

Н.И. Лисина, К.Ю. Романова, Л.П. Сычева, Л.М. Рождественский

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВОЛУЧЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЛАГЕЛЛИНА ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ И МИКРОЯДЕРНОМУ ТЕСТУ

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

Контактное лицо: Нина Ивановна Лисина: ni-lisina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Сравнительная оценка эффективности отечественного препарата флагеллин (разработка ГНИИ особо чистых биопрепаратов, СПб) в расширенном диапазоне сроков введения препарата до и после облучения, а также оценка возможности использования микроядерного теста в качестве биомаркера его эффективности.

Материал и методы: Работа выполнена на мышах самцах ICR CD1 массой 20–22 г. Радиозащитную эффективность флагеллина оценивали по 30-суточной выживаемости подопытных животных в сравнении с контрольными группами. Цитогенетический эффект оценивали микроядерным тестом в полихроматофильных эритроцитах (МЯ-ПХЭ) костного мозга мышей. Облучение проводили на рентгеновской установке РУСТ М1 при мощности дозы 1,1 Гр/мин в интервале доз от 7 до 10 Гр при оценке выживаемости и в дозе 1 Гр для микроядерного теста. Флагеллин вводили внутрибрюшинно по 0,2 мг/кг за 18 ч и 30 мин до облучения, через 10 и 30 мин после облучения. Животным контрольных групп в те же сроки и в том же объеме вводили растворитель – фосфатно-альбуминовый буфер.

Результаты: Наиболее эффективным оказалось применение флагеллина за 30 мин и через 10 мин по отношению к облучению (выживаемость при 8,5 Гр 92 % и 78 %, при 9 Гр 81 % и 55 % соответственно) при выживаемости в контроле 29 % и 0. При наиболее исследованном варианте введения флагеллина за 30 мин до облучения значения фактора изменения дозы на уровне общепринятых оценок LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄, составили 1,3, 1,2 и 1,2 соответственно.

Выводы: Целесообразно еще больше расширить временной диапазон применения флагеллина, особенно после облучения. Использование метода оценки доли полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге позволило выявить оптимальные сроки введения препарата намного быстрее, чем по выживаемости (МЯ-ПХЭ тест осуществляли через 24 ч после облучения). Показатель МЯ-ПХЭ может рассматриваться как потенциальный биомаркер медикаментозно повышенной радиорезистентности (ранее это было показано в наших исследованиях в отношении беталейкина, индралина и рибоксина).

Ключевые слова: *противолучевые препараты, флагеллин, рентгеновское излучение, мыши, радиозащитная эффективность, микроядерный тест, полихроматофильные эритроциты*

Для цитирования: Лисина Н.И., Романова К.Ю., Сычева Л.П., Рождественский Л.М. Сравнительная оценка противолучевой эффективности флагеллина по выживаемости и микроядерному тесту // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021. Т. 66. № 4. С.13–17.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-13-17

Введение

Способность флагеллина защищать подопытных животных при введении его в относительно малых дозах за короткое время до и после облучения в летальных дозах и даже в дозах, превышающих минимальную абсолютно летальную дозу, была отмечена рядом зарубежных и отечественных авторов. В настоящее время в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна проводятся исследования противолучевой эффективности флагеллина в разных схемах – при профилактическом и лечебном его применении.

Целью данной работы является сравнительная оценка противолучевой эффективности отечественного препарата флагеллин, разработанного в ГНИИ особо чистых биопрепаратов (ОЧБ) в расширенном диапазоне сроков введения препарата до и после лучевого воздействия, а также оценка возможности использования доли ПХЭ с микроядрами (МЯ-ПХЭ) в костном мозге мышей в качестве биомаркера его эффективности.

Материал и методы

Работа выполнена на 250 мышах-самцах ICR CD1 массой 20–22 г, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино». При работе с экспериментальными животными соблюдали требования и условия, изложенные в нормативных и правовых документах о порядке проведения экспериментальных работ с применением животных [1].

Мышей содержали в поликарбонатных клетках на установке ИВК (индивидуальная вентиляция клеток) с подачей стерильного воздуха. (Фармбиолойн, Финлян-

дия). Животные содержались на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде и пище. Случайным отбором формировали опытные и контрольные группы по 8 – 10 животных.

В нашей работе была использована делетированная форма рекомбинантного флагеллина (производство ГосНИИ ОЧБ, С-Пб). Лиофилизат флагеллина растворяли в фосфатно-альбуминовом буфере. Препарат в дозе 0,2 мг/кг вводили мышам опытных групп однократно внутрибрюшинно за 18 ч и 30 мин до начала облучения и через 10 и 30 мин после него. Животным контрольных групп в то же время и в тех же объемах вводили растворитель. Острое рентгеновское облучение осуществляли на установке РУСТ М1 при напряжении 200 кВп, токе на трубке 2,5 мА, алюминиевом фильтре 1,5 мм. Мощность дозы облучения составляла 1,1 Гр/мин. Поглощенные дозы облучения находились в интервале 7–9,5 Гр при оценке выживаемости облученных животных. Для оценки дозовой зависимости были сформированы группы мышей, которых облучали дополнительно в дозах 1, 3, 5 Гр. Антимутагенную активность флагеллина оценивали только при воздействии дозы излучения 1 Гр.

Радиозащитную эффективность флагеллина оценивали по 30-суточной выживаемости подопытных животных и по средней продолжительности жизни (СПЖ) павших мышей в сравнении с контрольными группами. Цитогенетический эффект оценивали микроядерным тестом в полихроматофильных эритроцитах (МЯ-ПХЭ) костного мозга мышей. Препараты клеток

Таблица 1

Выживаемость облученных мышей в контрольных и защищенных флагеллином группах
Survival of irradiated mice in control and flagellin-protected groups

№ п/п	Доза, Гр	Выживаемость в различных экспериментальных группах, %				
		Контроль	Флагеллин			
			За 18 ч	За 30 мин	Через 10–15 мин	Через 30 мин
1.	10	0		12,5		
2.	9,5	0		62,5		0
3.	9	0	40	81	55	17
4.	8,5	29	78	92	78	60
5.	8	60		100		
6.	7,5	87,5		100		

Таблица 2

Выживаемость мышей в контрольных и опытных группах при введении флагеллина до и после облучения на разных уровнях оценок ФИД по показателю выживаемости в пробитах
Survival of mice in the control and experimental groups with the introduction of flagellin before and after irradiation at different levels of DCF estimates in terms of survival in probit

	Условия опытов	Уравнение регрессии	Оценка ФИД по показателю выживаемости					
			пробит 5		пробит 4		пробит 6	
			Гр	ФИД	Гр	ФИД	Гр	ФИД
1	Контроль	$y=17,8-1,6x$	8	1,0	8,6	1,0	7,4	1,0
2	Фл за 18 ч	$y=20,6-1,75x$	8,9	1,1	9,5	1,1	8,3	1,1
3	Фл за 30 мин	$y=14,9-1,0x$	9,9	1,2	10,9	1,3	8,9	1,2
4	Фл через 10–15 мин	$y=15,4-1,13x$	9,2	1,15	10,1	1,2	8,3	1,1
5	Фл через 30 мин	$y=23,4-2,13x$	8,6	1,07	9,1	1,1	8,2	1,1

костного мозга для учета микроядер были приготовлены общепринятым способом в соответствии с методическими рекомендациями [2–5]. Анализировали по 1000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) от каждого животного для учета ПХЭ с микроядрами. Долю ПХЭ от суммы ПХЭ и нормохромных эритроцитов определяли при дополнительном подсчете 200 эритроцитов.

Результаты опытов подвергали статистической обработке по программе Statistica for Windows, версия 6. Статистическую обработку результатов по учету микроядер, а также сравнение доли ПХЭ от суммы всех эритроцитов в контрольных и опытных группах проводили с помощью критерия Манна–Уитни при уровне значимости для каждого из сравнений 0,05. Критерием являлось статистически значимое изменение исследуемого показателя, по крайней мере, в одной из опытных групп по сравнению с контрольной. Для определения дозовой зависимости проводили регрессионный анализ.

Результаты и обсуждение

Данные о выживаемости мышей контрольной и защищенных флагеллином групп представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, наиболее эффективным оказалось применение флагеллина за 30 мин и через 10 мин по отношению к облучению (выживаемость при 8,5 Гр – 92 % и 78 %; при 9 Гр – 81 % и 55 % соответственно) при выживаемости в контроле 29 % и 0. Противолучевая эффективность флагеллина, примененного за 30 мин до облучения, сохраняется и при воздействии доз излучения, превышающих в данных условиях эксперимента минимальную абсолютно летальную дозу ЛД_{95/30} (9,5 – 10 Гр).

Анализ данных по СПЖ показывает, что почти все мыши, и опытные и контрольные, погибали в период костномозгового синдрома острой лучевой болезни – от 10 до 16 сут. Для количественного анализа эффективности флагеллина по критерию фактора изменения дозы (ФИД) были построены кривые выживаемости (рис. 1).

Для представленных на рис. 1 кривых доза–эффект в контроле и опыте были рассчитаны их аналитические выражения:

Контроль: $y = 17,8 - 1,6x$
 Фл за 18 ч $y = 20,6 - 1,75x$
 Фл за 30 мин: $y = 14,9 - 1,0x$
 Фл через 10 мин: $y = 15,4 - 1,13x$
 Фл через 30 мин : $y = 23,4 - 2,13x$,

где: y – 30-суточная выживаемость (пробит), x – доза облучения (Гр).

На рис. 1 и в табл. 2 видно, что все значения эффекта для всех рассчитанных кривых доза–эффект и в контроле и в опыте находятся в пределах пробитов 6 – 4, что позволяет оценить значения ФИД для опытных групп на уровне общепринятых оценок ЛД₈₄, ЛД₅₀ и ЛД₁₆. Так, ФИД для групп наиболее эффективного применения флагеллина за 30 мин до и через 10 мин после лучевого воздействия составляет 1,3; 1,2; 1,2 и 1,2; 1,15; 1,1 соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что флагеллин оказывает наиболее выраженное противолучевое действие при профилактическом

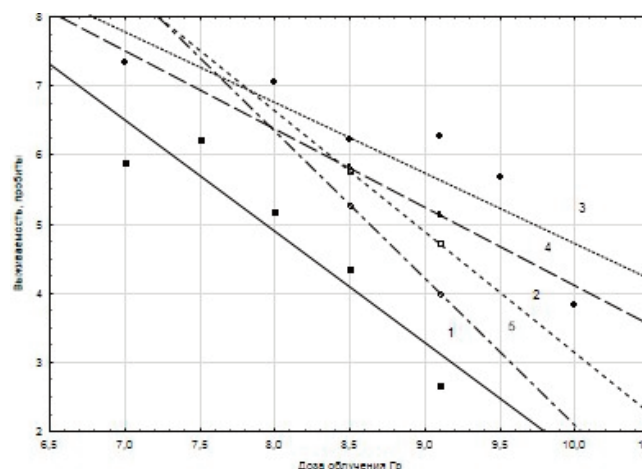


Рис. 1. Кривые выживаемости облученных мышей в опыте и контроле
 1 – Контроль; 2 – Фл за 18 ч; 3 – Фл за 30 мин;
 4 – Фл через 10–15 мин; 5 – Фл через 30 мин
 Fig. 1. Survival curves of irradiated mice in experiment and control
 1 – Control; 2 – Fl for 18 hours; 3 – Fl in 30 min;
 4 – Fl in 10–15 min; 5 – Fl in 30 min

Таблица 3

Зависимость выхода МЯ-ПХЭ от сроков введения флагеллина до и после облучения в дозе 1 Гр
Dependence of the yield of MN-PCE on the timing of flagellin administration before and after irradiation at a dose of 1 Gy

	Условия опыта	Средняя частота ПХЭ с микроядрами после облучения в дозе 1 Гр на 1000 ПХЭ	Равноэффективная доза в контроле по количеству МЯ-ПХЭ в группах с флагеллином (x)	ФИД по МЯ-ПХЭ
1	Фл за 18 ч	16±4,2	1,92	0,5
2	Фл за 30 мин	5,7±3,0	0,25	4
3	Фл через 10–15 мин	5,5±1,8	0,28	3,6
4	Фл через 30 мин	8,8±1,6	0,77	1,29

и лечебном его применении за короткое время (за 30 мин и через 10 мин) по отношению к облучению.

В опытах по оценке противолучевой эффективности флагеллина микроядерным методом МЯ-ПХЭ в костном мозге мышей при остром лучевом воздействии в дозе 1 Гр выявлено статистически значимое снижение частоты МЯ-ПХЭ по отношению к контролю в большинстве вариантов применения флагеллина за исключением срока 18 ч до облучения (табл. 3).

При изучении антимутагенной активности препарата по микроядерному тесту защитный эффект обнаружен при вариантах введения препарата за 30 мин и через 10 и 30 мин после облучения в дозе 1 Гр и в целом коррелировал с оценками по выживаемости. Для расчета ФИД по микроядерному тесту использовали дозовую зависимость выхода МЯ-ПХЭ в контроле в диапазоне доз облучения 0 – 5 Гр (рис. 2, табл. 3). Была проведена оценка противолучевого эффекта по тесту МЯ-ПХЭ только для одной дозы облучения 1 Гр.

Для представленной на рис. 2 кривой доза–эффект была рассчитана регрессионная зависимость: $y = 3,9 + 6,3x$, где y – выход МЯ-ПХЭ (на 1000 эритроцитов); x – доза облучения (Гр). При расчете ФИД по показателю МЯ-ПХЭ вставляли значения показателя при разных сроках введения флагеллина в качестве переменной y . Затем рассчитывали переменную x , получая расчетную равноэффективную дозу в контроле. Разделив отпущенную дозу 1 Гр на расчетную равноэффективную дозу в контроле, получали значения ФИД (табл. 3).

При этом значения ФИД оказались значительно выше, чем по интегральному показателю выживаемости (4 при сроке введения за 30 мин и 3,6 через 10 мин после облучения). Это может быть связано с отличием доз облучения, при которых оценивалась эффективность противолучевых

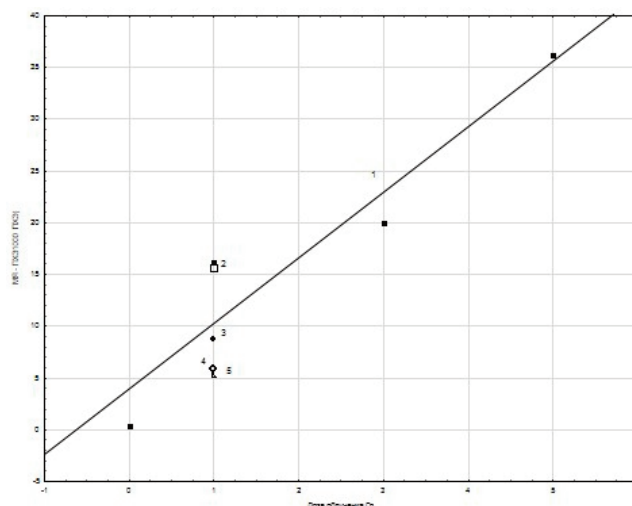


Рис. 2. Зависимость выхода МЯ-ПХЭ в контроле в диапазоне 0–5 Гр и в вариантах различных сроков введения флагеллина при дозе облучения 1 Гр
 1 – Контроль, 2 – Фл за 18 ч, 3 – Фл через 30 мин, 4 – Фл за 30 мин, 5 – Фл через 15 мин

Fig. 2. Dependence of the yield of MN-PCE in the control in range 0–5 Gy and in variants of different terms of flagellin administration at an irradiation dose of 1 Gy
 1 – Control, 2 – Fl in 18 h, 3 – Fl in 30 min, 4 – Fl in 30 min, 5 – Fl in 15 min

препаратов по двум указанным тестам.

Из табл. 2, 3 и рис. 3 видно, что частота выхода полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей при использовании флагеллина, примененного в разные сроки до и после облучения в дозе 1 Гр, в целом коррелировала с оценками по выживаемости

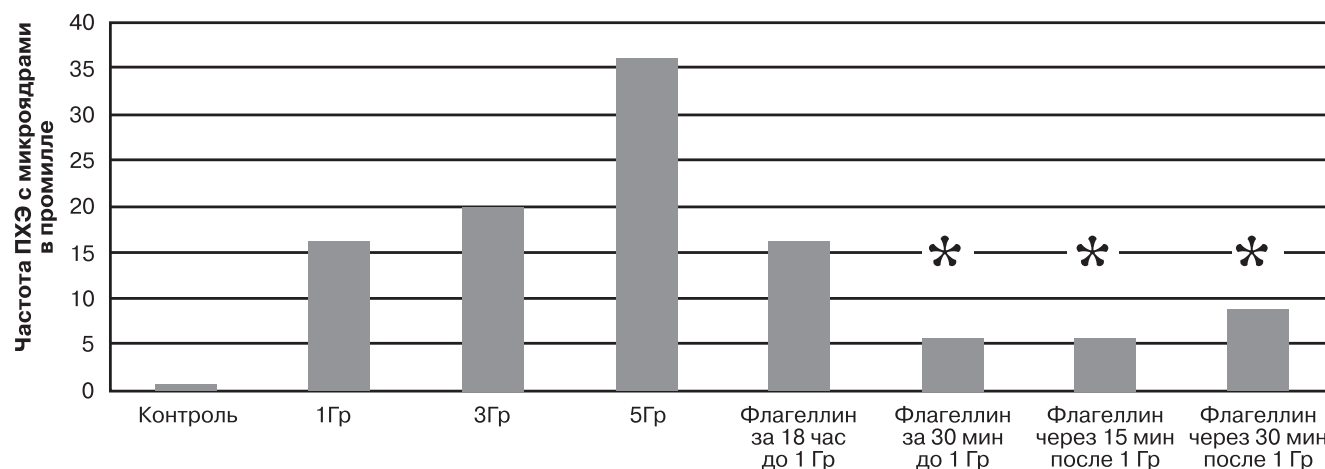


Рис. 3 Частота МЯ-ПХЭ в костном мозге мышей при действии ионизирующей радиации и флагеллина (* – отличие от группы 1 Гр в контроле по критерию Манна–Уитни)

Fig. 3 Frequency of MN – PCE in the bone marrow of mice under the action of ionizing radiation and flagellin (* - difference from group 1 Gy in control according to the Mann – Whitney test)

Таблица 3

Сопоставление эффектов различных вариантов применения флагеллина по тестам выживаемости и ПХЭ с микроядрами

Comparison of the effects of different variants of flagellin use by survival tests and PCE with micronuclei

Условия опыта	ФИД	
	Выживаемость (пробит 5)	МЯ-ПХЭ (на 1000 ПХЭ)
Фл за 30 мин	1,2	4,0
Фл через 10–15 мин	1,15	3,6
Фл через 30 мин	1,07	1,3
Фл за 18 ч	1,1	0,5

мышей в тех же условиях экспериментов. Наибольшее понижение частоты появления МЯ-ПХЭ наблюдалось при применении флагеллина за те же сроки до и после облучения в дозе 1 Гр (за 30 мин до и через 10–15 мин после), как и при изучении выживаемости животных в опытах с теми же условиями введения флагеллина.

В табл. 4 представлены данные сравнения оценок эффектов выживаемости и выхода МЯ-ПХЭ по критерию ФИД при различных вариантах применения флагеллина. Хотя ФИДы по количественному выражению расходятся, но порядок убывания вариантов применения флагеллина по эффективности в целом сохраняется. Так, флагеллин оказывает наиболее выраженное противолучевое действие при профилактическом и лечебном его применении за короткое время (за 30 мин и через 10–15 мин) по отношению к облучению на уровне пробита 5 – значения ФИД самые высокие (1,2 и 1,15); то же самое и для частоты МЯ-ПХЭ – значения ФИД самые высокие (4 и 3,6). Различия между сравниваемыми значениями ФИД применения флагеллина через 30 мин и за 18 ч по критерию Стьюдента оказались недостоверными.

Способность флагеллина при введении его за короткое время до облучения летальными дозами защищать подопытных животных была отмечена ранее рядом зарубежных и отечественных авторов [6–14].

На основании результатов, полученных нами в опытах на мышах ICR СД1, можно сделать вывод, что наиболее эффективным оказалось применение флагеллина за 30 мин до и через 10 мин после облучения: так при 8,5 Гр выживаемость составила 92 % и 78 %, при 9 Гр – 81 % и 55 % соответственно при выживаемости в контрольной группе – 29 % и 0.

В работах отечественных авторов большое внимание также было уделено изучению радиозащитной эффективности флагеллина в опытах на белых беспородных мышах при его применении за 15–30 мин до облучения в смертельных дозах 7–8,5 Гр [8–14]. В этих опытах выживало от 39 до 87 % подопытных животных при выживаемости 20 % в контроле в зависимости от дозы препарата.

Не выявлено значимых различий между опытными группами в условиях лечебного применения флагеллина в большом диапазоне доз препарата от 2 до 1000 мкг/кг, примененного через 15–30 мин после облучения в дозе 7 Гр. В условиях этих экспериментов выжило от 39 до 50 % мышей в разных группах [13].

В наших предыдущих опытах в более широких границах доз облучения (7–10 Гр) к 30-м суткам выжило 62 % (9,5 Гр) и 12% (10 Гр) облученных мышей при полной гибели мышей в контрольной группе [14].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 16.03.2021. Принята к публикации: 21.04.2021.

При наиболее исследованном нами варианте введения флагеллина профилактически за 30 мин до облучения значения ФИД на уровне общепринятых оценок LD₁₆, LD₅₀ и LD₈₄ составили 1,3; 1,2 и 1,2 соответственно.

При изучении антимуутагенной активности препарата по микроядерному тесту защитный эффект обнаружен при вариантах введения препарата за 30 мин и через 10 и 30 мин после облучения в дозе 1 Гр, и в целом он коррелировал с оценками по выживаемости. При этом значения ФИД оказались значительно выше, чем по интегральному показателю выживаемости (2,3 и 3,6 при сроках введения за 30 мин и через 10 мин после облучения). Это может быть связано с отличием доз облучения, при которых оценивалась эффективность флагеллина по указанным показателям.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения противолучевого действия отечественного препарата флагеллина. Представляет интерес еще больше расширить временной диапазон применения препарата, особенно после облучения. Использование метода оценки доли МЯ-ПХЭ в костном мозге мышей позволило выявить оптимальные сроки введения препарата намного быстрее, чем по выживаемости, так как ответ по МЯ-ПХЭ получили раньше (тест МЯ-ПХЭ осуществляли через 24 ч после облучения). Показатель МЯ-ПХЭ может рассматриваться как потенциальный биомаркер медикаментозно повышенной радиорезистентности (ранее это было показано в наших исследованиях в отношении беталейкина, индралина, рибоксина и флагеллина) [5,16].

Другим перспективным методом оценки антимуутагенного действия противолучевых препаратов является микроядерный метод на лимфоцитах периферической крови лабораторных животных. Этот метод более трудоемок, чем МЯ-тест на ПХЭ, так как требует культивирования клеток и стимуляции их к делениям. Однако его преимуществом является возможность анализа эффекта в более широком диапазоне доз и оценки эффекта в отдаленные сроки после лучевого воздействия, а также возможность анализа эффекта в клетках крови на нескольких сроках (без забоя животных).

Заключение

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что флагеллин оказывает защитное действие в разных схемах экспериментов – при профилактическом и лечебном его применении за короткое время (за 30 мин и через 10 мин) по отношению к облучению. При наиболее исследованном варианте введения флагеллина за 30 мин до облучения значения ФИД на уровне общепринятых оценок LD₁₆, LD₅₀ и LD₈₄ составили 1,2; 1,3 и 1,2 соответственно.

Использование метода оценки доли полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге позволило выявить оптимальные сроки введения препарата намного быстрее, чем по выживаемости (МЯ-ПХЭ тест осуществляли через 24 ч после облучения). Показатель МЯ-ПХЭ может рассматриваться как потенциальный биомаркер медикаментозно повышенной радиорезистентности (ранее это было показано в наших исследованиях в отношении беталейкина, индралина и рибоксина).

Выявлен антимуутагенный эффект флагеллина при его введении за 30 мин до воздействия, а также через 10 и 30 мин после воздействия ионизирующей радиации.

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

Financing. The study had no sponsorship.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 16.03.2021. Accepted for publication: 21.04.2021.

Comparative Evaluation of the Anti-Radiation Efficacy of Flagellin by Survival and Micronucleus Test

N.I. Lisina, K.Yu. Romanova, L.P. Sycheva, L.M. Rozhdestvensky

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Nina Ivanovna Lisina: ni-lisina@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: Comparative evaluation of the effectiveness of the domestic drug flagellin (development of the State Research Institute of High-Purity Biological Products, St. Petersburg) in an extended range of drug administration periods before and after irradiation, as well as evaluation of the possibility of using the micronucleus test as a biomarker of its effectiveness.

Material and methods: The work was performed on male ICR CD1 mice weighing 20–22g. The radioprotective effectiveness of flagellin was evaluated by the 30-day survival rate of experimental animals in comparison with control groups. The cytogenetic effect was evaluated by a micronucleus test in polychromatophilic erythrocytes (MJ-PCE) of mouse bone marrow. Irradiation was performed on the RUST M1 X-unit at a dose rate of 1.1 Gy/min in the dose range from 7 to 10 Gy for survival assessment and at a dose of 1 Gy for the micronucleus test. Flagellin was administered intraperitoneally at 0.2 mg/kg for 18 h and 30 min before irradiation, 10 and 30 min after irradiation. The animals of the control groups were injected with a solvent – phosphate-albumin buffer at the same time and in the same volume.

Results: The most effective was the use of flagellin for 30 min and 10 min in relation to radiation (survival at 8.5 Gy 92 % and 78 %, at 9 Gy 81 % and 55 %, respectively) with survival in the control 29 % and 0. In the most studied version of the introduction of flagellin 30 minutes before exposure, the FID values at the level of generally accepted estimates LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄, were 1.3; 1.2 and 1.2, respectively.

Conclusions: It is of interest to further expand the time range of the use of flagellin, especially after irradiation. The use of the method of estimating the proportion of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow allowed us to identify the optimal timing of drug administration much faster than in terms of survival (MJ-PCR test was performed 24 hours after irradiation). The MJ-PHE indicator can be considered as a potential biomarker of drug-induced increased radioresistance (this was previously shown in our studies for betaleukin, indralin, and riboxin).

Key words: anti-radiation drugs, flagellin, X-radiation, mice, radioprotective efficacy, micronucleus test, polychromatophilic erythrocytes

For citation: Lisina NI, Romanova KYu, Sycheva LP, Rozhdestvensky LM. Comparative Evaluation of the Anti-Radiation Efficacy of Flagellin by Survival and Micronucleus Test. Medical Radiology and Radiation Safety. 2021;66(4):13-17.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-13-17

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб: Rus-Lasa «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными» 2012, 48 с.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
3. Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future // Environmental and Molecular Mutagenesis. 1991. Vol. 18. P. 277–291.
4. OECD Guideline for the testing of chemicals №474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Adopted 21st July 1997. 10 p.
5. Сычева Л.П., Лисина Н.И., Щеголева Р.А., Рождественский Л.М. Антимутагенное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 4. С.388–393.
6. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C., et al. An Agonist of Toll-lair Receptor 5 has Radioprotective Activity in Mouse and Primate models // Science 2008. V. 320. No. 5873. P. 226–230.
7. Krivokrysenko VN, Shakhov AN, Gudkov AV, Feinstein E. Identification of G-CSF and IL-6 as Candidate Biomarkers of GBLB502 Efficacy as a Medical Radiation Countermeasure // JPET Fast Forward. 2012 as DOI: 0.1124/jpet.112.196071. P. 1–46.
8. Гребенюк А.Н., Аксенова Н.В., Петров А.В. и др. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности // Медицинский Академический Журнал. 2017. Т. 43. № 3. С.75–80.
9. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В. и др. Противолучевые свойства бактериального флагеллина // Известия Российской Военно-Медицинской Академии 2017, Т. 36, №. 2, Прил.1, С. 242–243.
10. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Симбирцев А.С. и др. Оценка радиозащитных свойств рекомбинантного флагеллина при применении раздельно или в комбинации с ИЛ-1бета // Медицинский Академический Журнал. 2018. Т. 18. № 3. С. 77–84.
11. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В. и др. Экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. 2018. №. 3. С.122–128.
12. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В. и др. Перспективные для разработки новых противолучевых средств биотехнологические препараты // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. 2017. № 3. С.133–136.
13. Сапожников Р.Ю., Халимов Ю.Ш., Легева В.И. и др. Профилактическая и лечебная эффективность рекомбинантного флагеллина при остром радиационном поражении // Вестник Рос. Военно-мед. акад., 2019. Т. 3. №. 67. С. 141–144.
14. Лисина Н.И., Щеголева Р.А., Шлякова Т.Г., Зорин В.В., Шкаев А.Э., Рождественский Л. М. Противолучевая эффективность флагеллина в опытах на мышах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т.59. №3. С.1–5.
15. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микродермным методом. Методические рекомендации. Изд. Официальное. М., Межведомственный научный совет по экологии и гигиене окружающей среды РФ. 2001. 21с.
16. Сычева Л.П., Рождественский Л.М., Лисина Н.И. и др. Антимутагенная активность и гепатопротекторное действие противолучевых препаратов // Медицинская генетика. 2020. Т. 19. № 9 (218). С.81–82.

REFERENCES

1. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. Saint Petersburg: Rus-Lasa "NP association of specialists in working with laboratory animals" 2012, 48 p. (In Russian)
2. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part 1. M.: Grif and K. 2012. 944 p. (In Russian)
3. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1991; 18: 277–291.
4. OECD Guideline for the testing of chemicals №474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Adopted 21st July 1997. 10 p.
5. Sycheva LP, Lisina NI, Shchegoleva RA, Rozhdestvensky LM. Antimutagenic effect of anti-radiation drugs in an experiment on mice. Radiation biology. Radioecology.2019; 59(4):388–393. (In Russian)
6. Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, et al. An agonist of toll-lair receiver 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. Scieps 2008; 320. (5873): 226–230. (In Russian)
7. Krivokrysenko VN, Shakhov AN, Gudkov AV, Feinstein E. Identification of G-CSF and IL-6 as candidate biomarkers of GBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure. JPET Fast Forward. 2012 P. 1–46. DOI: 0.1124/jpet.112.196071. (In Russian)
8. Grebenyuk AN, Aksenov KV, Petrov AV, etc. Obtaining various variants of recombinant flagellin and evaluating their radioprotective effectiveness. Medical Academic. Journal. 2017; 43(3):75–80. (In Russian)
9. Murzina EV, Sofronov GA, Aksenova NV, etc. Anti-radiation properties of bacterial flagellin. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2017; 36(2). Suppl 1: 242–243. (In Russian)
10. Murzina EV, Sofronov GA, Simbirsev AS, et al. Evaluation of the radioprotective properties of recombinant flagellin when used separately or in combination with IL-1beta. Medical. Academic. Journal. 2018; 18(3):77–84. (In Russian)
11. Murzina EV, Sofronov GA, Aksenova NV, et al. Experimental evaluation of the anti-radiation efficacy of recombinant flagellin. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2018; 3: 122–128. (In Russian)
12. Murzina EV, Sofronov GA, Aksenova NV, et al. Biotechnological preparations promising for the development of new anti-radiation agents. The Messenger Grew. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2017; 3: 133–136. (In Russian)
13. Sapozhnikov RYu, Khalimov Yu Sh, Legeva VI, etc. Preventive and curative efficacy of recombinant flagellin in acute radiation damage. Bulletin of the Russian Military Medical Academy, 2019; 67(3):141–144. (In Russian)
14. Lisina NI, Shchegoleva RA, Shlyakova TG, Zorin VV, Shkaev AE, Rozhdestvensky LM. Anti-radiation efficacy of flagellin in experiments on mie. Radiation biology. Radioecology.2019; 59(3):1–5. (In Russian)
15. Evaluation of the mutagenic activity of environmental factors in the cells of different mammalian organs by the micronucleus method. Methodological recommendations. Ed. Official. M., Interdepartmental Scientific Council for Ecology and Environmental Hygiene of the Russian Federation. 2001. p. 21.
16. Sycheva LP, Rozhdestvensky LM, Lisina NI, et al. Antimutagenic activity and hepatoprotective effect of anti-radiation drugs. Medical Genetics. 2020; 19(9): 81–82.