

А.Н. Гребенюк<sup>1</sup>, Н.В. Аксенова<sup>1</sup>, А.В. Петров<sup>2</sup>,  
Р.И. Аль-Шехадат<sup>2</sup>, Н.А. Климов<sup>2</sup>, А.С. Симбирцев<sup>2</sup>

## Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

**Резюме.** Получен рекомбинантный флагеллин в виде полноразмерного белка, а также в виде варианта с делетированным центральным доменом. Оценена радиозащитная эффективность этих веществ по показателям 30-суточной выживаемости и эндогенного колониеобразования у мышей при остром рентгеновском облучении. Два варианта флагеллина были получены методами генной инженерии, очищены из биомассы *E. coli* и охарактеризованы по биологической активности *in vitro*. Для оценки радиозащитной эффективности препараты флагеллина вводили внутривентриально в дозе 200 мкг/кг за 30 мин до облучения. В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный интерлейкин-1 $\beta$  человека (50 мкг/кг за 24 ч до облучения) и цистамин (225 мг/кг за 15 мин до облучения). Установлено, что обе формы рекомбинантного флагеллина обладают умеренной радиозащитной эффективностью: фактор изменения дозы для полноразмерной формы флагеллина составляет 1,20, для делетированной формы – 1,23. Эффект препаратов по выраженности был сравним с таковым интерлейкина-1 $\beta$  (фактор изменения дозы 1,21), но значительно уступал табельному радиопротектору цистамину (фактор изменения дозы 1,52). В модели эндогенного колониеобразования показано, что механизм радиозащитного действия флагеллина связан со стимуляцией гемопоэза.

**Ключевые слова:** флагеллин, облучение, радиационные поражения, профилактика, выживаемость, эндогенное колониеобразование, мыши.

**Введение.** Флагеллины представляют собой эволюционно консервативную группу белков, являющихся основным структурным компонентом бактериальных жгутиков – флагелл. Флагеллины являются мощными активаторами системы врожденного иммунитета благодаря наличию на клетках иммунной системы специфического рецептора TLR-5, относящегося к системе толл-подобных рецепторов (toll-like receptor, TLR) [12, 22]. Агонисты TLR в последнее десятилетие привлекают пристальное внимание исследователей, поскольку активация TLR в эксперименте сопровождается мощным иммуностимулирующим действием, что может быть использовано не только для лечения инфекций, но и в борьбе с онкологическими, аллергическими и другими заболеваниями [23]. Первым агонистом TLR, нашедшим применение в клинической практике, стал имиквимод, одобренный для терапии базальноклеточного рака [16]. Еще один агонист TLR-5 энтолимод (CBLB502) в настоящее время проходит I фазу клинических испытаний.

Стимуляция рецептора TLR-5 в эксперименте также демонстрирует целый ряд терапевтических эффектов. Показано, что агонист TLR-5 флагеллин предотвращает повреждение тканей при ишемии-реперфузии [11], обладает противоопухолевым действием в ряде моделей на животных [9, 21], блокирует развитие болезни «трансплантат против хозяина» [14], уменьшает проявления экспериментальной аллергической астмы [18], является мощным адьювантом при системной и

мукозальной вакцинации [20]. Также в работах зарубежных авторов показано, что флагеллин и его производные обладают радиозащитным действием при системном и местном облучении [6, 7].

Механизм действия агонистов TLR связан, прежде всего, с активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [13]. Схожий путь внутриклеточной передачи сигнала имеет интерлейкин-1 (ИЛ-1), который обладает рядом активностей, характерных для агонистов TLR, включая радиопротекторную [2, 5]. Различия в эффектах агонистов отдельных толл-подобных рецепторов при действии на организм животных или человека определяются в значительной мере особенностями экспрессии этих рецепторов на различных типах клеток. Так, экспрессия TLR-5 характерна для нейтрофилов, моноцитов, дендритных клеток и Т-лимфоцитов (как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>), но, помимо клеток иммунной системы, также для эндотелиоцитов и практически всех эпителиальных клеток [23], что делает потенциальными мишенями при системном введении агонистов TLR-5 практически все системы и внутренние органы.

Принимая во внимание вышесказанное, агонисты TLR-5, к которым относятся флагеллин и его производные, могут рассматриваться как интересные и потенциально перспективные для клинического применения лекарственные препараты. Это определяет актуальность разработки отечественных препаратов на основе бактериального флагеллина и исследова-

ния их биологических эффектов *in vivo* в сравнении с другими препаратами со схожим механизмом действия, в том числе при радиационной патологии.

**Цель исследования.** Получение рекомбинантного флагеллина в виде полноразмерного белка, а также в виде варианта с делетированным центральным доменом, и оценка радиозащитной эффективности этих веществ по показателям 30-суточной выживаемости и эндогенного колониеобразования у мышей при остром внешнем рентгеновском облучении.

**Материалы и методы.** Ген полноразмерного флагеллина клонирован из геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты *S. enteritidis* var. *typhimurium* в экспрессионный вектор pET151/D-TOPO (Invitrogen). Ген делетированной формы флагеллина получен методом химического синтеза и вставлен путем рестрикции и лигирования в экспрессионную плазмиду pET302/NT-His (Invitrogen). **Продуценты рекомбинантных флагеллинов** получены на основе штамма *E. coli* BL21[DE3]Star (Invitrogen), оптимизированного для высокоэффективной продукции рекомбинантных белков, путем электропорации на генераторе высоковольтных импульсов ГВИ-1 (СПбГТУ, Санкт-Петербург) при электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см и длительностью 4 мс. После трансформации проведена селекция на плотной питательной среде с ампициллином (100 мкг/мл).

Индукция экспрессии белков проводилась в двухлитровых колбах в 250 мл среды RYP-5052 с 0,2% лактозы в термостатированном орбитальном шейкере при скорости вращения платформы 250 об/мин в течение 18 ч и температуре 37°C. Полученную биомассу клеток лизировали, очистку рекомбинантных белков проводили на Ni-NTA-агарозе (Qiagen) по инструкции производителя. Элюцию проводили градиентным раствором имидазола (0–0,5 М). Полученные образцы концентрировали до объема 200 мкл и диализовали против фосфатно-солевого буфера (pH 7,2).

Для оценки биологической активности рекомбинантного флагеллина использовали клеточную линию А-549, полученную из коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург). В качестве контрольного препарата использовали препарат нативного флагеллина из *S. typhimurium* с содержанием липополисахаридов менее 50 ЕЭ/мг белка (Invivogen).

Клетки линии А-549 вносили в количестве  $5 \times 10^4$  на лунку в 96-луночную плоскодонную культуральную плату (Costar) в 100 мкл среды DMEM/F12 с глутамином (Биолот) и 10% телячьей эмбриональной сывороткой (Nuclone). Плату инкубировали 24 ч в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в условиях абсолютной влажности. За время инкубации клетки в плате образовывали плотный монослой. Далее к клеткам добавляли исследуемые препараты в различных концентрациях в объеме 100 мкл в культуральной среде (не менее 3 параллельных лунок для каждой концентрации). Затем плату инкубировали еще 24 ч

в CO<sub>2</sub>-инкубаторе и собирали супернатанты, которые замораживали и хранили при –20°C до определения концентрации ИЛ-8. Уровень ИЛ-8 в супернатантах определяли с помощью набора на основе твердофазного иммуноферментного анализа (Цитокин) по инструкции производителя.

Исследования радиозащитных свойств полученных рекомбинантных флагеллинов проводили на самцах 172 белых беспородных мышей и 120 гибридов F1 (СВА×С57ВL/6), полученных из питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово» (пос. Рапполово Ленинградской обл.). Перед проведением экспериментов животные в течение двух недель находились на карантине, после чего методом рандомизации распределялись на группы по 10–14 мышей.

Животных содержали в условиях вивария, не более 12 особей в одной клетке. Их кормление осуществлялось 1 раз в сут с 10.00 до 13.00 ч, доступ к стандартному гранулированному корму и воде у животных был постоянно. При проведении исследований выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [3].

Маточные растворы двух форм флагеллина разводили непосредственно перед введением в физиологическом растворе до концентрации 20 мкг/мл. Препараты вводили животным внутривентриально в дозе 200 мкг/кг (4 мкг на особь) в 0,2 мл физиологического раствора за 30 мин до облучения.

В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный ИЛ-1β человека и табельный радиопротектор цистамин. Субстанцию рекомбинантного ИЛ-1β человека (Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург) непосредственно перед применением разводили до концентрации 5 мкг/мл в физиологическом растворе и за 24 ч до облучения внутривентриально вводили мышам соответствующих экспериментальных групп в дозе 50 мкг/кг (1 мкг/особь) в 0,2 мл физиологического раствора. Цистамин в дозе 225 мг/кг (4,5 мг/особь) хлористоводородной соли, растворенной в 0,2 мл физиологического раствора, вводили за 15 мин до облучения. Животным контрольных групп в те же сроки внутривентриально вводили физиологический раствор в том же объеме.

Мышей подвергали общему равномерному рентгеновскому облучению на установке «РУМ-17» при напряжении 180 кВ, силе тока 14 мА, фильтре 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, при направлении облучения «спина – грудь», кожно-фокусном расстоянии 50 см, мощности экспозиционной дозы 0,206 мА/кг (38,2 Р/мин). Дозиметрический контроль проводили с помощью индивидуального дозиметра «ИД-11» с последующей оценкой показаний прибора на аппарате «ГО-32».

Радиозащитную эффективность препаратов оценивали путем изучения 30-суточной выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) погибших от облучения мышей. На основании данных о выживаемости определяли фактор изменения дозы (ФИД),

представляющий собой отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат особей (экспериментальная группа), к дозе того же излучения, смертельной для половины особей незащищенной (контрольной) группы.

Для оценки эффективности рекомбинантных флагеллинов по критерию эндогенного колониеобразования мышей F1 (СВА×С57BL/6) облучали в дозах 6,5; 7,5 или 8,5 Гр (условия облучения идентичны описанным выше). Исследуемые препараты вводили по схемам, использованным в первом эксперименте. Каждая экспериментальная и контрольная группа включала от 10 до 16 мышей. На 9-е сутки после облучения животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Извлекали селезенки и размещали их на бумажных полосках. Полоски с селезенками помещали в чашки Петри и заливали свежеприготовленной жидкостью Буэна на одни сутки. На следующий день под бинокулярной лупой подсчитывали число колоний на свободной поверхности селезенки. Колонии имели вид бугорков, более светлых, чем остальная поверхность органа. Определяли среднее число колоний, образовавшихся на селезенках после облучения в каждой экспериментальной и контрольной группе после облучения в соответствующей дозе.

Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Средняя величина относительных показателей (выживаемости) и её ошибка определялись с помощью таблиц процентов и их ошибок В.С. Генеса [1]. Достоверность различий средних значений показателей выживаемости оценивали с использованием точного метода Фишера, показателей средней продолжительности жизни погибших от облучения животных – по непараметрическому логранк-критерию, количества эндогенных колоний – с помощью U-критерия Манна – Уитни [4]. Вероятность ошибки  $p \leq 0,05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных. Величину ФИД рассчитывали методом пробит-анализа по Финни [4].

**Результаты и их обсуждение.** В качестве целевых структур для получения рекомбинантных белков были выбраны две: полноразмерный флагеллин и предложенный L.G. Burdelya и соавт. [4] вариант, в котором центральный, наиболее вариабельный и иммуногенный домен заменен на короткий гибкий

мостик. Такая форма флагеллина, по данным авторов, обладает пониженной иммуногенностью, но при этом лучше растворима, менее склонна к агрегации и имеет более высокую активность [6, 10].

Ген полноразмерного флагеллина FlhC выделен из генома *S. enteritidis var. typhimurium*, а ген делетированной формы синтезирован химически. Оба гена были вставлены в коммерческие экспрессионные плазмиды, обеспечивающие экспрессию рекомбинантного белка в *E. coli* с N-концевым тагом из шести гистидиновых остатков, который облегчает последующую очистку белка. Схематично структуры полученной полноразмерной и делетированной форм флагеллина представлены на рисунке 1.

После трансформации соответствующими плазмидами и селекции на плотной питательной среде с ампициллином были получены штаммы-продуценты полноразмерного и делетированного варианта флагеллина. С помощью металл-хелатной хроматографии из биомассы продуцентов были выделены рекомбинантные белки с чистотой около 95% и молекулярной массой около 51 кДа (полноразмерный флагеллин) и 37 кДа (делементированный флагеллин). Для оценки биологической активности полученных белков была отработана методика, основанная на способности клеток линии А-549 дозозависимо секретировать хемокин ИЛ-8 при добавлении в культуральную среду флагеллина [15, 19].

Установлено, что делементированная форма флагеллина является наиболее активной: концентрация, обеспечивающая 50% эффекта ( $ED_{50}$ ), составляет около 2 нг/мл (рис. 2). Примерно на порядок менее активным был рекомбинантный полноразмерный флагеллин:  $ED_{50}$  около 20 нг/мл. Еще менее активным оказался стандартный коммерческий препарат нативного флагеллина. Полученные нами результаты при анализе активности препаратов полностью соответствуют зарубежным данным [6].

Радиозащитные свойства исследовались путем введения флагеллинов в дозе 200 мкг/кг за 30 мин до облучения. Используемые доза и схема введения флагеллинов описаны в литературе как оптимальные [6, 17]. В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$  человека, а также табельный радиопротектор цистамин.

Показано, что обе формы рекомбинантного флагеллина увеличивают выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных животных (табл. 1).



Рис. 1. Схема полученных рекомбинантных флагеллинов  
А – полноразмерный флагеллин; Б – делементированный флагеллин; His<sub>6</sub> – гистидиновый таг

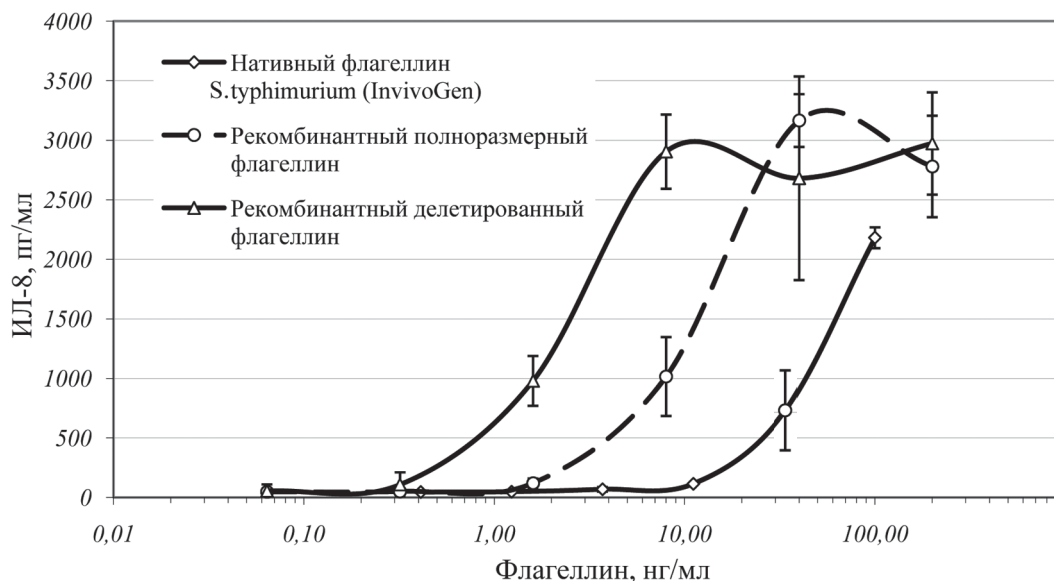


Рис. 2. Влияние полученных препаратов полноразмерного и делегированного рекombинантного флагеллина на продукцию интерлейкина-8 клетками линии А-549

Так, введение полноразмерного флагеллина позволяло увеличить выживаемость животных при облучении в дозе 6,5 Гр на 30%, в дозе 7,5 Гр – на 17%, а при дозе 8,5 Гр – на 36%, причем в последнем случае средняя продолжительность жизни повышалась на 7,4 сут ( $p < 0,05$ ). Профилактическое введение делегированной формы флагеллина оказывало практически идентичный эффект, увеличивая выживаемость животных

на 20, 37 и 29% при облучении в трех использованных дозах, соответственно. При облучении в дозе 7,5 Гр увеличение СПЖ в группе, получавшей делегированный флагеллин, составило 7,4 сут ( $p < 0,05$ ), в дозе 8,5 Гр – 7,2 сут ( $p < 0,05$ ).

Использование ИЛ-1 $\beta$  позволяло увеличить выживаемость облученных в дозе 6,5 Гр мышей на 30%, в дозе 7,5 Гр – на 34%, в дозе 8,5 Гр – на 8%; при этом

Таблица 1

**Влияние профилактического введения полноразмерного и делегированного флагеллина, интерлейкина-1 $\beta$  и цистамина на выживаемость и среднюю продолжительность жизни белых беспородных мышей-самцов, подвергнутых острому рентгеновскому облучению,  $M \pm m_x$**

Условия эксперимента	Доза облучения, Гр	Количество выживших животных / общее количество животных в группе	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Облучение (контроль)	6,5	5/10	50 $\pm$ 17	22,1 $\pm$ 2,8
	7,5	4/12	33 $\pm$ 15	18,9 $\pm$ 2,6
	8,5	0/13	0 $\pm$ 8	11,1 $\pm$ 0,5
Полноразмерный флагеллин + облучение	6,5	8/10	80 $\pm$ 13	26,6 $\pm$ 2,2
	7,5	5/10	50 $\pm$ 17	21,4 $\pm$ 3,0
	8,5	5/14	36 $\pm$ 11#	18,5 $\pm$ 2,6*
Делегированный флагеллин + облучение	6,5	7/10	70 $\pm$ 15	24,1 $\pm$ 2,9
	7,5	7/10	70 $\pm$ 15#	26,3 $\pm$ 2,0*
	8,5	4/14	29 $\pm$ 13#	18,3 $\pm$ 2,5*
ИЛ-1 $\beta$ + облучение	6,5	8/10	80 $\pm$ 13	28,3 $\pm$ 1,1
	7,5	8/12	67 $\pm$ 15	24,9 $\pm$ 2,4
	8,5	1/13	8 $\pm$ 8	13,8 $\pm$ 1,6
Цистамин + облучение	6,5	8/10	80 $\pm$ 13	26,1 $\pm$ 2,5
	7,5	7/10	70 $\pm$ 15#	25,6 $\pm$ 2,2*
	8,5	10/14	71 $\pm$ 12#	24,6 $\pm$ 2,3*

**Примечание:** # – различия с группой «Облучение» по точному критерию Фишера,  $p \leq 0,05$ ; \* – различия с группой «Облучение» по логранк-критерию,  $p \leq 0,05$ .

СПЖ увеличивалась на 6,2; 5,0 и 2,7 сут, соответственно ( $p > 0,05$ ). Наиболее выраженный радиозащитный эффект оказало профилактическое введение цистамина, после которого было зафиксировано увеличение выживаемости на 30% при облучении в дозе 6,5 Гр (прирост СПЖ – 4,0 сут), на 37% при облучении в дозе 7,5 Гр (увеличение СПЖ – 6,7 сут,  $p < 0,05$ ) и на 71% при облучении в дозе 8,5 Гр (увеличение СПЖ составило 13,5 сут,  $p < 0,05$ ).

При использованных схемах введения исследуемых препаратов расчетное значение ФИД составило: для полноразмерного флагеллина  $1,20 \pm 0,08$ , для делетированной формы белка –  $1,23 \pm 0,10$ , для ИЛ-1 $\beta$  –  $1,21 \pm 0,09$ , для цистамина –  $1,52 \pm 0,12$ .

Возможный механизм радиозащитного действия рекомбинантного флагеллина по результатам методики эндогенного колониеобразования (табл. 2) сводится к следующему.

Радиационное воздействие вызывает дозозависимое снижение количества эндогенных колоний, выросших на селезенке облученных мышей-гибридов. Профилактическое применение препаратов рекомбинантного флагеллина за 30 мин до облучения, несмотря на ощутимое увеличение выживаемости, оказывает минимальный эффект на количество колоний после облучения животных в дозе 6,5 Гр. В группах, облученных в дозе 7,5 Гр, влияние исследуемых препаратов было более заметным и позволяло сохранить в 1,8–2,2 раза больше колоний, чем у мышей контрольной группы (облучение). Наиболее существенным было действие флагеллинов у мышей, облученных затем в максимальной дозе 8,5 Гр. Введение полноразмерного флагеллина сохраняло в 5,5 раз больше эндогенных колоний на селезенке, а делетированного флагеллина – в 4,5 раза ( $p < 0,05$ ).

Полагаем, что у животных, подвергшихся облучению после введения флагеллина, стимулируется гемопоэз. Данные литературы также свидетельствуют о повышении в крови животных после введения флагеллина уровня ряда цитокинов, обладающих

гемостимулирующим действием [17]. Однако, весьма вероятно, что механизм радиозащитного действия флагеллина может быть более сложным. Так, активация NF- $\kappa$ B в клетках эпителия может повышать их радиорезистентность и ингибировать развитие апоптоза [13]. В то же время, по последним данным основным органом-мишенью для флагеллина на уровне организма является печень, в клетках которой зафиксирована активация не только NF- $\kappa$ B, но и ряда других транскрипционных факторов, совокупное функционирование которых приводит к экспрессии ряда дополнительных белков, возможно участвующих в механизмах противолучевой защиты [8].

**Выводы**

1. На основе рекомбинантного флагеллина получены новые биологически активные препараты – полноразмерный белок и делетированная форма, лишенная центрального домена.
2. Полученные рекомбинантные флагеллины обладают более высокой биологической активностью, чем нативная коммерческая форма препарата.
3. Обе полученные формы флагеллина обладают умеренным радиопротекторным действием при остром облучении: при внутрибрюшинном введении в дозе 200 мкг/кг за 30 мин до воздействия рентгеновского излучения в дозах  $S_{D_{50-100/30}}$  расчетное значение ФИД для полноразмерного флагеллина составляет 1,20, для делетированной формы белка – 1,23.
4. Выраженность радиозащитного эффекта рекомбинантных флагеллинов при однократном профилактическом применении близка к таковой рекомбинантного ИЛ-1 $\beta$  человека и уступает эффективности цистамина.
5. Механизм радиозащитного действия флагеллина связан со стимуляцией гемопоэза.

**Литература**

1. Генес, В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований / В.С. Генес. – М.: Наука, 1967. – 190 с.
2. Гребенюк, А.Н. Противолучевые свойства интерлейкина-1 / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза. – СПб.: Изд-во «Фолиант», 2012. – 216 с.
3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб.: RUS-LASA «Научно-производственное объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. – 48 с.
4. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов. – М.: Изд-во Российской академии медицинских наук, 2000. – 52 с.
5. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника / А.С. Симбирцев. – СПб.: Изд-во «Фолиант», 2011. – 480 с.
6. Burdelya, L.G. An agonist of Toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models / L.G. Burdelya [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320, № 5873. – P. 226–230.
7. Burdelya, L.G. Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: Implications for head-and-neck cancer radiotherapy / L.G. Burdelya [et al.] // Int. j. radiat. oncol. biol. phys. – 2012. – Vol. 83, № 1. – P. 228–234.

Таблица 2

**Влияние профилактического введения полноразмерного и делетированного флагеллина на количество 9-суточных колоний на селезенках мышей-самцов F<sub>1</sub> (СВАхС57BL/6),  $M \pm m_x$**

Условия облучения	Доза облучения, Гр		
	6,5	7,5	8,5
Облучение (контроль)	4,1 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,2
Полноразмерный флагеллин + облучение	4,4 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,7*
Делетированный флагеллин + облучение	4,5 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,9*	1,8 $\pm$ 0,6*

**Примечание:** \* – различия с группой «Облучение» по U-критерию Манна – Уитни,  $p \leq 0,05$ .

8. Burdelya, L.G. Central role of liver in anticancer and radioprotective activities of Toll-like receptor 5 agonist / L.G. Burdelya [et al.] // PNAS. – 2013. – Vol. 110, № 20. – P. 1857–1866.
9. Cai, Z. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth / Z. Cai [et al.] // Cancer res. – 2011. – Vol. 71, № 7. – P. 2466–2475.
10. Eaves-Pyles, T.D. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein / T.D. Eaves-Pyles [et al.] // J. immunol. – 2001. – Vol. 167, № 12. – P. 7009–7016.
11. Fukuzawa, N. A TLR5 agonist inhibits acute renal ischemic failure / N. Fukuzawa [et al.] // J. immunol. – 2011. – Vol. 187, № 7. – P. 3831–3839.
12. Hayashi F. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 / F. Hayashi [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 410, № 6832. – P. 1099–1103.
13. Hayden, M.S. NF- $\kappa$ B in immunobiology / M.S. Hayden, S. Ghosh // Cell res. – 2011. – Vol. 21, № 2. – P.223–244.
14. Hossain, M.S. Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity / M.S. Hossain [et al.] // J. immunol. – 2011. – Vol. 187, № 9. – P. 5130–5140.
15. Im, J. Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells / J. Im [et al.] // Mol. immunol. – 2009. – Vol. 47. – P. 614–622.
16. Jiménez-Baranda, S. Plasmacytoid dendritic cells lead the charge against tumors / S. Jiménez-Baranda, I.P. Silva, N. Bhardwaj // J. clin. invest. – 2012. – Vol. 122, № 2. – P. 481–484.
17. Krivokrysenko, V.I. Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure / V.I. Krivokrysenko [et al.] // J. pharmacol. exp. ther. – 2012. – Vol. 343, № 2. – P. 497–508.
18. Lee, S.E. Inhibition of airway allergic disease by co-administration of flagellin with allergen / S.E. Lee [et al.] // J. clin. immunol. – 2008. – Vol. 28. – P. 157–165.
19. Lopez-Boado, Y.S. Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells / Y.S. Lopez-Boado, L.M. Cobb, R. Deora // Infect. immunol. – 2005. – Vol. 73. – P. 7525–7534.
20. Mizel, S.B. Flagellin as an adjuvant: Cellular mechanisms and potential / S.B. Mizel, J.T. Bates // J. immunol. – 2010. – Vol. 185, № 10. – P. 5677–5683.
21. Rhee, S.H. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer / S.H. Rhee, E. Im, C. Pothoulakis // Gastroenterol. – 2008. – Vol. 135, № 2. – P. 518–528.
22. Smith, K.D. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility / K.D. Smith [et al.] // Nat. immunol. – 2003. – Vol. 4, № 12. – P. 1247–1253.
23. Takeda, K. Toll-like receptors / K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira // An. rev. immunol. – 2003. – Vol. 21. – P. 335–376.

A.N. Grebenyuk, N.V. Aksenova, A.V. Petrov, R.I. Al-Shekhadat, N.A. Klimov, A.S. Simbirtsev

### Expression of different variants of recombinant flagellin and study of their radioprotective efficacy

**Abstract.** The goal of the study was to express and purify full-sized recombinant flagellin and a variant with deleted central domain and to estimate the radioprotective efficacy of two flagellin variants by 30-day survival and endogenous colony formation assay in mice after acute X-ray irradiation. Two flagellin variants were obtained by genetic engineering techniques, purified from *E. coli* and their biological activity was assessed in vitro. To estimate the radioprotective efficacy flagellins were administered intraperitoneally 30 min before irradiation at dose 200 mg/kg. As preparations of comparison we used human recombinant interleukin-1 $\beta$  (50 mkg/kg for 24 h before irradiation) and cystamine (225 mg/kg for 15 min before irradiation). Both variants of flagellin have demonstrated moderate radioprotective effect: the dose reduction factor of full-sized recombinant flagellin was 1,20 and the dose reduction factor of variant with deleted central domain was 1,23. The radioprotective effect of both variants of recombinant flagellin has been comparable with those effect of recombinant interleukin-1 $\beta$  (the dose reduction factor 1,21) but considerably conceded to cystamine (the dose reduction factor 1,52). Endogenous colony formation assay have shown that the mechanism of radioprotective effect of flagellin is at least partly related to the stimulation of hemopoiesis.

**Key words:** flagellin, irradiation, radiation injuries, radioprotection, survival rate, endogenous colony formation, mice.

Контактный телефон: 8 (921) 310-46-20; e-mail: avpetrov@hpb-spb.com