

УДК 616-092

Лактоферрин положительно влияет на динамику восстановления физиологических и поведенческих показателей мышей при остром гамма-облучении

Копалева М.Ю.¹, Алчинова И.Б.², Нестеренко М.В.³, Черепов А.Б.¹, Зарайская И.Ю.¹, Карганов М.Ю.²¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ ООО «Лактобио». 119331, Москва, просп. Вернадского, д. 29

Целью настоящей работы стало исследование эффектов лактоферрина (Лф) человека у мышей после острого гамма-облучения в сублетальной дозе.

Методы. Исследование было проведено на 2–2,5-месячных самцах мышей линии C57Bl/6. Животные из экспериментальных групп были подвергнуты общему воздействию гамма-излучения в дозе 7,5 Гр. Сразу после облучения и повторно через 24 часа после него часть животных получила инъекцию Лф (внутрибрюшинно, 4 мг на животное). Было изучено влияние Лф на выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей. Для оценки общей двигательной и исследовательской активности использовали тест «Открытое поле».

Результаты. Введение Лф позволило увеличить выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных мышей в течение эксперимента. Происходила более быстрая нормализация динамики изменения массы тела. Кроме того, Лф оказал компенсаторное действие на исследовательскую активность облученных животных.

Ключевые слова: лактоферрин человека; острое гамма-облучение; мыши линии C57Bl/6; выживаемость; средняя продолжительность жизни; тест «Открытое поле»; исследовательская активность

Для цитирования: Копалева М.Ю., Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Карганов М.Ю. Лактоферрин положительно влияет на динамику восстановления физиологических и поведенческих показателей мышей при остром гамма-облучении. *Патогенез.* 2020; 18(1): 29-33.

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33

Для корреспонденции: Копалева Марина Юрьевна, e-mail: m.kopaeva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 05.12.2019.

Lactoferrin beneficially influences the recovery of physiological and behavioral indexes in mice exposed to acute gamma-irradiation

Kopaeva M.Yu.¹, Alchinova I.B.², Nesterenko M.V.³, Cherepov A.B.¹, Zarayskaya I.Yu.¹, Karganov M.Yu.²¹ National Research Center «Kurchatov Institute», Ploshchad Akademika Kurchatova 1, Moscow 123182, Russian Federation² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation³ Lactobio Ltd, Prospekt Vernadskogo 29, Moscow 119331, Russian Federation

The **aim** of this study was to investigate effects of human lactoferrin (Lf) in mice exposed to acute gamma-irradiation at a sublethal dose.

Methods. C57Bl/6 2–2.5-month-old male mice were used for the experiments. Animals from experimental groups were exposed to whole-body gamma-radiation at a dose of 7.5 Gy. Some animals received an intraperitoneal injection of Lf (4 mg per animal) immediately and then at 24 hours after the irradiation. The effect of Lf on survival rate and life span was studied. The open field test was used to assess locomotor and research activity.

Results. The Lf administration increased the survival rate and life span of irradiated mice during the experiment. The dynamics of body weight normalized faster. In addition, Lf exerted a compensatory effect on the research activity of irradiated animals.

Key words: human lactoferrin; acute gamma-irradiation; C57Bl/6 mice; survival rate; average life; open field test; research activity.

For citation: Kopaeva M.Yu., Alchinova I.B., Nesterenko M.V., Cherepov A.B., Zarayskaya I.Yu., Karganov M.Yu. [Lactoferrin beneficially influences the recovery of physiological and behavioral indexes in mice exposed to acute gamma-irradiation]. *Patogenez. [Pathogenesis].* 2020; 18(1): 29-33. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33

For correspondence: Kopaeva Marina Yurievna, e-mail: m.kopaeva@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Accepted: 05.12.2019.

Введение

В настоящее время активно исследуются патогенные процессы, вызываемые ионизирующим излучением. Согласно существующим представлениям о патогенезе лучевого поражения, ведущую роль в механизме его развития играет оксидативный стресс [1]. Активные формы кислорода и свободные радикалы могут инициировать процессы повреждения в различных органах и тканях, которые способны продолжаться длительное время. Ранее нами были проведены исследования изменений различных показателей организма мышей (массы тела, субфракционного состава сыворотки крови, лейкоцитарной формулы крови) после воздействия гамма-излучения [2].

Лактоферрин (Лф) – полифункциональный белок из семейства трансферринов. Он является глобулярным гликопротеином с молекулярной массой около 80 кДа. Лф относят к системе врожденного иммунитета. Этот белок обладает множественными защитными функциями [3], радиопротективными свойствами [4].

Целью настоящей работы стало исследование эффектов лактоферрина человека (чЛф) у мышей после острого гамма-облучения в сублетальной дозе.

Материалы и методы исследования

Исследование было проведено на 2-2,5-месячных самцах мышей линии C57Bl/6 (ФГБУН ФИБХ РАН питомник «Пушино», Россия). Животные содержались по 5 особей в клетке со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 часов при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ от 19.06.2013 г., а также требованиями Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протокол №1 от 13.02.2020 г.). В работе был использован человеческий Лф, выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии [5] с последующей доочисткой на аффинном сорбенте гепарин-сефарозе.

Мыши были разделены на 7 групп: три экспериментальные («Обл», «Обл+Лф», «Обл+Лфх2») и четыре контрольные (ложнооблученные – активный контроль («АК», «АК+Лф», «АК+Лфх2»); интактные – пассивный контроль, данные не показаны). В каждой экспериментальной группе было по 17 животных, в каждой контрольной – по 8. Мыши из экспериментальных групп были подвергнуты общему воздействию γ -излучения на установке ГУТ-200М от источника ^{60}Co в дозе 7,5 Гр при мощности дозы 0,6 Гр/мин. Сразу после воздействия («Обл+Лф», «АК+Лф») и повторно через 24 ч после него («Обл+Лфх2», «АК+Лфх2») животные получили инъекцию чЛф (внутрибрюшинно, 4 мг на животное). Мышам из групп «Обл» и «АК» был дважды введен 0,9 % раствор NaCl.

Оценивали влияние чЛф на поведенческие функции облученных животных с использованием теста «Открытое поле» ($d = 120$ см) на 1-е, 10-е, 20-е, 30-е сутки после облучения. Регистрацию двигательной активности проводили в течение 5 мин. Сбор и последующий анализ данных проводили с помощью программы EthoVision XT 8.5 (Noldus, Голландия). На основе треков рассчитывали общую длину пройденного пути и длительность нахождения животных в центральной зоне ($d = 60$ см). Было подсчитано количество стоек.

Каждые три дня измеряли массу тела мышей. Также было изучено влияние чЛф на выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) облученных животных. СПЖ рассчитывали, принимая за максимальный срок жизни выживших мышей 30 суток.

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prizm 6.01 (La Jolla, California, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При нормальном характере распределения исследуемых параметров применяли t -критерий Стьюдента. Для сравнения СПЖ мышей использовали непараметрический U -критерий Манна-Уитни. Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Мейера (критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Результаты исследования и обсуждение

Первая гибель мышей произошла на 8-е, 11-е и 12-е сутки после облучения в группах «Обл», «Обл+Лф» и «Обл+Лфх2», соответственно. Обнаружено, что введение Лф позволило увеличить 30-суточную выживаемость облученных животных с 29,4% («Обл») до 76,5% («Обл+Лфх2»; $p = 0,003$) и 70,6% («Обл+Лф»; $p = 0,010$) (рис. 1). Введение Лф также достоверно увеличивало СПЖ («Обл+Лфх2» $26,1 \pm 1,8$ и «Обл+Лф» $24,9 \pm 2,0$ vs «Обл» $16,5 \pm 2,3$, сутки; $p_1 = 0,003$, $p_2 = 0,010$, соответственно). Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. Действие коровьего Лф после общего рентгеновского облучения мышей [6] и Лф, полученного биотехнологическим методом из молозива кроликов, после общего гамма-облучения морских свинок [7] проявлялось в повышении выживаемости животных и в стимуляции гемопоэза.

На 9-е и 12-е сутки после облучения масса тела животных из всех экспериментальных групп уменьшилась и значимо отличалась от массы тела контрольных животных (рис. 2). На фоне введения Лф происходила нормализация динамики изменения массы тела. К 15-м («Обл+Лфх2») и 18-м («Обл+Лф») суткам масса тела животных в обеих группах была восстановлена до уровня контроля. У мышей группы «Обл» масса тела значимо отличалась от показателей контрольных животных даже через 30 суток после облучения.

Результаты измерения пройденного пути в тесте «Открытое поле» показали, что через 10 и 20 суток по-

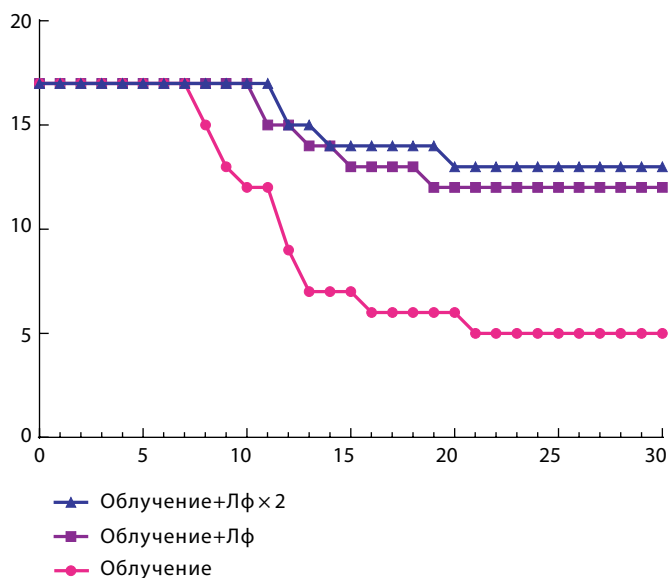


Рис. 1. Выживаемость мышей после общего гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. По оси ординат – количество животных (шт.), по оси абсцисс – время после облучения, сутки.

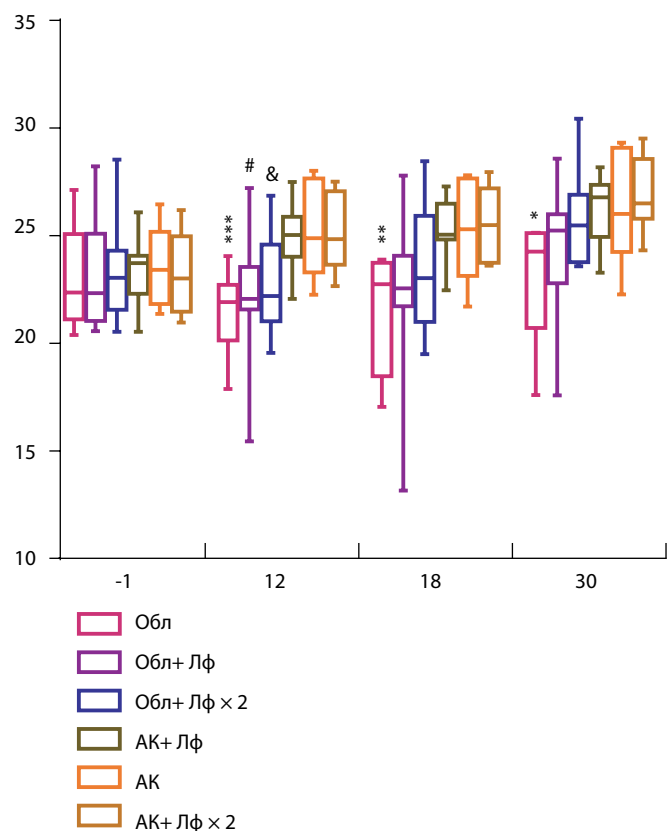


Рис. 2. Масса тела облученных и ложнооблученных мышей на разных сроках после воздействия. По оси ординат – вес животных (г), по оси абсцисс – время после облучения, сутки. Данные представлены как медиана (жирная черта), квартили (границы прямоугольника), минимальное и максимальное значения. Отличия от группы «АК»: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$; отличия от группы «АК+Лф»: # – $p < 0,05$; отличия от группы «АК+Лфх2»: & – $p < 0,05$, (по U-критерию Манна-Уитни).

сле воздействия общая двигательная активность у всех облученных мышей была снижена по сравнению с контролем. Однако через 30 суток животные из экспериментальных групп не отличались от контрольных по этому показателю. Количество стоек является мерой исследовательской активности мышей. У облученных мышей выявлено уменьшение количества стоек через 10 суток после воздействия по сравнению с контрольными животными. Введение Лф выравнивало этот показатель уже к 20-м суткам (**рис. 3**).

По времени, проведенному животными в центральной зоне, группы «Обл+Лф» и «Обл+Лфх2» не отличались от контрольных на всех этапах тестирования. Животные группы «Обл» уже к 10-м суткам проводили в центральной зоне значительно меньше времени. Восстановления нормального уровня по этому показателю у них не произошло даже к 30-м суткам. Таким образом, введение Лф оказало компенсаторное действие на индуцированное облучением снижение исследовательской активности мышей.

В настоящее время компенсаторный механизм действия Лф после воздействия гамма-излучения еще недостаточно понятен. Ранее нами были изучены пути транспортировки чЛФ в головной мозг мышей при

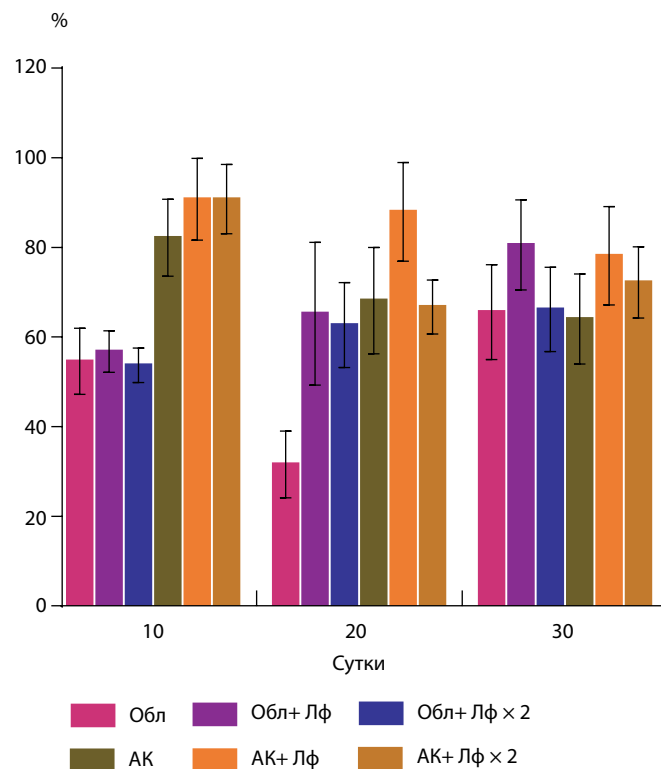


Рис. 3. Результаты тестирования мышей в «Открытом поле» на 10-е, 20-е, 30-е сутки после облучения. По оси ординат – количество стоек (в % от их количества в тесте накануне воздействия), по оси абсцисс – время после облучения, сутки. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Отличия от группы «АК»: * – $p < 0,05$, отличия от группы «АК+Лф»: # – $p < 0,005$; отличия от группы «АК+Лфх2»: & – $p < 0,005$, (по t-критерию Стьюдента).

разных способах введения. Экзогенный белок быстро проникал в головной мозг и накапливался в отдельных областях неокортекса, стриатуме, гиппокампе и таламусе. Было выявлено высокоспецифичное связывание чЛФ в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии [8]. Положительное действие ЛФ может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами.

Ранее также был продемонстрирован защитный эффект ЛФ против окислительного повреждения ДНК [9]. Одной из причин гибели при облучении является развитие инфекционных заболеваний из-за снижения иммунитета организма. Противолучевое действие ЛФ может быть основано на его иммуномодулирующей функции. Вызванное ЛФ восстановление кишечной микрофлоры при пероральном введении тормозит развитие и обострение инфекционных заболеваний, повышая выживаемость после облучения [6].

Заключение

Результаты исследования выявили, что у облученных мышей при введении ЛФ происходила более быстрая нормализация динамики изменения массы тела. Введение ЛФ позволило увеличить выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных животных в течение эксперимента. Кроме того, ЛФ оказал компенсаторный эффект на исследовательскую активность облученных мышей. Эти данные позволяют предположить, что ЛФ может снижать негативные последствия радиационного повреждения. Полученные результаты могут стать основой для проведения доклинических исследований активности чЛФ при воздействии радиации.

Список литературы

1. Seed T.M. Radiation protectants: current status and future prospects. *Health Phys.* 2005; 89(5): 531-545. DOI: 10.1097/01.hp.0000175153.19745.25
2. Алчинова И.Б., Полякова М.В., Яковенко Е.Н., Медведева Ю.С., Сабурин И.Н., Карганов М.Ю. Введение внеклеточных везикул из клеток костного мозга способствует восстановлению физиологических параметров облученных мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 237-240. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.04.237-240
3. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biomaterials.* 2004; 17(3): 189-196. DOI: 10.1023/b:biom.0000027691.86757.e2
4. Garcia-Montoya I.A., Cendon T.S., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview.

Сведения об авторах:

Копеева Марина Юрьевна — научный сотрудник Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-6100-2830>

Алчинова Ирина Борисовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Biochim. Biophys. Acta. 2012; 1820(3): 226-236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018

5. Faraji N., Zhang Y., Ray A.K. Determination of adsorption isotherm parameters for minor whey proteins by gradient elution preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1412: 67-74. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.004
6. Nishimura Y., Homma-Takeda S., Kim H.S., Kakuta I. Radioprotection of mice by lactoferrin against irradiation with sublethal X-rays. *J. Radiat. Res.* 2014; 55(2): 277-282. DOI: 10.1093/jrr/rrt117
7. Иванов А.А., Уланова А.М., Ставракова Н.М., Дешевой Ю.Б., Насонова Т.А., Котеров А.Н., Гуценко К.К., Мальцев В.Н. Противолучевая эффективность лактоферрина. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2009; 49(4): 456-461.
8. Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. Проникновение лактоферрина человека в мозг мыши: пути введения и распределение. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2019; 2: 106-113. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3
9. Ogasawara Y., Imase M., Oda H., Wakabayashi H., Ishii K. Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(1):1003-1013. DOI: 10.3390/ijms15011003

References

1. Seed T.M. Radiation protectants: current status and future prospects. *Health Phys.* 2005; 89(5): 531-545. DOI: 10.1097/01.hp.0000175153.19745.25
2. Alchinova I.B., Polyakova M.V., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. [Administration of extracellular vesicles from bone marrow cells promotes recovery of physiological parameters in irradiated mice]. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya Terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2018; 62(4): 237-240. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.04.237-240. (in Russian)
3. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biomaterials.* 2004; 17(3): 189-196. DOI: 10.1023/b:biom.0000027691.86757.e2
4. Garcia-Montoya I.A., Cendon T.S., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1820(3): 226-236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
5. Faraji N., Zhang Y., Ray A.K. Determination of adsorption isotherm parameters for minor whey proteins by gradient elution preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1412: 67-74. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.004
6. Nishimura Y., Homma-Takeda S., Kim H.S., Kakuta I. Radioprotection of mice by lactoferrin against irradiation with sublethal X-rays. *J. Radiat. Res.* 2014; 55(2): 277-282. DOI: 10.1093/jrr/rrt117
7. Ivanov A.A., Ulanova A.M., Stavrakova N.M., Deshevoï Iu.B., Nasonova T.A., Koterov A.N., Gutsenko K.K., Mal'tsev V.N. [Antiradiation effects of Lactoferrin]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia [Radiation biology. Radioecology]*. 2009; 49(4): 456-461. (in Russian)
8. Kopeeva M.Yu., Cherepov A.B., Zarayskaya I.Yu., Nesterenko M.V. Transport of human lactoferrin into mouse brain: administration routes and distribution. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 167(4):561-567. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3
9. Ogasawara Y., Imase M., Oda H., Wakabayashi H., Ishii K. Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(1):1003-1013. DOI: 10.3390/ijms15011003

Нестеренко Михаил Владимирович — доктор биологических наук, научный руководитель ООО «Лакто-био»; <https://orcid.org/0000-0002-0504-9853>

Черепов Антон Борисович — ведущий инженер Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

Зарайская Ирина Юрьевна — кандидат биологических наук, руководитель Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0003-2371-0227>

Карганов Михаил Юрьевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>