

*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

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Казань 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет» и в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

**Научные  
консультанты:**

**Семенов Владимир Григорьевич** – заслуженный деятель науки Чувашской Республики, доктор биологических наук, профессор  
**Низамов Рамзи Низамович** – заслуженный деятель науки Республики Татарстан, доктор ветеринарных наук, профессор

**Официальные  
оппоненты:**

**Трошин Евгений Иванович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ветеринарной радиобиологии и БЖЧС ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

**Козак Сергей Степанович** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории санитарно-гигиенической оценки сырья и продуктов «Всероссийский научно-исследовательский Институт птицеперерабатывающей промышленности»

**Лавина Светлана Алексеевна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

**Ведущее учреждение:**

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «10» июня 2021г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана» и на сайте <http://www.kazvetakademiya.ru>.

Автореферат разослан « » 2021г. и размещен на сайтах: <http://www.vak.ed.gov.ru> и <http://www.kazvetakademiya.ru>.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

А.М. Ежкова

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), колониестимулирующего фактора (КСФ), туморнекротического фактора (ТНФ- $\alpha$ ) 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 гомопоэз, 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; Андрушенко В.Н. и др., 1996; Агиров, А.Х. 2008; Bleddyne, 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; Раҳматуллина 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, энtero- и экзотоксины (Зароза В.Г., 1991), цитокины (Пепоян А.З и др., 2001, 2015; Kuriup, A. 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 экономичных и экологичных 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, аллергизирующие свойства).
6. Испытать радиозащитную активность препарата на лабораторных и сельскохозяйственных животных.
7. Изучить механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения препарата РЗК (радиозащитная композиция).

**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 иммуногемоэпаза 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 радиотоксикемии, радиосенсибилизации и радиоиндукции апаптоза стволовых клеток системы иммуногемоэпаза – основных детерминантов выживаемости организма при радиотоксикемии.

Практическая значимость работы определяется тем, что для специфической профилактики и лечения радиационных поражений предложен препарат на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов. Полученный 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. 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», утвержденный директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 09 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», утвержденный 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 (катализы – 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  $^{60}\text{Со}$  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 «Statistica 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, клинико-лабораторных методов исследований, методов статистической и математической обработки данных. Все исследования выполнены на современном оборудовании отдела радиобиологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

**Специальности, которым соответствует диссертация.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 06.02.05 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза. Работа посвящена разработке средств профилактики и лечения радиоиндуцированной экопатологии с использованием радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения – РЗК. Разработанный препарат оказывает радиопротекторное действие путем ингибирования синтеза радиоиндуцированных иммунотоксических агентов – радиотоксинов, блокировании их доступа к клеткам – мишениям (лимфоцитам и лейкоцитам-детерминантам выживаемости при радиопатологии, усиление синтеза медиаторов иммуногемопоэза – цитокинов (ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ), сохранение активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ), обеспечивающих повышение выживаемости летально пораженных животных. Результаты научного исследования соответствуют 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 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 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, радиоэкологии и агроэкологии» (г. Обнинск 2019 г.).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях кафедры морфологии, акушерства и терапии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный аграрный университет» и на заседаниях Ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по итогам НИР за 2016-2019 гг.

**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 на изобретение Российской Федерации.

**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, приложения.

**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.

## 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 «ФЦТРБ-ВНИВИ» и является разделом комплексной темы научно-исследовательской работы, государственная регистрация № 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. Отобрано и исследовано 5737 пробы.

Направление и объем исследований представлены в схеме 1.

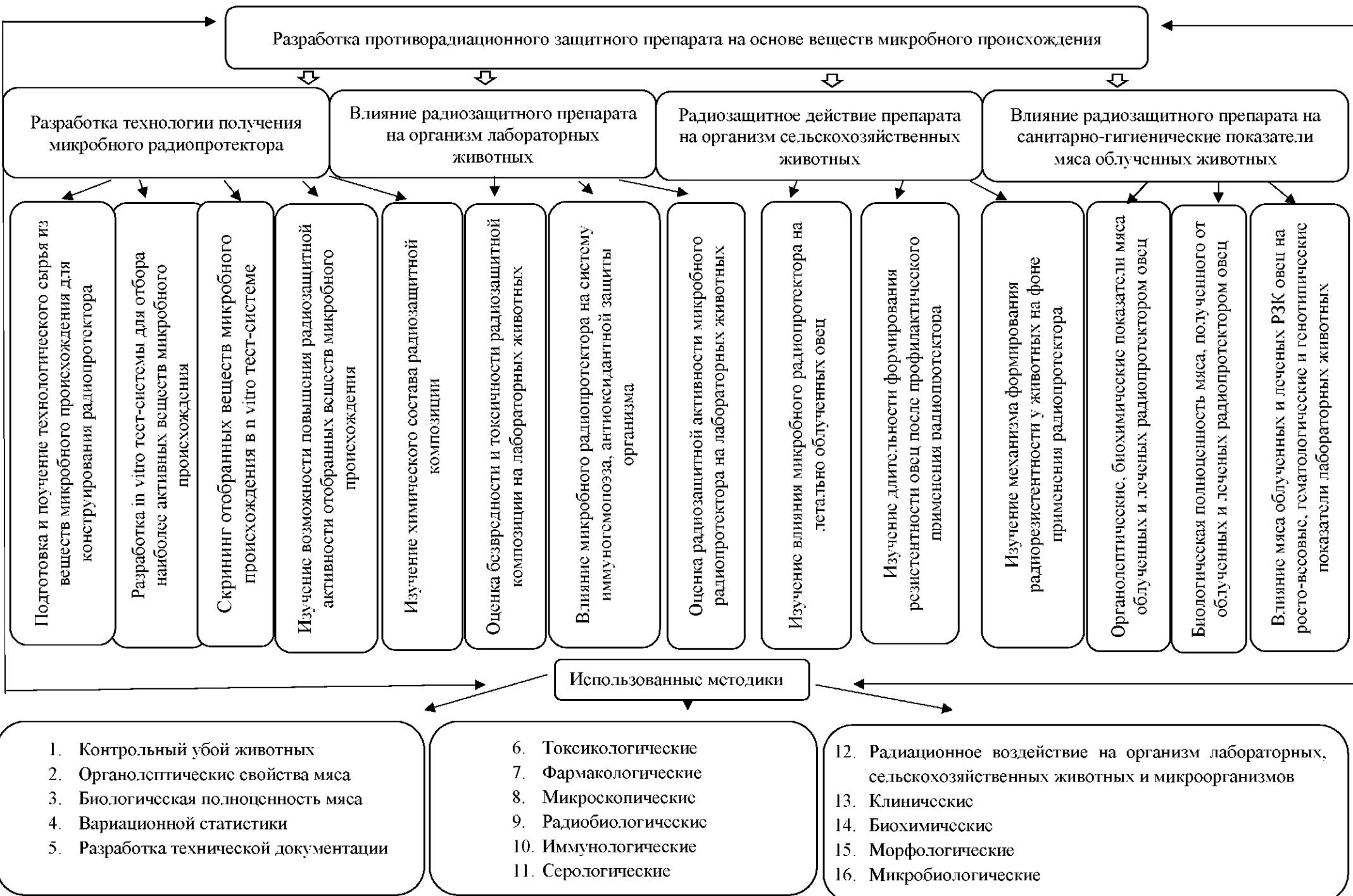


Схема 1 – Направление и объем исследований

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 Аусски), 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, *Saccharomyces cerevisiae* шт. 230.

Кроме вакциновых 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 генноминеральных продуктов (интерфероны, цитокины и др.), стафилококки, клостридии, протей, стрептококки, непатогенные штаммы сальмонелл (*Sal.typhimurium* шт. 370, 371; *Sal.enteritidis* шт. 418).

Использовали спорообразующие микроорганизмы-бациллы: *B.cerus* (фактор порчи пищевых продуктов), *B.megaterium*, *B.subtilis* (шт. 1, 168, 20-31, JH64), *B.mesentericus*, *B.rumilus* КМ62, *B.thuringensis* (var.*subtoxicus*), *B.polimixa*, *B.circularis*, *R.intermedius* (шт. 7р и 3-19) обитающие в организме животных, растениях и почве.

Вышеперечисленные вакциновые препараты бактериальной и вирусной природы получены в системе «Зооветснаб», из музеиных 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 *Saccharomyces cerevisiae* на агаре Сабуро.

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, использовали 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  $^{137}\text{Cs}$  с мощностью экспозиционной дозы излучения  $3,13 \times 10^{-5}$  Кл(кг $\cdot$ с). С целью индуцирования радиотоксинов микробные клетки облучали на гамма-установке «Исследователь», изготовленной 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, соответствующие химические реактивы, сыворотки, антисыворотки, антигены, приборы и оборудование (холодильники, терmostаты, водяные бани, центрифуги, спектрофотометры и т.д.).

**Методы исследований.** Получение протективных антигенов, анатоксинов и радиотоксинов *E.coli*, *Sal.typhimurium* осуществляли по методикам, описанным Мухаметшиным И.Р. (2002). Для получения протективного антигена, *E.coli* «ПЛ-6» выращивали на МПА при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов, затем биомассу смывали стерильным 0,85%-ным раствором хлорида натрия, готовили микробную суспензию в концентрации 1,2×10<sup>10</sup> м.к./см<sup>3</sup> 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 37<sup>0</sup>С в течение 42 часов с последующей инактивацией токсина в условиях холодильника при 6±2<sup>0</sup>С в течение 12 суток. По истечении указанной экспозиции, микробную взвесь разводили 0,2 М раствором NaCl до концентрации 30×10<sup>9</sup> м.к./см<sup>3</sup> 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-токсими-карбазона, предложенными 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 37<sup>0</sup>С в течение 5-7 суток, затем к культуре для перевода токсина в анатоксин добавляли формалин или гексаметилентетрамин, 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 37<sup>0</sup>С в течение 48 часов, биомассу смывали 0,85%-ным раствором хлорида натрия с pH 7,2. Микробную суспензию трехкратно отмывали центрифугированием, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, доводя концентрацию микробов до 1,2×10<sup>10</sup> м.к./см<sup>3</sup>, 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. Дляdealкаголизации экстракта, полученный материал упаривали на вакуумном испарителе до постоянного объема (например, 1000 см<sup>3</sup> смеси микробной суспензии и экстрагента, объем экстрагента составляет 8±2 см<sup>3</sup>). Dealкаголизированный радиотоксинсодержащий экстракт кашицеобразной консистенции нейтрализовали 0,1 н КОН до нейтрального значения (pH 7,2-7,4).

Для идентификации хиноидного радиотоксина из *E.coli*, dealкаголизированный экстракт подвергали физико-химическому анализу с использованием инфракрасной спектрометрии (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 dealкаголизированного 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 гидроксидов (3410 см<sup>-1</sup>), карбонилов в ароматическом ядре (хиноны: 2865 см<sup>-1</sup>; 1745 см<sup>-1</sup>; 1658 см<sup>-1</sup>;) и связей C-H и C=O (980 см<sup>-1</sup>; 2935 см<sup>-1</sup>). 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 (O-хинонов) - фенолоно-хиноидный радиотоксин (**ФХРТ**).

Инактивацию бактериальных вакцинальных препаратов проводили путем нагревания при  $65^0\text{C}$  в течение 30 минут, а споровых форм – путем гидро-, баротермического воздействия (автоклавирования) при температуре  $120^0\text{C}$  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  $37^0\text{C}$  на твердой питательной среде (МПА), *B.cereus* – при  $30^0\text{C}$  на богатой среде Сабуро; дрожжи при  $32^0\text{C}$  на антигенной сахарозно-аммонийной среде. Выросшие культуры смывали и разводили физиологическим раствором до концентрации  $1\times 10^9$  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 течение 1 суток. Из отдиализированного раствора полисахаридный комплекс (антigen) 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 TE (раствор трис- $\text{HCl}$ -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  $-20^0\text{C}$  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  $37^0\text{C}$ , после чего добавляли сухую лиофилизированную протелиазу K до конечной концентрации 100 мкг/мл. Смесь инкубировали, периодически помешивая, в течение

30 мин при 37<sup>0</sup>С, 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<sup>0</sup>С этилового спирта. Выпавший осадок ДНК собирали центрифугированием, промывали при комнатной температуре для удаления осадков этанола и растворяли в 2 мл буфера ТЕ. Буферный раствор ТЕ готовили путем внесения 1,0 мл раствора трисс-HCl при концентрации 1 моль/л pH 8,0 в градуированный химический стакан, прибавления 0,2 мл буферного раствора трилона-Б в концентрации 0,5 моль/л с pH 8,0 и добавления дистиллированной воды до 100,0 мл; раствор хранили в течение одного месяца при 4-6<sup>0</sup>С.

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

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

A – оптическая плотность раствора при длине волны 256 нм;

$\varnothing$  – 50мкг/мл (при такой концентрации оптическая плотность раствора ДНК при 256 нм равна одной оптической единице);

P – 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: СДНК=0,2×50×100=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 центрифugировали 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:

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

D<sub>270</sub> и D<sub>290</sub> – 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<sub>270</sub> и D<sub>290</sub> 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 анtronового 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 анtronового метода.

Метод основан на способности углеводов после дегидратации образовывать производные фурфурола, которые дают цветную реакцию с анtronом (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 анtronового реактива (0,2 %-ный раствор антрана 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 эталоновых (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<sup>0</sup>С. 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 Огонесяна 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 см<sup>3</sup>, смешивали ее с 27% раствором ЭДТА в соотношении 20:1 и центрифугировали на градиенте плотности фиккол-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 Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. 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 отиттированных 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 трихлор-уксусной 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 Блаурукка) в соответствии с общепринятой в микробиологической практике методом (Справочник ..., 1982).

Для получения продуктов метаболизма *B.bifidum* исходную культуру высевали в анаэробных условиях при 37<sup>0</sup>С в течение 4 суток, определяя в динамике концентрацию бифидобактерий. По достижении максимальной концентрации микробных клеток ( $2 \times 10^9$  КОЕ/мл) и сухого вещества ( $275 \pm 23$  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 суспензировали в дистиллированной воде, после чего вновь центрифугировали в течение 13 минут при 5000 g для отмывания компонентов КЖ (культуральная жидкость).

Данная методика обеспечивала получение очищенного и достаточно плотного осадка биомассы влажностью 80-90%. Биомассу охлаждали до 0<sup>0</sup>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). 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<sup>-1</sup>. Интерпретация ИК-спектров полученного апизана, на которых регистрировались полосы поглощения сопряженных углеродных связей при 1650 см<sup>-1</sup>, карбоксильных – при 1736 см<sup>-1</sup> и 1712 см<sup>-1</sup>, гидроксильных – при 3288 см<sup>-1</sup> и 1170 см<sup>-1</sup>, валентных колебаний метильных и метиленовых групп в области 2900-2810 см<sup>-1</sup>, деформационных колебаний аминогруппы – при 1600 см<sup>-1</sup>, 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 ЛД<sub>50</sub> 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 суспенсирования бактериальных клеток и химических компонентов. Использованные в опытах микроорганизмы (вакцинныe 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 радиоантител 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 «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов» (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 Кельдалю, жира – жиромером, воды, минеральных и сухих веществ, калорийность – общепринятыми методами (Колоболотский В.Г., 1966).

Биологическую ценность мяса, полученного от облученных и иммунизированных до облучения животных, определяли в опытах на растущих крысятках-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).

## 2.2 Результаты собственных исследований

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

На первом этапе исследований вышеупомянутые вещества микробного происхождения (вакцины, пробиотики, антигены, целые и разрушенные клетки микроорганизмов, их компоненты и метаболиты) были испытаны как в нативном (живые), так и убитом виде.

Инактивацию бактериальных вакцинных препаратов проводили путем нагревания при 65<sup>0</sup>С в течение 30 минут, а споровых форм – путем гидро-, баротермического воздействия (автоклавирования) при температуре 120<sup>0</sup>С 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%.

Были проведены исследования по получению протективных веществ микробного происхождения (протективные антигены, радиотоксины, анатоксины *E.coli*), а так же параллельно получен 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. В качестве структурных компонентов веществ микробного происхождения, в работе использовали эндо- и энзотоксины эшерихий, сальмонелл, листерий, микоплазм, которые длительно выращивали на соответствующих питательных средах. В качестве источников эндо- и экзотоксингодержащих материалов использовали супернатанты, центрифугаты и опытные культуры испытуемых видов микроорганизмов. В качестве специальных структурных компонентов микробных клеток, обладающих радиопротекторными свойствами, использовали полисахариды (полисахаридно-пептидные комплексы), полученные из кишечной палочки, сальмонелл и микоплазм. Одним из следующих важнейших структурных компонентов микроорганизмов, обладающих радиозащитным эффектом, являются нуклеиновые кислоты (НК), ДНК и РНК, поэтому 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 вакциной).

В результате проведенной работы были получены 180 видов ВМП, из которых 57 представлены в виде антибактериальных и противовирусных 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 (43), включающих полисахариды, Ви-, О-антитела, 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.

## **2.2.2 Скрининг веществ микробного происхождения на радиозащитную активность в *in vitro* тест-системе**

Полученные вещества микробного происхождения на втором этапе были подвергнуты предварительному (скрининговому) исследованию с использованием модельной *in vitro* тест-системы культивируемых лимфоцитов периферической крови животных. 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. Для имитирования 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%-ном этаноле с последующим микроскопическим цитометрированием. С целью унификации физического состояния вносимых в инкубированные культуры клеток испытуемых средств их переводили в единую – твердую – форму, количество вносимых в суспензию инкубируемых культур клеток (лимфоцитов) при этом составляло от 0,1 до 0,32 мг/мл, а атоксичных структурных компонентов микробных клеток (анатоксинов, полисахаридов, ДНК, НК, липидов, О-, Ви-антител) 0,20±0,05 мг/мл, при этом изучалось возможное токсическое влияние испытуемых веществ микробного происхождения на инкубируемые культуры клеток (лимфоцитов) путем внесения их в среду инкубирования. Результаты цитолитических динамических исследований показали, что внесение вышеуказанных количеств испытуемых агентов в среду культивирования лимфоцитов токсического влияния не оказывало, что послужило основанием для проведения скрининговых исследований по отбору наиболее активных веществ микробного происхождения с целью конструирования на их основе микробного биопрепарата.

Далее проводили скрининговые исследования по оценке радиозащитной активности противобактериальных и противовирусных вакцин описанных ранее. Результаты проведенных исследований показали, что из исходных 54 вариантов вакцин 6 препаратов (сальмонеллезная, туляремийная, дезинтериальная, паратифозная, колибактериозная и вирус-вакцина против гриппа) обладали радиозащитными свойствами. Параллельно изучали возможность и эффективность лечебного варианта применения испытуемых вакциновых препаратов путем пострадиационного внесения ВМП в культуру 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-антителы, эндо- и экзотоксины, нуклеиновые кислоты, ДНК, радиоантителы, 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). Результаты динамических исследований мазков инкубуемых лимфоцитов в присутствии испытуемых средств, показали, 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 радиоантител и радиотоксин кишечной палочки (процент защиты – 74,5; 74,1%), эндотоксин кишечной палочки (73,3%). Вторую позицию по степени радиозащиты занимал О-антител 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. 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. Были проведены опыты по изучению лечебного действия структурных компонентов вышеперечисленных микроорганизмов. Установлено, что 4 препарата обладали лечебной эффективностью, обеспечивая 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 радиозащитной гибели, менее выраженный эффект проявляли нуклеиновые кислоты (ДНК,РНК) обеспечивая 67,3-66,5%-ную выживаемость пораженных ионизирующей радиацией иммуноцитов, последнее место в ряду активности (степень защиты 64,9%) обеспечивал эндотоксин сальмонелл.

Продолжая скрининговые исследования по экспресс-оценке радиозащитной активности полученных веществ микробного происхождения, в следующей серии опытов изучали радиопротекторные свойства пробиотиков (два варианта применения: профилактический и лечебный), эффективность которых представлена в таблице 1.

Кроме вакциновых штаммов, пробиотиков и структурных компонентов лимфоцитов, 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, проведена оценка их радиозащитной и лечебной эффективности.

Таблица 1 – 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

По итогу этапа скрининговых исследований проведены 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 веществ микробного происхождения

На следующем этапе работы проводили исследования по изучению возможности повышения радиозащитной активности ВМП.

В качестве основных тест-микров мы использовали *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и *Sal.typhimurium*, их продукты метаболизма в составе культуральной жидкости, а также иммуномодуляторы и сорбенты: гидроокись алюминия (ГОА), высокодисперсную фракцию гидроокиси алюминия (ГСА) и природные биополимеры из подмора пчел. 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 целью повышения адсорбционной активности гидросиликатов алюминия (бентонита) проводили его активацию путем селективного фракционирования по Прицкой З.В. и др. (1982). Очищенную фракцию бентонита (ОФБТ) использовали в качестве одного из компонентов радиозащитных композиций. Параллельно проводили исследования по получению более активных иммуномодуляторов и активаторов микробного метаболизма и потенциальных усилителей биологической и радиозащитной активности радиопротекторов на основе апизана (радиолиз хитина осуществляли путем облучения депротеинированного и дезацетилированного хитиносодержащего продукта гамма-лучами  $^{137}\text{Cs}$ ). На основе продуктов метаболизма (культуральная жидкость) вышеуказанных микроорганизмов, цельных (осажденная биомасса-центрифугат) и разрушенных клеток (дезинтегратт), высокодисперсной активированной фракции природного минерального сорбента-бентонита и иммуномодулятора нового поколения - апизана были составлены композиции с включением в состав указанных компонентов, условно которые можно поделить на 4 группы: 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.

Полученные композиции ВМП 4 видов микроорганизмов из кишечно-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.

Установлено, что РЗК 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), обладают 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 природного 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 усилиению 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,  $2 \times 10^9$  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* ( $2 \times 10^9$  КОЕ/мл) в сочетании с 2% высокодисперсной фракцией бентонита (ВДФБ).

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 – апизана (для лечебных композиций) или высокодисперсной фракции природного минерального сорбента – бентонита.

В качестве основных компонентов потенциального биорадиопротектора на основе ВМП на основе данных, полученных нами ранее, 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* ПМВ.б (компонент IV), продукты метаболизма В.С-ПМВ.с (компонент V), высокодисперсная фракция природного минерального сорбента бентонита – ВДФБ (компонент VI) и природного биополимера апизана – АПЗ (компонент VII).

Алгоритм конструирования полифункционального композиционного монопрепарата предполагал:

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

Определяли различные соотношения компонентов из микробных клеток *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum*. Микробные суспензии – смеси трех тест-микробов были тестиированы на радиозащитную активность в *in vitro* тест-системе с использованием лимфоцитов

периферической крови. Установлено оптимальное содержание микробных клеток в полученной биомассе, 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* соответственно. 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 I.

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; ПМВс.

По результатам тестирования вышеуказанных соотношений компонентов из метаболитов использованных штаммов-продуцентов в *in vitro* тест системе с использованием облученных лимфоцитов периферической крови установлено, что, базовый компонент, «компонент II» – (жидкая часть) потенциального унифицированного бифункционального биорадиопротектора на основе ВМП должна 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).

В качестве третьего компонента «компонент III» потенциального микробного биорадиопротектора использовали порошки очищенной фракции бентонита (ВДФБ) и биополимера ализана (АПЗ) в количествах, установленных экспериментальным путем, которые составляли 2% и 0,5% к объему смеси компонентов I и II.

Смесь компонентов I, II и III перемешивали на шуттль-аппарате при 80 качаниях в минуту в течение 30 минут при комнатной температуре, затем разливали во флаконы емкостью 100, 200 см<sup>3</sup> и подвергали лучевой стерилизации на гамма-установке «Исследователь» с источником излучения <sup>60</sup>Со при мощности дозы излучения  $1,24 \times 10^{-2}$  Кл/кг\*с и поглощенной дозе излучения 20 кГр.

Определена схема получения разрабатываемого препарата, которая включает следующие стадии: 1) посев штаммов-продуцентов на МПБ и среду Блауорка, культивирование при 37°C в течение 24-48 часов; 2) спектрофотометрическое определение концентрации (плотности биомассы) микробов и их метаболитов с использованием оценочного критерия –коэффициента экстинкции (оптической плотности)  $D=1,04 \pm 0,007$ , что соответствует плотности микробной биомассы  $2,5 \times 10^9$  м.к./мл и продуктов метаболизма  $11,59 \pm 0,007$  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  $1,5 \times 10^9$  м.к/мл,  $0,6 \times 10^9$  м.к/мл и  $0,4 \times 10^9$  м.к/мл микробной биомассы в соответствующих КЖ; 4) тщательное перемешивание смеси микробов и микробных метаболитов на шуттль-аппарате в течение 30 минут при 80 качаниях/мин, розлив во флаконы емкостью 100,200 см<sup>3</sup>, радиостерилизация на гамма-установке «Исследователь» в дозе  $2 \times 10^4$  Гр; 5) хранение при  $t=4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и использование по назначению в качестве радиозащитного препарата.

## 2.2.5 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 центрифugирования 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. 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 10 кроликам внутрибрюшинно согласно методическим указаниям (МУ 2.1.5.720-98) с последующим наблюдением за состоянием животного в течение 28 дней. Установлено, что 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, результаты данных исследований дают основание считать, что испытуемое композиционное средство аллергизирующими свойствами не обладает.

Изучено раздражающее действие сконструированного композиционного потенциального биорадиопротектора, при этом установлено отсутствие раздражающего действия у испытуемого препарата. Эмбриотоксическое действие испытуемого препарата устанавливали после убоя крыс. Отрицательного влияния на клиническое состояние и эмбриогенез животных, внутрибрюшинное введение испытуемого препарата не оказывало.

## **2.2.6 Влияние композиционного препарата на неспецифическую резистентность организма (НР)**

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.

Установлено, 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.

## **2.2.7 Влияние РЗК на систему иммуногемопоэза лабораторных животных**

Изучали влияние испытуемого препарата на систему иммуногемопоэза лабораторных животных. Опыты проводили на тех же животных (белые крысы), которые были использованы при изучении влияния испытуемого препарата на факторы неспецифической резистентности организма (ФНР).

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

В следующей серии опытов изучали влияние композиции на основе ВМП на систему иммунитета у белых крыс. Установлено, что испытуемый препарат обладает иммунотропным 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 состояния системы иммунитета - иммунорегуляторный индекс (ИИ), выражющий соотношение Т-хелперов ( $T_h$ ) и Т-супресоров ( $T_c$ ), которое имело

тенденцию к увеличению. Следовательно, применение композиционного препарата на основе веществ микробного происхождения, обладающего иммунотропным действием при радиоиммуном иммунодефиците, вполне логично, оправдано и целесообразно.

Определялось наличие в составе композиционного препарата специфических антигенов, индуцирующих синтез антирадиотоксических антител. 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 полиантисигена (РЗК) определяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием антителного варианта антирадиотоксического эритроцитарного диагностикума (АТЭД), изготовленного сотрудниками отдела радиобиологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Патент RU №2324176 C1 GO1№33/02 //Иванов А.В., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В., Курбангалеев Я.М., Гайнуллин Р.Р. Опубл. 10.05.2008. Бюлл. №13).

Результаты серологического анализа культуральной жидкости с биомассой тест-штаммов, составляющей основу потенциальной радиозащитной композиции, показали, что исследуемый препарат обладает полным антигенным набором, представленным адгезивным K88-антисигеном, протективным антигеном, анатоксином и радиотоксином, титры которых составляли  $3,49\pm0,7 \log_2$  (K-88-антисиген),  $3,57\pm0,5 \log_2$  (протективный антиген);  $2,45\pm0,7 \log_2$  (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.

## **2.2.8 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, содержание нуклеиновых кислот с использованием метода Спиринга, содержание углеводов с использованием анtronового метода. Изучалось наличие и содержание колицинов, полисахаридов в ассоциации из биомассы и культуральной жидкости, составляющих основу композиционного радиозащитного препарата.

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), сульфагидрильных ферментов (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – ГЛАДГ), лактатдегидрогеназы – (ЛДГ); алкогольдегидрогеназы (АДГ); антиоксидантного фермента – формиатдегидрогеназы (ФДГ).

При этом обнаружено, что наиболее высокую активность в культуральной жидкости проявляли глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Активность сульфагидрильного фермента – алкогольдегидрогеназы была незначительной (в 1,11 раза,  $P\geq0,05$ ) 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 оксиредуктаз, сульфагидрильные и антиоксидантные ферменты, которые играют важную роль

в формировании радиорезистентности и проявлении радиотерапевтического эффекта препарата.

Изучалось так же наличие в составе разрабатываемого радиозащитного препарата аминокислот, витаминов, микро- и макроэлементов, 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; фениаланина – 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. Результаты химических исследований показали, что в культуральной жидкости препарата РЗК содержатся следующие витамины (мкг/мл): В<sub>1</sub> – 5; В<sub>2</sub> – 0,5; В<sub>3</sub> – 20; В<sub>5</sub> – 0,9; В<sub>6</sub> – 3; В<sub>7</sub> – 0,2; В<sub>9</sub> – 0,3; В<sub>10</sub> – 0,1; В<sub>12</sub> – 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,mono- и полисахаридами, нуклеиновыми (ДНК, РНК) кислотами, аминокислотами; окислительно-восстановительными, сульфидрильными и антиоксидантными 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 пострадиационном (лечебном) применении.

## **2.2.9 Изучение возможности усиления синтеза антирадикальных ферментов использованными в работе тест-микробами**

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 радиолиза 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 нами были продолжены исследования по изучению возможности усиления синтеза антирадикальных ферментов тест-штаммов, используемых в

качестве основных компонентов радиозащитного препарата на основе веществ микробного происхождения.

Проведены эксперименты по возможности усиления тест-штаммом (*E.coli* ПЛ-6) синтеза антирадикальных ферментов в процессе адаптации микробы к повышенным дозам ионизирующей радиации и приобретению им радиорезистентности. Установлено, что 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.

У исходного и полученного радиорезистентного мутанта *E.coli* (R<sub>7</sub>) 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±0,07 мг бактериальной биомассы  $1 \times 10^9$  мкг/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 радиоиндукционная резистентность микроорганизма сопровождалась изменением клеточного метаболизма с приобретением способности синтезировать ключевые антиоксидантные ферменты: каталазу, пероксидазу и супероксиддисмутазу. Дальнейшие исследования включали изучение содержание ДНК, ферментов каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы в клеточной суспензии, клеточном экстракте и культуральной жидкости *E.coli* ПЛ-6 и *E.coli* ПЛ-6(R<sub>7</sub>).

Таблица 2 – Содержание ДНК, ферментов каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы в клеточной суспензии, клеточном экстракте и культуральной жидкости *E.coli* ПЛ-6 и *E.coli* ПЛ-6(R<sub>7</sub>)

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

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

Установлено, что в результате многократного радиационного воздействия, тест-штамм *E.coli* ПЛ-6(R<sub>7</sub>) приобрел свойство синтезировать антирадикальные ферменты, придающие тест-микробу радиопротекторные свойства.

Таким образом, в результате радиомикробиологических исследований, получен радиорезистентный (радиомодифицированный) вариант *E.coli* ПЛ-6(R<sub>7</sub>), 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, супероксиддисмутазы,

катализы, глютатионпероксидазы, 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(R<sub>7</sub>) в дальнейшем был использован в качестве одного из основных компонентов – микробной биомассы в многокомпонентном композиционном препарате РЗК.

## **2.2.10 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 динамическое наблюдение, следя за клиническим состоянием, регистрируя число павших и выживших животных. 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).

Установлено, 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

РЗМП 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 РЗМП на белых мышах послужили основанием для испытания препарата на белых крысах и кроликах.

### **2.2.11 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.

Установлено, 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), 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.

### **2.2.12 Оценка радиозащитной активности композиционного препарата на кроликах**

Следующая серия 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.

Установлено, 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. 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. 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  $^{137}\text{Cs}$  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. Оба испытанных препарата на всех трех видах летально облученных лабораторных животных оказывали высокий радиозащитный эффект, обеспечивая 50-75%-ную защиту животных от радиационной гибели.

Из сопоставительного анализа данных установлено, 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 отличии 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.

### **2.2.13 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 костного мозга подчтывали 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.

Гемотоксический эффект облучения начинал развиваться уже в первые сутки, постепенно нарастал и достигал максимальных значений к периоду разгара костномозгового синдрома (7-9 сутки). Развитие пострадиационной 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 ( $KOE_c$ ) - в 3,3 раза.

Применение композиционного препарата РЗК оказывало гемокоррегирующее 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 выражеными: снижение количества эритроцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в подавляющем большинстве случаев было недостоверным, а процессы восстановления их числа происходили более интенсивно.

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.

Изучая антитоксический эффект, опыты проводили 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.

Установлено, 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.

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 ( $5,01 \pm 0,11 \log_2$ ), 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 радиотоксический 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. Показано, 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).

Результаты цитологических исследований костномозгового 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 ингибирирование панцитопении.

Применение препарата оказывало иммунотропное 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. В проведении данных исследований принимала участие д.в.н. Плотникова Э.М., любезно предоставившая коммерческие цитокиновые наборы фирмы «Протеиновый контур» (С.-Петербург).

Однократное подкожное введение испытуемого препарата вызывало повышение концентрации геморегуляторных цитокинов (ИЛ-1, КСФ): во все сроки исследования содержание обоих медиаторов иммуногемопоэза 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 иммуногемопоэза путем ингибирирования иммунотоксических эффектов облучения – панцитопении и миелопрессии, что коррелировало с большей выживаемостью животных.

В следующей серии опытов проводили изучение состояния прооксидантно-антиоксидантной системы организма на фоне применения препарата РЗК у летально облученных животных. Для этого определяли содержание липидных радиотоксинов в МДА-тесте и антирадикальных ферментов с использованием спектрофотометрического метода.

Установлено, 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 под кожное 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 супероксиддисмутазы. 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.

### **2.2.14 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 «Прекос» 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 под кожно 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 (микробный полиантител). 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 автоантител 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.

#### **2.2.14.1 Модификация острой лучевой болезни (ОЛБ) овец на фоне применения композиционного препарата РЗК**

Установлено, что иммунизация животных испытуемыми антигенами оказывала влияние на клинико-гематологические и иммунологические показатели облученных животных.

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. При этом отмечалась также тенденция недостоверного увеличения содержания нейтрофилов, базофилов, эозинофилов и моноцитов. Наиболее существенные изменения отмечены со стороны лимфоцитов - у иммунизированных микробным полиантigenом через 20 дней после введения радиопротектора. Количество этих форменных элементов крови увеличивалось на 13 (1-я группа) и на 11% (2-я группа)( $P<0,05$ ). Предварительная иммунизация овец испытуемыми радиозащитными препаратами оказывала влияние на состояние гуморальных и клеточных факторов иммунитета через 10 дней после введения испытуемых 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. 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 формалинизованных и танизированных по Чизмесу и Байдену 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 ( $P<0,05$ ). 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 же тенденция просматривалась и в отношении иммуноглобулинов класса M. Что касается иммуноглобулинов класса A, то их количество в обоих случаях имело тенденцию к уменьшению.

Под влиянием антигенной стимуляции с использованием препаратов РЗК и МПАГ происходило существенное преобразование иммунологических функций одного из основных элементов лимфоидной ткани – лимфоцитов, которые выявили в специальной тест-системе – реакции бласттрансформации лимфоцитов с использованием митогена – фитогемагглютинина. Установлено, 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).

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 (blastтрансформирующей) функции лимфоцитов, увеличением титра аутоантител, индукцией синтеза противорадиационных (антирадиотоксических) антител, стимуляцией синтеза иммуноглобулинов классов G и M.

При однократном подкожном применении РЗК с профилактической целью за 30 суток до летального облучения овец установлено, 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. Использованная 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 патогномоничные 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 проявление с момента облучения и продолжается до 2-3 суток и характеризовался кратковременным возбуждением или угнетением. Видимые слизистые оболочки были сильно гиперемированы 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 эпилляция 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 эпилляцию 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. 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 полиантigenом (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).

Лучевая болезнь у неиммунизированных овец сопровождалась значительными нарушениями гемопоэза, которые характеризовались кратковременной (в течение первых 3 суток) гипергемоглобинемией, сменяющейся в дальнейшем и до гибели стойкой гипоглобулинемией, эритропенией и резкой лейкопенией ( $P<0,01$ ). У иммунизированных за 30 суток до летального облучения овец лучевая болезнь протекала в более легкой форме, указанные изменения были менее выраженным ( $P>0,05$ ). 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 нарушение гемопоэза у облученных без иммунизации животных. 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 ( $P<0,001$ ). В отличие от только облученных животных (3-я группа), у овец, иммунизированных микробным полиантigenом 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 полиантigenом 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.

При изучении гуморальных факторов иммунитета у облученных на фоне иммунизации и без нее, обнаружено, что предварительная иммунизация овец испытуемыми антигенами обусловливала 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 радиоиндированных антигенов – радиотоксинов. 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 teste 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. 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 регистрировался 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, что этот тест у облученных на фоне иммунизации и без нее имел существенные различия как по срокам, так и от вида использованного радиозащитного препарата. 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  $12,2\pm3,3$  % у животных 3-й группы (контроль облучения),  $28,3\pm3,1$  – 2-й группы, (МПАГ) и  $34,5\pm3,7$  %, 1-й группы (РЗК) против  $55,3\pm4,9$  % – в контроле ( $P<0,05$ ). Только к 28 суткам функциональная активность лимфоцитов у овец 1-й группы (РЗК) восстанавливалась до уровня контрольных значений.

Таблица 3 – Динамика изменения РБТЛ у иммунизированных и летально облученных через 30 сут после прививки овец

Группа	Стат. показатель	Бласттрансформирующая активность лимфоцитов (%) сут							
		исход	3	7	10	14	21	28	45
1	M±	61,3	29,4 <sup>x</sup>	28,5 <sup>x</sup>	28,9 <sup>x</sup>	26,7 <sup>x</sup>	34,5 <sup>x</sup>	43,7	51
	m	5,7	2,9	3,1	3,4	2,5	3,7	5,3	3,4
2	M±	59,9	27,3 <sup>x</sup>	25,7 <sup>x</sup>	25,9 <sup>x</sup>	24,3 <sup>x</sup>	28,3 <sup>x</sup>	36,1 <sup>x</sup>	42,9
	m	4,3	3,1	2,9	3,1	2,7	3,1	4,9	3,6
3	M±	53,8	25,0 <sup>x</sup>	22,3 <sup>x</sup>	19,5 <sup>x</sup>	15,2 <sup>x</sup>	12,2 <sup>x</sup>	-	-
	m	4,1	2,3	1,8	1,9	1,5	3,3	-	-
4	M±	55,1	56,3	54,9	55,5	54,9	55,3	55,2	52,3
	m	5,3	6,1	4,7	5,1	5,7	4,9	5,3	4,6

<sup>x</sup> -  $P<0,05$

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, усилениям синтеза иммуноглобулинов класса G, стимуляции выработки иммунокомпетентных клеток (T- 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 радиоиндукционных лучевых антигенов-радиотоксинов путем нейтрализации их с помощью противорадиационных и антитканевых аутоантител, препятствуя тем самым развитию геморрагического и гемопатологического симтомокомплекса, сопровождающегося катастрофическим снижением количества лейкоцитов и лимфоцитов у неиммунизированных животных.

#### **2.2.14.2 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 24 взрослых овец породы «Прекос» обоего пола со средней живой массой 43,3 кг. Перед постановкой опытов у животных изучали клиническую-гематологическую картину, иммунный фон, определяя количество и функциональную активность T- 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).

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. Обнаружено, что после введения микробного полиантисera 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.

При изучении лейкоцитарной формулы у привитых РЗК и МПАГ за 30, 60 и 90 дней до облучения установлено, что оба использованных антигена вызывали изменения клеток белой крови, которые сводились к увеличению содержания лейкоцитов нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов ( $P>0,05$ ). Отмечено, что тканевой антиген вызывал более выраженный лейкоцитоз-нейтрофило (юные, палочкоядерные), базофило-, эозинофило-

и моноцитостимулирующий эффект. В отличие от тканевого, микробный полиантigen 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).

У животных, привитых микробным полиантigenом, 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. Стимуляция образования и созревания указанных иммунокомпетентных клеток у животных, иммунизированных известным полиантigenом (МПАГ), во все сроки исследования была менее выраженной (в 1,4 раза), чем при применении микробного полиантigenа. Выработка, созревание и выброс в кровяное русло лимфоцитов при стимуляции РЗК сопровождались не только увеличением их количества, но изменением функциональной активности лимфоцитов. 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 полиантigenом, 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. 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 полиантigenом, превосходя таковые у привитых МПАГ в 1,3 раза. 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 миробным полиантigenом в 1,25 раза.

Таким образом, иммунизация животных как известными, так и предлагаемыми антигенами за 30, 60 и 90 суток до облучения оказывало стимулирующее действие на систему гемопоэза и на иммунную систему, вызывая увеличение иммоноцитов (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 выражеными по сравнению с таковыми у овец, привитых известным полиантigenом.

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, иммunoцитов, 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.

### **2.2.15 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 леченых 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. 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. По результатам изучения показателей мяса полученного от облученных животных, установлено значительное снижение показателей мясной продуктивности относительно контроля (заведомо здоровых животных). Изучение химических показателей мяса облученных и леченых препаратом РЗК овец показало, что они имели определенные отличия от формы воздействия на макроорганизм. Изучая биологическое действие мяса, полученного от облученных, и леченых РЗК животных, изучали влияние образцов мяса на воспроизводительную функцию животных. Установлено, 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. Установлено, что применение иммунопрофилактического препарата оказывало модифицирующее действие (радиозащитное) на течение мутагенных свойств, что сопровождалось восстановлением химического состава мяса и биологических его качеств. Обладая широким спектром биологического действия, вместе с тем препарат является малотоксичным, безвредным, не обладает тератогенным, эмбриотоксическим и аллергизирующим свойствами. Мясо животных, обработанных препаратом с лечебнопрофилактической целью, не имеет существенных отличий от такового интактных животных и соответствует требованиям ГОСТов к доброкачественному мясу и имеет одинаковую полноценность с таковыми интактных животных.

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.

### З 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 результаты о целесообразности и эффективности использования их для радиозащиты организма животных на фоне радиогенного стресса. Анализ полученных данных и их обобщение обуславливают следующие выводы:

1. Путем термо- и радионактивации, 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 ЛД<sub>50</sub> лимфоцитов периферической крови и испытуемых соматических и растворимых антигенов тест-штаммов) проведен скрининг полученных веществ микробного происхождения (ВМП) на радиозащитную активность. Из 57 испытанных вакцин выделено 6; из 55 структурных компонентов микробных клеток – 10; из 22 пробиотиков – 5; из 23 спорообразующих и условно-патогенных штаммов микроорганизмов – 6, которые обладали радиозащитной активностью в диапазоне от 50 до 78,9%. Максимальную радиозащитную активность проявляли эндотоксин (76,1%), 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 природный биополимер 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 являлась малотоксичным препаратом (ЛД<sub>50</sub> для белых мышей при подкожном введении составляла 2390 мг/кг, пероральном – 2000 мг/кг), не проявляла местнораздражающего, аллергизирующего, тератогенного и эмбриотоксического действия, и согласно ГОСТ 12.1.007-76 соответствовала IV классу опасности.

6. В культуральной жидкости, полученной от использованных в опытах тест-штаммов, содержались 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 радиоустойчивый вариант *E.coli* «ПЛ-6» (R<sub>7</sub>), обладающий способностью синтезировать ключевые ферменты антирадикальной защиты (каталазу супероксиддисмутазу). Полученный радиомодификант *E.coli* «ПЛ-6» (R<sub>7</sub>) использован в качестве одного из компонентов композиционного радиозащитного препарата РЗК.

8. Однократное подкожное введение РЗК в дозе  $1 \times 10^9$  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 доступа к клеткам мишениям (детерминантам выживаемости) – лимфоцитам и моноцитам, усиления синтеза медиаторов иммуногемопоэза-цитокинов (ИЛ-6, ФНО- $\lambda$ ), 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.

### **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 ионизирующими 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», утвержденный директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 9 ноября 2011 г.

2. Получен радиомодифицированный вариант *E.coli* ПЛ-6 ( $R_7$ ) который используется при конструировании радиозащитных препаратов (представлен на депонирование).

3. В ветеринарную практику для лечения и профилактики радиационных поражений организма 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.

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в российских рецензируемых журналах из Перечня ВАК

1. Смирнова, М.С. Клеточные патологии, связанные с активностью шаперонов во внецитоплазматических компартментах / М.С. Смирнова., О.В. Осипенкова, А.В. Шибаева, А.В. Белякова, Т.В. Кузнецова, Т.Н. Казеева, К.Н. Вагин, Т.О. Волкова, З.Р. Гилязова, Ж.В. Белоусова, Л.Ф. Валиуллин, А.Р. Валеева, Р.А. Сафина, М.А. Гусева, Е.М. Елагина // Успехи современного естествознания. 2010. № 12. - С. 71-72.
2. Конюхов, Г.В. Биотехнология и ее значение в создании радиозащитных препаратов / Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов, Н.Б. Тарасова, К.Н. Вагин, Р.Р. Гайзатуллин // Ветеринарный врач. 2011. № 6. - С. 24-28.
3. Низамов, Р.Н. Радиозащитная активность природного адаптогена в условиях радиогенного стресса / Р.Н. Низамов, Р.Р. Гайзатуллин, Г.И. Рахматуллина, К.Н. Вагин // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2011. № 2 (6). - С. 78-81.
4. Вагин, К.Н. Продукты метаболизма микробов для лечения и профилактики острой лучевой болезни / К.Н. Вагин, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, Г.И. Рахматуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. Т. 206. - С. 27-32.
5. Конюхов, Г.В. Использование веществ микробного происхождения в качестве радиозащитных средств / Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин, Р.Р. Гайзатуллин // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2012. № 1 (7). - С. 128-132.
6. Тарасова, Н.Б. Содержание общего белка и белковых фракций в сыворотке крови лошадей-доноров, используемых при получении противорадиационных препаратов / Н.Б. Тарасова, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин // Ветеринария и кормление. - 2013. - № 6. - С. 16-18.
7. Сычев, К.В. Препарат на основе иммуноглобулинов, обладающий иммуностимулирующим действием / К.В. Сычев, Н.Б. Тарасова, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им.Н.Э.Баумана-2014. Т. 217. - С.255-260.
8. Годованюк, Ю.В. Влияние ионизирующего излучения на окислительно-восстановительные процессы / Ю.В. Годованюк, Н.Б. Тарасова, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин, В.А. Гурьянова// Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им.Н.Э.Баумана-2014. Т. 220. - С.89-91.
9. Тарасова, Н.Б. Ветеринарно-санитарная оценка мяса при комбинированном радиационно-токсическом поражении / Н.Б. Тарасова, Г.В. Конюхов, Э.К. Папуниди, К.Н. Вагин //Ветеринарный врач. 2015. № 2. - С. 40-42.
10. Конюхов, Г.В. Радиозащитная активность композиций на основе метаболитов *E.coli*, *B.bifidum* и иммуномодуляторов нового поколения / Г.В. Конюхов., Р.Н. Низамов, Д.Т. Шарифуллина, Т.Р. Гайнутдинов, К.Н. Вагин; А.С. Титов // Ветеринарный врач. - 2016. - № 6. - С. 36-39.
11. Низамов, Р.Н. Оценка радиозащитных свойств комплексных препаратов на основе продуктов метаболизма *E.coli* / Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, Д.Т. Шарифуллина, А.С. Титов, М.М. Шакуров, К.Н. Вагин // Актуальные вопросы военной теории и практики, результаты исследований по важнейшим проблемам военной науки в области радиационной, химической и биологической безопасности. 5-6 декабря 2017, - Кострома - С. 182-185.
12. Тарасова, Н.Б. Изыскание противолучевых средств из класса индукторов цитокинов /Н.Б. Тарасова, К.Н. Вагин, Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов // Ветеринарный врач. 2018. № 6. - С. 21-25.

13. Гайнутдинов, Т.Р. Способ получения препарата для лечения комбинированного радиационно-термического поражения организма / Т.Р. Гайнутдинов, К.Н. Вагин, Р.Н. Низамов // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2018. Т. 54. № 4. - С. 32-37.
14. Фролов, А.В. Оценка радиозащитной эффективности микробного полиантигена / А.В. Фролов, Рам. Н. Низамов, Н.М. Василевский, К.Н. Вагин, Рус. Н. Низамов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 244. № 4. - С. 207-211.
15. Фролов, А.В. Молочная продуктивность, качество и химический состав молока коров при использовании в рационе кормовых добавок «лакто-гарант», «сп-60» и «сел-плекс» / А.В. Фролов, Р.Р. Гайнуллин, К.Н. Вагин, К.Т. Ишмухаметов, Е.Н. Майорова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 244. № 4. - С. 203-206.
16. Гайнутдинов, Т.Р. Течение острой лучевой болезни на фоне естественного заражение животных агентами биологической природы / Т.Р. Гайнутдинов, А.М. Идрисов, К.Н. Вагин, Н.М. Василевский, Г.Ш. Закирова, Я.М., Курбангалеев, В.Г. Семенов // Ветеринарный врач. 2020. № 6. - С. 15-20.

### **Патенты РФ на изобретения**

1. Патент РФ № 2697828. «Способ получения препарата для профилактики и лечения радиационных поражений организма животных и способ профилактики и лечения радиационных поражений организма животных» / Г.И. Рахматуллина, Рус. Н. Низамов, Р.Н. Низамов, К.Н. Вагин, Г.В. Конюхов, Н.М. Василевский // 21.08.2019. Заявка № 2019117190, от 03.06.2019.
2. Патент на изобретение RU 2660916 С1 «Способ хранения мяса» / А.И. Никитин, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, М.З. Тухватулов, Я.М. Курбангалеев, З.Л. Тухватулов, К.Н. Вагин, А.С. Титов, М.М. Шакуров, В.А. Гурьянова // 11.07.2018. Заявка № 2018100689 от 10.01.2018.
3. Патент на изобретение RU 2694690 С1 «Способ консервирования молока и молочных продуктов» / А.И. Никитин, Р.Н. Низамов, З.Л. Тухфатулов, Г.В. Конюхов, М.З. Тухфатулов, Н.М. Василевский, М.М. Шакуров, Г.Р. Низамова, К.Н. Вагин, Г.И. Рахматуллина // 16.07.2019. Заявка № 2018111387 от 29.03.2018.
4. Патент на изобретение RU 2655802 С1 «Биологически активная кормовая добавка для поросят» / Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, А.И. Никитин, Д.Т. Шарифуллина, Н.М. Василевский, К.Н. Вагин // 29.05.2018. Заявка № 2017126820 от 25.07.2017.
5. Патент на изобретение RU 2641907 С1. «Биологически активная кормовая добавка для сельскохозяйственных животных и птицы» / А.И. Никитин, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, Н.М. Василевский, М.З. Тухватулов, К.В. Сычев, К.Н. Вагин, А.С. Титов // 23.01.2018. Заявка № 2016129774 от 20.07.2016.

### **Основные статьи, опубликованные в журналах, материалах и сборниках конференций**

1. Конюхов, Г.В. Радиофармакологические свойства композиций на основе продуктов метаболизма микроорганизмов и иммуномодуляторов / Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов, Д.Т. Шарифуллина, Т.Р. Гайнутдинов, К.Н. Вагин, А.С. Титов // Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института. ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт»; ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет». 2016. С. 48-52.
2. Вагин, К.Н. Санитарно-гигиенические качества мяса облученных животных, защищенных микробным полиантигеном / К.Н. Вагин, Г.В. Конюхов, Н.Б. Тарасова, Г.И.

Рахматуллина // Научные исследования в области сельскохозяйственных наук. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. 2017. С. 8-10.

3. Вагин, К.Н. Создание радиозащитных препаратов – приоритетное направление радиационной безопасности / К.Н. Вагин, Г.В. Конюхов, Н.Б. Тарасова // Экология и безопасность в техносфере: современные проблемы и пути решения. Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. Юргинский технологический институт. 2017. С. 557-562.

4. Тарасова, Н.Б. Разработка средств и способов производства экологически "чистой" продукции животноводства в зонах техногенных радиационных загрязнений / Н.Б. Тарасова, В.П. Шашкаров, К.Т. Ишмухаметов, В.А. Гурьянова, К.Н. Вагин // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. 2018. № 20. С. 339-342.

5. Рахматуллина, Г.И. Получение и изучение радиозащитной активности препаратов на основе веществ микробного происхождения / Г.И. Рахматуллина, К.Н. Вагин // Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина. 2018. С. 94-97.

6. Вагин, К.Н. Декорпорирующая активность препаратов на основе апипродуктов и пчел среднерусской породы / К.Н. Вагин, Р.Н. Низамов, К.Т. Ишмухаметов // Состояние и перспективы развития среднерусской породы пчел. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. 2018. С. 75-78.

7. Сычев, К.В. Изучение возможности повышения радиозащитной активности веществ микробного происхождения / К.В. Сычев, К.Н. Вагин, Р.Н. Низамов // Экология и безопасность в техносфере: современные проблемы и пути решения. Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Юргинский технологический институт. 2018. С. 360-363.

8. Вагин, К.Н. Создание радиозащитных препаратов – приоритетное направление радиационной безопасности / К.Н. Вагин, Г.В. Конюхов, Р.Н. Низамов, Н.М. Василевский, Н.Б. Тарасова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина. 2018. С. 35-38.

9. Шарифуллина, Д.Т. Получение радиозащитных препаратов на основе продуктов микробного метаболизма и природных минералов / Д.Т. Шарифуллина, Р.Н. Низамов, К.Н. Вагин, А.С. Титов, М.М. Шакуров // Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина. 2018. С. 107-110.

10. Низамов, Р.Н. Детоксикационная и гомеопротекторная активность сывороточно-бифидогенной композиции (сбк) на фоне комбинированного радиационно-термического поражения организма / Р.Н. Низамов, Т.Р. Гайнутдинов, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин, Н.М. Василевский, И.Р. Юнусов / Аграрная наука – сельскому хозяйству. Сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах. 2019. С. 327-329.

11. Гурьянова, В.А. Перекисное окисление липидов при воздействии ионизирующей радиации на печень / В.А. Гурьянова, Н.Б. Тарасова, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин, К.Т. Ишмухаметов, Н.М. Василевский // Аграрная наука – сельскому хозяйству. Сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах. 2019. С. 281-283.

12. Тарасова, Н.Б. Влияние иммуноглобулина на иммунокомпетентные клетки у облученных овец на фоне Т-2 токсикоза / Н.Б. Тарасова, В.А. Гурьянова, Г.И. Рахматуллина, К.Н. Вагин, К.Т. Ишмухаметов // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы Национальной научно-практической конференции. В 2-х томах. 2019. С. 242-245.

13. Вагин, К.Н. Радиационно-гигиеническая экспертиза объектов ветнадзора Республики

Мордовия / К.Н. Вагин, Г.И. Рахматуллина, К.Т. Ишмухаметов, И.Р. Юнусов, Г.В. Конюхов, Н.Б. Тарасова, Н.М. Васильевский / Наука и образование – 2018. Материалы всероссийской научно-практической конференции. 2019. С. 351-356.

14. Конюхов, Г.В Диагностикум для индикации токсических соединений в организме облученных животных / Г.В. Конюхов, Н.Б.Тарасова, Р.Н. Низамов, К.Т. Ишмухаметов, К.Н. Вагин / Традиции и инновации в развитии АПК. Материалы международной научно-практической конференции. 2019. С. 246-251.

15. Галлямова, М.Ю Радиационно-гигиеническая экспертиза объектов ветнадзора республики Крым / М.Ю. Галлямова, К.Т. Ишмухаметов, К.Н. Вагин, Г.И. Рахматуллина, Р.М. Асланов // Инновационные тенденции развития российской науки. Материалы XIII Международной научно-практической конференции молодых ученых. 2020. С. 62-64.

16. Шакуров, М.М. Изучение радиозащитных свойств препаратов на основе продуктов метаболизма *E. coli* и природных минералов / М.М. Шакуров, Р.Н. Низамов, К.Н. Вагин, К.Т. Ишмухаметов, М.Ю. Галлямова // Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса. Юбилейный сборник научных трудов XIII международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию Донского государственного технического университета (Ростовского-на-Дону института сельхозмашиностроения), в рамках XXIII Агропромышленного форума юга России и выставки «Интерагромаш». В 2-х томах. 2020. С. 415-418.

17. Низамов, Р.Н. Направленное изменение фенотипа бактерий *E. coli* и *B. bifidum* с использованием ионизирующей радиации / Р.Н. Низамов, М.Ю. Галлямова., И.В. Савкин, К.Н. Вагин, Г.И. Рахматуллина // Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач апк. материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 90-летию образования казанской зоотехнической школы (факультет ветеринарной медицины). Совет молодых ученых и специалистов ФГБОУ ВО Казанской ГАВМ. Казань, 2020. С. 335-337.

18. Ишмухаметов, К.Т. Радиационно-гигиеническая экспертиза объектов ветнадзора орловской области / К.Т. Ишмухаметов, К.Н. Вагин, Р.Р. Гайнуллин, Г.И. Рахматуллина, И.Р. Юнусов // Природноресурсный потенциал, экология и устойчивое развитие регионов России. Сборник статей XVIII Международной научно-практической конференции. 2020. С. 53-56.

19. Курбангалеев, Я.М. Определение радиотоксинов в продуктах, подвергнутых радиационной технологии / Я.М. Курбангалеев, Н.М. Васильевский, К.Н. Вагин // От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение производства и переработки продукции растениеводства. Ресурсосберегающие технологии, технические средства и цифровая платформа АПК. Сборник материалов международной научно-практической конференции. 2020. С. 51-53.

20. Вагин, К.Н. Вещества микробного происхождения как основное сырье для конструирования радиозащитного препарата / К.Н. Вагин, Р.Н. Низамов, В.Г. Семенов // Современное состояние и перспективы развития ветеринарной и зоотехнической науки: сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Чебоксары, 2020.- С. 215-219.

### **Статьи в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science**

1. Golovanova, A.M. A composite therapeutic preparation for radioisotope elimination: theoretical presuppositions / A.M. Golovanova, M.N. Mukminov, R.N. Nizamov. K.V. Sychev, K.N. Vagin // International Journal of Pharmacy and Technology. 2016. T. 8. № 4. С. 24558-24564.

2. Nikitin, A.I. Study of radioprotective properties of *E.coli* metabolites / A.I. Nikitin, R.R. Gaizatullin., G.V. Koniukhov, R.N. Nizamov, N.B. Tarasova, K.N. Vagin // International Journal of Pharmacy and Technology. 2016. T. 8. № 2. С. 14328-14340.

3. Galiullina, A.V. Accumulation and redistribution of radionuclides in honey bees and apiary

products in the republic of Tatarstan, Russia / A.V. Galiullina, R.N. Nizamov, K.N. Vagin, K.V. Sychev, D.G. Vakilova, M.N. Mukminov // Astra Salvensis. 2017. Т. 2017. С. 581-590.

4. Plotnikova, E.M. Virus-reproducing ability of growth media containing immunogenesis mediators / E.M. Plotnikova, I.A. Nesterova, R.N. Nizamov, K.N. Vagin, R.R. Gainullin // Systematic Reviews in Pharmacy, 2020, 11(11), стр. 281-284.