

УДК 616-092

Радиомитигирующее действие лактоферрина при остром гамма-облучении мышей: поведение, клетки головного и костного мозга

Копеева М.Ю.¹, Черепов А.Б.^{1,2}, Алчинова И.Б.², Шапошникова Д.А.¹, Рыбакова А.В.¹, Трашков А.П.¹¹ 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

Человек может подвергаться воздействию радиации как в силу профессиональной деятельности, так и столкнувшись с необходимостью получения медицинской помощи. При лучевой терапии и радиодиагностике у пациентов возможны такие побочные эффекты, как подавление иммунитета, уменьшение количества лейкоцитов в крови, неврологические осложнения, прогрессирующая когнитивная дисфункция. В связи с этим актуален поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для профилактики и ранней патогенетической терапии радиационных поражений.

Целью настоящей работы стало изучение эффектов лактоферрина (Лф) на вызванные острым тотальным гамма-облучением изменения у мышей (выживаемость, масса тела, двигательная и исследовательская активность, клетки головного и костного мозга).

Методы: тотальное гамма-облучение мышей линии C57BL/6 в дозе 7,5 Гр; введение Лф; введение 5-этинил-2'-дезоксисуридина (EdU); измерение массы тела; анализ выживаемости (30 дней); тест «Открытое поле»; иммунофлуоресцентный анализ клеток костного мозга и срезов головного мозга с использованием клик-реакции с азидом Alexa Fluor 568, первичных антител к маркерам зрелых нейронов (NeuN), незрелых нейронов (DCX) и соответствующих вторичных антител, меченных флуорофорами Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, ядерного красителя Hoechst.

Результаты. Лф продемонстрировал выраженное радиомитигирующее действие на организм экспериментальных животных при остром лучевом поражении. Введение исследуемого белка увеличило выживаемость в течение эксперимента (30 дней), компенсировало индуцированное облучением снижение массы тела, предотвратило угнетение двигательной и исследовательской активности, оказало защитное действие на клетки головного мозга облученных мышей.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки на основе Лф радиопротективных препаратов для снижения побочных эффектов лучевой терапии, для профилактики и лечения неврологических и когнитивных осложнений радиационного поражения.

Ключевые слова: лактоферрин; острое гамма-облучение; выживаемость; тест «Открытое поле»; исследовательская активность; головной и костный мозг; зубчатая извилина гиппокампа; пролиферативная активность.

Для цитирования: Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Алчинова И.Б., Шапошникова Д.А., Рыбакова А.В., Трашков А.П.

Радиомитигирующее действие лактоферрина при остром гамма-облучении мышей: поведение, клетки головного и костного мозга. Патогенез. 2025; 23(1): 32–40

DOI: 10.25557/2310-0435.2025.01.32-40

Для корреспонденции: Копеева Марина Юрьевна, e-mail: m.kopeeva@mail.ru

Финансирование. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.12.2024.

Radiomitigating effect of lactoferrin in acute gamma-irradiation of mice: behavior, brain and bone marrow cells

Kopeeva M.Yu.¹, Cherepov A.B.^{1,2}, Alchinova I.B.², Shaposhnikova D.A.¹, Rybakova A.V.¹, Trashkov A.P.¹¹ National Research Center «Kurchatov Institute»

Ploshchad Akademika Kurchatova 1, Moscow 123182, Russian Federation

² Institute of General Pathology and Pathophysiology

Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

People may be exposed to radiation due to their professional activities, or when faced with the need to receive medical care. With radiation therapy and radiodiagnostics, patients may have side effects such as immune suppression, a decrease in the number of white blood cells, neurological complications, and progressive cognitive dysfunction. The search for effective and safe medicines for the prevention and early pathogenetic therapy of radiation damage is relevant.

The **aim** of this study was to investigate the effects of lactoferrin (Lf) on changes caused by acute total gamma-irradiation in mice (survival, body weight, motor and research activity, brain and bone marrow cells).

Methods: whole-body gamma-radiation of C57BL/6 mice in a dose of 7.5 Gy, administration of Lf, administration of 5-ethyl-2'-deoxyuridine (EdU), body weight measurement, survival analysis (30 days), Open Field test, immunofluorescence analysis of bone marrow cells and brain sections using click-reactions with azide Alexa Fluor 568, primary antibodies to markers of mature neurons (NeuN), immature neurons (DCX) and corresponding secondary antibodies labeled with fluorophores Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, Hoechst nuclear dye.

Results. Lf has demonstrated a radiomitigating effect on the experimental animals with acute radiation damage. The administration of the studied protein increased survival during the experiment (30 days), compensated for radiation-induced

body weight loss, prevented suppression of motor and research activity, and had a protective effect on brain cells of irradiated mice.

Conclusion. The results obtained indicate the prospects for the development of radioprotective drugs based on lactoferrin to reduce the side effects of radiation therapy, for the prevention and treatment of neurological and cognitive complications of radiation damage.

Key words: lactoferrin; acute gamma-irradiation; survival rate; «Open field» test; research activity; brain and bone marrow; dentate gyrus of the hippocampus; proliferative activity.

For citation: Kopaeva M.Yu., Cherepov A.B., Alchinova I.B., Shaposhnikova D.A., Rybakova A.V., Trashkov A.P. [Radiomitigating effect of lactoferrin in acute gamma-irradiation of mice: behavior, brain and bone marrow cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2025; 23(1): 32–40 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2025.01.32-40

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

Funding. The work was carried out within the state assignment of the National Research Center “Kurchatov Institute”.

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

Received: 18.12.2024.

Введение

В настоящее время источники ионизирующего излучения широко используются во многих сферах. Человек может подвергаться воздействию радиации как в силу профессиональной деятельности, так и столкнувшись с необходимостью получения медицинской помощи. При лучевой терапии и радиодиагностике у пациентов возможны такие побочные эффекты, как подавление иммунитета, значительное уменьшение количества лейкоцитов в крови, неврологические осложнения, прогрессирующая когнитивная дисфункция. Радиационно-индуцированное повреждение головного мозга может привести к молекулярным, клеточным и функциональным нарушениям [1]. В связи с этим актуален поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для профилактики и ранней патогенетической терапии радиационных поражений.

Лактоферрин (Лф) — полифункциональный глобулярный гликопротеин из семейства трансферринов — перспективен для изучения в качестве средства ранней противолучевой терапии. Он участвует во многих физиологических процессах, включая связывание и транспорт ионов железа, иммунные и воспалительные реакции. Этот белок обладает множественными защитными свойствами, в частности радиопротективными [2, 3] и нейропротективными [4].

Целью настоящей работы стало изучение эффектов лактоферрина (Лф) на вызванные острым тотальным гамма-облучением изменения у мышей (выживаемость, масса тела, двигательная и исследовательская активность, клетки головного и костного мозга).

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 2-2,5-месячных самцах мышей линии C57BL/6 SPF-категории ($n = 135$, ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия) с массой тела 20–28 г. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 02-4 от 20.06.2023).

В работе использовали Лф, выделенный из женского молозива (ООО «Лактобио», Москва).

Мыши были разделены на четыре группы по характеру воздействия: опытные (Обл, $n = 45$; Обл+Лф, $n = 42$) и контрольные (К, $n = 24$; К+Лф, $n = 24$). Животные из опытных групп были подвергнуты тотальному воздействию гамма-излучения на установке ГУТ-200М от источника ^{60}Co (НИЦ «Курчатовский институт») до средней поглощенной дозы 7,5 Гр. Сразу после воздействия животные получили инъекцию Лф (в/б, 4 мг/животное) или физраствора. Измерение массы тела мышей проводили каждые три дня. Влияние Лф на выживаемость было изучено с помощью ежедневного учета в течение 30 дней после облучения.

Поведение животных анализировали в тесте «Открытое поле» (ОП, $d = 120$ см) на 26-й день после облучения. Мышей высаживали в центр арены и давали 5 мин для свободного обследования. Сбор и анализ данных проводили с помощью программы EthoVision XT 8.5 (Noldus, Голландия). Более подробно метод описан ранее [3, 5]. На основе треков рассчитывали длину пройденного пути, скорость (среднюю и в каждой зоне), длительность нахождения животных в центральной, промежуточной и пристеночной зонах, подсчитывали количество стоек.

Через 3, 15 или 30 дней после облучения мышам вводили аналог тимидина — 5-этинил-2'-дезокситуридин (EdU; в/б, 40 мг/кг; Lumiprobe, Россия) [6, 7]. Спустя 2 ч животных анестезировали внутримышечным введением золетила (40 мг/кг; Virbac, Франция) и рометара (5 мг/кг; Bioveta, Чешская Республика). Головной мозг был извлечен и постфиксирован 4% раствором параформальдегида в PBS при 4°C в течение 24 ч. На vibratome Leica VT1200S (Leica, Германия) были сделаны серийные сагиттальные срезы (50 мкм). Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей мышей по стандартной методике [8].

Включение EdU выявляли при помощи клик-реакции с азидом Alexa Fluor 568 (Lumiprobe, Россия) согласно протоколу Salic and Mitchison [9]. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к белку даблкор-

тину (DCX, экспрессируется незрелыми нейронами) (1:1000, ab18723; Abcam) и мышечных моноклональных антител к нейрональному ядерному белку (NeuN, clone A60; локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме зрелых нейронов) (1:500, MAB377; Millipore, США) с последующей детекцией с помощью ослиных противокроличьих антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 488 (1:500, ab150073; Abcam), и ослиных противомышечных антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 647 (1:500, A-31571; Invitrogen, США). Ядра клеток докрашивали Hoechst 33342 (1 мкг/мл; Thermo Scientific, Германия).

Флуоресцентные срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа Fluoview 10i (Olympus, Япония). Для обработки и анализа полученных изображений использовали программный пакет Imaris 7.4.2 (Bitplane, Швейцария). Был проведен количественный анализ EdU- и DCX-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа путём подсчёта окрашенных клеток на каждом срезе, среднее арифметическое рассчитано по 7–9 срезам для каждого животного. Клетки костного мозга анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria Fusion (BD Life Sciences, США). Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo 10.5.3 (Tree Star Inc., США).

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prism 8.0.1 (La Jolla, США). Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Мейера (критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). В зависимости от результатов проверки выборок на нормальность распределения применяли параметрический дисперсионный анализ One Way ANOVA с последующим *post hoc* сравнением по критерию Шидака, или непараметрический дисперсионный анализ Краскелл-Уоллиса с последующим *post hoc* анализом по критерию Данна или *U*-критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего или в виде медиан, квартилей, минимального и максимального значений.

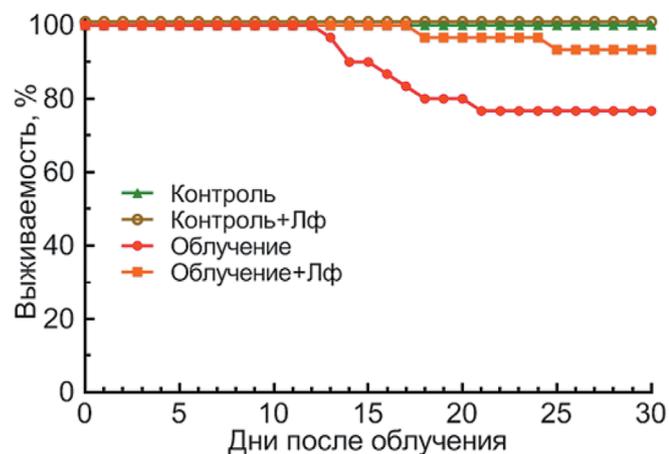


Рис. 1. Выживаемость мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр.

Результаты исследования

Физиологические параметры

В контрольных группах в течение эксперимента не погибло ни одно животное. В группе ОБЛ гибель мышечной началась на 13-й день и была интенсивной по 18-й. В группе ОБЛ+Лф гибель была незначительной, а ее начало пришлось на 18-й день (рис. 1). Обнаружено, что введение Лф увеличило выживаемость облученных животных с 76,7% (группа ОБЛ) до 93,3% (группа ОБЛ+Лф) (рис. 1) в течение эксперимента (30 дней).

Масса тела животных обеих контрольных групп постепенно увеличивалась. В течение эксперимента не было выявлено различий между группами К и К+Лф (рис. 2). Масса тела мышечных опытных групп (ОБЛ, ОБЛ+Лф) уменьшилась на 3-й день после облучения, затем к 9-му дню животные практически восстановили значение этого показателя до уровня, близкого к тому, который был перед облучением (рис. 2). На 12-й и 15-й дни наблюдали повторное снижение массы тела, причем на фоне введения Лф оно было менее значительным (ОБЛ+Лф vs ОБЛ: $p < 0,05$). Облученные животные начали набирать вес с 18-го дня. Масса тела мышечных опытных групп отличалась от контрольных значений с 3-го дня до конца эксперимента. Однако на фоне введения Лф животные быстрее восстанавливались по этому показателю начиная с 15-го дня (ОБЛ+Лф vs ОБЛ: 15-й, 18-й, 30-й дни – $p < 0,05$; 21-й, 24-й, 27-й дни – $p < 0,01$) (рис. 2).

Поведение

Результаты измерений в ОП на 26-й день после облучения показали, что двигательная активность животных группы ОБЛ была снижена (табл. 1).

Длина общего пройденного пути и пути, пройденного в пристеночной зоне арены, а также скорость в пристеночной, промежуточной зонах и в арене в целом группы ОБЛ были меньшими, чем группы К (путь: $p = 0,007$ и $p = 0,001$, соответственно; скорость: $p = 0,003$, $p = 0,009$ и $p = 0,008$, соответственно) (табл. 1). Облученные животные, получившие Лф (ОБЛ+Лф), не отличались от контрольных (К+Лф) по этим показателям. У облученных животных (группа ОБЛ) выявили уменьшение количества стоек как по сравнению с контролем (К; $p = 0,0002$), так и с облученными животными, получившими Лф (ОБЛ+Лф; $p = 0,043$) (табл. 1). Количество стоек облученных и контрольных мышечных на фоне введения Лф не различалось (ОБЛ+Лф vs К+Лф: $p = 0,522$).

Иммунофлуоресцентный анализ

Долю клеток, реплицирующих ДНК, определяли по включению EdU. Проточная цитометрия показала, что у контрольных животных относительное количество EdU-позитивных клеток в костном мозге поддерживалось на постоянном уровне в течение эксперимента. Облучение привело к резкому снижению этого показате-

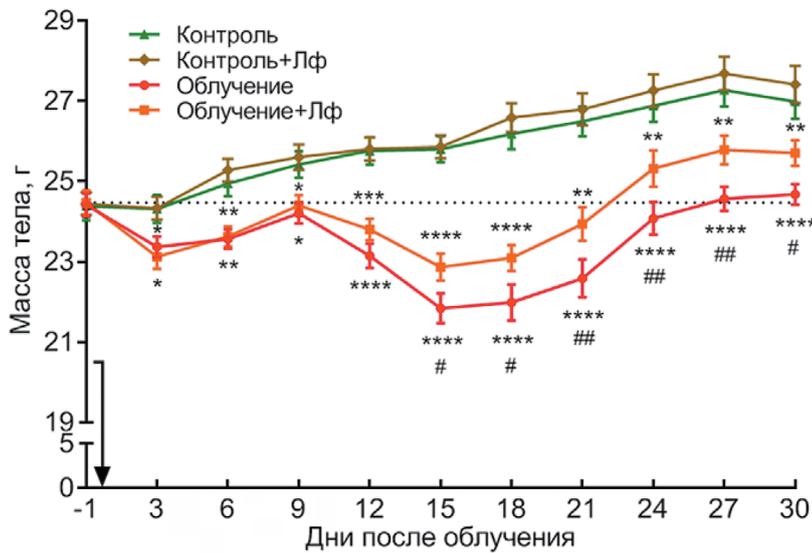


Рис. 2. Динамика массы тела мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр в течение эксперимента. Стрелка указывает день, когда было проведено облучение. Обозначение статистической значимости межгрупповых различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с соответствующими контрольными группами; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой Облучение+Лф в тот же день (One Way ANOVA с последующим *post hoc* сравнением по критерию Шидака).

Таблица 1.

Влияние лактоферрина на показатели поведения мышей в тесте «Открытое поле» после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Mean \pm SEM

Показатель	Зона арены	Группа			
		Контроль	Контроль +Лф	Облучение	Облучение +Лф
Пройденный путь, см	Центр	319 \pm 36	347 \pm 35	293 \pm 30	278 \pm 38
	Промежуточная	797 \pm 77	936 \pm 87	687 \pm 63	701 \pm 72
	Пристеночная	2688 \pm 233	2527 \pm 162	1824 \pm 121**	2141 \pm 147
	Общий	3844 \pm 245	3880 \pm 223	2846 \pm 187**	3162 \pm 205
Скорость, см/с	Центр	16,1 \pm 1,3	15,1 \pm 0,9	13,8 \pm 0,9	12,8 \pm 1,1
	Промежуточная	18,5 \pm 1,5	17,3 \pm 1,5	14,0 \pm 0,7**	15,5 \pm 0,8
	Пристеночная	11,7 \pm 0,8	11,9 \pm 0,6	8,3 \pm 0,6**	9,5 \pm 0,6
	Средняя в арене	12,8 \pm 0,8	13,0 \pm 0,7	9,5 \pm 0,6**	10,6 \pm 0,6
Время, с	Центр	20 \pm 2	24 \pm 2	21 \pm 2	22 \pm 3
	Промежуточная	46 \pm 6	61 \pm 5	49 \pm 4	45 \pm 4
	Пристеночная	228 \pm 7	211 \pm 5	225 \pm 5	228 \pm 5
Количество стоек		32 \pm 3	28 \pm 2	18 \pm 2***#	24 \pm 3

Примечание: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с соответствующими контрольными группами; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой Облучение+Лф (One Way ANOVA с последующим *post hoc* сравнением по критерию Шидака).

ля на 3-й день после воздействия (ОБЛ vs К: $p = 0,011$; ОБЛ+Лф vs К+Лф: $p = 0,008$) (рис. 3). В опытных группах к 15-му дню количество EdU+-клеток значительно выросло (наблюдали широкий внутригрупповой разброс) и на 30-й день превышало контрольные уровни (ОБЛ vs К: $p = 0,012$; ОБЛ+Лф vs К+Лф: $p = 0,029$). Между группами ОБЛ и ОБЛ+Лф не выявлено различий по количеству EdU-позитивных клеток в костном мозге в рассмотренные сроки.

Анализ окрашенных срезов головного мозга показал, что у контрольных животных количество EdU-позитивных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа поддерживалось на постоянном уровне в течение эксперимента (рис. 4, Б). Облучение

привело к резкому снижению количества EdU+-клеток в этой зоне, детектируемому через 3 дня после воздействия (ОБЛ vs К: $p < 0,01$; ОБЛ+Лф vs К+Лф: $p < 0,01$). Введение Лф облученным животным позволило сохранить в 2 раза больше EdU+-клеток (ОБЛ+Лф vs ОБЛ: $p < 0,01$) (рис. 4, А, Б). Через 15 дней наблюдали значительное увеличение этого показателя в обеих опытных группах. При этом на фоне введения Лф количество пролиферирующих клеток у облученных животных было значимо больше (ОБЛ+Лф vs ОБЛ: $p < 0,05$), хотя продолжало оставаться несколько меньшим, чем в контроле (рис. 4, Б). На 30-й день выявлено снижение количества EdU+-клеток в обеих опытных группах (ОБЛ vs К: $p < 0,01$; ОБЛ+Лф vs К+Лф: $p < 0,01$).

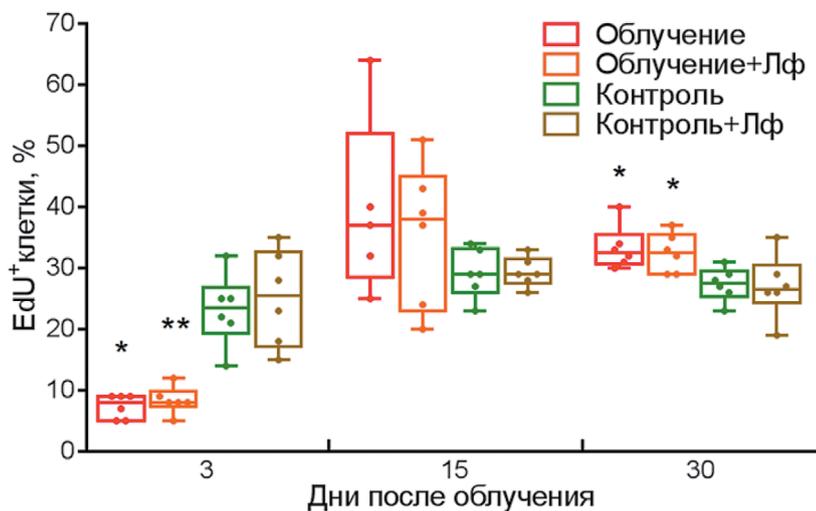


Рис. 3. Динамика количества EdU-положительных клеток в костном мозге мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр в течение эксперимента (%). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – по сравнению с соответствующими контрольными группами в тот же день (анализ Краскелл-Уоллиса с последующим *post hoc* сравнением по критерию Данна).

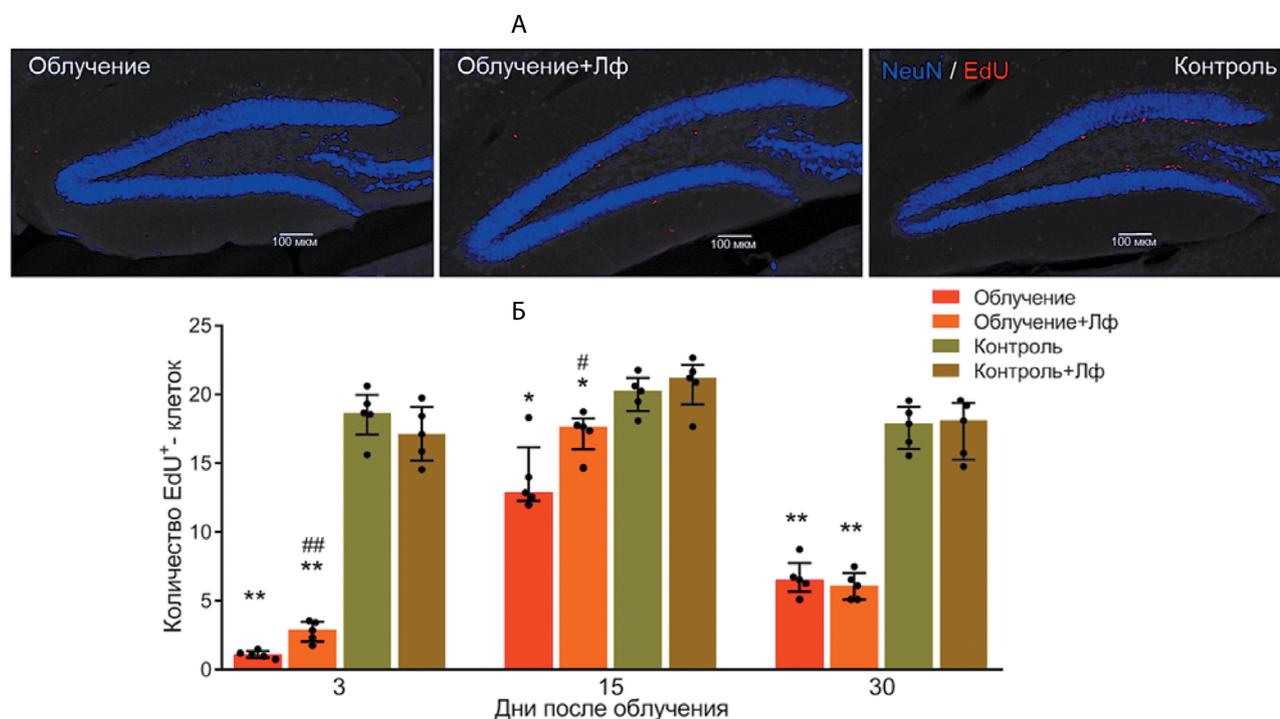


Рис. 4. Иммунофлуоресцентная детекция включения EdU (красный) и белка NeuN (синий) в клетках зубчатой извилины гиппокампа мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. А – лазерная конфокальная сканирующая микроскопия: репрезентативные микрофотографии срезов мозга на 3-й день. Б – количественный анализ EdU-положительных клеток в зубчатой извилине гиппокампа мышей. Обозначение статистической значимости межгрупповых различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими контрольными группами; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой Облучение в тот же день (анализ Краскелл-Уоллиса с последующим *post hoc* сравнением по критерию Данна или U-критерию Манна-Уитни).

У контрольных мышей Лф не оказал заметного влияния на количество DCX-положительных клеток, не было выявлено различий между группами К и К+Лф в течение эксперимента (рис. 5, Б). У облученных животных количество DCX+ -клеток было значительно меньшим на 3-й, 15-й и 30-й дни после воздействия по сравнению с контролями ($p < 0,01$) (рис. 5, А, Б). Введение Лф способствовало сохранению DCX-положительных клеток, их количество в группе ОБЛ+Лф было большим по сравнению с группой ОБЛ на 3-й ($p < 0,01$), 15-й ($p < 0,01$) и 30-й ($p < 0,05$) дни (рис. 5, А, Б).

Как и ожидалось, EdU+ -клетки не экспрессировали маркер зрелых нейронов NeuN. Однако некоторые EdU+ -клетки были также DCX-положительными (рис. 6). Такие EdU+/ DCX+ -клетки наблюдали в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа как контрольных (на 3-й, 15-й и 30-й дни), так и облученных (на 15-й и 30-й дни) животных.

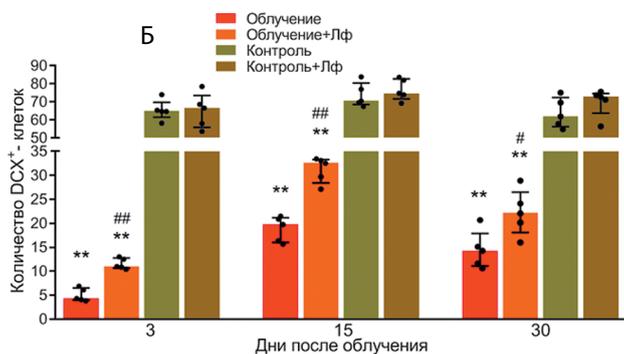
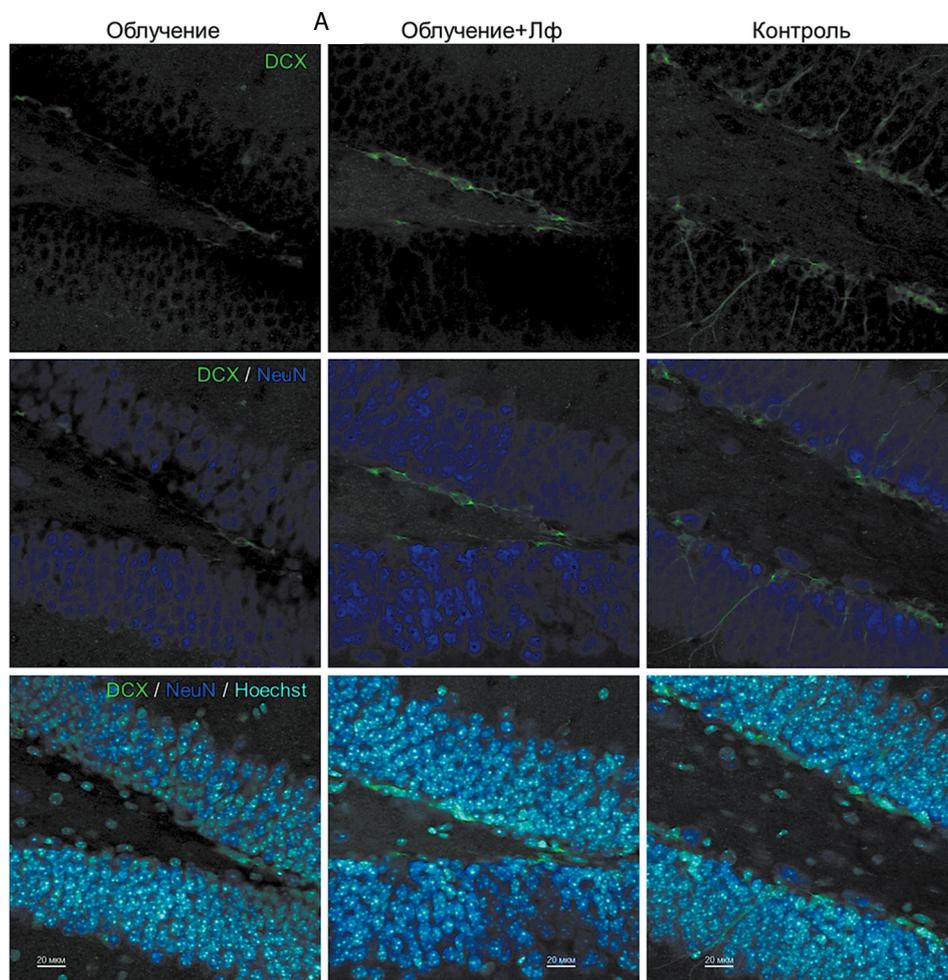


Рис. 5. Иммунофлуоресцентная детекция белков DCX (зелёный) и NeuN (синий) в клетках зубчатой извилины гиппокампа мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. А – лазерная конфокальная сканирующая микроскопия: репрезентативные микрофотографии срезов мозга на 15-й день. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой). Б – количественный анализ DCX-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа мышей. Обозначение статистической значимости межгрупповых различий: ** – $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими контрольными группами; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой Облучение в тот же день (анализ Краскелл-Уоллиса с последующим *post hoc* сравнением по критерию Данна или U-критерию Манна-Уитни).

Обсуждение

В настоящем исследовании мы оценили способность Лф уменьшать радиационно-индуцированные нарушения у мышей, подвергнув молодых взрослых животных тотальному воздействию гамма-излучения в дозе 7,5 Гр. Моделирование острого лучевого поражения отражается на всех аспектах функционирования организма. Наиболее очевидным является значительное снижение массы тела и сокращение продолжительности жизни. Так было показано, что к 14-му дню после тотального гамма-облучения в дозе 8 Гр масса тела мышей снижалась на 15% [10], а на 30-й

день после рентгеновского облучения в дозе 6,8 Гр выживаемость составляла 61,5% [2]. В представленной работе, к 15-му дню облученные животные (группа ОБЛ) потеряли около 11% массы тела, а выживаемость к 30-му дню составила 76,7%. Введение Лф (группа ОБЛ+Лф) позволило улучшить показатели до 6% и 93,3%, соответственно (рис. 1, 2). Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее [3, 5].

Подавление двигательной и исследовательской активности наблюдали у мышей после гамма-облучения в дозе 8 Гр [11]. Полученные нами в тесте ОП на 26-й день после воздействия поведенческие данные по груп-

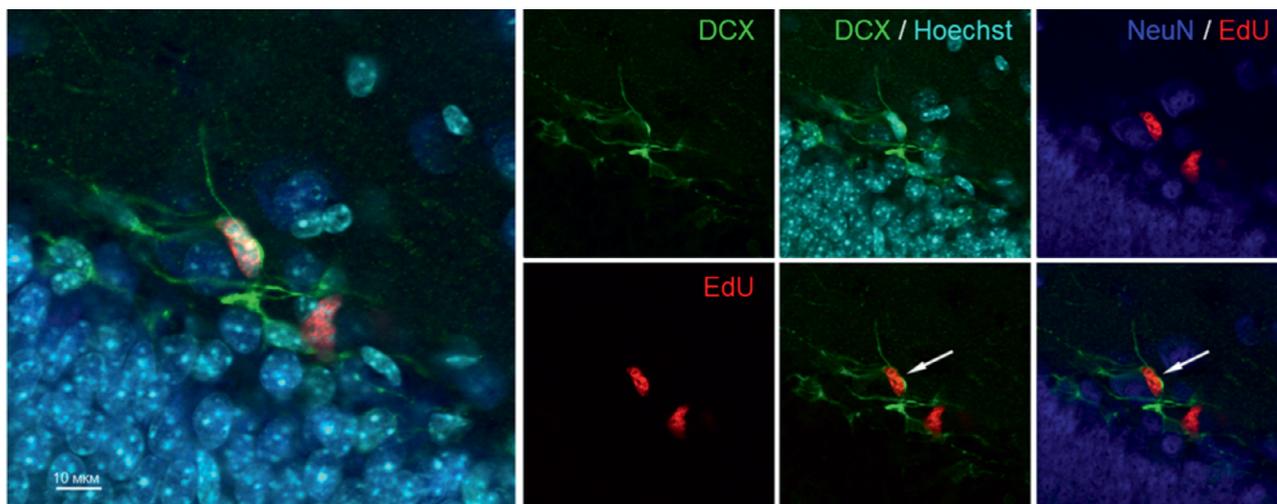


Рис. 6. Иммунофлуоресцентная детекция включения EdU (красный), белков DCX (зелёный) и NeuN (синий) в клетках зубчатой извилины гиппокампа мышей. Репрезентативные микрофотографии среза мозга контрольного животного. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой). EdU+/ DCX+ -клетка указана стрелкой.

пе ОБЛ согласуются с результатами других исследований. Пройденный путь и скорость облученных животных были на 26%, а количество стоек почти в два раза (44%) меньше по сравнению с контролем. Введение Лф (группа ОБЛ+Лф) позволило свести к минимуму изменение этих поведенческих параметров облученных мышей (табл. 1).

Включение синтетических аналогов тимидина в реплицирующуюся ДНК во время S-фазы клеточного цикла является широко используемым методом для оценки пролиферативной активности *in vivo* [12, 13]. В представленной работе с этой целью животным вводили 5-этил-2'-дезоксинуридин (EdU). Пролиферирующие клетки костного мозга очень чувствительны к действию радиации и могут поражаться даже при незначительных дозах. Облучение привело к снижению относительно количества EdU-позитивных клеток в костном мозге животных в три раза на 3-й день после воздействия. К 15-му дню этот показатель вырос в опытных группах, незначительно превышая уровни контролей, и на 30-й день стал превышать их на 16% (рис. 3). Между облученными группами не было выявлено различий по количеству пролиферирующих клеток в костном мозге в течение эксперимента. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. Так, содержание ДНК в костном мозге мышей значительно уменьшилось на 3-й день после тотального гамма-облучения от источника ^{60}Co в дозе 3,5 Гр [14]. Общий уровень апоптоза клеток костного мозга достигал 21% через 24 ч после тотального гамма-облучения ^{60}Co в дозе 8 Гр, на 3-й день общее количество клеток костного мозга значительно уменьшилось, а к 7-му дню увеличилось в два раза [10].

Субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа является областью активной клеточной пролиферации у млекопитающих [15, 16]. В наших предыдущих

исследованиях [17], а также в работах других авторов [7, 18] было показано, что облучение вызывает в ней увеличение уровня апоптоза, снижение пролиферации и нейрогенеза. В представленной работе незрелые нейроны были идентифицированы с помощью антитела к DCX, белку, связанному с миграцией нейронов и нейробластов. Облучение привело к значительному снижению количества EdU- и DCX-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа мышей, детектируемому на 3-й день после воздействия (рис. 4, 5). На 15-й день оба показателя увеличились и затем несколько уменьшились повторно на 30-й день. Ранее сообщалось о кратковременном увеличении количества пролиферирующих клеток в зубчатой извилине гиппокампа взрослых крыс после облучения [18]. Это может отражать как изменение скорости клеточной пролиферации, так и переход от асимметричного деления к симметричному в популяции клеток-предшественников. Введение Лф облученным животным оказало защитное действие на клетки мозга, способствовало сохранению как пролиферирующих клеток, так и незрелых нейронов (DCX-позитивных клеток) в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 4, 5).

Механизм действия Лф, способствующего сохранению или ускоренному восстановлению функциональной активности клеток мозга мышей в выбранной нами экспериментальной модели, по-видимому, имеет отношение к прерыванию одного или сразу нескольких звеньев патогенеза радиационного поражения. Белок связывается с соответствующими рецепторами, интернализуется посредством эндоцитоза и переносится в ядро, где модулирует экспрессию генов [19, 20].

Заключение

Результаты исследования демонстрируют выраженное радиомитигирующее действие Лф на организм экс-

периментальных животных при остром лучевом поражении. Введение Лф увеличило выживаемость в течение эксперимента (30 дней), компенсировало индуцированное облучением снижение массы тела, предотвратило угнетение двигательной и исследовательской активности, оказало защитное действие на клетки головного мозга облученных мышей.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки на основе Лф радиопротективных препаратов для снижения побочных эффектов лучевой терапии, для профилактики и лечения неврологических и когнитивных осложнений радиационного поражения.

Список литературы

- Balentova S., Adamkov M. Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27796–27815. DOI: 10.3390/ijms161126068
- 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
- Копалева М.Ю., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Деморзхи М.С., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю., Крганов М.Ю. New properties of a well-known antioxidant: pleiotropic effects of human lactoferrin in mice exposed to gamma irradiation in a sublethal dose. *Antioxidants.* 2022; 11(9): 1833. DOI: 10.3390/antiox11091833
- Yong S.J., Veerakumarasivam A., Lim W.L., Chew J. Neuroprotective effects of lactoferrin in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a narrative review. *ACS Chem. Neurosci.* 2023; 14(8): 1342–1355. DOI: 10.1021/acscemneuro.2c00679
- Копалева М.Ю., Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Крганов 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
- Ivanova A., Gruzova O., Ermolaeva E., Astakhova O., Itaman S., Enikolopov G., Lazutkin A. Synthetic thymidine analog labeling without misconceptions. *Cells.* 2022; 11(12): 1888. DOI: 10.3390/cells11121888
- Amelchenko E.M., Bezriadnov D.V., Chekhov O.A., Ivanova A.A., Kedrov A.V., Anokhin K.V., Lazutkin A.A., Enikolopov G. Cognitive flexibility is selectively impaired by radiation and is associated with differential recruitment of adult-born neurons. *J. Neurosci.* 2023; 43(34): 6061–6083. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0161-22.2023
- Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Vis. Exp.* 2016; (110): 53936. DOI: 10.3791/53936
- Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(7): 2415–2420. DOI: 10.1073/pnas.0712168105
- Liu C., Liu J., Hao Y., Gu Y., Yang Z., Li H., Li R. 6,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavone improves the survival of whole-body-irradiated mice via restoration of hematopoietic function. *Int. J. Radiat. Biol.* 2017; 93(8): 793–802. DOI: 10.1080/09553002.2017.1321808
- Van der Meeren A., Lebaron-Jacobs L. Behavioural consequences of an 8 Gy total body irradiation in mice: regulation by interleukin-4. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 79(2): 140–143.
- Solius G.M., Maltsev D.I., Belousov V.V., Podgorny O.V. Recent advances in nucleotide analogue-based techniques for tracking dividing stem cells: An overview. *J. Biol. Chem.* 2021; 297(5): 101345. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101345
- Martí-Clúa J. Methods for inferring cell cycle parameters using thymidine analogues. *Biology (Basel).* 2023; 12(6): 885. DOI: 10.3390/biology12060885
- Liu X.R., Zhu N., Hao Y.T., Yu X.C., Li Z., Mao R.X., Liu R., Kang J.W., Hu J.N., Li Y. Radioprotective effect of whey hydrolysate peptides against γ -radiation-induced oxidative stress in BALB/c mice. *Nutrients.* 2021; 2; 13(3): 816. DOI: 10.3390/nu13030816
- Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat. Histol. Embryol.* 2020; 49(1): 3–16. DOI: 10.1111/ahc.12496

- Ribeiro F.F., Xapelli S. An Overview of adult neurogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1331: 77–94. DOI: 10.1007/978-3-030-74046-7_7
- Копалева М.Ю., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю. Лактоферрин оказывает защитное действие на клетки мозга мыши при остром гамма-облучении головы. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2023; 3: 161–168. DOI: 10.47056/1814-3490-2023-3-161-168
- Tada E., Parent J.M., Lowenstein D.H., Fike J.R. X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience.* 2000; 99(1): 33–41. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00151-2.
- Chen Y., Zheng Z., Zhu X., Shi Y., Tian D., Zhao F., Liu N., Hüppi P.S., Troy F.A., Wang B. Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 2015; 52: 256–269. DOI: 10.1007/s12035-014-8856-9
- Копалева М.Ю., Азиева А.М., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю. Lactoferrin modulates induction of transcription factor c-Fos in neuronal cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(9): 8373. DOI: 10.3390/ijms24098373

References

- Balentova S., Adamkov M. Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27796–27815. DOI: 10.3390/ijms161126068
- 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
- Копалева М.Ю., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Деморзхи М.С., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю., Крганов М.Ю. New properties of a well-known antioxidant: pleiotropic effects of human lactoferrin in mice exposed to gamma irradiation in a sublethal dose. *Antioxidants.* 2022; 11(9): 1833. DOI: 10.3390/antiox11091833
- Yong S.J., Veerakumarasivam A., Lim W.L., Chew J. Neuroprotective effects of lactoferrin in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a narrative review. *ACS Chem. Neurosci.* 2023; 14(8): 1342–1355. DOI: 10.1021/acscemneuro.2c00679
- Копалева М.Ю., Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Крганов М.Ю. [Lactoferrin beneficially influences the recovery of physiological and behavioral indexes in mice exposed to acute gamma-irradiation]. *Pathogenesis. [Pathogenesis].* 2020; 18(1): 29–33. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33 (in Russian)
- Ivanova A., Gruzova O., Ermolaeva E., Astakhova O., Itaman S., Enikolopov G., Lazutkin A. Synthetic thymidine analog labeling without misconceptions. *Cells.* 2022; 11(12): 1888. DOI: 10.3390/cells11121888
- Amelchenko E.M., Bezriadnov D.V., Chekhov O.A., Ivanova A.A., Kedrov A.V., Anokhin K.V., Lazutkin A.A., Enikolopov G. Cognitive flexibility is selectively impaired by radiation and is associated with differential recruitment of adult-born neurons. *J. Neurosci.* 2023; 43(34): 6061–6083. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0161-22.2023
- Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Vis. Exp.* 2016; (110): 53936. DOI: 10.3791/53936
- Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(7): 2415–2420. DOI: 10.1073/pnas.0712168105
- Liu C., Liu J., Hao Y., Gu Y., Yang Z., Li H., Li R. 6,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavone improves the survival of whole-body-irradiated mice via restoration of hematopoietic function. *Int. J. Radiat. Biol.* 2017; 93(8): 793–802. DOI: 10.1080/09553002.2017.1321808
- Van der Meeren A., Lebaron-Jacobs L. Behavioural consequences of an 8 Gy total body irradiation in mice: regulation by interleukin-4. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 79(2): 140–143.
- Solius G.M., Maltsev D.I., Belousov V.V., Podgorny O.V. Recent advances in nucleotide analogue-based techniques for tracking dividing stem cells: An overview. *J. Biol. Chem.* 2021; 297(5): 101345. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101345
- Martí-Clúa J. Methods for inferring cell cycle parameters using thymidine analogues. *Biology (Basel).* 2023; 12(6): 885. DOI: 10.3390/biology12060885
- Liu X.R., Zhu N., Hao Y.T., Yu X.C., Li Z., Mao R.X., Liu R., Kang J.W., Hu J.N., Li Y. Radioprotective effect of whey hydrolysate peptides against γ -radiation-induced oxidative stress in BALB/c mice. *Nutrients.* 2021; 2; 13(3): 816. DOI: 10.3390/nu13030816

15. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat. Histol. Embryol.* 2020; 49(1): 3–16. DOI: 10.1111/ahel.12496
16. Ribeiro F.F., Xapelli S. An Overview of adult neurogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1331: 77–94. DOI: 10.1007/978-3-030-74046-7_7
17. Копеева М.У., Черепов А.В., Зарайская И.У. Lactoferrin has a protective effect on mouse brain cells after acute gamma irradiation of the head. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023; 176(2): 246–252. DOI: 10.1007/s10517-024-06004-3
18. Tada E., Parent J.M., Lowenstein D.H., Fike J.R. X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience.* 2000; 99(1): 33–41. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00151-2.
19. Chen Y., Zheng Z., Zhu X., Shi Y., Tian D., Zhao F., Liu N., Hüppi P.S., Troy F.A., Wang B. Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 2015; 52: 256–269. DOI: 10.1007/s12035-014-8856-9
20. Копеева М.У., Азиева А.М., Черепов А.В., Зарайская И.У. Lactoferrin modulates induction of transcription factor c-Fos in neuronal cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(9): 8373. DOI: 10.3390/ijms24098373

Сведения об авторах

Копеева Марина Юрьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник экспериментально-биологической клиники Курчатовского комплекса НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-) природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-6100-2830>

Черепов Антон Борисович — ведущий инженер Курчатовского комплекса НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-) природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

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>

Шапошникова Дарья Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, молекулярной медицины и иммунологии Курчатовского комплекса НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-) природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0009-0004-5173-7907>

Рыбакова Анна Владимировна — кандидат ветеринарных наук, заведующий экспериментально-биологической клиникой Курчатовского комплекса НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-) природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0001-7734-298X>

Трашков Александр Петрович — кандидат медицинских наук, заместитель руководителя Курчатовского комплекса НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-) природоподобных технологий по научной работе Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-3441-0388>