ

Группа	Кол-во животных,	Препарат	Доза (мг/кг, м.к./кг)	Результат опыта		
				пало, гол	выжило, гол	ПЗ, %
1	6	РЗК	2,5 10 ⁹ м.к./кг	2	4	66,6
2	6	МПАГ	2,5 10 ⁹ м.к./кг	3	3	50
3	3	Физ. раствор	-	3	0	0
4	3	-	-	0	3	100

Из материалов таблицы 30 видно, что предварительное однократное подкожное введение РЗК обеспечивало 66,6 %-ную выживаемость летально облученных животных через 30 сут после облучения при 100 %-ной гибели контрольных (неиммунизированных) овец. В группе овец (2-я), предварительно иммунизированных МПАГ, выживаемость составляла 50 %, что на 16,6 % ниже, чем в 1-й группе животных. Используемая для моделирования острой лучевой болезни у овец доза 6,0 Гр оказалась абсолютно смертельной для этого вида животных, вызывая радиационную гибель всех использованных в опытах овец.

Предварительное применение препаратов с профилактической целью оказывало модифицирующее влияние не только на выживаемость, но и на

среднюю продолжительность жизни. Так, если в группе неиммунизированных животных (контроль облучения) радиационная гибель наступала на 18-21 сутки, то в группе иммунизированных МПАГ животных (2-я группа) - на 23-24 сутки, а в группе овец, иммунизированных РЗК (1-я группа) гибель животных наступала на 26-35 день после облучения.

При патологоанатомическом вскрытии трупов павших овец обнаруживали патогномичные для лучевой болезни изменения органов, характеризующиеся катарально-геморрагической пневмонией, язвенно-некротическими поражениями слизистой ротовой полости, носоглотки и желудочно-кишечного тракта.

Результаты наблюдения за облученными животными показали, что течение лучевой болезни у овец было различно у иммунизированных и неиммунизированных животных (контроль облучения). Лучевая болезнь у неиммунизированных овец (3-я, контроль облучения) протекала в крайне тяжелой форме. При этом период первичных реакций у некоторых животных проявлялся с момента облучения и продолжается до 2-3 суток и характеризовался кратковременным возбуждением или угнетением. Видимые слизистые оболочки были сильно гиперемированны и синюшны. Со стороны сердечно сосудистой системы отмечали резкое ослабление ее деятельности и тонуса сосудов. В первые (1-2) сутки после облучения наблюдали кратковременное повышение температуры тела на 0,5-0,7°C. У части животных отмечали усиление перистальтики кишечника, разжижение каловых масс, снижение аппетита. В дальнейшем отмеченные явления прогрессировали, животные были вялыми, малоподвижными, аппетит понижен, на 7-8-й день опыта у животных начиналась аллопеции в области спины и шеи, регистрировали уменьшение массы тела. В дальнейшем (через 10-15 суток после облучения) отмеченные признаки лучевой болезни прогрессировали, у некоторых животных наблюдалась полная адинамия и отказ от корма, у большинства овец наблюдали полную эпиляцию за исключением лицевой части и нижней части конечностей, множественные кровотечения, болезненность. Видимые слизистые оболочки приобрели синюшность, разлитые множественные кровотечения, катаральный ринит,

язвеннонекротический стоматит. За 1-3 дня до смерти животные полностью отказывались от корма, наблюдали понос с примесью крови и слизи в кале. Со стороны органов дыхания отмечали одышку, истечения из носа, хрипы, бронхопневмонию. Пульс у животных был резко учащен, слабого наполнения. На фоне указанных патологических симптомов животные погибали от острой лучевой болезни на 16-18 дни после облучения.

В отличие от облученных неиммунизированных животных, течение острой лучевой болезни овец, подвергнутых предварительной иммунизации обоими антигенными препаратами, носила более легкий характер.

Различное течение крайне тяжелой формы лучевой болезни, т.е. ее модификация, была обусловлена предварительной иммунизацией животных испытанными радиозащитными антигенами, которые обусловили иммунологическую перестройку привитого организма, блокировали процессы угнетения гемопоэза и снижения радиорезистентности организма, что нашло подтверждение в иммуногематологических исследованиях периферической крови подопытных животных. Результаты гематологических исследований представлены в таблицах 31 и 32.

Таблица 31 - Гемограмма летально облученных овец через 30 суток после иммунизации различными антигенами

Срок исследований, сут	Группа ж-х	Гемоглобин, г/л	Общий белок, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Лейкоциты, $\times 10^9/л$
1	1	109,0 \pm 6,3	74,0 \pm 3,5	6,21 \pm 0,25	10,29 \pm 0,31
	2	110,0 \pm 6,6	76,0 \pm 3,3	6,27 \pm 0,31	11,23 \pm 0,41
	3	98,0 \pm 5,1	71,0 \pm 2,3	6,09 \pm 0,13	9,47 \pm 0,25
	4	9,6 \pm 0,43	71,0 \pm 2,1	6,22 \pm 0,17	9,50 \pm 0,33
3	1	101,0 \pm 5,3	79,0 \pm 3,8	6,0 \pm 0,27	8,1 \pm 0,55
	2	115,0 \pm 8,7	83,0 \pm 4,9	5,6 \pm 0,38	6,3 \pm 0,47
	3	129,0 \pm 9,0	91,3 \pm 6,7	5,3 \pm 0,50	4,40 \pm 1,24 ^x
	4	95,0 \pm 4,1	72,0 \pm 3,3	6,30 \pm 0,19	9,60 \pm 0,37
7	1	101,0 \pm 7,5	72,1 \pm 3,5	5,98 \pm 0,25	7,21 \pm 0,49
	2	109,0 \pm 6,9	70,1 \pm 4,9	5,57 \pm 0,41	5,8 \pm 0,77 ^x
	3	68,0 \pm 1,0	69,0 \pm 2,2	5,01 \pm 0,23	4,30 \pm 1,05 ^x
	4	97,0 \pm 5,3	73,0 \pm 3,8	6,25 \pm 0,19	9,4 \pm 0,4
10	1	91,0 \pm 2,8	74,0 \pm 3,1	6,23 \pm 0,33	8,1 \pm 0,31
	2	87,0 \pm 4,7	76,0 \pm 4,9	5,8 \pm 0,29	6,3 \pm 0,65 ^x
	3	73,0 \pm 9,5	72,0 \pm 7,2	5,3 \pm 0,51	5,0 \pm 0,97 ^x
	4	97,0 \pm 5,1	73,0 \pm 4,7	6,3 \pm 0,41	9,4 \pm 0,29
14	1	97,0 \pm 9,0	71,7 \pm 7,1	6,1 \pm 0,37	7,28 \pm 0,43
	2	99,0 \pm 8,7	72,0 \pm 8,5	5,75 \pm 0,85	6,1 \pm 0,75
	3	71,0 \pm 9,9	77,0 \pm 3,9	5,00 \pm 0,93	4,37 \pm 0,95
	4	96,0 \pm 6,5	71,0 \pm 4,3	6,31 \pm 0,21	9,5 \pm 0,39
21	1	96,0 \pm 7,1	69,0 \pm 3,9	6,19 \pm 0,47	8,3 \pm 0,69
	2	98,0 \pm 3,3	70,0 \pm 0,4	5,81 \pm 0,79	6,9 \pm 0,57
	3	73,0 \pm 4,7	75,0 \pm 7,7	5,10 \pm 0,51	3,71 \pm 1,01
	4	94,0 \pm 3,9	70,0 \pm 5,1	6,35 \pm 0,25	9,4 \pm 0,44
28	1	94,0 \pm 3,7	71,0 \pm 9,1	6,21 \pm 0,39	9,0 \pm 0,71
	2	93,0 \pm 4,1	72,0 \pm 3,9	6,17 \pm 0,45	8,9 \pm 0,59
	3	-	-	-	-
	4	95,0 \pm 4,3	73,0 \pm 3,9	6,29 \pm 0,33	9,35 \pm 0,35
45	1	99,0 \pm 2,8	73,0 \pm 3,2	6,18 \pm 0,34	10,1 \pm 0,55
	2	98,0 \pm 3,4	74,0 \pm 2,4	6,09 \pm 0,51	9,98 \pm 0,34
	3	-	-	-	-
	4	98,0 \pm 5,1	71,0 \pm 6,1	6,01 \pm 0,33	9,5 \pm 0,43

(P \leq 0,01)

Из данных таблицы 31 видно, что лучевая болезнь у неиммунизированных овец сопровождалась значительными нарушениями гемопоэза, которые характеризовались кратковременной (в течение первых 3 суток) гипергемоглобинемией, сменяющийся в дальнейшем и до гибели стойкой гипоглобулинемией, эритропенией и резкой лейкопенией ($P \leq 0,01$). У иммунизированных за 30 суток до летального облучения овец лучевая болезнь протекала в более легкой форме, указанные изменения были менее выраженными ($P \geq 0,05$).

При изучении лейкоцитарного профиля у облученных овец на фоне иммунизации вышеуказанными антигенами и без нее, обнаружена аналогичная закономерность, менее выраженного изменения изученных показателей у иммунизированных и существенные нарушения гемопоэза у облученных без иммунизации животных (таблица 32).

Таблица 32 - Лейкоцитарный профиль у летально облученных овец через 30 суток после иммунизации различными антигенами

Срок исследования (сут)	Группа ж-х	Показатель							
		кол-во лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	нейтрофилы, %			базофилы, %	эозинофилы, %	моноциты, %	лимфоциты, %
			ю	п	с				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	10,29 \pm 0,31	6,0 \pm 1,8	4,1 \pm 2,0	37,8 \pm 5,5	0,26 \pm 0,08	0,25 \pm 0,07	1,39 \pm 0,3	69,7 \pm 3,3
	2	11,23 \pm 0,41	6,3 \pm 2,3	4,5 \pm 1,9	37,9 \pm 4,1	0,30 \pm 0,05	0,25 \pm 0,09	1,5 \pm 0,7	63,4 \pm 5,1
	3	9,47 \pm 0,25	6,1 \pm 1,7	4,0 \pm 1,8	31,5 \pm 3,3	0,24 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03	1,1 \pm 0,2	61,9 \pm 4,9
	4	9,50 \pm 0,33	5,7 \pm 1,6	4,1 \pm 1,9	32,9 \pm 2,7	0,22 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	1,0 \pm 0,2 ^x	60,5 \pm 4,5
3	1	8,1 \pm 0,55	5,7 \pm 1,3	6,3 \pm 1,7	33,9 \pm 4,1	0,35 \pm 0,07	0,33 \pm 0,09	1,7 \pm 0,8	58,3 \pm 4,1
	2	6,3 \pm 0,47	5,5 \pm 2,1	7,5 \pm 2,1 ^x	39,5 \pm 3,1	0,7 \pm 0,09 ^x	0,61 \pm 0,1 ^x	2,3 \pm 0,5	47,1 \pm 5,3
	3	4,40 \pm 1,24 ^x	3,3 \pm 2,6	8,6 \pm 1,5 ^x	45,0 \pm 1,9 ^x	1,1 \pm 0,2 ^x	2,0 \pm 0,5	3,1 \pm 0,7 ^x	39,1 \pm 1,9 ^x
	4	9,60 \pm 0,37	6,0 \pm 3,4	4,1 \pm 1,9	32,4 \pm 3,7	0,22 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	1,0 \pm 0,2	60,5 \pm 4,5
7	1	7,21 \pm 0,49	4,7 \pm 0,9	7,0 \pm 1,9	25,7 \pm 2,9	0,25 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	1,3 \pm 0,1	55,4 \pm 2,9
	2	5,8 \pm 0,77 ^x	3,9 \pm 0,5 ^x	8,5 \pm 2,1 ^x	23,1 \pm 3,1 ^x	0,29 \pm 0,03	0,23 \pm 0,03	1,9 \pm 0,3	51,3 \pm 3,5
	3	4,30 \pm 1,05 ^x	3,5 \pm 1,7 ^x	11,7 \pm 3,3 ^x	27,3 \pm 3,5	0,34 \pm 0,05	0,29 \pm 0,05 ^x	2,1 \pm 0,5 ^x	43,1 \pm 2,9 ^x
	4	9,4 \pm 0,4	6,0 \pm 2,1	4,1 \pm 1,9 ^x	32,4 \pm 3,7	0,22 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	1,0 \pm 0,2	60,5 \pm 4,5

	2	3	4	5	6	7	8	9	10
45	1	10,1 ±0,55	6,1±0,9	4,2±0,7	30,5±3,2	0,25±0,05	0,20±0,04	1,09±0,21	65,1±2,15
	2	9,9±0,34	6,2±0,8	4,1±0,8	29,1±1,9	0,30±0,04	0,24±0,05	1,11±0,15	62,9±3,11
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	9,5±0,43	6,0±0,9	4,0±0,9	31,1±2,3	0,24±0,06	0,21±0,08	1,15±0,22	61,4±4,31
10	1	8,1±0,31	4,2±0,7	8,0±2,1	26,1±2,5	0,23±0,05	0,20±0,03	1,1±0,3	54,7±3,1
	2	6,3±0,65 ^x	3,6±1,1 ^x	4,1±2,9 ^x	25,5±2,8	0,27±0,07	0,25±0,05	1,7±0,1	50,3±4,5
	3	5,0±0,97 ^x	2,6±0,9 ^x	12,7±2,7 ^x	29,9±3,3	0,35±0,09	0,31±0,09 ^x	2,3±0,3	31,1±3,9 ^x
	4	9,4±0,29	6,1±1,9	4,1±1,9	32,4±3,7	0,22±0,01	0,18±0,03	1,0±0,20	60,5±4,5
14	1	7,28±0,43	4,9±0,9	9,1±2,3 ^x	25,3±2,7	0,24±0,07	0,21±0,05	1,0±0,09	56,3±5,1
	2	6,1±0,75	3,8±1,3 ^x	9,9±3,1 ^x	24,1±3,5	0,26±0,09	0,23±0,07	1,3±0,3	52,4±3,3
	3	4,37±0,95	2,3±0,7 ^x	15,4±2,9 ^x	27,5±4,1	0,37±0,10	0,37±0,09 ^x	2,5±0,5 ^x	22,3±5,7 ^x
	4	9,5±0,39	5,9±1,9	4,1±1,9	32,4±3,7	0,22±0,01	0,18±0,03	1,0±0,20	60,5±4,5
21	1	8,3±0,69	5,0±1,1	8,5±2,9 ^x	27,9±3,1	0,21±0,03	0,19±0,07	0,9±0,05	59,7±5,9
	2	6,9±0,57	4,1±1,5	9,0±3,3 ^x	25,5±4,5	0,23±0,08	0,21±0,09	1,1±0,09	56,3±4,7
	3	3,71±1,01	2,0±1,2 ^x	16,5±2,1 ^x	28,1±3,9	0,31±0,09 ^x	0,35±0,05 ^x	2,4±0,3 ^x	20,1±5,9 ^x
	4	9,4±0,44	6,1±2,3	4,1±1,9	32,4±3,7	0,22±0,01	0,18±0,03	1,0±0,20	60,5±4,5
28	1	9,0±0,71	-	6,0±1,8	27,5±3,1	0,20±0,05	0,18±0,05	0,5±0,03	61,3±3,5
	2	8,9±0,59	-	9,5±2,3 ^x	25,3±4,9	0,23±0,03	0,20±0,09	0,7±0,05	58,1±4,1
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	9,35±0,35	6,0±2,5	4,1±1,9	32,4±3,7	0,22±0,01	0,18±0,03	1,0±0,20	60,5±4,5

^x - P<0,05

Таблица 33 - Иммунологические показатели у привитых испытуемыми антигенами овец после летального облучения их гамма-лучами ^{137}Cs в динамике

	Группа	Показатель							
		кол-во лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	кол-во Т-лимфоцитов (%)	кол-во В-лимфоцитов (%)	титры ААТ к ЛСЭ (баллы)	титры анти-токсических антител в РНГА (\log_2)	иммуноглобулины, мг/мл		
							G	M	A
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	69,7 \pm 2,7	46,3 \pm 2,3	26,7 \pm 1,8	0,49 \pm 0,03 ^x	4,4 \pm 0,07 ^x	30,2 \pm 0,9	2,6 \pm 0,07	0,19 \pm 0,01
	2	63,4 \pm 3,1	45,9 \pm 2,2	25,2 \pm 1,9	0,59 \pm 0,09 ^x	3,3 \pm 0,05	25,4 \pm 0,5	2,2 \pm 0,08	0,21 \pm 0,07
	3	61,9 \pm 3,5	42,7 \pm 2,6	24,2 \pm 1,1	0,17 \pm 0,15	-	24,1 \pm 0,09	1,57 \pm 0,04	0,20 \pm 0,01
	4	60,5 \pm 3,4	41,9 \pm 1,7	24,3 \pm 1,7	0,17 \pm 0,05	-	24,0 \pm 0,1	1,53 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03
3	1	58,3 \pm 4,1	32,0 \pm 2,0 ^x	19,8 \pm 1,3	0,59 \pm 0,09 ^x	3,1 \pm 0,03 ^x	29,3 \pm 0,7	2,7 \pm 0,05	0,20 \pm 0,02
	2	47,1 \pm 5,3	30,1 \pm 1,7 ^x	17,5 \pm 2,1 ^x	0,65 \pm 0,1 ^x	2,3 \pm 0,01	24,5 \pm 0,9	2,5 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03
	3	39,1 \pm 1,9 ^x	27,3 \pm 0,5 ^x	14,3 \pm 2,5 ^x	0,8 \pm 0,03 ^x	-	23,9 \pm 1,1	2,1 \pm 0,07 ^x	0,27 \pm 0,09 ^x
	4	60,5 \pm 4,5	41,9 \pm 1,7	24,3 \pm 1,7	0,17 \pm 0,05	-	24,0 \pm 0,1	1,53 \pm 0,03	0,22 \pm 0,05
7	1	55,4 \pm 2,9	30,3 \pm 2,7 ^x	18,5 \pm 2,1	0,61 \pm 0,1 ^x	2,8 \pm 0,3 ^x	31,5 \pm 1,9	2,8 \pm 0,09	0,18 \pm 0,02
	2	51,3 \pm 3,5	28,1 \pm 3,1 ^x	16,3 \pm 1,9 ^x	0,75 \pm 0,3 ^x	1,9 \pm 0,1	25,7 \pm 2,1	2,6 \pm 0,08	0,17 \pm 0,05
	3	43,1 \pm 2,9 ^x	24,0 \pm 1,4 ^x	12,1 \pm 3,1 ^x	1,0 \pm 0,3 ^x	-	22,1 \pm 3,7	2,5 \pm 0,09	0,37 \pm 0,07 ^x
	4	60,5 \pm 4,5	41,9 \pm 1,7	24,3 \pm 1,7	0,17 \pm 0,05	-	24,0 \pm 0,1	1,53 \pm 0,03	0,22 \pm 0,25
10	1	54,7 \pm 3,1	33,0 \pm 2,4 ^x	20,5 \pm 3,1	0,77 \pm 0,1 ^x	3,9 \pm 0,3 ^x	33,1 \pm 5,1	2,0 \pm 0,07	0,21 \pm 0,03
	2	50,3 \pm 4,5	27,0 \pm 3,5 ^x	18,7 \pm 2,9	0,89 \pm 0,5 ^x	2,8 \pm 0,09	28,7 \pm 3,3	1,7 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05
	3	31,1 \pm 2,9 ^x	22,1 \pm 2,5 ^x	14,0 \pm 1,5 ^x	1,39 \pm 0,3 ^x	-	20,3 \pm 4,7	2,3 \pm 0,09	0,43 \pm 0,08 ^x
	4	60,5 \pm 4,9	41,9 \pm 1,7	24,3 \pm 1,7	0,17 \pm 0,05	-	24,02 \pm 0,1	1,53 \pm 0,03	0,22 \pm 0,05

Продолжение таблицы 33

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
14	1	56,3±5,1	39,9±1,7	21,0±3,5	0,91±0,1 ^x	4,1 ±0,17	34,3±4,3 ^x	1,8+0,05	0,23+0,03
	2	52,4±2,9	31,3±2,3 ^x	19,3±2,9	1,03±0,3 ^x	3,3±0,9	29,1 ±3,2	1,6+0,03	0,24+0,07
	3	22,3±3,7 ^x	24,7±3,1 ^x	13,0±1,5 ^x	1,67±0,33 ^x	-	13,5+3,7 ^x	1,3+0,05	0,45+0,09 ^x
	4	60,5±4,5	41,9±1,7	24,3±1,7	0,17±0,05	-	24,0±0,1	1,33+0,03	0,22+0,05
21	1	59,7±5,9	39,7±2,1	22,1±2,8	0,95±0,2	4,3±0,9	33,5±5,1	1,4+0,05	0,25+0,07
	2	56,3±4,7	31,5±3,7	19,7±3,1	1,19±0,3	3,8±0,5	27,1 ±4,5	1,3+0,07	0,26+0,05
	3	20,1±5,9 ^x	22,3±3,9 ^x	12,1 ±2,9 ^x	2,1±0,7 ^x	-	12,1 ±2,9 ^x	1,1+0,03	
	4	60,5±4,5	41,9±1,7	24,3±1,7	0,17±0,05	-	24,0±0,1	1,53+0,03	0,22+0,05
28	1	61,3±3,5	40,5±2,8	23,9±3,3	0,85±0,1	4,5±0,9	28,1±2,5	1,41+0,05	0,22+0,07
	2	58,1 ±4,1	37,8±3,1	20,1 ±2,7	1,01±0,3	4,0±0,5	25,3±2,8	1,31+0,07	0,23+0,05
	3	-	-	-	-	-			
	4	60,5±4,5	41,9±1,7	24,2±1,7	0,17±0,05	-	24,0±0,1	1,53+0,03	0,22+0,03
45	1	6,51 ±2,15	43,1±3,11	24,3±3,3	0,61±0,25	4,4±0,8	29,0±0,9	1,7+0,03	0,20+0,02
	2	62,9±3,11	40,0±2,98	21,9±2,4	0,95±0,36	3,9±0,7	25,1±0,7	1,5+0,02	0,19+0,01
	3	-	-	-	-	-			
	4	61,4±4,31	41,6±3,15	24,5±2,7	0,20±0,11	-	24,9±0,3	1,5+0,06	0,20±0,02

^x - P<0,05

Из представленных в таблице 32 данных видно, что облучение неиммунизированных овец сопровождалось увеличением палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, базофилов и эозинофилов, с одновременным уменьшением юных форм нейтрофилов (сдвиг влево). Наиболее существенные изменения в периферической крови были обнаружены со стороны лимфоцитов, когда количество их к 10 суткам уменьшилось вдвое, а к 21-м суткам - втрое. В отличие от только облученных животных (3-я группа), у овец, иммунизированных микробным полиантигеном РЗК, отмеченные изменения носили менее выраженный характер, имея недостоверные различия в большинстве исследованных сроков. В отличие от овец 1-й группы, у овец, иммунизированных антигеном МПАГ, изменения гемограммы, хотя и отличались от только облученных животных, однако они по степени выраженности превышали таковые животных 1-й группы, иммунизированных микробным полиантигеном РЗК.

Существенные изменения в системе кроветворения у летально облученных гамма-квантами овец сопровождались значительными изменениями системы иммунитета и иммунологической реактивности организма, затрагивая как гуморальные, так и клеточные факторы иммунитета (таблица 33).

При изучении гуморальных факторов иммунитета у облученных на фоне иммунизации и без нее, обнаружено, что предварительная иммунизация овец испытуемыми антигенами обуславливала синтез иммуноглобулинов класса G ($P < 0,05$), антирадиотоксических антител и аутоантител к лизатам собственных эритроцитов. При этом следует отметить, что титры противорадиационных антител у иммунизированных РЗК были достоверно выше ($P < 0,05$), чем у овец, иммунизированных МПАГ - (2-я группа). Что касается аутоантител, то здесь прослеживалась обратная зависимость - титры аутоантител у только облученных овец были выше чем у иммунизированных обоими антигенами, однако у овец 1-й группы, иммунизированных РЗК, были меньше, чем у овец 2-й группы (иммунизированных МПАГ), что свидетельствует о развитии в организме процессов аутоиммунизации и аутоаллергии, которая была менее выражена у овец 1-й группы.

Развитие в облученном организме процесса аутоиммунизации продуктами тканевого распада и токсического синдрома были обусловлены появлением радиоиндуцированных антигенов - радиотоксинов, что иллюстрируется данными таблицы 34.

Таблица 34 - Динамика уровня радиоиндуцированного антигена (радиотоксина) в РНГА у иммунизированных и неиммунизированных овец после летального облучения

	Титр антигена в сыворотке крови (\log_2), через сут					
	1	3	7	10	14	21
1	-	$0,9 \pm 0,07$	$2,1 \pm 0,07$	$2,5 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,04$
2	-	$2,1 \pm 0,01$	$3,5 \pm 0,05$	$3,9 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,01$
3	-	$4,7 \pm 0,09$	$5,6 \pm 0,03$	$6,1 \pm 0,07$	$5,1 \pm 0,08$	$3,0 \pm 0,03$
4	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

Из данных таблицы 34 видно, что, у только облученных в летальной дозе гамма-лучей овец уже на 3-й день после облучения выявляются лучевые антигены - радиотоксины в значительных титрах ($4,7 \pm 0,9 \log_2$ в РНГА). Титры указанного антигена у облученных животных были достоверно выше, чем у иммунизированных животных ($P < 0,05$), однако предварительная иммунизация микробным полиантигеном (РЗК) оказывала ингибирующее действие на образование и накопление радиотоксина - во все сроки исследования содержание указанного антигена у овец 1-й группы было достоверно ниже, чем у только облученных ($P < 0,01$) и у иммунизированных МПАГ ($P < 0,05$). Указанная тенденция в отношении лучевого антигена - радиотоксина сохранялась вплоть до гибели животных (21-26 суток опыта).

Наряду с нарушением гуморальных факторов иммунитета после облучения, были выявлены существенные нарушения и со стороны факторов клеточного иммунитета. При этом были прослежены в динамике изменения относительного содержания Т- и В-лимфоцитов, а также изменения их функционального

состояния по степени стимуляции митогенами (ФГА) в тесте бласттрансформации лимфоцитов.

Результаты изучения количественного содержания Т- и В-лимфоцитов в зависимости от воздействия на организм ионизирующей радиации на фоне применения средств радиозащиты (РЗК и МПАГ), представленные в таблице 35 показали, что предварительное (профилактическое) применение антигенных препаратов оказывало модифицирующее влияние на динамику и содержание иммунокомпетентных клеток макроорганизма. Как видно из данных таблицы, летальное облучение животных гамма-лучами вызывало достоверное снижение количества Т- и В-лимфоцитов уже начиная с третьих суток после облучения ($P < 0,05$), которое сохранялось на значительно низком уровне вплоть до радиационной гибели животных. Достоверно низкий уровень Т- и В-лимфоцитов регистрировали в крови иммунизированных МПАГ животных до 21 дня после облучения ($P < 0,05$). В отличие от летально облученных и иммунизированных тканевым антигеном овец, у животных 1-й группы, иммунизированных РЗК, значительные изменения указанных субпопуляций лимфоцитов отмечены до 14 дня после облучения.

Поражение животных гамма-лучами в летальной дозе сопровождалась не только количественными изменениями иммунокомпетентных клеток Т- и В-клеточного звена, но и значительными изменениями их функционального состояния.

Результаты опытов по изучению функционального состояния лимфоцитов в тест-системе РБТЛ с использованием митогена (ФГА) показали (таблица 35), что этот тест у облученных на фоне иммунизации и без нее имел существенные различия как по срокам, так и от вида использованного радиозащитного препарата. Как видно из данных таблицы, функциональная активность лимфоцитов угнетена уже на 3-й день после летального облучения животных почти в два раза по сравнению с животными необлученной группы ($P < 0,05$). В дальнейшем указанная тенденция снижения функциональной активности лимфоцитов сохранялась до конца опытов, однако наиболее резкое угнетение

этого показателя наблюдалась в группе только облученных животных без предварительной иммунизации, когда к началу гибели животных значения РБТЛ составляли $12,2 \pm 3,3$ % у животных 3-й группы (контроль облучения), $28,3 \pm 3,1$ - 2-й группы, (МПАГ) и $34,5 \pm 3,7$ %, 1-й группы (РЗК) против $55,3 \pm 4,9$ % - в контроле ($P < 0,05$). Только к 28 суткам функциональная активность лимфоцитов у овец 1-й группы (РЗК) восстанавливалась до уровня контрольных значений.

Таблица 35 - Динамика изменения РБТЛ у иммунизированных и летально облученных через 30 сут после прививки овец

Группа	Бласттрансформирующая активность лимфоцитов (%) сут							
	исход	3	7	10	14	21	28	45
1	$61,3 \pm 5,7$	$29,4 \pm 2,9$	$28,5 \pm 3,1$	$28,9 \pm 3,4$	$26,7 \pm 2,5$	$34,5 \pm 3$	$43,7 \pm 5,3$	$51 \pm 3,4$
2	$59,9 \pm 4,3$	$27,3 \pm 3,1$	$25,7 \pm 2,9$	$25,9 \pm 3,1$	$24,3 \pm 2,7$	$28,3 \pm 3$	$36,1 \pm 4,9$	$42,9 \pm 3,6$
3	$53,8 \pm 4,1$	$25,0 \pm 2,3$	$22,3 \pm 1,8$	$19,5 \pm 1,9$	$15,2 \pm 1,5$	$12,2 \pm 3$	-	-
4	$55,1 \pm 5,3$	$56,3 \pm 6,1$	$54,9 \pm 4,7$	$55,5 \pm 5,1$	$54,9 \pm 5,7$	$55,3 \pm 4$	$55,2 \pm 5,3$	$52,3 \pm 4,6$

^x - $P < 0,05$

Таким образом, в результате проведенных в 1-й серии опытов на сельскохозяйственных животных (овцах) установлено, что предварительная иммунизация животных РЗК создает длительную (в течение 30 суток) радиорезистентность организма, предохраняя 66,6 % животных от радиационной гибели после минимального абсолютного летального облучения животных. Использование известного биорадиопротектора – МПАГ оказалось менее эффективным, которое защищало от радиационной гибели 50,0 % летально облученных животных. Использование РЗК в качестве биорадиопротектора оказывало модифицирующее действие на течение лучевой болезни, которая реализовалась путем синтеза противорадиационных антител, усилению синтеза иммуноглобулинов класса G, стимуляции выработки иммунокомпетентных клеток (Т- и В-лимфоцитов) и повышения их функциональной активности.

Указанные гуморально-клеточные факторы иммунитета, стимулированные предварительной иммунизацией испытанными антигенами микробного происхождения, повышая эндогенный фон радиорезистентности, препятствовали образованию, накоплению и распределению по органам и тканям радиоиндуцированных лучевых антигенов - радиотоксинов путем нейтрализации их с помощью противорадиационных и антитканевых аутоантител, препятствуя тем самым развитию геморрагического и гемопатологического симптомокомплекса, сопровождающегося катастрофическим снижением количества лейкоцитов и лимфоцитов у неиммунизированных животных.

2.6.2 Изучение длительности формирования радиорезистентности овец после профилактического применения композиционного препарата РЗК

Полученные положительные результаты 1 -й серии опытов по испытанию защитной эффективности биорадиопротектора на основе микробной биомассы и продуктов их метаболизма послужили основанием для постановки 2-й серии экспериментов на овцах, целью которой являлось изучение длительности радиорезистентности животных после иммунизации их РЗК.

В опытах использовали 36 взрослых овец породы «Прекос» обоего пола со средней живой массой 43,3 кг. Перед постановкой опытов у животных изучали клинико-гематологическую картину, иммунный фон, определяя количество и функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, содержание иммуноглобулинов классов G, M, A, уровень аутоантител и противорадиационных антител. Затем животные были разделены на 8 групп по 5 голов (1-6 группы) и по 3- (7-8 группы). Животных 1-й, 3-й и 5-й групп подкожно иммунизировали РЗК однократно в дозе 5,0 мл. Овец 2-й, 4-й и 6-й групп иммунизировали также однократно подкожно МПАГ (контрольный биорадиопротектор) в той же дозе. Овец 7-й и 8-й групп не иммунизировали, они служили в качестве контроля облучения (К1) и биологического контроля (К2).

Схема проведения опытов на мелком рогатом скоте по изучению длительности радиорезистентности после применения РЗК и МПАГ представлена в таблице 36.

Таблица 36 - Схема постановки 2-й серии опытов на мелком рогатом скоте

Группа	Кол-во жив-ых, гол	Использованный радиозащитный препарат	Интервал между иммунизациями и облучением (сут)	Иммунизирующая доза (ИД ₅₀)
1	5	РЗК	90	$2,5 \times 10^9$ м.к./кг
2	5	МПАГ	90	$2,5 \times 10^9$ м.к./кг
3	5	РЗК	60	-\\-
4	5	МПАГ	60	-\\-
5	5	РЗК	30	-\\-
6	5	МПАГ	30	-\\-
7	3	K ₁ (K ₀)	-	-
8	3	K ₂ (Б.к.)	-	-

За иммунизированными (1-6 группы) и интактными (7-8 группы) животными вели клиническое наблюдение, ежемесячно брали пробы периферической крови для гематологических исследований и определения состояния клеточного и гуморального факторов иммунитета и иммунологической перестройки организма. Результаты гематологических и иммунологических исследований, проведенных через 30, 60 и 90 дней после иммунизации двумя различными антигенами, представлены в таблицах 37-39.

Таблица 37 - Гемограммы овец после иммунизации предлагаемым и известным антигенами в динамике ($M \pm m$)

Группа	Срок исследования,	Гемоглобин, г/л	Общий белок, г/л	IgG, мг/мкл	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Тромбоциты, $\times 10^9/л$
1	1	98,0 \pm 4,0	70,0 \pm 1,2	24,5 \pm 0,8	6,20 \pm 0,20	316,5 \pm 44,1
	30	109,0 \pm 6,3	74,0 \pm 3,5	31,2 \pm 0,9	6,30 \pm 0,5	311,2 \pm 39,3
	60	105,0 \pm 9,1	73,0 \pm 2,3	29,5 \pm 0,7	6,24 \pm 0,3	307,5 \pm 37,1
	90	103,0 \pm 7,7	72,0 \pm 3,1	27,8 \pm 0,8	6,21 \pm 0,4	314,1 \pm 29,5
2	1	97,0 \pm 3,9	72,0 \pm 1,9	23,9 \pm 0,5	6,15 \pm 0,19	315,3 \pm 39,7
	30	112,0 \pm 4,4	77,0 \pm 3,1	28,4 \pm 0,7	6,27 \pm 0,31	307,1 \pm 28,9
	60	107,0 \pm 2,8	75,0 \pm 2,5	27,3 \pm 0,3	6,25 \pm 0,43	304,3 \pm 44,5
	90	99,0 \pm 5,1	73,0 \pm 2,7	25,5 \pm 0,2	6,21 \pm 0,35	309,5 \pm 37,7
3	1	98,0 \pm 4,1	70,0 \pm 1,2	34,5 \pm 0,8	6,20 \pm 0,5	316,2 \pm 44,7
	30	109,0 \pm 6,3	74,0 \pm 3,5	31,2 \pm 0,9	6,30 \pm 0,5	311,2 \pm 39,3
	60	105,0 \pm 9,1	73,0 \pm 2,3	29,5 \pm 0,7	6,24 \pm 0,3	307,5 \pm 37,1
4	1	97,0 \pm 3,9	72,0 \pm 1,9	23,9 \pm 0,5	6,15 \pm 0,19	315,3 \pm 39,7
	30	112,0 \pm 4,4	77,0 \pm 3,1	28,4 \pm 0,7	6,27 \pm 0,31	307,1 \pm 28,9
	60	107,0 \pm 2,8	75,0 \pm 2,5	27,3 \pm 0,3	6,25 \pm 0,43	304,3 \pm 44,5
5	1	98,0 \pm 4,0	70,0 \pm 1,2	24,5 \pm 0,8	6,20 \pm 0,20	316,5 \pm 44,1
	30	109,0 \pm 6,3	74,0 \pm 3,5	31,2 \pm 0,9	6,30 \pm 0,5	311,2 \pm 39,3
6	1	97,0 \pm 3,9	72,0 \pm 1,9	23,9 \pm 0,5	6,15 \pm 0,19	315,3 \pm 39,7
	30	112,0 \pm 4,4	77,0 \pm 3,1	28,4 \pm 0,7	6,27 \pm 0,31	307,1 \pm 28,9
K ₁	1	98,0 \pm 4,0	70,0 \pm 1,2	24,5 \pm 0,8	6,20 \pm 0,20	316,5 \pm 44,1
	30	97,0 \pm 4,7	73,0 \pm 3,1	24,1 \pm 0,9	6,22 \pm 0,11	315,3 \pm 53,1
K ₂	1	95,0 \pm 3,9	72,0 \pm 2,5	24,3 \pm 0,3	6,21 \pm 0,17	314,5 \pm 41,5
	30	96,0 \pm 4,3	71,0 \pm 3,1	24,0 \pm 0,5	6,19 \pm 0,20	315,7 \pm 39,9

Из данных таблицы 37 видно, что иммунизация как предлагаемым (РЗК), так и известным (МПАГ) антигенами, вызывала изменения в содержании гемоглобина, общего белка, иммуноглобулинов класса G, эритроцитов и тромбоцитов, степень изменения которых зависела от использованного антигена. При этом обнаружено, что после введения микробного полиантигена в течение всего срока исследования регистрировали повышенное содержание гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, по сравнению с таковыми у животных, иммунизированных тканевым антигеном. В отличие от животных 1-й группы, у

овец, иммунизированных МПАГ, содержание иммуноглобулинов класса G несколько ($P>0,05$) уступало таковому животных 1-й группы (иммунизация (РЗМП)), что способствовало более усиленному синтезу антитканевых аутоантител у животных 2-й группы (таблица 39).

При изучении лейкоцитарной формулы у привитых РЗК и МПАГ за 30, 60 и 90 дней до облучения установлено (таблица 38), что оба использованных антигена вызывали изменения клеток белой крови, которые сводились к увеличению содержания лейкоцитов нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов ($P>0,05$). При этом отмечено, что тканевой антиген вызывал более выраженный лейкоцитозо-нейтрофило (юные, палочкоядерные), базофило-, эозинофило- и моноцитостимулирующий эффект. В отличие от тканевого, микробный полиантиген вызывал менее выраженные изменения белой крови, за исключением того, что после иммунизации последним последовало более выраженная стимуляция образования и созревания лимфоцитов, что наблюдалось во все сроки исследования (30, 60 и 90 суток после иммунизации).

Антигенная стимуляция гемопоэза после применения РЗК и МПАГ нашла отражение на клеточных и гуморальных факторах иммунитета, что иллюстрируется данными таблицы 39. Как видно из ее данных, у животных, привитых микробным полиантигеном, во все сроки после иммунизации регистрировали более высокое содержание иммунокомпетентных клеток Т- и В-клеточного звена иммунитета. Содержание Т- и В-лимфоцитов у иммунизированных РЗК животных во все сроки исследования превышало контрольные значения в 1,4-1,7 раза ($P<0,05$)

Таблица 38 - Лейкоцитарный профиль крови овец после иммунизации предлагаемым (РЗК) и известным (МПАГ) препаратами в динамике

Группа	Срок исследования (сут)	Показател							
		лейкоциты, x10 ⁹ /л	нейтрофилы, %			базофилы,	эозинофилы, %	моноциты, %	лимфоциты, %
			ю	п	с				
	1	9,60±0,11	2,0±0,3	4,1±1,7	41,3±3,7	0,3±0,05	0,9±0,03	2,1 ±0,5	51,7±2,7
1	30	10,29±0,31	1,3±0,1	4,5±2,1	47,1±4,9	1,8±0,3	3,1±0,5	2,8±0,1	58,3±2,1
2	60	10,09±0,29	1,0±0,3	4,3±1,9	49,3±5,1	1,5±0,1	2,8±0,3	2,5±0,3	56,1 ±3,5
3	90	9,77±0,37	0,9±0,07	4,2±2,1	46,9±5,5	1,3±0,3	1,3±0,2	2,2±0,5	55,7±2,9
4	30	11,23±0,41	2,5±0,5	4,7±1,8	45,3±3,3	1,9±0,3	4,5±0,7	3,2±0,7	53,5±3,7
5	60	10,59±0,37	2,3±0,1	4,6±2,2	47,5±4,1	1,7±0,3	4,3±0,5	2,9±0,8	51,9±4,3
6	90	10,13±0,49	1,5±0,4	4,5±1,9	44,7±3,9	1,5±0,1	2,1±0,3	2,5±0,5	50,8±3,9
7 K ₁	30, 60, 90	9,63±0,11	1,3±0,1	4,1±1,7	41,3±3,1	0,3±0,05	0,9±0,03	2,1 ±0,5	51,7±2,7
8 K ₂	30, 60, 90	9,51±0,23	1,1 ±0,2	4,1±1,7	41,3±3,7	0,3±0,05	0,9±0,03	2,1±0,5	51,7±2,7

Таблица 39 - Изменения факторов клеточного и гуморального иммунитета у овец после иммунизации радиозащитными антигенами

Группа	Срок исследований, сут	Показатель						
		кол-во лимфоцитов, %	кол-во Т-лимфоцитов, %	кол-во В-лимфоцитов, %	титры ААТ к ЛСЭ (баллы)	титр антирадиотоксических антител в РНГА (log ₂)	Иммуноглобулины класса G, мг/мкл	РБТЛ, %
	1	51,7±2,7	41,9±2,3	24,3±1,7	0,17±0,05	-	24,02±0,1	55,1±3,3
1	30	58,3±2,1	46,3±3,5	27,5±2,5	0,49±0,08	4,4±0,07	30,2±0,9	61,3±5,7
2	60	56,1 ±3,5	45,1±2,9	25,9±3,3	0,41 ±0,09	3,7±0,09	27,5±0,7*•	59,2±2,9
3	90	53,7±2,9	43,4±3,3	25,1±4,5	0,35±0,07	3,5±0,06	26,1±0,5	57,5±3,3
4	30	53,5±3,7	44,7±4,1	25,9±3,7	0,61±0,06	3,3±0,05	26,9±0,8	58,1±4,5
5	60	51,9±4,3	43,1±3,8	24,9±4,6	0,53±0,09	2,7±0,09	25,5±0,4	57,3±5,1
6	90	50,8±3,9	42,7±4,5	24,5±5,1	0,45±0,07	1,5±0,08	24,9±0,7	55,9±3,7
7 (K ₁)	30, 60, 90	51,7±2,7	41,9±2,3	24,3±1,7	0,17±0,05	-	24,02±0,1	55,1±5,3
8 (K ₂)	30, 60, 90	51,7±2,7	41,9±2,3	24,3±1,7	0,17±0,05	-	24,02±0,1	55,1±5,3

Стимуляция образования и созревания указанных иммунокомпетентных клеток у животных, иммунизированных известным полиантигеном (МПАГ), во все сроки исследования была менее выраженной (в 1,4 раза), чем при применении микробного полиантигена. Выработка, созревание и выброс в кровяное русло лимфоцитов при стимуляции РЗК сопровождались не только увеличением их количества, но изменением функциональной активности лимфоцитов, о чем свидетельствуют данные по изучению бласттрансформирующей функции лимфоцитов (таблица 39). Как видно из данных таблицы 39, на протяжении всего срока исследований после иммунизации количество бластных клеток у иммунизированных РЗК животных превышало таковое как у контрольных, так и у иммунизированных МПАГ овец. У животных, иммунизированных указанным полиантигеном, стимуляция бласттрансформирующей активности лимфоцитов хотя и превышала контрольные значения, но уступала таковой овец 1-й группы на 2 % ($P > 0,05$).

Антигенная стимуляция иммунокомпетентных клеток под воздействием изучаемых антигенов нашла отражение и на состоянии факторов гуморального иммунитета, в качестве которых мы изучали синтез противотканевых аутоантител, иммуноглобулинов класса G и противорадиационных (антирадиотоксических) антител. Как видно из данных таблицы 39, использование РЗК в качестве пролонгированного радиозащитного препарата, вызывало более усиленный синтез иммуноглобулинов класса G и противорадиационных (антирадиотоксических) антител, последние из которых отсутствовали у контрольных (неиммунизированных) животных. При этом отмечено, что образование и накопление указанных гуморальных факторов иммунитета происходили более интенсивно у овец, иммунизированных микробным полиантигеном, превосходя таковые у привитых МПАГ в 1,3 раза ($P < 0,05$). Относительно образования и накопления противотканевых аутоантител следует сказать, что синтез последних происходил более интенсивно у овец, привитых тканевым антигеном, количество их у последних превышало таковое у привитых микробным полиантигеном в 1,25 раза ($P < 0,05$).

Таким образом, иммунизация животных как известными, так и предлагаемыми антигенами за 30, 60 и 90 суток до облучения оказывало стимулирующее действие на систему гемопозза и на иммунную систему, вызывая увеличение иммуноцитов (микрофагов, макрофагов, лимфоцитов, Т- и В-клеток, иммунобластов) и их функциональной активности, усиливая синтез иммуноглобулинов класса G, противотканевых и специфических противорадиационных антител, создавая и усиливая эндогенный фон радиорезистентности. При этом установлено, что указанные параметры эндогенной радиорезистентности у иммунизированных композиционными препаратами были более выраженными по сравнению таковыми у овец, привитых известным полиантигеном.

Сказанное нашло подтверждение при изучении выживаемости иммунизированных вышеуказанными антигенами животных (таблица 40).

Таблица 40 - Выживаемость овец, иммунизированных антигенами за 30, 60 и 90 суток до облучения в дозе 6,0 Гр

Группа ж-х	Кол-во ж-х, гол	Использованный антиген	Интервал между иммунизацией и облучением (сут)	Результат опытов		
				пало, гол	выжило, гол	ПЗ* %
1	5	РЗК	30	1	4	80
2	5	РЗК	60	2	3	60
3	5	РЗК	90	2	3	60
4	5	МПАГ	30	2	3	60
5	5	МПАГ	60	3	2	40
6	5	МПАГ	90	4	1	20
7 (K ₁)	3	-	-	3	0	0
8(K ₂)	3	-	-	0	3	100

*-процент защиты

Из приведенных в таблице 40 данных видно, что выживаемость овец, облученных гамма-лучами в дозе 6,0 Гр, иммунизированных различными радиозащитными антигенами, зависела как от вида использованного антигена, так

и от интервала времени между иммунизацией и облучением. При этом установлено, что овцы, иммунизированные РЗК за 30 суток до летального облучения, проявляли максимальную радиорезистентность - выживаемость их составила 80 % при гибели всех не иммунизированных (контроль облучения) животных. При увеличении интервала времени между иммунизацией и облучением степень радиорезистентности у привитых РЗК животных имела тенденцию к снижению - через 60 и 90 суток после иммунизации РЗК процент защиты у животных составил 60%.

Результаты параллельного испытания радиозащитной активности препарата МПАГ показали, что по изучаемому показателю этот антиген значительно уступает РЗК, поскольку процент защиты у животных, иммунизированных за 30 суток до летального облучения МПАГ составлял 60% против 80% в 1-й группе, за 60 суток - 40 и за 90 суток 20 % соответственно, что на 20, 40 и 60 % ниже, чем у овец 1-й группы, иммунизированных предлагаемым антигеном.

Таким образом, в результате проведенных опытов на сельскохозяйственных (овцы) животных, установлено, что предварительная однократная подкожная иммунизация РЗК способствует формированию длительной (в течение 3 мес) радиорезистентности за счет стимуляции образования микро- и макрофагов, иммуноцитов, синтеза ауто- и специфических антирадиотоксических антител, иммуноглобулинов класса G, активации функциональной активности лимфоцитов, что обеспечивает высокую степень выживаемости (60-80 %) летально облученных гамма-лучами животных.

2.6.3 Изучение влияния РЗК на предубойное состояние, санитарно-гигиенические показатели мяса облученных животных

Одним из важнейших требований, предъявляемых к лечебно-профилактическим препаратам, является влияние их на санитарно-гигиенические требования и биологическую ценность мяса после применения испытуемых препаратов.

С учетом изложенного, нами были проведены исследования по оценке качества мяса овец после лечения их препаратом РЗК на фоне развития острой лучевой болезни тяжелой степени.

Изучено влияния радиозащитного препарата РЗК на санитарно-гигиенические показатели качества мяса и его полноценность, которое было получено от леченных РЗК, необлученных и облученных в дозе 6,0 Гр через 15, 30 сут после лечения животных. При этом ветеринарно-санитарной экспертизе были подвергнуты 18 туш контрольных, облученных и леченых РЗК овец.

Результаты ветеринарно-санитарной экспертизы показали, что туши животных были хорошо обескровлены, через сутки они имели сухую корочку подсыхания бледно-белого цвета, мышцы плотные, упругой консистенции, на разрезе влажные, не липкие, цвет от бледно-розового до темно-красного соответствует данному виду животных. Жир от белого до бледно-розового цвета, твердый, без постороннего запаха. Сухожилия упругие, плотные, поверхность суставов гладкая и блестящая. Лимфатические узлы без видимых изменений. При проведении пробой варкой – бульоны были ароматными, прозрачными, на поверхности их жир собирался в виде крупных капель.

Мясо, полученное от контрольных, леченых РЗК и облученных животных исследовали на свежесть, изучали выход туши и внутренних органов. При осмотре туш и внутренних органов контрольных и леченых РЗК овец независимо от сроков убоя, каких-либо отклонений от нормы не выявили.

При убое животных, облученных в дозе 6,0 Гр, на 15-й день после облучения наблюдали точечные кровоизлияния на эпикарде и под капсулой печени. Кроме того, отмечали увеличение лимфатических узлов, особенно тех, которые расположены в грудной и брюшной полостях. У овец, облученных в дозе 6,0 Гр, через 15 суток (в период разгара ОЛБ) после облучения выявлялись различной величины кровоизлияния в подкожной клетчатке, коже и мышцах. Множественные кровоизлияния наблюдали во внутренних органах: в сердце (под эпикардом и в миокарде), легких, печени, селезенке, желудочно-кишечном тракте, особенно, в толстом и тонком отделах кишечника. В отдельных случаях наблюдали некротические участки на слизистых оболочках ротовой полости, глотки, гортани, кишечника и печени. Отмечали отек легких. Лимфатические узлы были набухшими, сочными и с кровоизлияниями.

При изучении мясной продуктивности животных, учитывали живую и убойную массу, выход туши, жира-сырца, субпродуктов (таблица 41).

Таблица 41 – **Выход продуктов убоя облученных и леченых овец**

Группа животных	Показатель (кг, %)				
	Живая масса, кг	Убойная масса	Выход туши	Выход жира-сырца	Выход субпродуктов
Контрольные	76,1±6,10	54,4±5,30	45,3±3,10	1,9±0,10	7,2±0,60
Леченые	76,3±5,70	54,9±2,30	46,92±2,72	1,98±0,19	7,1±0,51
Облученные	62,3±5,30	43,59±2,70	37,12±2,86	1,28±0,10	5,40±0,54

По результатам изучения показателей мяса полученного от облученных животных, было видно, насколько снижены показатели мясной продуктивности относительно контроля (заведомо здоровых животных): живая масса на 13,8 кг (у облученных в дозе 6,0 Гр), убойная на 10,81 кг, а также выход туши на 8,18 кг соответственно.

У овец, больных ОЛБ, количество внутреннего жира было меньше на 32,64% по сравнению с таковым у контрольных животных. Аналогичная тенденция наблюдалась и при выходе субпродуктов (печени, почек, легких, сердца).

При изучении свойств подкожного и внутреннего жиров, включающих определения цвета, прозрачности, запаха, вида и консистенции, показатели кислотного и перекисного чисел, было выявлено, что иммунизация овец за 30 сут до летального облучения оказывала коррегирующее влияние на изучаемые показатели (таблица 42).

Таблица 42 - Влияние однократной подкожной иммунизации на показатели подкожного и внутреннего жира леченных и облученных овец

Показатель	Ед. измерения	Контроль	Леченные РЗК	Облученные
Кислотное число				
Подкожный жир	мг КОН	1,01±0,21	1,03±0,14	1,05±0,17
Внутренний жир	мг КОН	1,06±0,09	1,05±0,11	1,08±0,15
Перекисное число				
Подкожный жир	йод (г)	0,017±0,003	0,016±0,005	0,019±0,002
Внутренний жир	йод (г)	0,021±0,005	0,020±0,002	0,028±0,005*

Из данных таблицы видно, что лечение овец РЗК не вызывало существенных изменений в химическом составе жира у подопытных животных. О доброкачественности жира свидетельствует плотная консистенция, отсутствие постороннего запаха и вкуса. Однократное подкожное введение РЗК овцам не изменило значения кислотного и перекисного чисел жиров – они были характерными для жира, пригодного в пищу без ограничений.

У овец, облученных в дозе 6,0 Гр, наблюдали определенные изменения свойств подкожного и внутреннего жира (таблица 42). Эти изменения

сопровождались недостоверным увеличением кислотного (в 1,03 и 1,01 раза) и перекисного (в 1,11 и 1,33 раза) чисел подкожного и внутреннего жира соответственно. При этом изменения перекисного числа внутреннего жира имели достоверные различия по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

В отличие от облученных, у леченых РЗК животных, изученные показатели мясной продуктивности незначительно отличались от контрольных показателей, уступая таковым не более, чем на 4,66-8,44 %.

Изучение степени обескровливания туш, полученных от леченых РЗК животных через 24 часа после облучения в дозе 6,0 Гр в динамике показало, что независимо от сроков убоя, их показатели незначительно отличались от контрольных животных. В отличие от контрольных, леченых через 24 часа после облучения препаратом РЗК, только у облученных этот показатель имел определенные отличия от первых. Обескровливание туш овец, облученных в дозе 6,0 Гр, было значительно хуже (в 1,5 раза, $P < 0,01$), чем в контроле, что свидетельствует о меньшей доброкачественности мяса облученных животных в средних и летальных дозах.

Изучение химических показателей мяса, облученных и леченых препаратом РЗК овец, показало, что они имели определенные отличия от формы воздействия на макроорганизм.

При изучении указанных показателей оцениваемого мяса мы учитывали содержание воды, белка, жира, минеральных веществ, энергетической ценности (калорийности), величины рН, коэффициента кислотности-окисляемости, реакции на пероксидазу, кислотное и перекисное числа подкожного и внутреннего жира.

Результаты сравнительного изучения химического состава мышечной ткани овец в зависимости от характера воздействия на организм (облучение, лечение РЗК после облучения) после облучения представлены в таблице 43.

Таблица 43 - Химический состав и энергетическая ценность мяса, полученного от облученных и леченых РЗК овец

Группа	Показатель					
	вода (%)	белок (%)	жир (%)	углеводы, (%)	минеральные вещества (%)	энергетическая. ценность, ккал
Контроль	77,10±0,93	20,45±0,17	3,50±0,14	1,10±0,08	1,13±0,09	120,50±1,96
	100	100	100	100	100	100
Облучение 6,0 Гр	73,30±0,81	17,80±0,09*	1,90±0,07*	0,98±0,08	0,92±0,03*	94,50±0,60*
	103,01	87,0	54,3	89,0	81,4	78,4
Леченые РЗК	73,90±0,95	19,50±0,09	3,11±0,07	0,95±0,15	0,97±0,13	112,50±1,0
	95,8	95,3	88,8	86,4	85,8	93,4

*-P<0,05. В числителе – показатели в процентах, знаменателе – процент относительно контролю,

Из данных таблицы видно, что мясо облученных животных содержало больше воды (на 1,9 и 3,01 %), меньше белка (на 9,5 и 13,0 %, $P<0,5$ и $P<0,01$), жира (на 43,0, $P<0,01$ и на 45,7, $P<0,001$), больше минеральных веществ (на 16,8, $P>0,03$ и 18,8 %, $P<0,01$). Мясо, полученное от облученных овец, перенесших среднюю и тяжелую степень ОЛБ, имело меньшую энергетическую ценность на 27 % ($P<0,05$).

Мясо леченых РЗК овец по изучаемым показателям, в том числе и по энергетической ценности, не отличалось от контрольных, уступая таковым не более чем на 4,9-4,66 % ($P>0,05$).

При изучении биохимических показателей мяса облученных и леченых РЗК животных были выявлены также определенные изменения со стороны pH, коэффициента кислотности-окисляемости и реакциями с сернокислой медью и на пероксидазу (таблица 44).

Таблица 44 - Биохимические показатели мышечной ткани облученных и леченых РЗК овец

Показатели	Сроки убоя после облучения (сут)	Группа		
		Контроль	Облученные 6,0 Гр	Леченые РЗК
pH	15	5,73±0,04	5,99±0,05	5,75±0,05
	30	5,72±0,05	5,98±0,03	5,74±0,03
Коэффиц. «кислотность-окисляемость» (ед.)	15	0,47±0,04	0,49±0,05	0,47±0,01
	30	0,46±0,01	0,48±0,05	0,46±0,03
Реакция на пероксидазу	15	+	+	+
	30	+	+	+
Амино-аммиачный азот мг / мл КОН	15	0,99±0,02	1,22±0,11	1,03±0,33
	30	0,97±0,03	1,14±0,25	1,06±0,25
ЛЖК (мг / КОН)	15	2,0±0,2	3,6±0,8*	2,4±0,8
	30	2,1±0,3	3,4±0,5*	2,3±0,7
Реакция с сернокислой медью	15	б/п	б/п	б/п
	30	б/п	б/п	б/п

+ - реакция положительная; б/п – бульон прозрачный; * – $P<0,05$

Из материалов таблицы видно, что мясо облученных и леченых животных не имело достоверных отличий от здоровых (контрольных). Мясо, полученное от больных ОЛБ овец имело определенные отличия от такового у здоровых и леченых животных.

Содержание летучих жирных кислот и аминокислотного азота в мышечной ткани больных ОЛБ овец, было достоверно (в 1,8 раза) выше, чем у контрольных животных. Показатель pH мяса, по истечении 72 ч созревания, соответствовал аналогичному показателю мяса здоровых животных, однако он недостоверно превышал (в 1,04 раза) контрольные значения ($P>0,05$). Аналогичная же тенденция увеличения отмечалась и со стороны коэффициента «кислотность-окисляемость», когда этот показатель превышал контрольные значения в 1,08 раза ($P>0,05$). У овец всех групп реакция на пероксидазу мышечной ткани была положительной, а бульон от пробы варкой - прозрачным.

В следующей серии опытов изучали биологическую полноценность мяса облученных и леченых РЗК овец. Оценку биологической полноценности мяса, облученных гамма-лучами в дозе 6,0 Гр и леченых РЗК через 24 часа после облучения, проводили на 80 крысятах-отъемышах, самцах, живой массой - 45 ± 2 г и 120 беспородных мышах, живой массой – 18 ± 20 г.

В эксперимент было взято 4-е группы крысят по 20 животных в каждой. Крысята I-й группы получали в рационе мясо овец леченых РЗК, II-й группы – мясо овец, облученных в дозах 6,0 Гр и убитых на 16-е сут после облучения, III-й группы – мясо здоровых овец (биологический контроль).

Подопытным животным всех групп давали вареное мясо в виде фарша в избытке по весу согласно методическим рекомендациям. Скармливание мяса подопытным крысятам продолжалось в течение 28 сут. Критериями прямого влияния исследуемых образцов мяса на организм крысят служили изменения роста-весовых, гематологических (после опыта) показателей и количество потребляемого мяса. Рассчитывали коэффициент эффективности мяса и белка.

Результаты изучения роста-весовых показателей подопытных и контрольных крысят представлены в таблице 45.

Таблица 45 - Изменение массы крысят в процессе опыта (г)

Сроки исследования, (сут)	Группа		
	I	II	III
Исход	45,8±0,45	46,0±0,52	46,0±0,35
3	$\frac{59,3 \pm 1,86}{13,5}$	$\frac{54,8 \pm 1,17}{8,8}$	$\frac{59,2 \pm 0,65}{13,2}$
7	$\frac{76,9 \pm 1,35}{31,1}$	$\frac{71,8 \pm 1,81}{25,3}$	$\frac{76,8 \pm 1,23}{30,8}$
10	$\frac{98,8 \pm 2,69}{53}$	$\frac{85,8 \pm 2,15}{39,8}$	$\frac{92,3 \pm 1,08}{46,3}$
14	$\frac{112,4 \pm 1,13}{66,6}$	$\frac{102,2 \pm 2,36}{56,2}$	$\frac{112,1 \pm 1,53}{66,1}$
21	$\frac{149,9 \pm 2,17}{104,1}$	$\frac{140,1 \pm 2,35}{94,1}$	$\frac{146,2 \pm 2,37}{100,2}$
28	$\frac{168,5 \pm 3,55}{122,7}$	$\frac{160,9 \pm 4,04}{114,9}$	$\frac{166,5 \pm 5,89}{120,5}$

Числитель – средняя масса крысят (г), знаменатель - привесы с начала опыта (г).

Данные таблицы 45 свидетельствуют о том, что увеличение массы подопытных крысят во всех группах происходило синхронно. Поедаемость мяса крысятами за 28 дней составляла в 1-й группе 358,2 г, во 2-й – 349,8 г, в 3-й – 357,1 г на одно животное.

Коэффициент эффективности мяса у крысят подопытных групп за весь период опыта составил в 1-й группе – 3,4, во 2-й – 3,28 и в 3-й – 3,35. Коэффициент эффективности белка составил – 2,01, 1,07 и 1,95 соответственно. Аналогичные показатели у крысят контрольной группы были соответственно равны 3,3 и 2,00 %.

Общее состояние крысят-самцов подопытных групп, их поведенческие реакции, прием корма и воды в течение всего эксперимента не отличались от такового контрольных животных.

Результаты изучения влияния скармливания мяса от облученных и леченых РЗК овец на гематологические показатели крыс показало, что количество

гемоглобина и эритроцитов у крыс всех групп не имело достоверного различия с контролем (таблица 46).

Таблица 46 - Гематологические показатели крысят, получавших в рационе мясо облученных и леченых РЗК овец

Показатели	Группа		
	1	2	3
Гемоглобин, г/%	14,3±0,3	13,6±0,4	14,5±0,5
Гематокрит, %	37±0,56	33±0,24	36±0,23
Общий белок, г/%	6,3±0,29	7,01±0,27	6,17±0,60
Лейкоциты, тыс.	9,9±0,7	8,3±0,3	9,6±1,1
Эритроциты, млн.	6,7±0,5	6,3±0,3	6,8±0,5
Базофилы, %	0	0	0
Эозинофилы, %	2,1±0,4	2,2±0,7	2,0±0,3
Нейтрофилы:			
юные, %	0	0	0
палочкоядерные, %	2,8±0,3	2,7±0,9	2,8±0,6
сегментоядерные, %	21,5±1,9	20,5±1,7	21,3±2,1
Лимфоциты, %	68,7±1,9	68,1±2,1	68,5±1,9
Моноциты, %	5,1±1,5	4,9±1,7	5,0±1,7

Из данных таблицы видно, что наблюдаемые колебания не выходили за пределы физиологической нормы. Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула крови крыс опытных групп не отличалась от таковых леченых животных.

Для продолжения исследования по биологическому действию мяса, полученного от облученных, и леченых РЗК животных, в следующей серии опытов изучали влияние образцов мяса на воспроизводительную функцию

животных. Для этого использовали 60 беспородных белых мышей, разделенных на 3 группы по 20 животных в каждой. В рацион мышей 1-й группы было включено мясо здоровых овец, 2-й – мясо животных облученных в дозе 6,0 Гр; 3-й – мясо овец леченых РЗК и облученных в указанной дозе. Условия скормливания мяса подопытным животным были аналогичны таковым в опытах на крысятах-отъемышах.

Критерием оценки биологического действия испытуемых образцов мяса на воспроизводительную функцию мышей служило: количество новорожденных мышат на 1 самку за 1 окот, количество мертворожденных, уродов, неоплодотворенных самок в опытных и контрольных группах мышей, а также жизнеспособность полученного о них потомства.

Результаты изучения воспроизводительной функции мышей и полученного от них потомства представлены в таблице 47.

Таблица 47 - Воспроизводительная функция мышей, которые в рационе получали мясо здоровых, облученных и леченых РЗК овец

Окоты	Количество новорожденных мышей на 1 самку за 1 окот по группам		
	1	2	3
I	7,3±0,64	6,1±0,51	6,7±0,49
II	7,2±0,65	6,3±0,43	6,8±0,55
III	7,1±0,58	6,5±0,39	6,9±0,71

Из анализа представленных в таблице 47 материалов видно, что длительное поступление в организм лабораторных животных (крыс, мышей) мяса овец, леченых РЗК через 24 часа после облучения (6,0 Гр), не оказывало отрицательного влияния на гематологические показатели крыс и воспроизводительную функцию белых мышей, включая отсутствие гонадотропного, эмбриотоксического и тератогенного эффектов, что свидетельствует о безвредности и доброкачественности исследуемого мяса.

Для доказательства абсолютной безвредности мяса облученных животных, подвергнутых лечению РЗК, в заключительной серии опытов проводили исследования по оценке генетических эффектов мясопродуктов, полученных от вышеупомянутых животных.

При оценке генетических эффектов полученных вследствие употребления мясопродуктов, полученных от облученных и леченых РЗК животных, в качестве оценочного критерия использовали уровень (частоту) хромосомных мутаций в соматических и половых клетках у белых мышей и полученного от них потомства. В опытах использовали 75 белых мышей, разделенных на 3 группы по 25 в каждой. В рацион мышей 1-й группы включили мясо от облученных в дозе 6,0 Гр; 2-й – от облученных и леченых РЗК и 3-й – мясо от здоровых животных (контрольных).

Для проведения исследований у животных через 30 сут после начала скормливания, брали пробы периферической крови и подвергали колхинизации с последующим инкубированием в соответствующих питательных средах.

Результаты определения генетических эффектов испытуемых образцов мяса облученных и леченых РЗК животных, представлены в таблице 48.

Таблица 48 - Генетические эффекты испытуемых образцов мяса облученных и леченых РЗК животных

№ группы	Пробы мяса, полученные от животных	Количество абберраций на 100 клеток	Кратность частоты абберраций
1	Облученные в дозе 6,0 Гр	5,95±0,59	3,52
2	Облученных и леченых РЗК овец	1,75±0,51	1,03
3	Здоровых (контрольных)	1,69±0,39	1,00

$P < 0,01$

Из анализа данных таблицы можно сделать вывод о том, что число абберантных клеток в периферической крови при скормливание белым мышам мяса, полученного от облученных животных в дозе 6,0 Гр, повышается в 3,52 раза ($P < 0,001$) по сравнению с контрольным уровнем. Однако применение радиозащитного препарата РЗК после облучения оказывало детоксицирующий эффект, способствуя снижению коэффициента индукции хромосомных aberrаций в 2,88 раза ($P < 0,01$) по сравнению с контролем облучения.

Следовательно, применение радиозащитного препарата после летального облучения способствует снижению доли интерфазной гибели, уменьшению числа клеток, дегенерирующих в первые часы после облучения, ингибированию образования радиотоксинов, ослаблению степени радиозащитной задержки клеточного деления и уменьшению доли клеток с хромосомными aberrациями. Образующейся фонд жизнеспособных кроветворных клеток определяет фактор уменьшения дозы (ФУД) радиозащитного препарата – РЗК.

В результате проведенных исследований по оценке санитарно-гигиенических свойств мяса и мясопродуктов, полученных от леченых РЗК животных, было установлено, что применение иммунопрофилактического препарата оказывало модифицирующее действие (радиозащитное) на течение мутагенных свойств, что сопровождалось восстановлением химического состава мяса и биологических его качеств.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработан комплексный препарат на основе веществ микробного происхождения РЗК, обладающий бифункциональным (радиозащитным и радиопрофилактическим) свойствами, обеспечивающий 83,3 % -ную выживаемость летально облученных животных. Получение и применение препарата регламентируется разработанными нами нормативно-методическими документами, утвержденными в установленном порядке, а способ изготовления радиопротектора защищен патентом РФ.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные исследования по разработке радиозащитных препаратов на основе веществ микробного происхождения являются научным обоснованием к получению и применению радиопротекторов нового поколения и подтверждают полученные нами результаты о целесообразности и эффективности использования их для радиозащиты организма на фоне радиогенного стресса. Анализ полученных данных и их обобщение обуславливают следующие выводы:

1. Путем термо- и радиоинактивации, этанолового, формалинового и ТХУ-экстрагирования получены 180 видов веществ микробного происхождения (вакцинные штаммы спорогенных и аспорогенных бактерий, вирусов, структурные компоненты микробных клеток, пробиотики).
2. С использованием *in vitro* модели (совместное культивирование облученных в дозе ЛД₅₀ лимфоцитов периферической крови и испытуемых соматических и растворимых антигенов тест-штаммов) проведен скрининг полученных веществ микробного происхождения (ВМП) на радиозащитную активность.

Установлено, что из испытанных 57 вакцин- 6, 55 структурных компонентов микробных клеток-10, пробиотиков-5, 23 спорообразующих и условно-патогенных штаммов микроорганизмов 6 обладали радиозащитной активностью в диапазоне от 50 до 78,9%. При этом максимальную радиозащитную активность проявляли эндотоксин (76,1% защита), протективный антиген (78,9%), липид (74,1%), радиотоксин (77,8%) *E.coli*, а из пробиотиков -радиобифидум -бактерин (77,6%).

3. По результатам скрининга в *in vitro* тест-системе отобраны 7 компонентов потенциального биорадиопротектора (БРП) на основе ВМП: продукты метаболизма *E.coli* (ПМЕс) (компонент I), микробные клетки *E.coli* (ОБМЕс)(компонент II), микробные клетки *B.bifidum* (ОМВв) (компонент III), продукты метаболизма *B.bifidum* (ПМВв) (компонент IV), продукты метаболизма *B.subtilis* (ПМВс) (компонент V), высокодисперсная фракция природного минерального сорбента (бентонита)-ВДФБ (компонент VI) и природного биополимера из подмора пчел-апизана-АПЗ (компонент VII).

4. Путем тестирования радиозащитной активности компонентов и их объемных соотношений в *in vitro* тест-системе составлена композиция на основе соматических клеток и продуктов метаболизма тест-микробов, радиозащитный микробный препарат РЗК, включающий 0,5 частей КЖ *E.coli*(ПМЕс), 0,3 части КЖ *B.bifidum* (ПМВв), 0,2 части КЖ *B.subtilis* (ПМВс); в эту смесь вносили $1,5 \times 10^9$ м.к/мл *E.coli*, $0,4 \times 10^9$ м.к/мл *B.bifidum* и $0,4 \times 10^9$ м.к/мл *B.subtilis*, 2% бентонита и 0,1% биополимера (апизана).

5. В опытах на лабораторных животных (белые мыши, белые крысы, кролики) установлено, что полученная композиция РЗК является малотоксичным препаратом (ЛД₅₀ для белых мышей при подкожном введении составляет - 2390 мг/кг, пероральном - 2000 мг/кг), не проявляет местнораздражающего, алергизирующего, тератогенного и эмбриотоксического действия и согласно ГОСТ 12.1.007-76, он соответствует IV классу опасности.

6. В культуральной жидкости, полученной от использованных в опытах тест-штаммов, содержатся белки, углеводы (моно- и полисахариды), нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), аминокислоты (лизин, гистидин, аргинин, аспарагин, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, аргинин, цистеин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин), органические (глюкуроновая, муравьиная, пировиноградная, лимонная, яблочная, янтарная) кислоты, микроэлементы (калий, натрий, магний, марганец, железо, фосфор) и витамины В, К, Е.

7. Путем последовательного многократного радиационного воздействия на исходный штамм *E.coli* «ПЛ-6» гамма- лучами в возрастающих дозах получен радиоорезистентный вариант *E.coli* «ПЛ-6» (R₇), обладающий способностью синтезировать ключевые ферменты антирадикальной защиты (каталазу супероксиддисмутазу). Полученный радиомодификант *E.coli* «ПЛ-6»(R₇) был использован в качестве одного из компонентов композиционного радиозащитного препарата РЗК.

8. Однократное подкожное введение РЗК в дозе 1×10^9 КОЕ/кг живой массы белым мышам, белым крысам кроликам и овцам за 1-30 сут до и через 1-

30 сут после летального облучения оказывало лечебно-профилактическое действие, обеспечивая 70-80% защиту животных от радиационной гибели.

9. Механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения радиозащитного препарата на основе *E.coli*, *B.bifidum* и *B.subtilis*, продуктов их метаболизма, природного сорбента(бентонита) и биополимера (апизана) реализовался путем ингибирования синтеза иммунотоксических агентов -радиотоксинов, блокирования их доступ к клеткам мишеням (детерминантам выживаемости) -лимфоцитам и моноцитам, усиления синтеза медиаторов иммуногемопозза-цитокинов (ИЛ-6, ФНО-λ), сохранения активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ), обеспечивая повышение выживаемости летально облученных животных.

10. Обладая широким спектром биологического действия, вместе с тем препарат является малотоксичным, безвредным, не обладает тератогенным, эмбриотоксическим и аллергизирующим свойствами. Мясо животных, обработанных препаратом с лечебно-профилактической целью, не имеет существенных отличий от такового интактных животных и соответствует требованиям ГОСТов к доброкачественному мясу и имеет одинаковую полноценность с таковыми интактных животных.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты исследований легли в основу разработанных нормативно-методических документов : «Методические рекомендации по использованию ионизирующего излучения для инактивации возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 26 декабря 2019 г.; «Способ получения препарата для профилактики и лечения радиационных поражений организма животных и способ профилактики и лечения радиационных поражений организма животных» Патент на изобретение RU 2697828 C1, 21 августа 2019 г. заявка № 2019117190 от 03 июня 2019 г.; «Методические рекомендации по лечению и профилактике комбинированных поражений животных ионизирующим излучением, микотоксинами и химическими агентами», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 25 октября 2018 года; «Методические рекомендации по профилактике и лечению радиационных поражений», утвержденные Отделением сельскохозяйственных наук РАН от 25 октября 2018 года; «Рекомендации по применению радиозащитного препарата на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов (ПМЕС)», утвержденные директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 10 июня 2010 г. и лабораторный регламент «Лечебно- профилактический лиофилизированный радиозащитный препарат на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов», утвержден директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 9 ноября 2011 г.

2. Получен радиомодифицированный вариант *E.coli* ПЛ-6(R₇) который используется при конструировании радиозащитных препаратов (представлен на депонирование).

3. Для лечения и профилактики радиационных поражений организма в ветеринарную практику предложен лечебно-профилактический радиозащитный комплексный препарат РЗК на основе *E.coli*, *B.bifidum* и *B.subtilis*, продуктов их метаболизма, природного сорбента (бентонита) и биополимера (апизана), обеспечивающий при однократном подкожном применении в дозе $2,5 \times 10^9$

м.к./кг или 11,6 мг/кг по сухому веществу 70-80%-ную выживаемость летально облученных животных.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	- антиген
АТ	- антитело
АНТ	- анатоксин
АТФ	- аденозинтрифосфорная кислота
АРФ	- антирадикальные ферменты
АТЭД	- антительный эритроцитарный диагностикум
БАВ	- биологически активные вещества
ВМП	- вещества микробного происхождения
Гр	- грей
ГПЭМ	- гидролизат плацентарный эмбрионально-маточный
ИГ	- иммуноглобулин
ИЛ	- интерлейкин
ЛРТ	- липидные радиотоксины
КАТ	- каталазная активность
КЖ	- культуральная жидкость
КОЕ _c	- колониеобразующая единица селезенки
МДА	- малоновый диальдегид
МПА	- мясопептонный агар
МПАГ	- микробный полиантиген
МПБ	- мясопептонный бульон
НМБК	- наружная мембрана бактериальной клетки
НСТ	- нитросиний тетразолий
ОММ	- оксидативная модификация макромолекул
ОЛБ	- острая лучевая болезнь
ОМЛ	- отек мышинной лапы
ПА	- протективный антиген
ПАОС	- прооксидантно-антиоксидантная система
ПМЕ _c	- продукты метаболизма <i>E.coli</i>

РА	- реакция агглютинации
РБТЛ	- реакция бласттрансформации лимфоцитов
РБФ	- реакция бентонитовой флокуляции
РЗК	- радиозащитная композиция
РНГА	- реакция непрямой гемагглютинации
РТ	- радиотоксины
ФА	- ферментативная активность
ФДГ	- формиатдегидрогеназа
САОЗ	- система антиоксидантной защиты
СДГ	- сукцинатдегидрогеназа
СМФ	- система моноклеарных фагоцитов
СПЖ	- средняя продолжительность жизни
ТБК	- тиобарбитуровая кислота
ХРТ	- хиноидный радиотоксин

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агиров, А.Х. Экологические проблемы современности /А.Х.Агиров, Н.С.Хиштова. – Майкоп, 2008. - С. 10-12.
2. Агеева, В.А. Брюшнотифозный препарат, содержащий комплекс ВИ- и К-антигенов: авториф. дис.... канд. биол. наук: 03.00.07. / Вера Александровна Агеева, - Москва, 1991. – 28 с.
3. Антипкин, Ю.Г. Радиация и клеточный иммунитет у детей Украины. Обобщение данных I и начала II этапов десятилетнего (1991-2001 гг.) мониторинга состояния иммунной системы у детей и подростков, пострадавших от облучения вследствие аварии на Чернобыльской АЭС / Ю.Г. Антипкин, В.П. Чернышов, Е.В. Выхованец //Международный журнал радиационной медицины. – 2001. – № 3-4. – С. 152.
4. Антипов, В.В. Материалы по изучению противолучевой эффективности индралина /В.В. Антипов, М.В. Васин, В.И. Давыдов //М.: Ин-т АиКМ, - 1973.- – С. 11.
5. Андрущенко, В.Н. Противолучевое действие веществ микробного происхождения /В.Н. Андрущенко, А.А. Иванов, В.Н. Мальцев //Радиационная биология. Радиоэкология - 1996. - Т. 38, вып. 2. - С. 195-207.
6. Александров, В.А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта /В.А.Александров //Методическое пособие. – Санкт-Петербург: МАПО, 2006. - С. 44.
7. Алешкин, В.А. Пробиотики, пребиотики, синбиотики и их роль в поддержании иммуномикробиологического статуса человека /В.А.Алешкин, С.С.Афанасьев, В.В.Поспелова и др. – Москва: «Фармарус Принт», 2006. – С. 43-57.
8. Александров, Ю.А. Основы радиационной экологии /Ю.А. Александров // Учебное пособие. – Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2007. – 268 с.
9. Алексеев, К. В. Фармацевтическая технология. Мазе / К. В. Алексеев, Е.В. Блынская, С.А. Кедик, С.К. Агапова // Учебное пособие / под ред. Профессора С. А. Кедика. – М. ; СПб., ЗАО «ИФТ». – 2014. – 584 с.

10. Амиреев, С.В. Стандартные определения случаев и алгоритмы мероприятий при инфекционных болезнях / С.В. Амиреев, Ж.М. Бекшин, Т.А. Муминов, Ю.В. Лобзин, Н.И. Брико, В.И. Покровский, В.П. Сергиев // Практическое руководство. – Алматы: 2014. – 632 с.
11. Архипов, В.В. Изучение экспериментальных серий туберкулиновых препаратов, изготовленных с применением ионизирующих излучений / В.В. Архипов, Л.А. Нечаева // Матер. VIII конф. по вопросам радиационной иммунологии и микробиологии – М. - 1972. - С. 102.
12. Архипов, В.В. Испытание вакцины против пуллороза - тифа птиц, изготовленной с применением ионизирующих излучений / В.В. Архипов, К.С. Богданова // Вопросы радиационной иммунологии и микробиологии - М. - 1972. - С. 101.
13. Баранов, А.Е. Острая лучевая болезнь: биологическая дозиметрия, ранняя диагностика и лечение, исходы и отдаленные последствия: в кн. Радиационные поражения человека / А.Е. Баранов - М.: Слово, 2007. - С. 53-84.
14. Белов, А.Д. Радиобиология / А.Д. Белов, В.А. Киршин, Н.П. Лысенко, В.В. Пак – Москва: Колос, 1999. – 195 с.
15. Бебешко, В.Г. Гематологічні та імунологічні ефекти хронічного опромінення / В.Г. Бебешко, Д.А. Бази́ка, В.І. Клі́менко // Чорнобиль: Зона відчуження / Під ред. В.Г. Бар'яхтара. – К.: Наукова думка. – 2001. – С. 214-216.
16. Бондаренко, В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации / В.М. Бондаренко - Тверь: Триада, 2011. - 88 с.
17. Бондаренко, В.М. Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл / В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии – 2006. - № 2. - С. 89-97.
18. Бондарчук, И.А. Гипотеза о механизме индукции адаптивного ответа при облучении клеток млекопитающих в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 36–42.

- 19.Бурлакова, Е.Б. Влияние низкоинтенсивного облучения в малых дозах на возникновение и развитие спонтанного лейкоза у мышей линии AKR /Е.Б.Бурлакова, В.Н.Ерохин //Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001. – Т. 41, № 4. – С. 385–388.
- 20.Биргер, М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим исследованиям /М.О.Биргер -М.: Медицина, 1982 - 361 с.
- 21.Бижокас, В.А.Лучевой антиген и специфические средства диагностики и терапии / В.А. Бижокас, В.М. Малиев //Veterinaria ir Zootechnika, Т.13[35], 2001. -Р.5-10.
- 22.Бычковская, И.Б. Особые долговременные изменения клеток при воздействии радиации в малых дозах /И.Б.Бычковская, Р.П.Степанов, Р.Ф.Федорцева //Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 20–35.
- 23.Вагин, К.Н. Разработка радиозащитного препарата на основе метаболитов *E.coli* / Вагин Константин Николаевич. - дисс. канд. биол. наук.: 03.01.01, 06.02.02 - Казань, 2011. - С 142.
- 24.Вальдштейн, Э.А. Действие противолучевых веществ при облучении *Escherichia coli* в бескислородной среде /Э.А.Вальдштейн /Радиобиология. - 1962 - Т. 2 - № 2. - С. 317-321.
- 25.Валеева, Р.Т. Вестник Казанского технологического университета / Валеева, Р.Т. Э.И. Нуретдинова, С.Г. Мухачев, М.Ю. Шурбина, О.В. // № 24, 133-135, (2014).
- 26.Васин, М.В. Противолучевые свойства радиопртектора экстренного действия индралина при его применении после облучения в условиях частичного экранирования живота крыс /М.В.Васин, И.Б.Ушаков, В.Ю.Ковтун, С.Н.Комарова // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2008. - Т. 48, № 2. - С. 199-202.
- 27.Верещагина, А.О. Частота лимфоцитов, мутантных по генам Т-клеточного рецептора как возможный критерий для формирования групп повышенного риска развития опухолей щитовидной железы у облученных и необлученных

- лиц /А.О.Верещагина, И.А.Замулаева, Н.В.Орлова и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45. – № 5. – С. 581-586.
- 28.Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство /В.А.Великов – Саратов, 2012. - 79 с.
- 29.Владимиров, В.Г. Радиологические аспекты медицины катастроф /В.Г.Владимиров и др. – М.: ВЦМК «Защита», 1997. – 220 с.
- 30.Гафарова, А.З. Влияние тимоллизата и лиенолизата на иммунный статус животных: дис. канд. вет. наук: 16.00.02, 16.00.03 / Гафарова Алсу Зуфаровна - Казань – 2003. – С.174.
- 31.Госманов, Р.Г. Лабораторные животные для микробиологических исследований: Учебное пособие / Р.Г.Госманов, А.К.Галиуллин, Ф.М.Нургалиев – Казань: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2017. - 67 с.
- 32.Гончарова, Р.И. Генетическая эффективность малых доз ионизирующей радиации при хроническом облучении мелких млекопитающих /Р.И.Гончарова, И.И.Смолич //Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 6. – С. 654–660.
- 33.Григорян, С.Л. Факторы, влияющие на токсичность комплексных антигенов кишечной палочки /С.Л.Григорян, М.А.Оганеносян //Проблемы стабильного развития антропоэкологических системы Закавказского региона - Ереван, 2002 - С. 38-41.
- 34.Гребенюк, А. Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины: учебник/ А.Н. Гребенюк О. Ю. Стрелова, В. И. Легеза. – Спб.: Фолиант, 2012 – 232 с.
- 35.Гайзатуллин, Р.Р. Иммунологические подходы к разработке средств экстраиммунной терапии при многофазной экопатологии: дисс. д-ра биол. наук: 03.01.01, 06.02.02 / Гайзатуллин Ринат Рауфович - Казань, 2012. - С. 76.
- 36.Грибова, И.А. Некоторые показатели состояния естественного иммунитета у лиц, подвергавшихся хроническому воздействию малых доз ионизирующей радиации: автореф. дис.... канд. мед. наук / Акад. мед. наук СССР. – Москва, 1963. - 14 с.

37. Грачев, С.А. Исследование возможности радиационной стерилизации метилурацила /С.А.Грачев, Б.А.Чакчир, Е.В.Кропачев, Г.И.Литвякова //Фармация в XXI веке: инновации и традиции: Тез. науч.-практ. конф. - Санкт-Петербург, 1999. - С. 231-232.
38. Гребенюк, А. Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины / А. Н. Гребенюк, О. Ю. Стрелова, В. И. Легеза //– СПб : ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2012. – С. 232.
39. Гусаров, И.И. О защитных эффектах действия малых доз ионизирующего излучения: Обзор / И.И.Гусаров, С.И. Иванов //АНРИ. – 2001. – № 4. – С. 8–17.
40. Гордеев, А.В. Освоение в стране радиационного метода стерилизации продукции медицинского назначения /А.В.Гордеев //Медицинская радиология и радиационная безопасность – 2016 - № 5, С. - 844-849.
41. Джойнер, М.С. Основы клинической радиобиологии / под ред. М. С., О. Дж. ван дер Когеля // – Бином. Лаборатория знаний, 2015. – С. 600.
42. Димов, С.К. Теория и практика управления эпизоотическим процессом: автореф. дис.... док. вет. наук.: 16.00.03 / Димов Сергей Константинович-Новосибирск. - 1993. - С. 45.
43. Димова, А.С. Оценка технологичности различных противобруцеллезных вакцин и схема их применения на крупном и мелком рогатом скоте: дис. канд. вет наук.: 16.00.03 - Новосибирск. - 2003. – С. -133.
44. Диковенко, Е.А. О влиянии бактериальных полисахаридов на гемопоэз при их введении после облучения / Е.А. Диковенко, Ж.Е. Елистратова //Радиобиология. - 1971. - Т. 11. - С. 207-210.
45. Драновская, Е.А. Влияние гамма-излучения на биологические свойства антигенов бруцелл / Е.А.Драновская //Сб. научн. тр. ИЭМ им. Н.Ф.Гамалея. – М., 1977. - С. 21.
46. Драновская, Е.А. Действие гамма-облучения на серологические, иммунологические и биохимические свойства липополисахарида бруцелл /Е.А. Драновская. И.В. Шибаева, Н.А. Хабакнашева, Н.А. Ростовцева //

- Матер. VIII конф. по вопросам радиационной иммунологии и микробиологии - М., 1972. - С. 98.
47. Драбкин, Ю.А. Оптимизация режима радиационной стерилизации медицинской продукции в современных условиях // Ю.А. Драбкин, В.В. Калашников, А.А. Молин и др. // Вопросы атомной науки и техники. Серия «Техническая физика и автоматизация». - 2004. - № 58. - С. 132–134.
48. Долбнев, Д.В. Идентификация лекарственных средств методом ближней инфракрасной спектроскопии: авториф. дисс.... канд. фармак. наук.: 14.04.02 / Долбнев, Дмитрий Владимирович - Москва, 2010. - С. 24.
49. Дуда, В.И. Радиозащитное действие спор некоторых анаэробных бактерий при лучевом поражении животных /В.И. Дуда, К.А. Калунянц, Г.П. Гоенко // Радиобиология. - 1980. - Т. 20, вып. 6. - С. 929-932.
50. Дуплищева, А.П. Влияние ионизирующей радиации на токсические свойства антигенов семейства Enterobacteriaceae / А.П. Дуплищева, Н.Г. Синилова // Вопросы радиационной иммунологии и микробиологии // Матер. 8-й конф. - 1972. - С. 96-97.
51. Елисеев, С.А. Нефтеотмывающий биоэмульгатор, образуемый *Bacillus species* /С.А. Елисеев, Р.И. Вильданова-Марцишин, А.Н. Шульга, З.В. Шабо, А.А. Туровский // Микробиологический журнал – 1991. – Т. 53, № 6. – С. 61-66.
52. Елисеев, С.А. Поверхностно-активные вещества и биотехнология /С.А. Елисеев, Р.В. Кучер - Киев: Наукова думка, 1991. - 116 с.
53. Евлашкина, В.Ф. Специфическая активность бифидосодержащих моно- и комплексных биопрепаратов и усовершенствование методов их контроля: авториф. дисс.... канд. биол. наук.: 03.00.07 / Евлашкина Вера Францевна - Москва, 2009. - С. 27.
54. Жестяников, В.Д. Репарация односторонних разрывов и пострепликативных пробелов ДНК в клетках *Escherichia coli* с термочувствительными мутациями /В.Д. Жестянико //В сб.: "Радиоцитология-76". - Л. - 1977. - С. 16.
55. Зароза, В.Г. Эшерихиоз телят /В.Г. Зароза - М.: Агропромиздат, 1991. -239 с.

- 56.Зайко, Н.Н. Патологическая физиология /Н.Н.Зайко, В.Ю.Быць – Киев: «Логос», 1996. – 647 с.
- 57.Иванов, А.А. Иммунный статус и радиация /А.А.Иванов //Сб. тез. науч. конф. - М., 1991. - С. 15.
- 58.Иванов, А.В. Радиовакцины: проблемы и перспективы: монография /А.В.Иванов, Р.Н.Низамов, Г.В.Конюхов - Казань: Изд-во Казанского гос. ун-та, 2008. - 499 с.
- 59.Иванов, К.К. Влияние радиации на О-соматичесике антигены бактерий *Sty 0-901* /К.К.Иванов, Н.Г.Симонова, А.П.Дуплищева //Матер. VIII конф. по вопросам радиационной иммунологии и микробиологии - М., 1972. - С. 95-96.
- 60.Иерусалимский, Н.Д. Основы физиологии микробов /Н.Д.Иерусалимский - М.: Изд-во АН СССР – 1963 - С. 97-100.
- 61.Ившина, И.Б. Биоремедиация нарушенных углеводородами и тяжелыми металлами почв с использованием *Rhodococcus* биосурфактантов и иммобилизованных родококков / И.Б. Ившина, А.В. Криворучко, М.С. Куюкина, Л.В. Костина, Т.А. Пешкур, К.Д. Каннингхэм //Аграрный вестник Урала – 2012. - № 8. - С. 65-68.
- 62.Ильязов, Р.Г. Адаптация агроэкоосферы к условиям техногенеза /Р.Г.Ильязов, Ф.Х. Шакиров - Казань: "ФЭН". - 2006. – С. 664.
- 63.Ильичева, Т.Н. Практикум по микробиологии: Методическое пособие / Т.Н. Ильичева, С.В. Нетесов, В.Н. Гуреев // – Новосибирск, 2012. – С. 86.
- 64.Игнатов, П.Е. Обоснование разработки иммуноактивных препаратов для лечения и профилактики инфекционных болезней: автореф. дис.... док. биол. наук.: 16.00.03; 03.00.07 / Игнатов Петр Евгеньевич - СПб., 1994. - 31 с.
- 65.Калашников, В.В. Разработка и применение метода радиационной стерилизации в Федеральном медицинском биофизическом центре им. А.И.Бурназяна / В.В. Калашников, А.В. Гордеев, Е.П.Павлов и соавт. // Саратовский научно-мед. журнал. - 2014. - Т. 10, № 4. - С. 844–849.

- 66.Калашников, В.В. Качество радиационной стерилизации изделий медицинского назначения / В.В. Калашников, Е.П. Павлов, И.И. Самойленко и соавт. //Мед. радиол. и радиац. безопасность. - 2012. - Т. 57, № 4. - С. 40–45.
- 67.Камышников, В.С. Справочник по клинико- биохимическим исследованиям в лабораторной диагностике /В.С.Камышников – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 579-591.
- 68.Каулен, Д.Р. Биологические свойства дизентерийного токсина, полученного на облученной гамма-лучами питательной среде /Д.Р. Каулен //Тр. Ташкентской конф. по мирному использованию атомной энергии. - Ташкент, 1966. - С. 88.
- 69.Кашкин, К.П. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия/ К.П.Кашкин, З.О.Караев-Л.: Медицина,1984. - С. 209.
- 70.Калмыкова, А.И. Пробиотики: терапия и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья / А.И. Калмыкова - НПФ «Био-Веста»: СибНИПТИП СО РАСХН. - Новосибирск, 2001. С. - 208.
- 71.Калинина, Е.Ф. Экспериментальные данные о возможности использования лучевой стерилизации в производстве бактериальных препаратов /Е.Ф. Калинина, А.З. Абидов // Медицинский журнал Узбекистана. - 1963. - № 6. - С. 62-65.
- 72.Калмыков, В.В. Профилактическая эффективность иммунизации крупного рогатого скота адьювант-вакциной из штамма *B.abortus KB 17/100* /В.В. Калмыков, А.Н. Бобылев // Матер. Междунар. научн. конф. - Казань. - 2000. - С. 69-71.
- 73.Касылов, Т.К. Иммуногенность адьювант-вакцины из штамма *B.abortus KB/100* / Т.К. Касымов, В.И. Ким // Ветеринария. - 2002. - № 5. - С. 10-12.
- 74.Кобякова, В.И. Влияние гамма-излучения на взаимодействие в системе микроорганизм-биодеструктор-полимер / В.И. Кобякова, Л.К. Панина, О.А.Соколов //Матер. радиобиол. съезда. Москва, 21-27 августа 1989 г. - Пушино, 1989. -Т. 2. – С. 281-287.

75. Конюхов, Г.В. Новые подходы в терапии острой лучевой болезни / Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов, Н.Б. Тарасова, И.Н. Нигматуллин // Ветеринарный врач. - Казань. - 2005. - № 1. - С.40-43.
76. Клемперская, Н.Н. Микрофлора кожи человека - диагностическое значение / Н.Н. Клемперская, О.Г. Алексеева // Матер. научно-практической конференции. - Москва, 1989 - С. 12—23.
77. Клемперская, Н.Н. О применении некоторых иммунологических и микробиологических методов для изучения состояния реактивности организма при лучевых поражениях / Н.Н. Клемперская, О.Г. Алексеева // Мед. радиология – 1959. - № 3. - С. 71-76.
78. Клемпарская, Н.Н. Вопросы индикации, иммунитета и аллергии при острой лучевой болезни / Н.Н. Клемпарская, О.Г. Алексева, Р.В. Петров, В.Ф. Сосова - М.: Медгиз, 1958. – С. 215.
79. Клемпарская, Н.Н. Нормальные аутоантитела и специфический иммуногенез / Н.Н. Клемпарская // Журн. эпидемиол., микробиол., иммунолог. - 1982. - Т. 26. - № 4. - С. 426-431.
80. Косарев, М.А. Состояние и перспективы специфической профилактики бруцеллёза мелкого рогатого скота в Российской Федерации / К.М. Салмаков, А.М. Фомин, Р.Х. Юсупов, М.А. Косарев, А.В. Иванов // Матер. Всероссийской науч. конф. «Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках нац. проекта «Развитие АПК»». - Казань: ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2007. - С. 112-116.
81. Королук, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело – 1988. - № 1 – С 16–19.
82. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: учебник / И. И. Краснюк, Г. В. Михайлова, Л. И. Мурадова. – М.: ГЭОТАРМедиа, 2016. – С. 560.

83. Киршин, В.А. Действие ионизирующих излучений на с.-х. животных. Противорадиационная защита с.-х. животных / В.А. Киршин // Ветеринарная патология. - 2002. - № 3. - С. 58-60.
84. Киршин, В.А. Ветеринарная противорадиационная защита / В.А. Киршин, В.А. Бударков - М.: Агропромиздат, 1990. – С. 207.
85. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: Учебник для студ. сред. проф. учеб. заведений / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Е.Т. Чижова // Под ред. И.И. Краснюка и Г.В. Михайловой. - М.: Издательский центр «Академия», 2004. – С. 464.
86. Кудлай, Д.Г. Бактериоцитопения / Д.Г. Кудлай, В.Г. Лиходед // Л.: Медицина, 1966 – С. 203.
87. Кудряшов, Ю.Б. Современные проблемы противолучевой химической защиты организмов / Ю.Б. Кудряшов, Е.Н. Гончаренко // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1999. - Т. 39. - № 2-3. - С. 197-211.
88. Куценко, С.А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита: учебник / ред. С. А. Куценко. – Санкт - Петербург: Фолиант, 2004. – С. 528.
89. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапов, В.Ж. Ковалева // Высшая химия. – 1990 - Т. 26 - №2 - С. 88-91.
90. Костина, Л.В. Биосорбция, биоаккумуляция и способы извлечения тяжелых металлов / Л.В. Костина, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // LAP Lambert Academic Publishing, 2010. – С. 254.
91. Ланге, К. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К. Ланге //- М.: Высшая школа, 2004. – С. 240.
92. Ленцнер, А.А. Лактофлора и колонизационная резистентность / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, М.Э. Микельсаар и др. // Антибиотики и химиотерапия. - 1987. - Т. 32. - № 3. - С. 173–179.

93. Леви, М.И. Значение биологических индикаторов для оценки эффективности стерилизации // М.И. Леви, Ю.Г. Сучков, В.Я. Бессонов и соавт. // Дезинфекционное дело. - 1998. - № 4. - С. 25–29.
94. Литвицкий, П.Ф. Патифизиология: Курс лекций / П.Ф.Литвицкий – М.: Медицина, 1995. – С. 745.
95. Лысак, В.В. Микробиология: Практическое пособие /В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В.Фомина // Минск: БГУ, 2015. – С. 115.
96. Лысенко, Н.П. Радиобиология: учебник / Н.П. Лысенко, В.В. Пак, Л.В. Рогожина – СПб.: Лань, 2012. – С. 569.
97. Магсумов, Р. З. Разработка технологии изготовления радиоинактивированной вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески (псевдобешенства) и изучение ее эффективности в производственных условиях: автореф. дисс. канд. биол. наук.: 03.00.07 / Магсумов Рустем Зуфарович – Казань, 2004 - 25с.
98. Мальцев, В.Н. Бактериотерапия острой лучевой болезни / В.Н. Мальцев, В.М. Коршунов, В.А. Стрельников, Т.Б. Иконникова // Радиобиология. - 1978. - Т. 18, вып. 5. - С. 757-760.
99. Мальцев, В.Н. Влияние бактериальных препаратов на выживаемость облученных животных / В.Н. Мальцев, К.К. Гуценко, Н.В. Емченко // Радиационная биология. Радиозэкология - 1994. - Т. 34, вып. 4-5. - С. 578-581.
100. Малофеева, Н.Б. Иммунохимическая характеристика холерного экзотоксина, подвергнутого облучению в различных дозах гамма-излучения / Н.Б. Малофеева, И.В. Рубцов, Г.И. Сыресина, И.И. Самойленко //Сб. научн. тр. ИЭМ им. Н.Ф.Гамалея. - М., 1977. - С. 46.
101. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский // – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна : Издатель Умеренков, 2012. – С. 1216.
102. Мигулов, А.И. Физико-химическая характеристика популяций вируса гриппа, инактивированного гамма-лучами / А.И. Мигулов, Р.А. Арон, А.К.

- Сироткин, Л.Ф. Черпина, О.К. Кузнецов // Радиобиология. - 1986. - Т. 26. – Вып. 5. - С. 647-651.
103. Михайленко, Е.В. Специфические и неспецифические иммуномодуляторы в повышении эмбриональной выживаемости крупного рогатого скота: автореф.... канд. дис.: 03.00.13 / Михайленко Ева Викторовна - п. Быково, Московской обл., 2000. - С. 26.
 104. Мухаметшин, И.Р. Изыскание средств для профилактики радиационных поражений животных: - автореф.... дисс. канд. биол. наук. 03.00.01, 03.00.07 / Мухаметшин, Ильшат Ришатович – Казань, 2002 – С. 25.
 105. Муравьев, А.А. Растворы смесей целлюлозы и хитина в ионных жидкостях и композиционные материалы на их основе: дисс.... канд. хим. наук.: 02.00.06, 02.00.04 / Муравьев Антон Алексеевич - Санкт-Петербург, 2017 -С. 111.
 106. Маликина, К.Д. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. Прикладная биохимия и микробиология / К.Д. Маликина, В.А. Шишов, Д.И. Чувелёв, В.С. Кудрин, А.В. Олескин //Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, 1991-2010. – Т. 46, № 6. - С. 672-677.
 107. Манухов, И.В. Учебное пособие к практическим занятиям по генетической инженерии / И.В. Манухов, М.Н. Коноплева, Л. Екимов, С. Баженов // – Москва, 2014. - С. 22.
 108. Мустафина, Э.Н. Получение радиоинактивированной вакцины против сибирской язвы и оценка иммунного статуса с.-х. животных при этой инфекции: автореф. дисс. ... канд. вет. наук.: 03.00.07, 16.00.03 / Мустафина, Эльмира Наримановна - Казань, 2005. - С. 24.
 109. Мазурик, В.К. Динамический компонент поддержания стабильности генома в клетках костного мозга у мышей после хронического облучения низкой интенсивности длительностью один год / В.К. Мазурик, В.Ф. Михайлов, Л.Н. Ушенкова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 6. – С. 402–406.

110. Мещерякова, И.С. Токсичность суспензий туляремийного микроба, убитых ионизирующей радиацией / И.С. Мещерякова // Вопросы радиационной иммунологии и микробиологии - М., 1972. - С. 97-98.
111. Николаева, Л.А. О возможности применения корпускулярных радиовакцин для энтеральной иммунизации мышей против брюшного тифа /Л.Н. Николаева, Н.Г. Синилова // Матер. VIII конф. - М., 1972. - С. 99-100.
112. Низамов, Р.Н. Изучение радиопротекторных свойств антигенов микробного происхождения / Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, А.С. Титов, И.Р. Мухаметшин, Н.Б. Тарасова // Матер. докл. IV съезда по рад. иссл. - М., 2001. – Т. 2. - С. 457.
113. Нигматуллин, И.Н. Изыскание противолучевых средств из класса индукторов цитокинов: дисс.... канд. биол. наук: 03.00.01: / Нигматуллин Ильдар Наилевич – Казань, 2006. – С. 151.
114. Немцов, С.В. Получение аписана из подмора пчел / С.В. Немцов, О.Ю. Зуева, Р.Г. Хисматуллин // Пчеловодство. – 2001 - № 5. - С. 50-51.
115. Орадовская, И.В. Анализ состояния здоровья и иммунного статуса лиц, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС / И.А. Лейко, М.А. Оприщенко //Международный журнал радиационной медицины. – 2001. – № 3-4. – С. 257.
116. Овсянников, В.Г. Общая патология: патологическая физиология: учебник /В.Г. Овсянников //ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России. - 4-е изд. – Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ, 2014 - Ч. I. Общая патофизиология. - 2014. – С. 388.
117. Панков, Я. Г. Разработка средств экстренной защиты животных от сибирской язвы : дисс.... канд. биол. наук.: 06.02.02 / Панков, Яков Геннадьевич - Казань, 2012.- 143 с.
118. Парахонский, А.П. Современные проблемы науки и образования /А.П.Парахонский - Краснодар, 2006. - №3 – С. 46.
119. Павлов, Е.П. Первая Всесоюзн. научно-техн. конф. по радиационной стерилизации мед. продукции /Е.П.Павлов, С.Г.Щеглова, Г.Я.Кивман //Матер. докл. - Москва, 1978. - С. 24-25.

120. Павлов, Е.П. Использование гамма-излучения для микробной деконтаминации лекарственных средств /Е.П.Павлов, Э.Г.Тушов, И.И.Самойленко //Хим.-фарм. журнал. - 1992. - № 2. - С. 76-78.
121. Паске, Л.Д. Методы изучения иммунной системы. Иммунологические методы исследований /Л.Дю Паске, М.Флайник, И.Г.Гюе, Э.Хсю, Пер. под ред. И.Левковитца, Б.Парина - М.: Мир, 1988. - С. 498-508.
122. Патрикеев, В.Г. Концентрирование вируса ящура методом проточной ультрафильтрации и использование его для изготовления противоящурных инактивированных вакцин / В.Г. Патрикеев, В.И. Шипилов, В.В. Дайнотович // Вирусные болезни с.-х. животных - Владимир, 1995. - С. 136.
123. Патент SU №1682394 A1 C 12 Q 1/04. Получение энтеротоксина /Н.С.Садыков, Р.Н.Низамов. - Оpubл. 07.10.91. Бюл. №37.
124. Патент RU №2300107 C2 GO1№33/535 Способ дифференциальной диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и способ получения препарата для его осуществления/ А.В.Иванов, К.М. Салмаков, Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов // Заявка:2005100565/15, 2005.01.11. Оpubл. 2007.05.27.
125. Патент RU №2226106 A61K39/108 Способ специфической профилактики радиационных поражений организма и способ получения препарата для профилактики радиационных поражений организма/ А.З. Равилов, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, А.С. Титов, Н.Б. Тарасова, И.Р. Мухаметшин, Д.Т. Шарифуллина, Р.Ш. Давкаев // - Оpubл. 27.03.2004.
126. Патент RU №2324176 C1 GO1№33/02 Способ обнаружения радиотоксинов в облученных пищевых продуктах / А.В. Иванов, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, Я.М. Курбангалеев, Р.Р. Гайнуллин // Оpubл. 10.05.2008. Бюлл. №13.
127. Патент РФ № 2235470. Способ стерилизации меланжа и устройство для его осуществления / Ю.А. Котов, С.Ю. Соковнин, А.А. Питер, В.И. Наконечный // БИ. 2004 №25, - С.343.
128. Патент РФ № 21695 72, А 61 К Способ лечения радиационных поражений организма и способ получения препарата для лечения радиационных

- поражений организма / В.М. Авилов, В.А. Киршин, Р.Н. Низамов и др. // 35/28. Бюлл. № 18 27.06.2001.
129. Патент РФ № 2004109896/13. Базовый комплекс биологически активных пищевых добавок и способ их применения для реабилитации облученных / М.Э. Бураев, О.Г. Макеев, В.В. Котомцев // Положительное решение на выдачу патента 10.10.2005 г.
130. Патент СССР № 952260 Способ получения диагностикума для проведения реакции бентонитовой флокуляции / З.В. Пручкина, Г.П. Сомов, Л.В. Краснова и др. // от 22.08.82. - Бюл. № 31.
131. Патент № 2226106, МПК А61К 39/108 Способ специфической профилактики радиозащитных поражений организма и способ получения препарата для профилактики радиационных поражений организма / А.З.Равилов, Р.Н.Низамов, Г.В.Конюхов и др. / - Оpubл. 27.03.2004. - Бюл. № 9.
132. Пелевина, И.И. Реакция популяции клеток на облучение в малых дозах / И.И. Пелевина, А.В. Алещенко, М.М. Антощина и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 161–166.
133. Погарская, Н.В. Хитозан-меланиновый комплекс из подмора пчел / Н.В. Погарская, М.И. Селионова // Пчеловодство - 2008. - № 9. - С. 46-47.
134. Покровский, В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология. – М: ГЭОТАР, 2009. 2-е изд-е, перераб. – С. 816.
135. Петровска, В.Г. Адгезины энтеротоксигенных кишечных палочек: роль в патогенезе диарей и генетический контроль / В.Г. Петровска, В.М. Бондаренко // Микробиология – 1990 - № 5. - С. 45-55.
136. Перетц, Л.Г. Значение нормальной микрофлоpы для организма человека /Л.Г. Перетц // Государственное издательство медицинской литературы, Москва: Медгиз, - 1955 - С. 436.
137. Пирог, Т.П. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных

- субстратах / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, И.Н. Волошина, Е.В. Карпенко // Прикл. биохим. микробиол. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 544-550.
138. Пепоян А.З., Антибиотикорезистентность *Escherichia coli* кишечной микробиоты у больных семейной средиземноморской лихорадкой / А.З. Пепоян [и др.] // Клиническая медицина. - М.: Медицина, 2015. – Т. 93. - № 7. - С. 37-39.
139. Пепоян А.З., Некоторые особенности антиокислительной системы бактериальных штаммов *Escherichia coli* G35 / А.З. Пепоян; Н.С. Мирзоян, М.О. Саакян, Л.А. Киракосян, К.Г. Карагезян // Молекулярная биология - 2001. – Т. 10. – С. 70-75.
140. Рахматуллина, Г.И. Усовершенствование технологии изготовления радиозащитного полиантигена: автореф. дисс.... канд. биол. наук.: 03.01.01 / Рахматуллина Гульназ Ильгизаровна - Казань, 2012. -С. 21.
141. Рогова, Л.Н. Влияние магнийсодержащей композиции на магниевый баланс, интенсивность пероксидации и активность антиоксидантных ферментов у крыс с ацетатной язвой желудка / Л.Н. Рогова; Н.В. Шестернина; В.А. Старовойтов // Вестник медицинских технологий – 2011 – Т. XVIII, № 2 – С. 89.
142. Сафин, М.А. Ионизирующее излучение радиоактивного изотопа ^{60}Co для ветеринарной медицины /М.А. Сафин, Д.Н. Латфуллин, А.И. Шарифуллин, Г.Х.Ильясова //Матер. научн.-произв. конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии - Казань, 2001. - Ч. 2. - С. 179.
143. Сафин, М.В. Диагностика инаktivации вируса псевдобешенства гамма-лучами //Матер. юбил. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию клинической больницы № 1 - Казань, 2000. - С. 202-203.
144. Сафин, М.В. Использование ионизирующих излучений и иммуномодуляторов для усовершенствования средств и методов диагностики герпесвирусных инфекций: автореф. дисс.... канд. биол. наук.: 03.00.07, 03.00.01 / Сафин Мунир Вазыхович - Казань, 2002. – С. 21.

145. Сафин, М.В. Использование ионизирующего излучения для схождения иммуногенного антигена вируса псевдобешенства / М.В.Сафин, Г.В. Конюхов, Г.Х. Ильясова //Матер. юбил. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию клинической больницы № 1 - Казань, 2000 - С. 202.
146. Сафронова, Л.А. 34-й Междунар. конгресс Общества микробной экологии и заболеваний (Йокогама, Япония, 20–23 ноября 2001 г.) //Микробиологический журнал - 2012. - Т. 74, № 1. - С. 64–65.
147. Саноцкий, И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ /И.В.Саноцкий - М.: Медицина - 1970. – С. 342.
148. Сергиев, В.П. Инфекционные болезни и цивилизация. Прошлое, настоящее, будущее /В.П. Сергиев, Н.А. Малышев, И.Д. Дрынов. - М.: П-Центр, 2000. – С.207.
149. Сергеев, О.С. Типовые патологические процессы. Воспаление: Учебное пособие для студентов медицинских институтов. / О.С. Сергеев, Л.И. Уксусова, В.В. Сапрыкин, Е.А. Денисова, И.О. Прохоренко - Самара, 2004. – С. 68.
150. Седова, Т.С. Влияние ионизирующей радиации на свойства радиоантигенов брюшнотифозных бактерий / Т.С. Седова //ЖМЭИ. - 1964. - № 1. - С. 1-13.
151. Сосюкин, А. Е. Клиническая радиология / А. Е. Сосюкин. – М.: ГЭОТАРМедиа, 2008. – С 224.
152. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования /Под ред. М.О.Бергера - М.: Медицина, 1982 - С. 464.
153. Старовойтова, С.А. Обзор международных проектов в области микробной экологии и создания пробиотиков //Национальный университет пищевых технологий - Киев, 2012. - С. 121-131.
154. Степин, В.С. Компоненты клеточного иммунитета в зависимости от способа введения вакцины / В.С. Степин, Л.И. Проскурина //Вестник сельскохоз. науки Казахстана. - 1986. - № 4. - С. 66-67.

155. Степанова, Л.К. Новая химическая комплексная вакцина против тифопаратифозной инфекции /Л.К. Степанова, Ю.А. Белая, Н.С. Сергеева //Радиационная микробиология и иммунология – М., 1977. -С. 69-72.
156. Симонян, А.В.Словарь по биотехнологии /А.В.Симонян, Ю.С.Покровская – Волгоград, 2002. - С. 86.
157. Синилова, Н.Г. Изменение липидного компонента: О-соматический антиген *S.typhi* под влиянием гамма-излучения / Н.Г. Синилова, С.Г. Батраков, Л.Г. Сурова, П. Дуплищева //Сб. научи, тр. ИЭМ им. Н.Ф.Гамалея. - М., 1977. - С. 66.
158. Стручкова, И.В. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова - Нижний Новгород, 2012. - С. 60.
159. Супотницкий, М.В. Эпидемиология искусственных эпидемических процессов как третий раздел эпидемиологии / М.В. Супотницкий //Новости медицины и фармации. - 2013. - (4). - 16–19 (5). – С. 16-19.
160. Ткаченко, Е.И. Эрадиационная терапия, включающая пробиотики / Е.И. Ткаченко, Е.Б. Аванцева, Ю.П. Успенский и др. // Клиническое питание. - 2005. - № 1. - С. 14-20.
161. Тарасова, Н.Б. Влияние «Вита-Форце» на иммунобиологическую реактивность мышей /Н.Б. Тарасова, И.Н. Нигматуллин, М.А. Тамбовский /Матер. Всерос. научно-практ. конф., посвященной 75-летию образования зооинженерного факультета КГАВМ – Казань, 2005. - С. 208-217.
162. Таршис, М.Г. Болезни животных, опасные для человека / М.Г. Таршис, Б.М.Черкасский. - М.: Колос, 1997. - С. 53-56.
163. Троицкий, В.Л. Влияние иммунизирующих излучений на иммунитет /В.Л.Троицкий, М.А.Туманян // - Москва: МЕДГИЗ, 1958. – С. 198.
164. Трофимов, В.И. Радиационные технологии обеззараживания и стерилизации: современное состояние и перспективы, техника и оборудование / В.И. Трофимов //Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине: Матер. междунар. симпоз. - Уфа, 1995. – Т. 4. - С. 233-238.

165. Тряпицына, Г.А. Закономерности реакций гемопоэза и иммунитета у экспериментальных животных и их значение в развитии отдаленных эффектов хронического γ -облучения : автореф. дисс.... канд. биол. наук.: 03.00.13 / Тряпицына Галина Александровна - Челябинск, 2001. -С. 21.
166. Торхова, О.А., Роль антиоксидантных систем в ответе бактерий *Escherichia coli* на действие антибиотиков и ацетамидофенола : дисс. ... канд. биол. наук.: 03.00.07 / Торхова Оксана Александровна - Пермь, 2004. – С. 162.
167. Тихонов, И.В. Биотехнология (под ред. акад. РАСХН Е.С.Воронина) / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др. - СПб.: ГИОРД, 2005. – С. 792.
168. Туманян, М.А. Радиационная стерилизация /М.А.Туманян, Д.А.Каушанский. – М.: Атомиздат, 1974. – С. 302.
169. Туманян, М.А. Радиопротективные свойства иммуномодуляторов //Матер. 1 Всесоюз. радиобиол. съезда, Москва, 21-27 августа 1989 г. - Пушино, 1989. - С. 1103.
170. Туманян, М.А. Влияние иммуномодуляторов на естественную резистентность к инфекции облученного организма. /М.А. Туманян, А.П. Дуплищева //Иммунный статус человека и радиация. //Матер. докл. Всесоюзн. науч. конф. Гомель, сентябрь 1991 г. - М., 1991. - С. 173-174.
171. Турковская, О.В. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* продуцент биоПАВ /О.В. Турковская, Т.В. Дмитриева, А.Ю. Муратова //Прикл. биохим. микробиол. - 2001. - Т. 37. - № 1. - С. 80-85.
172. Юнусов, И.Р. Изыскание радиозащитных средств из класса природных антиоксидантов : дисс. канд.... биол. наук.: 03.00.01, 16.00.04 / Юнусов Ильнар Расимович - Казань, 2009. – С.150.
173. Хмелевская, Г.В. Факторы патогенности некоторых условно-патогенных бактерий, вызывающих диареи //Г.В. Хмелевская, Л.В. Девтерева //Журнал микробиологии – 1990 - №4. - С. 97-102.
174. Хавкин, А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет //РМЖ. - 2003. - Т. 11, № 3. - С. 3–7.

175. Хаитов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы /Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин // - 2009. – С. 352.
176. Хафизов, А.Ш. Изыскание радиозащитных средств из класса веществ микробного происхождения: дисс....канд. биол. наук.: 03.00.01 / Хафизов, Айрат Шарафетдинович - Казань, 2007. – С. 132.
177. Угрюмова, В.С. Методические рекомендации по изготовлению и применению радиоинактивированного псевдорабического антигена. /В.С. Угрюмова, А.П. Цыбульский, Р.Х. Юсупов, Г.Х. Ильясова, Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов, М.В. Сафин, Г.Ф. Ильясова, Ш.М. Насыров, Р.З. Магсумов, А.И. Шарифуллин - Казань, 2002. – С. 10.
178. Ушакова, И.Б. Основы медицинской радиобиологии / под ред. И. Б. Ушакова. – СПб.: Фолиант, 2004. –С. 384.
179. Чичерин, И.Ю. Кишечная микрофлора / И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.В. Дармов // Тезисы инновационных научных статей. - 2013. - Выпуск 2.- С. 24.
180. Чубенко, Г.И. Нормальная микрофлора организма человека. Направления ее коррекции /Г.И.Чубенко - Благовещенск, 2005. – С. 30.
181. Чумак, А.А. Иммунная система пострадавших «чернобыльцев» в отдаленный послеаварийный период – диагностика недостаточности и подходы к коррекции / А.А. Чумак //Международный журнал радиационной медицины. – 2001. – № 3-4. – С. 400.
182. Чумак, А.А. Иммунологические эффекты у реконвалесцентов острой лучевой болезни – результаты тринадцатилетнего мониторинга /А.А.Чумак, Д.А.Базыка, А.Н.Коваленко и др. //Международный медицинский журнал. – 2002. – № 1 (5). – С. 40-41.
183. Чуешов, В.И. Промышленная технология лекарств: Учебник в 2-х т. /Под ред. В.И.Чуешова – Харьков: Издательство НФАУ МТК-Книга – 2002. – С. 716.

184. Фомин, А.М. Разработка методов и средств борьбы с туберкулезом /А.М.Фомин //Сборник научных трудов КВИ. – Казань, 1984. – С. 30-33.
185. Цыбульский, А.П. Перспектива создания напряженного иммунитета с использованием ксимедона в составе инактивированной вакцины /А.П.Цыбульский, М.В.Сафин, Г.Х.Ильясова //Матер. 13 съезда физиологического общества им. И.П.Павлова – Казань, 2001. – С. 51-52.
186. Шишов, В.А. Биогенные амины в динамике роста микроорганизмов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. / Шишов, Владимир Александрович- М., 2010. - С. 27.
187. Шангараева, Р.Ф. Влияние криорадиационной обработки плазмы донорской крови на ее белковый состав: автореф. дисс. ... канд. биол. наук.: 03.00.04 / Шангареева Райхана Фаатовна - Уфа. - 2002. - С. 22.
188. Шибаева, И.В. Изучение возможности применения гамма-облучения для лучевой стерилизации столбнячного анатоксина / И.В. Шибаева, Н.П. Денисова, К.К. Иванов, И.В. Васильева //Вопросы радиационной иммунологии и микробиологии – М., 1972 - С. 173.
189. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. /В.С.Шевелуха, Е.А.Калашникова, Е.С.Воронин // - Москва: Высш. школа, 2003. - С. 72-75.
190. Шевелуха, В.С. Биотехнология и биобезопасность / В.С. Шевелуха // Сельскохозяйственная биология. - 2002. - № 3. - С. 3-15.
191. Яблокова, А.В Миф о безопасности малых доз радиации /А.В.Яблокова //Гражданская инициатива – 2002. - №1(5) - С. 175.
192. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных: Учебное пособие. /С.П.Ярмоненко, А.А.Вайнсон // - М.: Высшая школа, 2004. – С. 549.
193. Ярилин, А.А. Иммунология: Учебник /А.А.Ярилин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - С. 752.
194. Шевцова, Э.В. Состояние иммунитета у морских свинок, иммунизированных бруцеллезной вакциной в условиях лучевого воздействия. / Э.В. Шевцова //Микробиология. - 1960. - Т. 9. - С. 105-109.

195. Abdus, S. The role of radiation treatment in the management of inflammatory musculoskeletal conditions: a revisit / Abdus-Salam, Abbas A; Olabumuyi, Adeniyi Adedayo; Jimoh, Mutiu Alani; Folorunso, Sharif Adeniyi; Orekoya, Ajibike Ayomide // Radiation oncology journal- 2020. - №38. - V. 3. - P. 151-161.
196. Aibara, K. Aflatoxin and its radio sensitivity /K. Aibara, K. Miyaki //Nat. list. of Health Dep. Of Food Res. (Tokyo, Japan); Int. conf. on the Peaceful uses of Atomic Energy. - Bombay, 1969. - P. 239.
197. Auger, R.L. Effect of nonionic surfactant on bacterial metabolism of naphthalene: assessment of toxicity and overflow metabolism potential /R.L. Auger, A.M. Jacobson, M.M. Domach //J. Hazard. Mater. - 1995. - V. 43. - P. 263-272.
198. Banat, I.M. Potential commercial application of microbial surfactants /I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - V. 53. - P. 495-508.
199. Beal, R. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa* /R. Beal, W.B. Betts //J. Appl. Microbiol. - 2000. - V. 89. - P. 158-168.
200. Bellamy, W.D. Effects of irradiation on herpesvirus /W.D. Bellamy, E.J. Lawton, J. Gordon //Atomic energy review. - Vienna, 1966. - V. 4. - № 3. - P. 39.
201. Belshe, R. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine. /R. Belshe, M.S. Lee, R.E. Walker, J. Stoddard, P.M. Mendelman //Expert. Rev. Vaccines – 2004. – 3. – P. 643–654.
202. Belyaev, I. Radiation-induced dna repair foci: fundamental and applied aspects /I. Belyaev, E. Markova, A. Somsedikova, S. Vasilyev, S. Sorokina, M. Durdik, P. Kosik, L. Zastko, P. Plavckova, L. Vokalova // VII Съезд по радиационным исследованиям: тезисы докладов. - Москва, 21–24 октября 2014 г. – Москва: РУДН, 2014. –С. 456.
203. Bertolini, J. Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use. / Bertolini Josef, Neil Goss, John Curling // Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons, 2013; 512 p.
204. Bluml, S. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. /S. Bluml, C. Scheinecker, J.S. Smolen, K. Redlich //Immunol. – 2012. – 24. - P. 275–81.

205. Blakely, E. A. The 20th Gray lecture 2019: health and heavy ions / Eleanor A. Blakely // The British journal of radiology. – 2020. - № 93. – V. - 1115. – P. 202-272.
206. Bleddyn, J. Clinical Radiobiology of Fast Neutron Therapy: What Was Learnt? /Jones, Bleddyn // Frontiers in oncology. – 2020. - № 10. – V. – 1537 p.
207. Bodour, A.A. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils /A.A. Bodour, K.P. Drees, R.M. Maier //Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - V. 69. - P. 3280-3287.
208. Bonomini, F. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress /F. Bonomini, L.F. Rodella, R. Rezzani //Aging Dis. – 2015. – № 6. – P. 109–120.
209. Buonagurio, D.A. Genetic stability of live, cold-adapted influenza virus components of the FluMist /CAIV-T vaccine throughout the manufacturing process. /D.A. Buonagurio et al. //Vaccine – 2006. – 24. – P. 2151–2160.
210. Cameotra, S.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules /S.S. Cameotra, R.S. Makkar // Curr. Opin. Microbiol. - 2004. - V. 7. - P. 262-266.
211. Christof, N. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation /N. Christofi, I.B. Ivshina //J. Appl. Microbiol. - 2002. -V. 93. - P. 915-929.
212. Cooper, D.G. Surface-active compounds from microorganisms /D.G. Cooper, J.E. Zajic //Appl. Microbiol. - 1980. - V. 26. - P. 229-252.
213. Cordell, A.R. Medicine at the medical center then and now: one hundred years of progress. /A.R. Cordell //South. Med. J. – 2002. – 95. – P. 1113–1121.
214. Denger, K. New halo- and thermotolerant fermenting bacteria producing surface-active compounds /K. Denger, B. Schink //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1995. - V. 44. - P. 161-166.
215. Denisov, A.A. Immunopotential of live brucellosis vaccine by adjuvants /A.A. Denisov, Y.S. Korobovtseva, O.M. Karpova, A.V. Tretyakova, L.V. Vikhina, A.V. Ivanov, K.M. Salmakov, R.V. Borovich //Vaccine. - 2010. - P. 17-22.
216. Desai, J.D. Microbial production of surfactants and their commercial potential /J.D. Desai, I.M. Banat //Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1997. - V. 61. - P. 47-64.

217. Deziel, E. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons /E. Deziel, G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine, J. Bisailon //Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - V. 62. - P. 1908-1912.
218. Dudzinski, S. Combination immunotherapy and radiotherapy causes an abscopal treatment response in a mouse model of castration resistant prostate cancer / Dudzinski, Stephanie O., Cameron, Brent D., Wang, Jian, Rathmell, Jeffrey C., Giorgio, Todd D., Kirschner, Austin N. // Journal for immunotherapy of cancer. - 2019. - V. 1. - P. 218.
219. Durante, M. Report of a National Cancer Institute special panel: Characterization of the physical parameters of particle beams for biological research / Durante, Marco; Paganetti, Harald; Pompos, Arnold; Kry, Stephen F; Wu, Xiaodong; Grosshans, David R. // Medical physics. - 2019. - №46. - V. 2. - P. e37-e52.
220. Engelbrecht, H.J. Immunological activity of Radiation vaccine against Helminthic Diseases /H.J. Engelbrecht //Parasit. - 1961. - №. 47. - P. 21-23.
221. Fajardo, L.F. Radiation Pathology. /L.F. Fajardo, M. Berthrong, R.E. Anderson - Oxford University Press, 2001. - 454 p.
222. Florian, P. FSRT vs. SRS in Brain Metastases-Differences in Local Control and Radiation Necrosis-A Volumetric Study / Putz, Florian; Weissmann, Thomas; Oft, Dominik; Schmidt, Manuel Alexander; Roesch, Johannes; Siavooshhaghghi, Hadi; Filimonova, Irina; Schmitter, Charlotte; Mengling, Veit // Frontiers in oncology. – 2020 - №10. – 559193 p.
223. Fujita, Y. Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry /Y. Fujita, T. Naka, T. Doi, I. Yano //Microbiology. - 2005. - V. 151. - P. 1443-1452.
224. Gligoriejevic, J. Radiation vaccine against Helminthic Diseases of pigs /J. Gligoriejevic, M. Iovanvic, A. Socolic, K. Cuperlovic, M. Movsesijan // Vet. Glasm. - 1962. - №. 16. - P. 1027.

225. Goes, E.G. Quality control of blood irradiation: determination T cells radiosensitivity to cobalt-60 gamma rays. /E.G. Goes, J.C. Borges, D.T. Covas et al. //Transfusion – 2006. - 46 (1). – P. 34–40.
226. Greco, M. Key drivers behind the development of global vaccine market. /M. Greco. //Vaccine. – 2001. – 19. – P. 1606–1610.
227. Gunther, N.W. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium /N.W. Gunther, A. Nunez, W. Fett, D.K.Y. Solaiman //Appl. Environ. Microbiol. - 2005. - ,
228. Halperin, S.A. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. /S.A. Halperin et al. //Vaccine – 2002. – 20. P. 1240–1247.
229. Hansen, E. Intraoperative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? /E. Hansen, V. Bechmann, J. Altmeyen //Transfus Apheresis Sci. – 2002. - 27 (2). – P. 153–157.
230. Harper, D.M. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. /D.M. Harper et al. //Lancet – 2006. – 367. – P. 1247–1255.
231. Haubler, S. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei* /S. Haubler, M. Nimtz, T. Domke, V. Wray, I. Steinmetz //Infect. Immun. - 1998. - V. 66. - P. 1588-1593.
232. Hoare, M. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m³ fermentation scale for an influenza pandemic. /M. Hoare et al. //Biotechnol. Prog. – 2005. – 21. –P. 1577–1592.
233. Holst, J. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. /J. Holst et al. //Vaccine – 2003. – 21. – P. 734–737.
234. Hou, X. Feasibility of single-time-point dosimetry for radiopharmaceutical therapies / Hou, Xinchu; Brosch, Julia; Uribe, Carlos; Desy, Alessandro; Boning, Guido; Beauregard, Jean-Mathieu; Celler, Anna; Rahmim, Arman //Journal of

- nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. - 2020-Oct-30 (Epub 2020 Oct 30).
235. Hosoki, A. The effect of radiation on the ability of rat mammary cells to form mammospheres / Hosoki, Ayaka; Ogawa, Mari; Nishimura, Yukiko; Nishimura, Mayumi; Daino, Kazuhiro; Kakinuma, Shizuko; Shimada, Yoshiya; Imaoka, Tatsuhiko // Radiation and environmental biophysics. – 2020. -№ 59. -V. 4. - P. 711-721.
 236. Hualin, Z. Photon GRID Radiation Therapy: A Physics and Dosimetry White Paper from the Radiosurgery Society (RSS) GRID-Lattice-Microbeam-FLASH Radiotherapy Working Group / Zhang, Hualin; Wu, Xiaodong; Zhang, Xin; Chang, Sha X; Megooni, Ali; Donnelly, Eric D; Ahmed, Mansoor M; Griffin, Robert; Welsh, James // Radiation research - 2020 Oct 17. - № 12. - P. 214-218.
 237. Hughes, J. FLASH Radiotherapy: Current Knowledge and Future Insights Using Proton-Beam Therapy / Hughes, Jonathan R; Parsons, Jason L. //International journal of molecular sciences- 2020. - № 21. – V. – 18. - P. 216-219.
 238. Ivashkiv, L.B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. /L.B. Ivashkiv //Trends Immunol. – 2013. – 34. – P. 216–230.
 239. Jordan, R.T. Effects of irradiation on Western encephalitis St. Lous /R.T. Jordan, L.L. Kempe, J. Gordon //Proc.soc.exp.biol.med. - 1956. - № 91. - P. 212-215.
 240. Karapiperis, C. The Coming of Age for Big Data in Systems Radiobiology, an Engineering Perspective / Karapiperis, Christos; Chasapi, Anastasia; Angelis, Lefteris; Scouras, Zacharias G; Mastroberardino, Pier G; Tapio, Soile; Atkinson, Michael J; Ouzounis, Christos A. // Big data. 2020-Sep-29 (Epub 2020 Sep 29).
 241. Kemp, A. Measles immunization in children with clinical with clinical reaction to egg protein // A. Kemp, P.A. Van Asperen Mukhi. – 1990 - Vol. 144. - P. 33-35.
 242. Kim, H.S. Production and properties of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9 /H.S. Kim, B.D. Yoon, C.H. Lee, H. M.Oh, T.Katsuragi, Y.Tani //J. Ferment. Bioeng. - 1997. - V. 84. - P. 41-46.

243. Kitamoto, D. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers /D. Kitamoto, H. Isoda, T. Nakahara //J. Biosc. Bioengin. - 2002. - V. 94. - P. 187-201.
244. Kornev, I.I. Sterilizaciya izdelii medicinskogo naznacheniya v lechebnoprofilakticheskikh uchrezhdeniyah: monografiya. /I.I. Kornev - M.: ANMI, 2000. - 175 s.
245. Kosaric, N. Biosurfactants in industry /N. Kosaric //Pure Appl. Chem. - 1992. - V. 64. - P. 1731-1737.
246. Konijnenberg, M. EANM position paper on article 56 of the Council Directive 2013/59/Euratom (basic safety standards) for nuclear medicine therapy /Konijnenberg, Mark; Herrmann, Ken; Kobe, Carsten; Verburg, Frederik; Hindorf, Cecilia; Hustinx, Roland; Lassmann, Michael// European journal of nuclear medicine and molecular imaging. – Epub. - 2020 Oct 15.
247. Kusliy, A.G. Radiation inactivation of viruses in blood plasma, and practical aspects of the fundamental problems. /A.G. Kusliy, T.G. Nigmatulin, V.L. Talroze, V.I. Trofimov //Chemical Physics – 2002. - 21 (4). – P. 86–95.
248. Kurup, A. Simulation of a radiobiology facility for the Centre for the Clinical Application of Particles / A. Kurup, J. Pasternak, R. Taylor, L. Murgatroyd, O. Ettlinger, W. Shields, L. Nevay, S. Gruber, J. Pozimski, H. // Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB) 2020 - №65.- – P. 21–28.
249. Lang, S. Rhamnose lipids biosynthesis, microbial production and application potential /S. Lang, D. Wullbrandt //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 51. - P. 22-32.
250. Langermans, J.A. Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. /J.A. Langermans et al. //Vaccine – 2005. – 23. –P. 2740–2750.

251. Leblanc, J. Burt, Julie JRadiation Biology and Its Role in the Canadian Radiation Protection Framework / Leblanc, Julie E; Burt, Julie J. // Health physics – 2019. – №117. – V. -3 -P. 319-329.
252. Logen, D.M. Effect of radiations on Polyoma Viruses /D.M. Logen, G.F. Whitnore //Virologi.1965. - V. 203. - № 25. - P. 495-497.
253. Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria /R. MMAier //Adv. Appl. Microbiol. - 2003. - V. 52. - P. 101-121.
254. Maier, R.M. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications /R.M. Maier, G. Soberon-Chavez //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - V. 54. - P. 625-633.
255. Mathieu, S. Differential transcriptome response to proton versus X-ray radiation reveals novel candidate targets for combinatorial PT therapy in lymphoma / Sertorio, Mathieu; Nowrouzi, Ali; Akbarpour, Mahdi; Chetal, Kashish; Salomonis, Nathan; Brons, Stephan; Mascia, Anthony; Ionascu, Dan; Shelby McCauley // Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. - 2020-Oct-20 (Epub 2020 Oct 20).
256. Makkar, R.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications /R.S. Makkar, S.S. Cameotra //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2002. - V. 58. - P. 428-434.
257. Margaritis, A. Production and surface-active properties of microbial surfactants /A. Margaritis, J.E. Zajic, D.F. Gerson //Biotech. Bioeng. - 1979. - V. 21. - P. 1151-1162.
258. Martineau, B. Sticking with growth. Vaccine market continues to rise. /B. Martineau //Mater. Manag. Health Care. – 2004. – 13. – P. 42.
259. McConkey, S.J. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. /S.J. McConkey //Nat. Med. – 2003. – 9. –P. 729–735.
260. McClatchy, D. Modeling Resistance and Recurrence Patterns of Combined Targeted- Chemoradiotherapy Predicts Benefit of Shorter Induction Period /McClatchy, David M; Willers, Henning; Hata, Aaron N; Piotrowska, Zofia;

- Sequist, Lecia V; Paganetti, Harald; Grassberger, Clemens //Cancer research.-2020-Sep-09 (Epub 2020 Sep 09).
261. McShane, H. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. /H. McShane et al. //Nat. Med. – 2004. – 10. – P. 1240–1244.
262. Mendez, R. LET-Dependent Intertrack Yields in Proton Irradiation at Ultra-High Dose Rates Relevant for FLASH Therapy / Ramos-Mendez, J; Dominguez-Kondo, N; Schuemann, J; McNamara, A; Moreno-Barbosa, E; Faddegon, Bruce // Radiation research. - №194. – V. 4. – P. 351-362.
263. Miller, T.A. Radiostesilisation of Medical Products /T.A. Miller. - Vienna - 1967 - P. 219-221.
264. Minnix, M. Comparison of CD38 targeted alpha- vs beta-radionuclide therapy of disseminated multiple myeloma in an animal model / Minnix, Megan; Adhikarla, Vikram; Caserta, Enrico; Poku, Erasmus; Rockne, Russell; Shively, John E; Pichiorri, Flavia // Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. - 2020-Oct-30 (Epub 2020 Oct 30).
265. Moran, A.C. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* 09 /A.C. Moran, N. Olivera, M. Commendatore, J.L. Esteves, F. Sineriz //Biodegradation. -2000. - V. 11. - P. 65-71.
266. Mulligan, C.N. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review /C.N. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs //Engineering Geology. 2016. - V. 60. - P. 371-380.
267. Neumann, G. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. /G. Neumann, K. Fujii, Y. Kino, Y. Kawaoka //Proc. Natl. Acad. Sci. – 2005. – 102. –P. 16825–16829
268. Nicolas, J.P. Molecular dynamics simulation of surfactin molecules at the water-hexane interface /J.P. Nicolas //Biophys. J. - 2003. - V. 85. - P. 1377-1391.
269. Nicolson, C. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. /C.

- Nicolson, D. Major, J.M. Wood, J.S. Robertson, //Vaccine. – 2005. – 523. – P. 2943–2952.
270. Nielsen, T.H. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54 /T.H. Nielsen, C. Christophersen, U. Anthoni, J. Serensen //J. Appl. Microbiol. - 1999. - V. 86. - P. 80-90.
271. Noll, H. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis* /H. Noll, H. Bloch, J. Asselineau, E. Lederer //Biochim. Biophys. Acta. - 1956. - V. 20. - P. 299-309.
272. Nunez, A. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis* /A. Nunez, R. Ashby, T.A. Fogilia, D. K. Solaiman //Biotechnol. Lett. - 2004. - V. 26. - P. 1087-1093.
273. Parales, R.E. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3) /R.E. Parales, N.C. Bruce, A. Schmid, L.P. Wackett //Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - V. 68. - P. 4699-4709.
274. Palmer, J. D. Radiotherapy and Late Effects / Palmer, Joshua D; Hall, Matthew D; Mahajan, Anita; Paulino, Arnold C; Wolden, Suzanne; Constine, Louis S // Journal Article; Review. Pediatric clinics of North America .- 2020. - № 67 - P. 1051-1067.
275. Patel, R. Protons and High-Linear Energy Transfer Radiation Induce Genetically Similar Lymphomas With High Penetrance in a Mouse Model of the Aging Human Hematopoietic System /Patel, Rutulkumar; Zhang, Luchang; Desai, Amar; Hoenerhoff, Mark J; Kennedy, Lucy H; Radivoyevitch, Tomas; La Tessa, Chiara; Gerson, Stanton L; Welford, Scott M// International journal of radiation oncology, biology, physics. – 2020. - №:10. – V.4. – P. 1091-1102.
276. Pedrosa-Rivera, M. Radiobiology data of melanoma cells after low-energy neutron irradiation and boron compound administration / Pedrosa-Rivera, Maria; Ruiz-Magana, M Jose; Alvarez, Patricia; Porras, Ignacio; Praena, Javier; Sabariego, Manuel P; Koster, Ulli; Haertlein, Michael; Forsyth, V Trevor; Soldner, Torsten // Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine. – 2020. - № 163. – P. 109205.

277. Petragnano, F. Clinically relevant radioresistant rhabdomyosarcoma cell lines: functional, molecular and immune-related characterization / Petragnano, Francesco; Pietrantoni, Ilaria; Camero, Simona; Codenotti, Silvia; Milazzo, Luisa; Vulcano, Francesca; Macioce, Giampiero; Giordani, Ilenia; Tini, Paolo; Cheleschi, Sara//Journal of biomedical science– 2020. - № 27. – P. 90.
278. Porras, I. BNCT research activities at the Granada group and the project NeMeSis: Neutrons for medicine and sciences, towards an accelerator-based facility for new BNCT therapies, medical isotope production and other scientific neutron applications / I. Porras, J. Praena, F. Arias de Saavedra, M. Pedrosa-Rivera, P. Torres-Sanchez, M. P. Sabariego, J. Exposito-Hernandez, J. Llamas-Elvira, M. Ramirez-Navarro, A. Rodriguez-Fernandez// Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine. – 2020. - № 165. – P. 109247.
279. Pshenichnyuk, S. Ionizing radiation and natural constituents of living cells: Low-energy electron interaction with coenzyme Q analogs / Pshenichnyuk, Stanislav A; Modelli, Alberto; Asfandiarov, Nail L; Komolov, Alexey S.// The Journal of chemical physics – 2020 - №153 - V. 11. – 111103 p.
280. Qiu, B. Advances in Radiobiology of Stereotactic Ablative Radiotherapy / Qiu, Bin; Aili, Abudureyimujiang; Xue, Lixiang; Jiang, Ping; Wang, Junjie // Frontiers in oncology. – 2020. - №:10. – 1165 p.
281. Quan, C. Impact of backscatter material thickness on the depth dose of orthovoltage irradiators for radiobiology research / Chen, Quan; Molloy, Janelle; Izumi, Tadahide; Sterpin, Edmond // Physics in medicine and biology. – 2019. - №:64. – V. 5. - 05001 p.
282. Rappuoli, R. The intangible value of vaccination. /R. Rappuoli, H.I. Miller, S. Falkow //Medicine. Science – 2002. – 297. –P. 937–939.
283. Ragimov, A.A. ed. Transfusion (national leadership). Moscow: Geotar Media, 2012; 1183 p. Russian.
284. Renault, P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment /P. Renault //Biochimie. - 2002. - V. 84. - P. 1073-1087.

285. Retzinger, G.S. The role of surface in the biological activities of trehalose 6,6'-dimicolate /G.S. Retzinger, S.C. Meredith, K. Takayama, R.L. Hunter, F. J. Kezdy //J. Biol. Chem. - 1981. - V. 256. - P. 8208-8216.
286. Ribot, W.J. Comparative vaccine efficacy of different isoforms of recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* spore challenge in rabbits. /W.J. Ribot et al. //Vaccine – 2006. – 24. – P. 3469–3476.
287. Rosenberg, E. //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 52. - P. 154-162.
288. Rottinghaus, S.T. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. /S.T. Rottinghaus, G.A. Poland, R.M. Jacobson, L.J. Barr, M.J. Roy //Vaccine – 2003. – 21. – P. 4604–4608.
289. Seibold, P. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility / Seibold, Petra; Auvinen, Anssi; Auerbeck, Dietrich; Bourguignon, Michel; Hartikainen, Jaana M; Hoeschen, Christoph; Laurent, Olivier; Noel, Georges; Sabatier, Laure //International journal of radiation biology. -2020 - №96 - V. 3. - P. 324-339.
290. Sheridan, C. The business of making vaccines. /C. Sheridan //Nat. Biotechnol. – 2005. – 23. – P. 1359–1366.
291. Shi, J. A Multimodality Image Guided Precision Radiation Research Platform: Integrating X-ray, Bioluminescence, and Fluorescence Tomography With Radiation Therapy/ J. Shi, K. Xu, A. Keyvanloo, Udayakumar, S. Thirupandiyur, A.Ahmad, F. Yang, Y. Yang// International journal of radiation oncology, biology, physics.-2020.- № 108.-Nov-15.-P.1063-1072.
292. Smolen, J.S. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? /J.S. Smolen, D. Aletaha, K. Redlich //Nature Rev. Rheumatol. – 2012. – 8. – P. 235–43.
293. Spoeckner, S. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources /S. Spoeckner, V. Wray, M. Nimtz, S. Lang //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 51. - P. 33-39.

294. Stoll, N.R. Production and utilization of Radiation vaccines against Helminthic Diseases /N.R. Stoll //Techn. Rep. Ser. IAEA. - Vienna, 1964. - V. 30. - P. 1-7.
295. Sullivan, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production /E.R. Sullivan //Curr. Opin. Biotechnol. - 1998. - V. 9. - P. 263-269.
296. Sundaram, K. Radiation effects on Naja-Naja venom and polyvalent antisera /K. Sundaram, J. Philot, M.B. Bhatt //Bhabhe Atomic. Res. Center, Bombay-Bombay, 1969. - P.433.
297. Tacket, C.O. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. /C.O. Tacket //Vaccine – 2005. – 23. –P. 1866–1869.
298. Tovar, I. Rationale for the Use of Radiation-Activated Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Acute Respiratory Distress Syndrome / Tovar, Isabel; Guerrero, Rosa; Lopez-Penalver, Jesus J; Exposito, Jose; Ruiz de Almodovar, Jose Mariano //Cells. – 2020. №9. - V. 9. - P. 263-269.
299. Traub E., Ehafii A., Kesting F., Ewalbsson B. Serological variation of FAMD virus in Iran (1936-1966). // Bull.Off.Int.Epiz.- 1966 65 - 11-12 - p. 2035-2050.
300. Trofimov, V.I. Radiation decontamination of blood and plasma derived therefrom protein preparations. /V.I. Trofimov //Remedium – 2003. - 5. – P. 62–64.
301. Ulmer, J.B. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. /J.B. Ulmer, B. Wahren, M.A. Liu //Trends Mol. Med. – 2006. – 12. – P. 216–222.
302. Vallabhapurapu, S. Regulation and function of NFkappaB transcription factors in the immune system. /S. Vallabhapurapu, M. Karin //Annu. Rev. Immunol. – 2009. – 27. – P. 693–733.
303. Varrett, W.F.H. Antihelminthics antibodies by vaccinated caws /W.F.H. Varrett, W. Jennings et al. //Immunology. - 1960. - №. 3. - P. 145-147.
304. Varrett, W.F.H. Radiation vaccine against Helminthic Diseases of caws /W.F.H. Varrett, F.W. Jennings et al. //Am. J. Vet. Res. - 1959. - №. 20. - P. 522-525.
305. Walsh, D.M. A beta oligomers - a decade of discovery /D.M. Walsh, D.J. Selkoe //J. Neurochem. - 2007. - Vol. 101. - № 5. - P. 1172-1184.

306. Watanabe, M. A new glycolipid from *Mycobacterium avium* -*Mycobacterium* intracellular complex /M. Watanabe, S. Kudoh, Y. Yamada, K. Iguchi, D.E. Minnikin // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1992. -V. - 1165.-P. 53-60.
307. Weisbach, V. Blood Irradiation for Intraoperative Autotransfusion in Cancer Surgery: the View of Transfusion Medicine. /V. Weisbach, R.Eckstein // *Transfusion Medicine and Hemotherapy* – 2004. – 31. –P. 282–285.
308. Yarilina, A. Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor-activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by JAK inhibitors. /A. Yarilina et al. // *Arthr. and Rheum.* – 2012. – 64. – P. 3856–3866.
309. Zacks, M.A. Encephalitic Alphaviruses /M.A. Zacks, S. Paessler // *Vet. Microbiol.* - 2010. - 140(3–4). - P. 281.
310. Zhong, Y. Dose rate determination for preclinical total body irradiation / Zhong, Yuncheng; Lai, Youfang; Saha, Debabrata; Story, Michael D; Jia, Xun; Stojadinovic, Strahinja // *Physics in medicine and biology.* – 2020. -№65 -V. - 17.-175018 p.

7. СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА

№	Название	Страница
1 Список таблиц		
1	Виды, условия получения и количество веществ микробного происхождения, использованных в качестве исходного материала для конструирования биопрепаратов	82-83
2	Радиозащитная активность вакцинных препаратов в in vitro тест-системе (инкубируемых облученных лимфоцитов)	87
3	Радиозащитная активность структурных компонентов микроорганизмов в in vitro тест-системе	90
4	Лечебная активность структурных компонентов микроорганизмов в in vitro тест-системе	92
5	Радиозащитная и лечебная эффективность пробиотиков в in vitro тест-системе	94
6	Радиозащитная активность радиомодифицированных патогенных, условно патогенных и нативных аэробных бацилл in vitro тест-системе	96
7	Радиозащитная и лечебная эффективности наиболее активных ВМП в in vitro тест-системе	98
8	Радиозащитная активность композиций ВМП на основе различных групп микроорганизмов in vitro	107-108
9	Эмбриотоксическое действие радиозащитной композиции на белых крысах	129
10	Влияние радиозащитной композиции на ФНР белых крыс	130-131
11	Влияние радиозащитного препарата на систему крови интактных белых крыс	133

12	Влияние композиционного препарата на основе ВМП на иммунохимические показатели белых крыс	134
13	Содержание оксидоредуктаз, антиоксидантных ферментов - дегидрогеназ в культуральной жидкости радиозащитной композиции	142
14	Содержание ДНК, ферментов каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы в клеточной суспензии, клеточном экстракте и культуральной жидкости <i>E.coli</i> ПЛ-6 и <i>E.coli</i> ПЛ-6(R ₇)	150
15	Влияние препаратов РЗК и МПАГ на течение, исход ОЛБ и выживаемость летально облученных животных	154-155
16	Течение и исход ОЛБ летально облученных белых мышей на фоне однократного применения лечебных препаратов	156
17	Радиозащитная активность препаратов РЗК и МПАГ при однократном подкожном введении крысам за 5-10 суток до облучения в дозе 9,5 Гр	158-159
18	Влияние препаратов РЗК и МПАГ на выживаемость летально облученных кроликов (11,0 ГР) в зависимости от срока применения препаратов до облучения (n=6)	161
19	Радиозащитная активность разработанного композиционного препарата РЗК и регламентированного (контрольного) микробного полиантигена (МПАГ)	162-163
20	Реакция системы крови мышей, облученных и леченных препаратом РЗК	166-167
21	Гематологические показатели у облученных (9,0 Гр) и леченых РЗК белых крыс на 7 сут после облучения	169

22	Содержание хиноидных (РБФ, \log_2), липидных (МДА, мкмоль/мл) радиотоксинов и ПУЭР (мин) у облученных (9,0 Гр) и леченых РЗК белых крыс	170
23	Гематологические показатели у кроликов, облученных и профилактированных препаратом РЗК	172
24	Уровни ИЛ-1 и КСФ (нг/мл) в сыворотке крови кроликов в различные сроки после облучения и применения испытуемого препарата	173
25	Содержание МДА, активность СОД и КАТ в сыворотке крови у кроликов, больных ОЛБ и получавших препарат РЗК через 1 сутки после облучения	174-175
26	Гематологические показатели иммунизированных испытуемыми препаратами овец в динамике ($M \pm m$)	178
27	Лейкоцитарный профиль в динамике у овец, иммунизированных испытуемыми радиозащитными препаратами	180
28	Иммунологические показатели в динамике у овец после введения препаратов	181
29	Динамика изменений РБТЛ у иммунизированных испытуемыми препаратами овец (%)	183
30	Выживаемость иммунизированных за 30 сут до облучения в дозе 6,0 Гр РЗК и МПАГ овец	184
31	Гемограмма летально облученных овец через 30 суток после иммунизации различными антигенами	187
32	Лейкоцитарный профиль у летально облученных овец через 30 суток после иммунизации различными антигенами	189-190
33	Иммунологические показатели у привитых испытуемыми антигенами овец после летального облучения их гамма-лучами ^{137}Cs в динамике	191-192
34	Динамика уровня радиоиндуцированного антигена (радиотоксина) в РНГА у иммунизированных и неиммунизированных овец после летального облучения	194

35	Динамика изменения РБТЛ у иммунизированных и летально облученных через 30 сут после прививки овец	196
36	Схема постановки 2-й серии опытов на мелком рогатом скоте	199
37	Гемограммы овец после иммунизации предлагаемым и известным антигенами в динамике	200
38	Лейкоцитарный профиль крови овец после иммунизации предлагаемым (РЗК) и известным (МПАГ) препаратами в динамике	202
39	Изменения факторов клеточного и гуморального иммунитета у овец после иммунизации радиозащитными антигенами	203
40	Выживаемость овец, иммунизированных антигенами за 30, 60 и 90 суток до облучения в дозе 6,0 Гр	205
41	Выход продуктов убоя облученных и леченых овец	208
42	Влияние однократной подкожной иммунизации на показатели подкожного и внутреннего жира леченных и облученных овец	209
43	Химический состав и энергетическая ценность мяса, полученного от облученных и леченых РЗК овец	211
44	Биохимические показатели мышечной ткани облученных и леченых РЗК овец	212
45	Изменение массы крысят в процессе опыта (г)	214
46	Гематологические показатели крысят, получавших в рационе мясо облученных и леченых РЗК овец	215
47	Воспроизводительная функция мышей, которые в рационе получали мясо здоровых, облученных и леченых РЗК овец	216
48	Генетические эффекты испытуемых образцов мяса облученных и леченых РЗК животных	217

2 Список схем		
1	Направление и объем исследований	53
	Условия опытов	54-60
	Получение полифункционального радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения (РЗК)	120
2	Усовершенствованная схема получение полифункционального радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения (РЗК)	124

ПРИЛОЖЕНИЯ

Российская академия наук
Отделение сельскохозяйственных наук

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель академика-секретаря
Отделения сельскохозяйственных наук
РАП - руководитель секции зоотехнии и
ветеринарии, академик РАН

В.В. Калапников

2019 г.

« 26 »



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по использованию ионизирующего излучения для инактивации возбудителей
инфекционных болезней сельскохозяйственных животных

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2697828

**Способ получения препарата для профилактики и лечения
радиационных поражений организма животных и способ
профилактики и лечения радиационных поражений
организма животных**

Патентообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный центр
токсикологической, радиационной и биологической
безопасности" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)**

Авторы: **см. на обороте**

Заявка № 2019117190

Приоритет изобретения **03 июня 2019 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **21 августа 2019 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **03 июня 2039 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 697 828** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61K 35/64 (2015.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61P 43/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/74 (2019.05); *A61K 35/64* (2019.05); *A61K 35/745* (2019.05); *A61K 33/06* (2019.05); *A61P 43/00* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2019117190, 03.06.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 03.06.2019

Дата регистрации:
 21.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.06.2019

(45) Опубликовано: 21.08.2019 Бюл. № 24

Адрес для переписки:
 420075, г. Казань, Научный городок, 2, ФГБНУ,
 "ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанову В.И.

(72) Автор(ы):

Низамов Рамзи Низамович (RU),
 Вагин Константин Николаевич (RU),
 Конюхов Геннадий Владимирович (RU),
 Василевский Николай Михайлович (RU),
 Низамов Рустам Наилевич (RU),
 Рахматуллина Гульназ Ильгизаровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 научное учреждение "Федеральный центр
 токсикологической, радиационной и
 биологической безопасности" (ФГБНУ
 "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2366448 C2, 10.09.2009. RU
 2549451 C2, 27.04.2015. RU 2226106 C2,
 27.03.2004. ВАГИН К.Н., Разработка
 радиозащитного препарата на основе
 метаболитов *E. coli*, авт. дисс. к.б.н., Казань,
 2012, стр. 8-10, найдено в Интернете 25.06.2019
 [on line] на сайте <http://earthpapers.net/preview/440248/a#?page=1>. НИЗАМОВ Р.Н. и др.,
 Использование апиэана в (см. прод.)

(54) Способ получения препарата для профилактики и лечения радиационных поражений организма животных и способ профилактики и лечения радиационных поражений организма животных

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к радиационной биологии, а именно профилактике и лечению радиационных поражений организма животных с использованием препаратов на основе веществ микробного, зоогенного и минерального происхождения. Для этого на питательных средах выращивают культуры пробиотических микроорганизмов, в качестве которых используют кишечную палочку *E. coli* шт. ПЛ-6, бифидобактерии *B. bifidum* шт. 1 и сенную палочку *B. subtilis* шт. 3. Затем культуральную жидкость тест-штаммов

смешивают в соотношении 0,5:0,3:0,2 и вносят в нее смесь микробных клеток в количестве $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мг (*E. coli*), $0,6 \cdot 10^9$ КОЕ/мг (*B. bifidum* 1) и $0,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мг (*B. subtilis* 3). В полученную смесь добавляют высокодисперсный бентонит в количестве 20-30 мг на 100 см³ композиции и апиэан в количестве 7-10 мг на 100 см³ композиции. Лечение радиационных поражений проводят путем однократного подкожного введения препарата в дозах 7-10 см³ мелким

животным и 15-20 см крупным животным. Препарат вводят из расчета 8,5-9,5 мл суспензии на 1 кг живой массы: для профилактиции - за 1-30 сут до облучения, а для лечения - через 1-10 сут после облучения. 1 группа изобретений

обеспечивает формирование реактивности организма животных при проффилактике и лечении при применении препарата. 2 п. и 2 зап. ф. тис. 5 пр.

(56) (продолжение):

качество иммуностимулятора при стимуляции поствакцинального иммунитета, *Вестник Владикавказского научного центра*, 2013, стр. 235-239, опублик. в Интернете 25.06.2019 [on line] на сайте <https://vestnikscni.ru/article/vspolzovanie-arizama-v-kachestve-immunomodulyatora-pri-stimulyatsii-postvaktsinalnogo-immuniteta>.


R U 2 6 9 7 8 2 8 C 1

R U 2 6 9 7 8 2 8 C 1

Российская академия наук
Отделение сельскохозяйственных наук

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель академика-секретаря
Отделения сельскохозяйственных наук
РАН, руководитель секции зоотехнии и
ветеринарии, академик РАН

 В.В. Калашников
«16» ноября 2019 г.

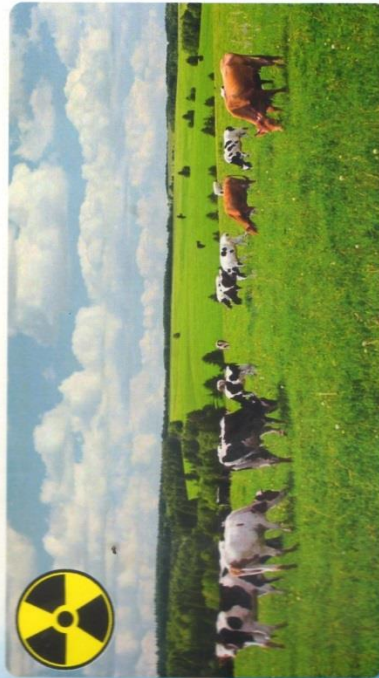
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по гамма-облучению различных видов продукции и сырья растительного и
животного происхождения

Москва - 2019

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по профилактике и лечению
радиационных поражений животных



Москва 2018

СОДЕРЖАНИЕ

1 Введение	Стр. 4
2 Профилактика лучевых поражений животных	5
2.1 Взаимное действие у млекопитающих и использование ее в качестве радиозащитного средства	6
2.2 Получение и применение тканевых антигенов для профилактики радиационных поражений животных	7
2.3- Получение и применение микробных антигенов для профилактики радиационных поражений животных	8
2.4 Применение тозилена для профилактики радиационных поражений животных	10
3 Лечение животных при радиационных поражениях	11
3.1 Получение противолучевых сывороток	11
3.2 Получение и применение противорадиационного иммуноглобулина	11
3.3 Получение и применение композиционного препарата для лечения животных при острой лучевой болезни	12
3.4 Получение и применение композиционных апитопрепаратов для лечения и профилактики радиационных поражений животных	13
4 Литература	17

Методические рекомендации разработали:

Конюхов Г.В., д.б.н., профессор; **Низамов Р.Н.**, д.в.н., профессор;
Тарасова Н.Б., д.б.н.; **Васильевский Н.М.**, д.в.н., профессор; **Палуинди К.Х.**, д.в.н., профессор; **Вагин К.Н.**, к.б.н.; **Гайнутдинов Т.Р.**, к.б.н. (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИИВ»); **Гулюкин М.И.**, д.в.н., профессор, академик РАН (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ).

Рецензенты:

Софронов В. Г. - зав. кафедрой зоотигиены ФГОУ ВО «Казанская ГАВМ», д.в.н., профессор;

Великанов В. И. - профессор кафедры фармакологии ФГОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия», д.б.н.

В данных рекомендациях впервые дается обобщение и приведены собственные данные о средствах профилактики и лечения животных при острой лучевой болезни.

Описываются разработанные сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИИВ» схемы применения радиозащитных препаратов различной природы, их эффективность по показателю выживаемости облученных животных и пути усиления данного эффекта.

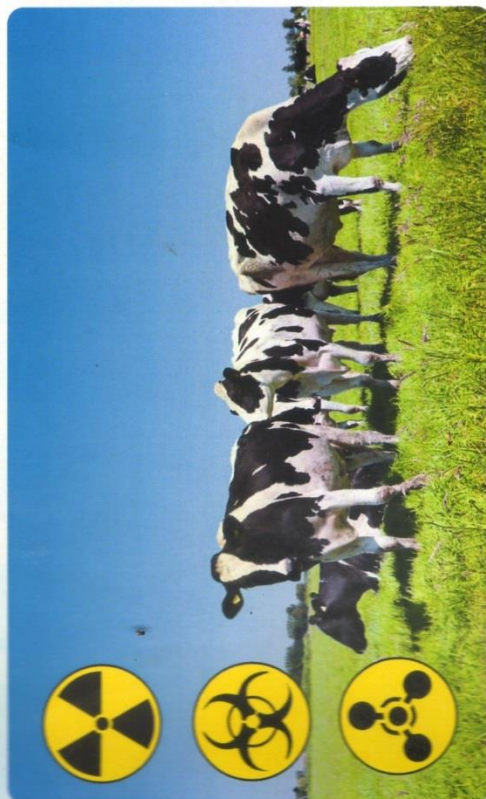
Методические рекомендации предназначены для специалистов государственных ветеринарных учреждений (субъектов Российской Федерации), научных сотрудников, ветеринарных врачей-лаборантов, слушателей курсов повышения квалификации и студентов профильных ВУЗов.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на заседании научно-методической комиссии ВНИИВСТЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №2 от 14 сентября 2018 г.) и Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 5 от 23 октября 2018 г.).

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по лечению и профилактике
комбинированных поражений животных
ионизирующим излучением,
микотоксинами и химическими агентами



Москва 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
1 Введение	4
2 Краткая характеристика комбинированных поражений	5
2.1 Комбинированные поражения, вызванные	6
ионизирующим излучением и Т-2 токсином	7
2.2 Комбинированные поражения, вызванные	9
химическими агентами и ионизирующим излучением	11
2.3 Комбинированные радиационно-термические	12
поражения	18
3 Лечение комбинированных поражений животных	19
3.1 Лечение животных с общим лучевым поражением	22
3.2 Лечение животных с преобладанием симптомов Т-2	23
токсикоза	27
3.3 Лечение животных с преобладанием симптомов	
отравления химическими агентами	
3.4 Лечение комбинированных радиационно-термических	
поражений	
4 Профилактика комбинированных поражений	
5 Литература	

Методические рекомендации по лечению и профилактике комбинированных поражений животных ионизирующим излучением, микотоксинами и химическими агентами разработаны сотрудниками ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТР-ВНИИ»), Казань) – (д-р биол. наук, проф. Г.В. Конохов; д-р вет. наук, проф. К.Х. Палуниди; д-р вет. наук, проф. Р.Н. Низамов; д-р биол. наук Н.Б. Тарасова; д-р вет. наук, проф. Н.М. Василевский; д-р биол. наук И.Р. Кадиков; канд. биол. наук К.Н. Вагин; канд. биол. наук Т.Р. Гайнутдинов; канд. вет. наук Г.Ш. Захарова; канд. биол. наук Э.И. Семёнов; канд. биол. наук В.П. Шашков) и Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук» - (д-р биол. наук, проф., академик РАН В.И. Дорожкин; д-р биол. наук Л.Л. Захарова; канд. вет. наук Г.А. Жоров).

В данных рекомендациях впервые дается обобщение и приведены данные о средствах профилактики и лечения комбинированных поражений животных ионизирующим излучением, микотоксинами и химическими агентами. Описываются схемы применения радиозащитных препаратов различной природы по показателю выживаемости облученных животных и пути усиления этого эффекта.

Методические рекомендации предназначены для специалистов государственных ветеринарных учреждений (субъектов Российской Федерации), научных сотрудников, ветеринарных врачей-лаборантов, слушателей курсов повышения квалификации и студентов профильных ВУЗов.

Рецензенты:

Софронов В. Г. - зав. кафедрой зоогигиены ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», д-р вет. наук, профессор;

Великанов В. И. - профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия», д-р биол. наук.

Методические рекомендации по лечению и профилактике комбинированных поражений животных ионизирующим излучением, микотоксинами и химическими агентами рассмотрены и одобрены на заседании научно-методической комиссии ВНИИВСТЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №2 от 14 сентября 2018 г.) и Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №5 от 23 октября 2018 г.).

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2655802

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ КОРМОВАЯ ДОБАВКА
ДЛЯ ПОРОСЯТ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)*

Авторы: *Низамов Рамзи Низамович (RU), Конюхов Геннадий Владимирович (RU), Никитин Андрей Иванович (RU), Шарифуллина Дина Талгатовна (RU), Василевский Николай Михайлович (RU), Вагин Константин Николаевич (RU)*

Заявка № 2017126820

Приоритет изобретения 25 июля 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 29 мая 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 25 июля 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 655 802** (13) **C1**

(51) МПК
A23K 50/30 (2016.01)
A23K 20/10 (2016.01)
A23K 20/28 (2016.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 50/30 (2006.01); *A23K 20/10* (2006.01); *A23K 20/28* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017126820, 25.07.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 25.07.2017

Дата регистрации:
 29.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.07.2017

(45) Опубликовано: 29.05.2018 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

420075, г. Казань, Научный городок, 2, ФГБНУ
 "ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанову В.И.

(72) Автор(ы):

Низамов Рамзи Низамович (RU),
 Конюхов Геннадий Владимирович (RU),
 Никитин Андрей Иванович (RU),
 Шарифуллина Дина Талгатовна (RU),
 Васильевский Николай Михайлович (RU),
 Вагин Константин Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 научное учреждение "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
 ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
 РАДИАЦИОННОЙ И
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ"
 (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 2579219 C1, 10.04.2016. RU
 2522339 C1, 10.07.2014. RU 2405374 C2,
 10.12.2010. RU 2497376 C2, 10.11.2013.

(54) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ КОРМОВАЯ ДОБАВКА ДЛЯ ПОРОСЯТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к кормовой промышленности, а именно к биологически активной кормовой добавке для поросят. Добавка содержит пчелиный подмор и сорбент, люцерновую муку, пижму, муку топинамбура и сорбент - наноразмерную фракцию опоки. Компоненты берут в следующем соотношении,

масс. %: подмор пчел 17,0-18,0, люцерновая мука 27,0-28,0, пижма 0,20-0,22, наноразмерная опока 0,50-0,55, мука топинамбура - остальное. Использование изобретения позволит увеличить привес и сохранность молодняка. 1 з.п. ф-лы, 8 пр.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2641907

**Биологически активная кормовая добавка для
сельскохозяйственных животных и птицы**

Патентообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный центр
токсикологической, радиационной и биологической
безопасности" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)**

Авторы: **см. на обороте**

Заявка № 2016129774

Приоритет изобретения 20 июля 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 23 января 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 июля 2036 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 641 907** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A23K 10/30 (2016.01)
A23K 10/20 (2016.01)
A23K 20/20 (2016.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 10/30 (2006.01); *A23K 10/20* (2006.01); *A23K 20/20* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016129774, 20.07.2016
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 20.07.2016
 Дата регистрации:
 23.01.2018
 Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 20.07.2016
 (45) Опубликовано: 23.01.2018 Бюл. № 3
 Адрес для переписки:
 420075, г. Казань, Научный городок, 2,
 ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанов В.И.

(72) Автор(ы):
 Никитин Андрей Иванович (RU),
 Низамов Рамзи Низамович (RU),
 Конюхов Геннадий Владимирович (RU),
 Василевский Николай Михайлович (RU),
 Тухватулов Марсель Завдатович (RU),
 Сычев Константин Владимирович (RU),
 Вагин Константин Николаевич (RU),
 Титов Александр Семенович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
 Федеральное государственное бюджетное
 научное учреждение "Федеральный центр
 токсикологической, радиационной и
 биологической безопасности" (ФГБНУ
 "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2497376 C2, 10.11.2013. RU
 2338546 C2, 20.11.2008. RU 2525920 C2,
 20.08.2014. SU 952260 A, 23.08.1982.

(54) Биологически активная кормовая добавка для сельскохозяйственных животных и птицы

(57) Реферат:

Изобретение относится к кормопроизводству, а именно к кормовым добавкам для сельскохозяйственных животных и птиц. Кормовая добавка содержит пчелиный подмор, трутневый расплод в разных стадиях развития, порошок клубней топинамбура, травяную муку и активированный минеральный сорбент - активированную опоку. Все компоненты взяты в определенных соотношениях. Скармливание кормовой добавки стимулирует обмен веществ, иммунную, антиоксидантную системы организма,

обеспечивает снижение заболеваемости, повышение усвояемости кормов, стимулирует рост и развитие молодняка, повышает его сохранность и сопротивляемость организма к агентам физической, химической и биологической природы, обеспечивая сорбционно-детоксикационный, противорадиационный и антиинфекционный эффект путем связывания, нейтрализации и выведения радиотоксинов, радионуклидов, экотоксинов, микотоксинов. 1 з.п. ф-лы, 1 табл., 8 пр.

RU 2 641 907 C 1

RU 2 641 907 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2694690

Способ консервирования молока и молочных продуктов

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018111387

Приоритет изобретения 29 марта 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 16 июля 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 29 марта 2038 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



Авторы: *Никитин Андрей Иванович (RU), Низамов Рамзи
Низамович (RU), Тухфатулов Завдат Латыпович (RU), Конюхов
Геннадий Владимирович (RU), Тухфатулов Марсель Завдатович
(RU), Василевский Николай Михайлович (RU), Шакуров Муланур
Максutowич (RU), Низамова Гюзель Рамзиевна (RU), Вагин
Константин Николаевич (RU), Рахматуллина Гульназ
Ильгизаровна (RU)*

RU 2694690 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 694 690** ⁽¹³⁾ **C1**(51) МПК
A23C 3/08 (2006.01)(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**(52) СПК
A23C 3/08 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018111387, 29.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.03.2018Дата регистрации:
16.07.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.03.2018

(45) Опубликовано: 16.07.2019 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

420075, г. Казань, Научный городок, 2, ФГБНУ,
"ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанову В.И.

(72) Автор(ы):

Никитин Андрей Иванович (RU),
Низамов Рамзи Низамович (RU),
Тухфатулов Завдат Латыпович (RU),
Конюхов Геннадий Владимирович (RU),
Тухфатулов Марсель Завдатович (RU),
Василевский Николай Михайлович (RU),
Шакуров Муланур Максutowич (RU),
Низамова Гюзель Рамзиевна (RU),
Вагин Константин Николаевич (RU),
Рахматуллина Гульназ Ильгизаровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный центр
токсикологической, радиационной и
биологической безопасности" (ФГБНУ
"ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2308837 C2, 27.10.2007. RU
2222956 C2, 10.02.2004. RU 2199872 C1,
10.03.2003. RU 2462037 C2, 27.09.2012. US
4426397 A1, 17.01.1984.

(54) Способ консервирования молока и молочных продуктов

(57) Формула изобретения

Способ консервирования молока и молочных продуктов, основанный на введении в молоко или подлежащий консервации продукт консерванта, отличающийся тем, что в качестве консерванта используют молочную эмульсию пчелиного воска на основе молока или сливок в количестве 1,0, или 1,25, или 1,75-3,0 г/л (кг) молока или молочного продукта.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2660916

Способ хранения мяса

Патентообладатель: **Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)**

Авторы: **Никитин Андрей Иванович (RU), Низамов Рамзи Низамович (RU), Конюхов Геннадий Владимирович (RU), Тухватулов Марсель Завдатович (RU), Курбангалеев Ягфар Мубаракзянович (RU), Тухватулов Завдат Латыпович (RU), Вагин Константин Николаевич (RU), Титов Александр Семенович (RU), Шакуров Муланур Максutowич (RU), Гурьянова Валентина Анатольевна (RU)**

Заявка № 2018100689

Приоритет изобретения 10 января 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 11 июля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 10 января 2038 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 660 916 (13) C1

(51) МПК
A23B 4/10 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(52) СПК
A23B 4/10 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2018100689, 10.01.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2018Дата регистрации:
11.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.01.2018

(45) Опубликовано: 11.07.2018 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

420075, г. Казань, Научный городок, 2, ФГБНУ
"ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанову В.И.

(72) Автор(ы):

Никитин Андрей Иванович (RU),
Низамов Рамзи Низамович (RU),
Конюхов Геннадий Владимирович (RU),
Тухватулов Марсель Завдатович (RU),
Курбангалеев Ягфар Мубаракзянович (RU),
Тухватулов Завдат Латыпович (RU),
Вагин Константин Николаевич (RU),
Титов Александр Семенович (RU),
Шакуров Муланур Максutowич (RU),
Гурьянова Валентина Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный центр
токсикологической, радиационной и
биологической безопасности" (ФГБНУ
"ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2178643 C2, 27.01.2002. RU
2345545 C2, 10.02.2009. US 3483004 A1,
09.12.1969. RU 2320243 C2, 27.03.2008.

(54) Способ хранения мяса

(57) Формула изобретения

Способ хранения мяса, включающий обработку мяса консервантом с последующей укладкой его в тару и дальнейшей заливкой мяса консервантом, отличающийся тем, что в качестве консерванта используют 9-10%-ный пчелиный воск, расплавленный до температуры +60-70°C, с расходом заливочного консерванта из расчета 9,5-10% к массе мяса.

RU 2 660 916 C 1

УТВЕРЖДАЮ
 Врио директора ФГБНУ
 «ФЦТРБ-ВНИВИ»
 Ж.Р. Насыбуллина
 20.08.2020 года

**ТРЕХКОМПОНЕНТНЫЙ РАДИОЗАЩИТНЫЙ
 ПРЕПАРАТ «ФЗМ» НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ
 БАКТЕРИЙ *VIBRIBACTERIUM VIBRIDUM*, ФИТОПРЕПАРАТА
 КУРКУМЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ
 КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «ВИТА-ФОРЦЕ М»**

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕЗЮМЕ

На экспериментальную партию

Срок введения с 01.08.2020

Срок действия до 31.08.2020

Продолжение титульного листа на следующей странице

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ КОНТРОЛЯ, СТАНДАРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ВЕТНАПО)

123022, г. Москва, Д-23
Бумажный проезд, д. 5
Телефакс: 235 - 14 - 91

18.07.2006 г. 11/07/06

на № _____ от _____ г.

Федеральному институту
примененной микробиологии
России

Россиа, 121803, Москва,
Борокская наб., 33.

УВАЖАЕМЫЙ

В депонировании отпатентованного штамма
"11-6" *Escherichia coli* - возбудителя
эшерихиозной диареи поручаю.

Авторами: Опишонов Л.Н., Рафеев Х.З. (Всероссийский научно-
исследовательский ветеринарный институт, Россия, 420075,
г. Казань, Научный городок-2).

Эпителиотропный энтеротоксигенный штамм "11-6" *Escherichia coli* -
возбудителя эшерихиозной диареи выделен в 1996г. от больных диареей
новорожденных поросят из свайсва "Калининский" Сосновского района
Республики Татарстан.

По морфологическим, типтовокальным, ферментативным и антигенным
свойствам штамм относится к сс. *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*,
роду *Escherichia coli*. Штамм имеет две антигенные активности: А, специфическую
группоспецифический и эндотоксиновый антигены, синтезирует кишечный
антиген К80, инфекционная активность на белых мышах - $10^{5,0}$
 $10^{5,0}$ у.е. в лизифицированном и $10^{5,0}$ $10^{5,0}$ у.е. в нативном состоянии.

Штамм патентован, предложен для изготовления вакцин.

Штамм депонирован 28 декабря 2006г. во Всероссийский государственный
научный центр микробиологии, используемых в ветеринарии и
микробиологии (Россия, 123022, Москва, Бумажный проезд, 5, ВВИА).

Копию хранения штамма в регистрационном номере (свайской) -
штамма "11-6" *Escherichia coli* - ВНИИ (г. Казань) - ВВИА - возбудителя эшерихиозной
диареи поросят отдалено Коллекция микроорганизмов Всероссийского
научно-исследовательского ветеринарного института (Россия,
420075, г. Казань, Научный городок-2).

Директор института
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик РАН

Заведующий лабораторией
генетики и молекулярной биологии



Павлов А.Н.
Иванов Е.А.



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ЭКОЛОГИЧЕСКОМУ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ И АТОМНОМУ НАДЗОРУ**
Волжское межрегиональное территориальное управление
по надзору за ядерной и радиационной безопасностью

РАЗРЕШЕНИЕ

Регистрационный номер **Р-ВО-04-210-5464** от **14 апреля 2020 г.**

Выдано Вагину Константину Николаевичу

на право ведения работ в области использования атомной энергии, при выполнении обязанностей по занимаемой должности - старший научный сотрудник отдела радиобиологии, по замещаемой должности - заведующий лабораторией отдела радиобиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», при эксплуатации радиационного источника (комплексы в которых содержатся радиоактивные вещества)

в соответствии со статьей 27 Федерального закона от 21 ноября 1995 г. №170-ФЗ «Об использовании атомной энергии».

Разрешение выдано на основании заявления вх. от 26.02.2020 № 430/861

Срок действия разрешения: с 14.04.2020 по 13.04.2025

Руководитель управления  В.Е. Савинов

М.П.

Разрешение действует при соблюдении прилагаемых условий действия разрешения, являющихся его неотъемлемой частью.

А П 248829