

*На правах рукописи*

Копеева Марина Юрьевна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА  
ПРИ РАДИАЦИОННОМ И НЕЙРОТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор **Карганов Михаил Юрьевич**  
кандидат биологических наук **Зарайская Ирина Юрьевна**

Официальные оппоненты:

**Пинелис Всеволод Григорьевич** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ

**Штемберг Андрей Сергеевич** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом космической радиобиологии и фармакологии и лабораторией радиационной и экстремальной нейрофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится « 17 » ноября 2022 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>

Автореферат разослан « 15 » октября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Взаимодействие патогенетических и саногенетических процессов, активирующихся при действии патогенного фактора, происходит на всех уровнях биологической организации – от молекулярного до организменного. Эти процессы могут иметь различную природу, разные механизмы развития и разное биологическое значение. Их основу составляет сложное сочетание патогенных и адаптивных процессов [Литвицкий П.Ф., 2003]. В связи с этим, является актуальным поиск эффективных терапевтических средств, способных к полисистемному действию во временных окнах, совпадающих с воздействием патогенных факторов. Лактоферрин (Лф), как полифункциональный белок, является перспективным для изучения в качестве средства ранней терапии.

Лактоферрин представляет собой глобулярный гликопротеин из семейства трансферринов, обладающий высокой аффинностью к ионам железа (III). Он участвует во многих физиологических процессах, включая связывание и транспорт ионов железа, иммунные и воспалительные реакции. Этот белок обладает множественными защитными функциями [Orsi, 2004], радиопротективными свойствами [Garcia-Montoya et al., 2012], модулирует широкий спектр нейрональных процессов, усиливает экспрессию генов, участвующих в выживании, дифференцировке и росте нейронов [Chen et al., 2015; Wang, 2016].

В настоящее время Лф активно исследуется в экспериментальных патологических моделях заболеваний человека в качестве радиопротекторного агента [Nishimura et al, 2014; Feng et al, 2018], белка, способного ослабить прогрессирование нейродегенеративных заболеваний и стимулировать нейрорегенерацию [Xu et al., 2019; Liu et al., 2020] при его хроническом введении. Было показано лечебное действие коровьего Лф после тотального воздействия рентгеновского излучения, которое проявлялось в повышении выживаемости облученных мышей, стимуляции гемопоэза [Nishimura et al, 2014; Feng et al, 2018].

Болезнь Паркинсона (БП), прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, патогенез которого характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС) и, как следствие, истощением дофамина (ДА) в стриатуме, что приводит к клиническим симптомам – ригидности мышц, тремору и брадикинезии [Крыжановский Г.Н. и др., 2002; Kalia and Lang, 2015]. Вопрос о роли Лф в нейродегенеративных процессах остается открытым. Показано, что нейроны пациентов, страдающих

болезнью Паркинсона, накапливают Лф в высоких концентрациях [Leveugle et al., 1996]. С другой стороны, количество рецепторов Лф увеличивается в дофаминергических нейронах, резистентных к патологическому процессу [Fauscheux et al., 1995]. Это является предпосылкой для изучения потенциала Лф в борьбе с нейродегенерацией. Одной из наиболее широко используемых моделей БП на животных является нейродегенерация, индуцированная нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) у мышей [Dauer and Przedborski, 2003; Кучеряну В.Г. и др., 2020].

Применение Лф в качестве терапевтического средства для минимизации радиационно-индуцированных повреждений и борьбы с нейродегенерацией изучено недостаточно, в связи с чем необходимо комплексное исследование влияния Лф на динамику изменения интегральных и системных показателей состояния организма в экспериментальных моделях патологии: тотального острого гамма-облучения в сублетальной дозе и МФТП-индуцированной гибели нейронов. Для понимания механизмов действия Лф необходимо изучить вопрос о конечных клетках-мишенях для него в мозге, который до настоящего времени остается открытым.

Большой интерес вызывает способность Лф модулировать целый спектр нейрональных процессов посредством изменения экспрессии генов, среди которых нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и полисиалирированная молекула адгезии нервных клеток (PSA-NCAM) [Chen et al., 2015; Wang, 2016; Xu et al., 2019]. Одним из маркеров долговременной пластичности нейронов является транскрипционный фактор *c-Fos* - продукт экспрессии немедленного раннего гена *c-fos*, быстро активирующегося в ответ на внешние воздействия [Анохин К.В., 1997]. Возможная связь между Лф и индукцией *c-Fos* на уровне отдельных клеток еще не изучена.

Результаты этой работы позволят расширить представление об участии Лф в защитных и компенсаторных механизмах систем организма, о возможности потенциального использования человеческого Лф (чЛф) в качестве терапевтического препарата при радиационных поражениях и при лечении нейродегенеративных заболеваний, а также приблизят нас к пониманию механизмов действия этого многофункционального белка.

**Целью** работы стало выявление эффектов человеческого лактоферрина в норме и в условиях экспериментальной патологии у мышей при воздействии гамма-излучения, при моделировании гибели нейронов *in vivo*, а также в условиях стимуляции нейронов *in vitro*.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать эффекты чЛф на интегральные (выживаемость, продолжительность жизни в течение эксперимента, масса тела, поведение, субфракционный состав сыворотки крови) и системные (уровень гемоглобина, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, гистология печени и селезенки) показатели состояния организма после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе.

2. Исследовать влияние чЛф на поведение мышей и экспрессию тирозингидроксилазы (ТГ) в нигростриатной системе мозга животных на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов.

3. Изучить пути транспорта чЛф в головной мозг мышей при различных способах введения, исследовать распределение чЛф в мозге и определить фенотип клеток, включающих чЛф.

4. Исследовать влияние чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции, определить клеточную локализацию чЛф и возможную колокализацию экзогенного белка с индуцированной экспрессией c-Fos.

### **Научная новизна исследования**

В работе впервые проведено комплексное исследование эффектов чЛф на интегральные и системные показатели состояния организма мышей после тотального острого гамма-облучения в сублетальной дозе, продемонстрировано его положительное полисистемное действие и позитивное влияние на общий гомеостаз. Показано, что однократное и двукратное введение чЛф позволило значительно увеличить выживаемость и продолжительность жизни облученных мышей в течение эксперимента.

Впервые исследовано влияние чЛф при его двукратном введении на поведение мышей и экспрессию ТГ в нигростриатной системе мозга животных в отдаленные сроки (через 28 дней после индукции) и на динамику изменения количества ТГ+ волокон в стриатуме и количества ТГ+ нейронов в ЧС (через 2 и 28 дней после индукции) в модели МФТП-индуцированной гибели нейронов. Показано, что введение чЛф способствовало восстановлению функциональной активности ТГ+ клеток нигростриатной системы после острого воздействия нейротоксина.

Впервые экзогенный чЛф детектирован с помощью флуоресцентного ИГХ анализа, и обнаружены высокоспецифичные сайты связывания белка в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши.

Получены оригинальные данные о влиянии чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в гиппокампальных культурах клеток мозга мышей после стимуляции 50 мМ КСl, выявлена его способность усиливать экспрессию этого транскрипционного фактора, показана колокализация экзогенного чЛф с белком c-Fos после стимуляции.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследования позволили расширить представления об участии Лф в защитных и компенсаторных механизмах и возможности потенциального использования Лф в качестве терапевтического препарата при лечении нейродегенеративных заболеваний человека.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ путей транспорта Лф, что позволило выявить наиболее эффективные способы доставки экзогенного белка в мозг. Удалось прояснить вопрос о конечных клетках-мишенях для Лф в мозге, который до настоящего времени оставался открытым. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования Лф для неинвазивного транспорта новых терапевтических препаратов, разработанных на его основе, в головной мозг.

Полученные данные о влиянии чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos могут послужить основой для раскрытия механизмов действия Лф по регулированию клеточных функций.

Полученные результаты свидетельствуют об актуальности разработки на основе данного белка радиопротекторных препаратов для профилактики и лечения осложнений при профессиональном облучении, а также для снижения побочных эффектов лучевой терапии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Человеческий Лф может быть использован в качестве вещества, способного оказывать полисистемные компенсаторные эффекты при радиационных воздействиях и при лечении нейродегенеративных заболеваний.

2. Возможность проникновения чЛф в клетку-мишень со сменой локализации с цитоплазматической на ядерную, а также его способность к усилению экспрессии белков, обеспечивающих долговременную пластичность, указывают на потенциал этого вещества в качестве модулятора нейрональных процессов.

### **Публикация результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах из актуального «Перечня рецензируемых научных изданий, в

которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» и приравненных к ним изданий, и 7 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

### **Структура и объем работы**

Диссертация представлена в виде введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 30 отечественных и 218 иностранных источника. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста и содержит 2 таблицы и 38 рисунков.

### **Личный вклад автора**

Разработка основной научной идеи и планирование исследования выполнены при непосредственном активном участии автора. Сбор литературных данных, их анализ и обобщение проведены автором самостоятельно. Все эксперименты выполнены автором лично. Автором самостоятельно проведены анализ и систематизация экспериментальных данных, их статистическая обработка и интерпретация. Все научные публикации по результатам выполненной работы подготовлены и написаны автором самостоятельно. Облучение животных проведено совместно с А.Б. Череповым, вед.инж. Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований НИЦ «Курчатовский институт». Сбор и анализ образцов крови и гистологическое исследование органов мышей после облучения проведены совместно с к.б.н. И.Б. Алчиновой, в.н.с. лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП». Подготовка гистологических препаратов печени и селезенки животных проведена совместно с М.С. Деморжи, н.с. лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП».

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе был использован чЛф (ООО «Лактобио», Россия), выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии с последующей доочисткой на аффинном сорбенте гепарин-сефарозе. По результатам ВЭЖХ чистота полученного белкового препарата составляла 97%.

#### **Экспериментальные животные**

В исследовании было использовано 290 мышей самцов линии C57BL/6 (ФГБУН ФИБХ РАН питомник «Пушино», Россия). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014. Соответствие экспериментальных исследований международным и российским

законодательным актам подтверждено заключением Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП» (протокол № 4-21 от 11.10.2021).

### **Моделирование патологий и введение чЛф**

1. Тотальное облучение животных (возраст 2-2,5 месяца) проводили на установке ГУТ-200М (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва) от источника  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7,5 Гр. Сразу после воздействия и повторно через 24 ч после него часть животных получила инъекцию чЛф (4 мг/животное, в/б).

2. Нигростриатное дофаминергическое повреждение у животных (возраст 5 месяцев) индуцировали однократным подкожным введением нейротоксина МФТП в дозе 40 мг/кг. чЛф (4 мг/животное, в/б), вводили за 24 и 3 ч до МФТП.

3. Для изучения путей транспорта чЛф вводили его животным (возраст 2-2,5 месяца) интраназально, конъюнктивально, подъязычно или внутривентрикулярно.

### **Поведенческое тестирование**

Поведенческие функции животных оценивали с использованием тестов: «Открытое поле» – накануне облучения и на 10-й, 20-й, 30-й день после него; «Открытое поле», ротарод, анализ длины шага – до инъекций и через 60, 120 мин, 1, 2, 7 и 28 дней после введения МФТП. Во время тестирования проводили регистрацию поведения при помощи видеокамеры WV-CP500G (Panasonic, Япония) и системы видеорегистрации EthoVision XT 8.5 (Noldus Information Technology, Нидерланды). Полученные видеозаписи анализировали в программе EthoVision XT 8.5.

### **Исследование изменений показателей крови мышей**

Уровень гемоглобина (с помощью автоматического анализатора Easy Touch GCHb (Biopic Technology, Inc., Тайвань) и количество лейкоцитов (в камере Горяева по стандартной методике) определяли в периферической крови мышей через 3, 10 и 30 дней после облучения. Для расчета лейкоцитарной формулы мазки крови окрашивали по Паппенгейму и подсчитывали по 200 клеток на каждом. Оценку изменений в субфракционном составе сыворотки крови проводили на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 («ИНТОКС», Санкт-Петербург).

### **Гистологическое исследование**

Забор органов проводили через 3, 10 или 30 дней после облучения (печень, селезенка); через 2 или 28 дней после введения МФТП (мозг). Препараты печени и селезенки готовили согласно принятой методике [Меркулов Г. А., 1969; Лилли Р., 1969]. Образцы заключали в парафин, на микротоме Leitz 1208 (Leitz, Германия) изготавливали срезы тканей (5 мкм). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Перлсу и по Ван-Гизону. Срезы

головного мозга (40 мкм) готовили на вибраторе Leica VT1200S (Leica, Германия). Для ИГХ окрашивания ДА-ергических нейронов использовали первичные антитела кролика к ТГ, вторичные антитела козы к антителам кролика, визуализацию 3,3'-диаминобензидином. Окрашенные срезы исследовали с помощью светового микроскопа Zeiss Imager Z2 VivaTome (Carl Zeiss, Германия).

### **Иммунофлуоресцентный анализ**

Для изучения путей транспорта через 5, 10, 15, 30 или 60 мин после введения чЛф мышей транскардиально перфузировали, извлекали мозг. Изготовленные серийные срезы (50 мкм) окрашивали с использованием первичных антител к чЛф, маркерам зрелых нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP), микроглии (Iba1), эндотелиальных клеток (CD31) и соответствующих вторичных антител, меченных флуорофорами Alexa Fluor 568, 488, 647; ядра докрашивали DAPI. Срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа FluoView10i (Olympus, Япония), полученные изображения анализировали в программном пакете Imaris 7.4.2 (Bitplane, Швейцария).

### **Клеточные культуры и стимуляция**

Первичные диссоциированные клеточные культуры (n=52) получали из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6. Индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках осуществляли путем трехкратного добавления 50 мМ KCl в культуральную среду на 8-й день культивирования *in vitro*. В качестве активного контроля использовали культуры с трехкратной сменой среды. За 24 ч до стимуляции/смены среды в культуральную среду части групп добавляли чЛф (1 мг/мл). Анализ содержания c-Fos проводили через 2 ч после стимуляции/смены среды.

Для изучения динамики проникновения чЛф в цитоплазму и ядро клеток на 7-й день культивирования белок добавляли в среду. Через 2, 24 или 72 ч культуры отмывали, фиксировали. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили с использованием первичных антител к чЛф, c-Fos, NeuN и вторичных антител, меченных флуорофорами Alexa Fluor 568, 488, 647; ядра докрашивали Hoechst.

### **Статистический анализ данных**

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова в зависимости от размеров выборок. При нормальном характере распределения применяли однофакторный дисперсионный анализ One-way ANOVA с последующим *post hoc* анализом по критерию Тьюки или критерию Шидака для множественных

сравнений. В остальных случаях применяли непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскелл-Уоллиса ANOVA с последующим *post hoc* анализом по критерию Данна для множественных сравнений. Для внутригрупповых сравнений на двух сроках обследования применяли парный непараметрический критерий Вилкоксона или непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых переменных. Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Мейера (критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование эффектов лактоферрина человека после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе

Влияние чЛф на выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в течение эксперимента мышей было изучено с помощью ежедневного учета в течение 30 дней после облучения. В контрольных группах не было зафиксировано ни одной гибели животных в течение эксперимента. В группе Обл гибель мышей началась на 5-й день и была высокой между 7-м и 14-м днями после облучения. Выживаемость животных в этой группе к 30-му дню составляла 28,1% (Рис. 1а), а СПЖ -  $16,0 \pm 1,7$  дней (Рис. 1б).

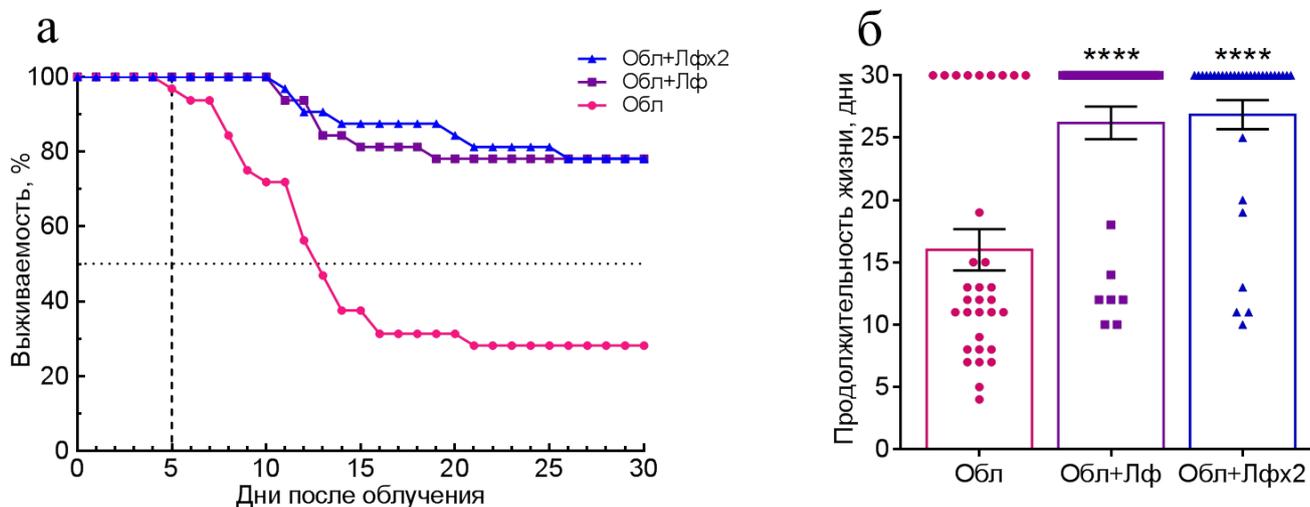


Рисунок 1. Выживаемость (а) и средняя продолжительность жизни в течение эксперимента (б) мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. \*\*\*\* $p < 0,0001$  - отличия от группы Обл (One-way ANOVA).

В группах Обл+Лф и Обл+Лфх2 первая гибель мышей произошла на 11-й день после облучения. Обнаружено, что введение чЛф увеличило выживаемость облученных животных до 78,1% в обеих группах, а СПЖ – до  $26,8 \pm 1,2$  (Обл+Лфх2) и  $26,2 \pm 1,3$  (Обл+Лф) дней.

Во всех трех опытных группах наблюдали снижение массы тела на 3-й день после облучения (Рис. 2). Животные всех опытных групп отличались от

соответствующих контролей с 6-го по 18-й день по этому показателю. К 30-му дню масса мышечной группы Обл не восстановилась даже до исходного уровня. Напротив, уже к 21-му дню масса тела животных опытных групп, получивших чЛф, начала превышать исходную и не отличалась от соответствующих контролей.

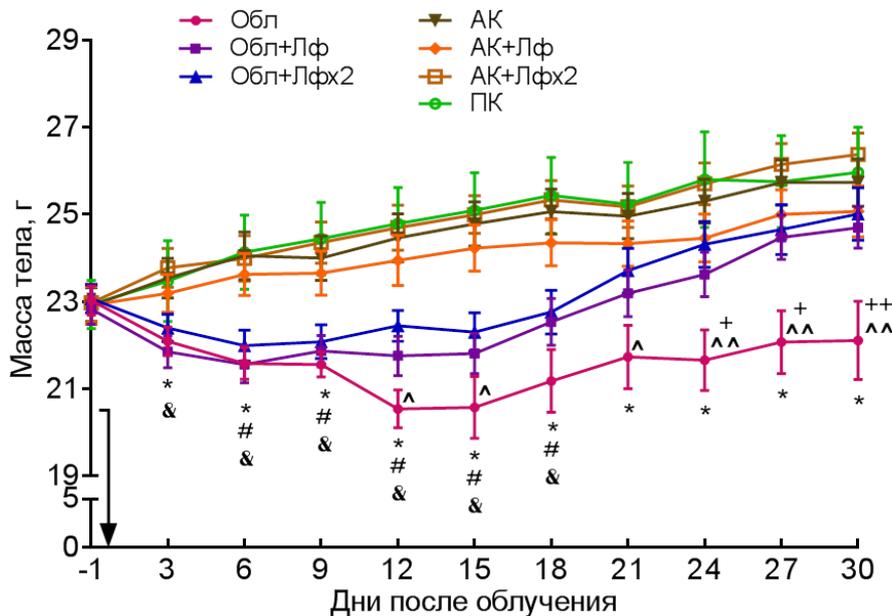


Рисунок 2. Изменение массы тела мышечной группы после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Стрелка указывает день, когда было проведено облучение. \* $p < 0,05$  – Обл vs АК; # $p < 0,05$  – Обл+Лф vs АК+Лф; & $p < 0,05$  – Обл+Лфх2 vs АК+Лфх2; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  – Обл vs Обл+Лф; ^ $p < 0,05$ , ^^ $p < 0,01$  – Обл vs Обл+Лфх2 в тот же день.

Таким образом, введение чЛф позволило увеличить выживаемость облученных мышечных групп и среднюю продолжительность жизни в течение эксперимента, а также оказало компенсаторное действие на индуцированное облучением снижение массы тела.

### **Оценка изменения поведения мышечных групп в тесте «Открытое поле»**

Известно, что острое воздействие высоких доз ионизирующего излучения вызывает существенные изменения поведения. Все группы мышечных групп показали сходную двигательную активность и исследовательское поведение перед экспериментальным воздействием. Результаты измерения пройденного пути в ОП показали, что на 10-й и 20-й дни после облучения общая двигательная активность мышечных групп была снижена по сравнению с соответствующими контролями и восстановилась к 30-му дню.

Количество стоек является мерой исследовательской активности [Carola et al., 2002]. У облученных мышечных групп выявили уменьшение количества стоек на 10-й день после воздействия (Рис. 3). На 20-й день этот показатель в группе Обл был ниже, чем в группах АК, Обл+Лф и Обл+Лфх2. Обе опытные группы, получившие чЛф, не отличались по количеству стоек от соответствующих контролей уже к 20-му дню.

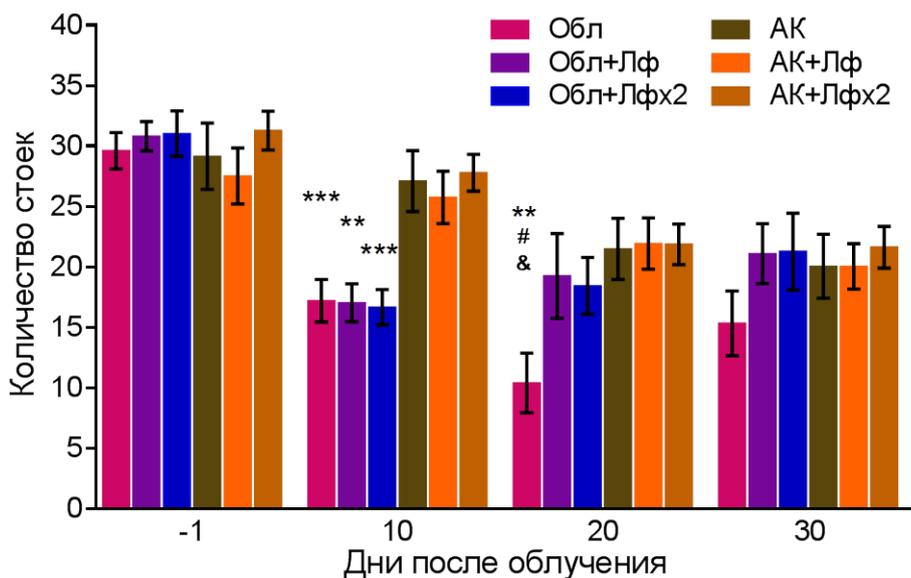


Рисунок 3. Поведение мышей в тесте ОП после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Количество стоек. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – отличия от соответствующих контрольных групп в тот же день; # $p < 0,05$  – отличия от группы Обл+Лф, & $p < 0,05$  – отличия от группы Обл+Лфх2 на 20-й день.

Мыши группы Обл на 10-ый день проводили в центральной зоне меньше времени, чем контрольные (Рис. 4). А на 20-й и 30-й дни этот показатель у них был ниже как по сравнению с контролем, так и по сравнению с мышами групп Обл+Лф и Обл+Лфх2, которые не отличались от контрольных на всех этапах тестирования. Таким образом, введение чЛф оказало компенсаторное действие на индуцированные облучением изменения поведения животных.

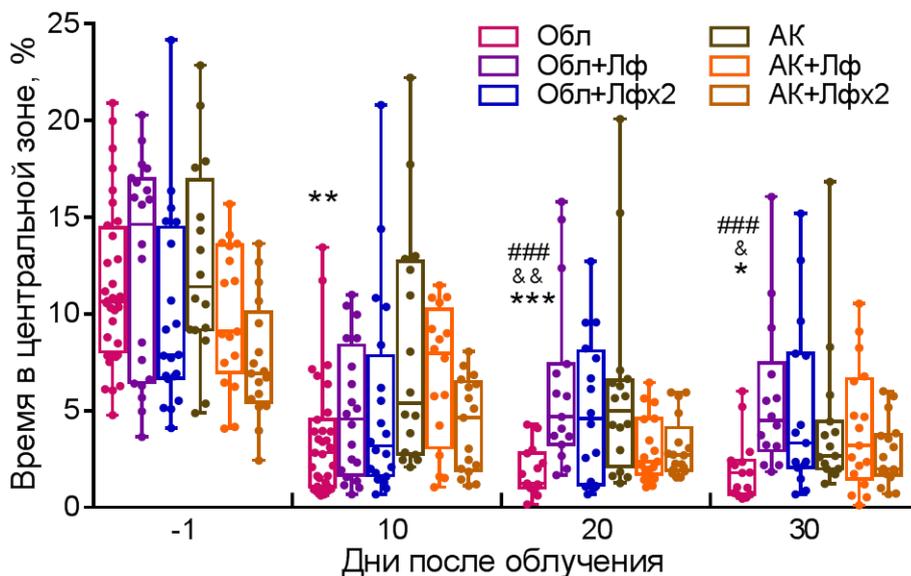


Рисунок 4. Поведение мышей в тесте ОП после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Время, проведенное в центральной зоне, %. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – отличия от группы АК; ### $p < 0,001$  – отличия от группы Обл+Лф; & $p < 0,05$ ; && $p < 0,01$  – отличия от группы Обл+Лфх2 в тот же день.

### ***Исследование изменений показателей крови мышей после гамма-облучения***

Облучение вызвало резкое снижение абсолютного количества лейкоцитов во всех опытных группах (3-й и 10-й дни) (Рис. 5). На 30-й день этот показатель увеличился, хотя в группе Обл продолжал оставаться меньшим, чем в контроле. Обе опытные группы, получившие чЛф, не отличались от соответствующих контролей на 30-й день после облучения.

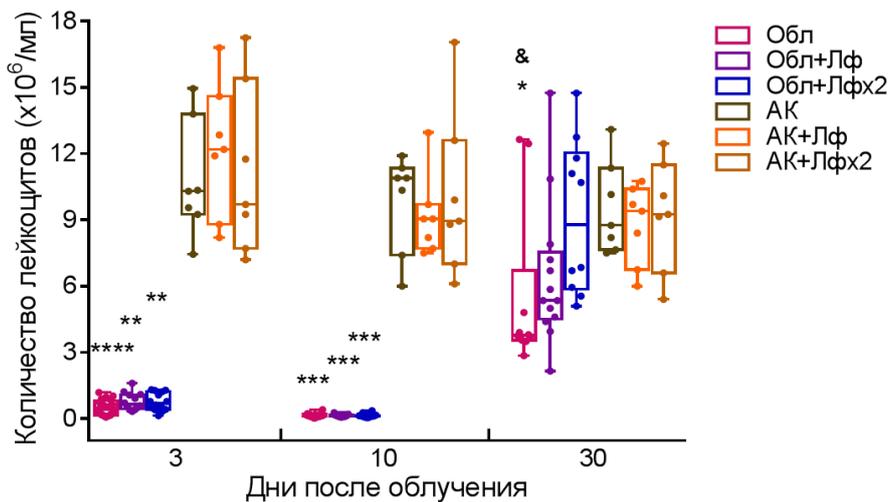


Рисунок 5. Динамика изменения количества лейкоцитов в крови мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  - отличия от соответствующих контрольных групп в тот же день; & $p < 0,05$  – отличия от группы Обл+Лфх2 на 30-й день.

В картине крови опытных групп на 3-й день наблюдали истощение запаса лимфоцитов и увеличение относительного числа нейтрофилов (Рис. 6). Количество моноцитов, эозинофилов и базофилов у облученных мышей не отличалось от контрольных значений. В обеих опытных группах, получивших чЛф, лейкоцитарная формула была восстановлена на 30-й день.

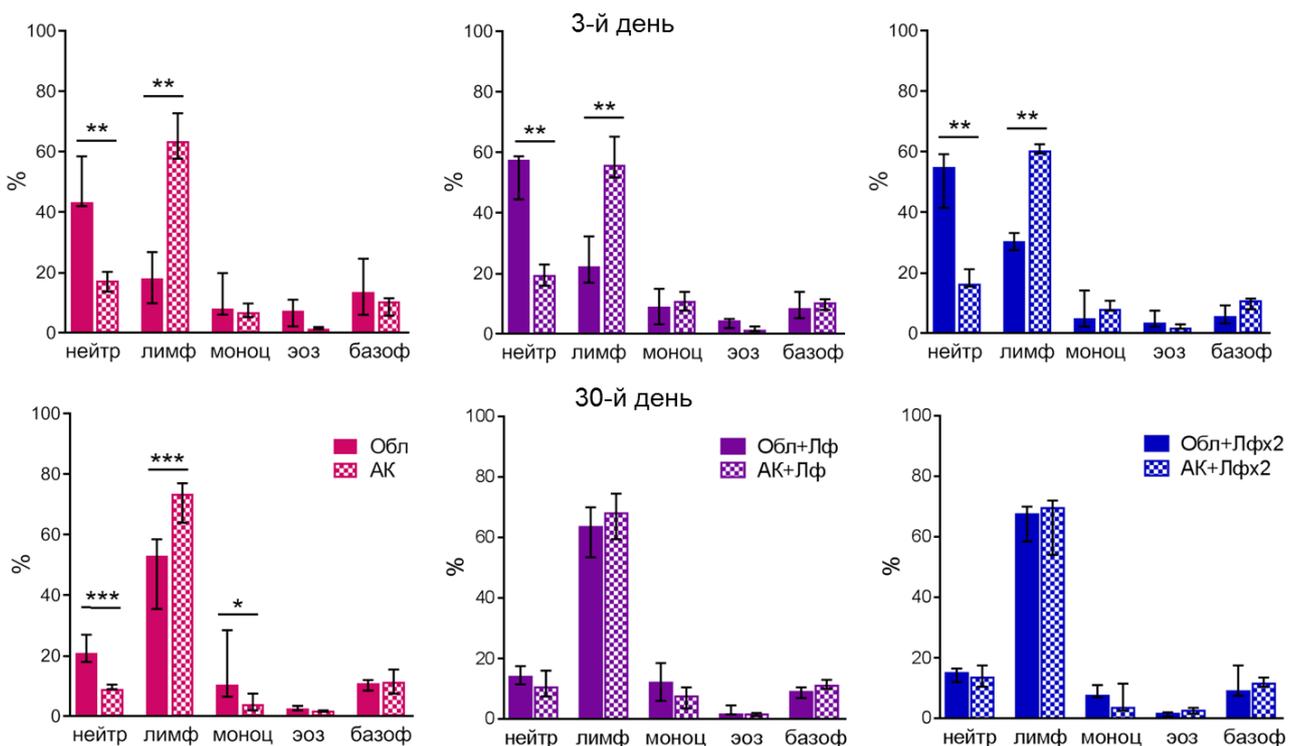


Рисунок 6. Лейкоцитарная формула крови мышей на 3-й и 30-й дни после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. По оси ординат – относительное содержание клеток крови. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$  – отличия от группы Обл+Лф; & $p < 0,05$  – отличия от группы Обл+Лфх2 (U - критерий Манна-Уитни).

Метод лазерной корреляционной спектроскопии основан на измерении спектральных характеристик рассеяния света и позволяет определять размер частиц в биологических жидкостях и их соотношение. Проведенные нами

исследования показали, что ЛК-спектры сыворотки крови мышей имели вид трехмодального распределения. При их анализе выделяли три дискретные зоны по размерам светорассеивающих частиц: мелкие, средние, крупные; и оценивали суммарный вклад в светорассеяние частиц в каждой из этих зон (Рис. 7). Облучение вызвало значительные изменения ЛК-спектров. Во всех опытных группах на 3-й день максимальный вклад в светорассеяние вносили частицы крупного размера. Введение чЛф привело к возвращению параметров сывороточного гомеостаза в пределы их нормальных значений на 30-й день.

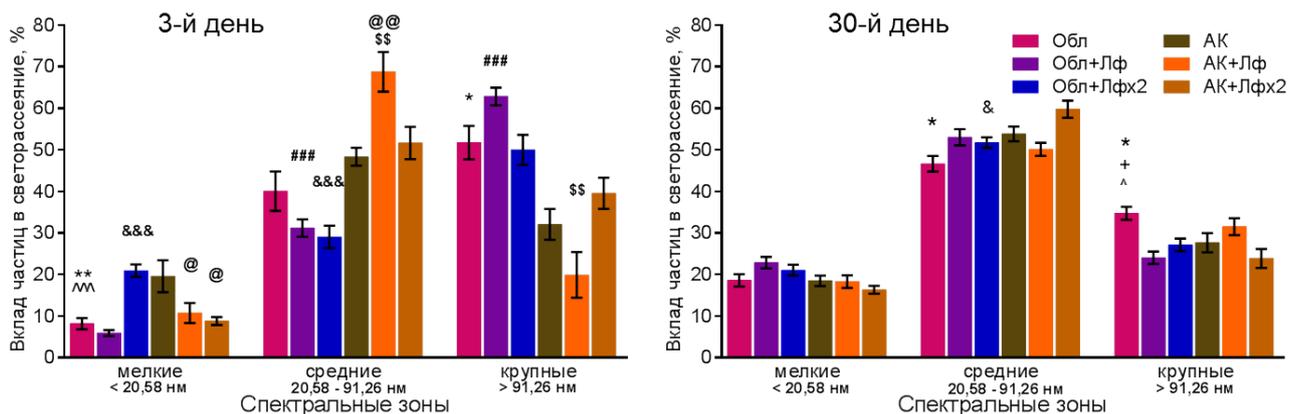


Рисунок 7. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей на 3-й и 30-й дни после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Распределение частиц по спектральным зонам. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  – Обл vs АК, ### $p < 0,001$  – Обл+Лф vs АК+Лф, & $p < 0,05$ , &&& $p < 0,001$  – Обл+Лфх2 vs АК+Лфх2, + $p < 0,05$  – Обл vs Обл+Лф, ^ $p < 0,05$ , ^^ $p < 0,001$  – Обл vs Обл+Лфх2, @ $p < 0,05$ , @@ $p < 0,01$  – отличия от группы АК; \$\$ $p < 0,01$  – отличия от группы АК+Лфх2 (One-way ANOVA с *post hoc* анализом по критерию Шидака).

Представленные данные свидетельствуют о том, что введение чЛф оказало компенсаторное действие на индуцированные облучением снижение общего количества лейкоцитов, изменение лейкоцитарной формулы крови и параметров сывороточного гомеостаза мышей.

### ***Гистологическое исследование динамики изменений ткани селезенки***

Облучение привело к накоплению гемосидерина в красной пульпе селезенки у мышей всех опытных групп, уровень которого повышался от 3-го к 10-му дню, а затем снижался, но оставался выше контрольного на 30-й день.

У мышей группы Обл на 3-й день после воздействия изменялось соотношение между белой и красной пульпой, на 10-й начиналась редукция фолликулов, на 30-й селезенка не имела четкого разделения на белую и красную пульпу, фолликулы были редуцированы. В обеих опытных группах, получивших чЛф, структурная организация селезенки сохранялась в течение эксперимента.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что введение чЛф оказало защитное действие на структурную организацию селезенки.

### Изучение эффектов лактоферрина человека у мышей на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов

У животных, получивших МФТП, наблюдали экстрапирамидные нарушения. Генерализованный тремор низкой и средней амплитуды появился вскоре после инъекции и сохранялся в течение 30-40 мин. Пилоэрекция появилась через 2-3 мин, реакция Штрауба, ригидность и гипокинезия – через 10-14 мин. Предварительное введение чЛф не предотвращало эти острые эффекты МФТП.

В группе МФТП на 7-й день после введения нейротоксина наблюдали снижение массы тела (Рис. 8). Прирост массы в группе МФТП был ниже по сравнению с контрольной группой на 7-ой, 14-ый и 21-ый день, а на 28-ой день и по сравнению с группой МФТП+Лф. В группах Контроль и МФТП+Лф масса тела мышей постепенно увеличивалась с 7-го по 28-й день. В течение всего эксперимента не наблюдали различий в приросте массы между группами Контроль и МФТП+Лф. Таким образом, чЛф оказал защитное действие на изменение массы тела животных после острого воздействия МФТП.

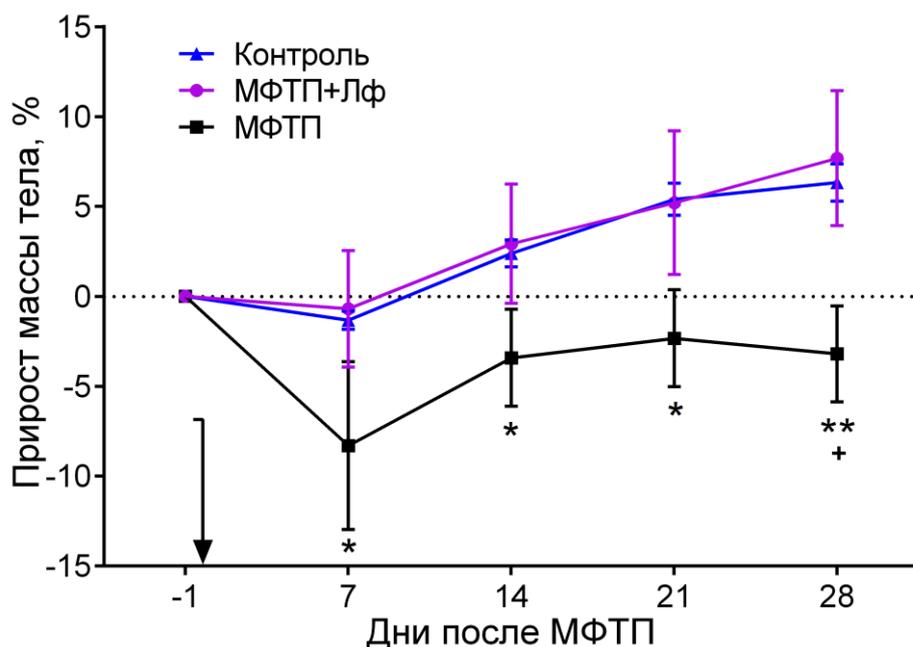


Рисунок 8. Изменение прироста массы тела мышей, получивших МФТП/физраствор. Стрелка указывает на день, когда они были введены. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  – отличия от группы Контроль; + $p < 0.05$  – отличия от группы МФТП+Лф в каждый момент времени (Кра-скелл-Уоллиса ANOVA с *post hoc* анализом по критерию Данна).

критерию Данна).

У мышей, получивших МФТП, наблюдали значительное нарушение координации движений (в тесте ротарод, Рис. 9а) и уменьшение средней длины шага (Рис. 9б) через 60, 120 мин, один и два дня после инъекции. Предварительное введение Лф не предотвращало эти острые эффекты МФТП.

Восстановление этих параметров наблюдали в обеих группах, получивших нейротоксин, на 7-й день.

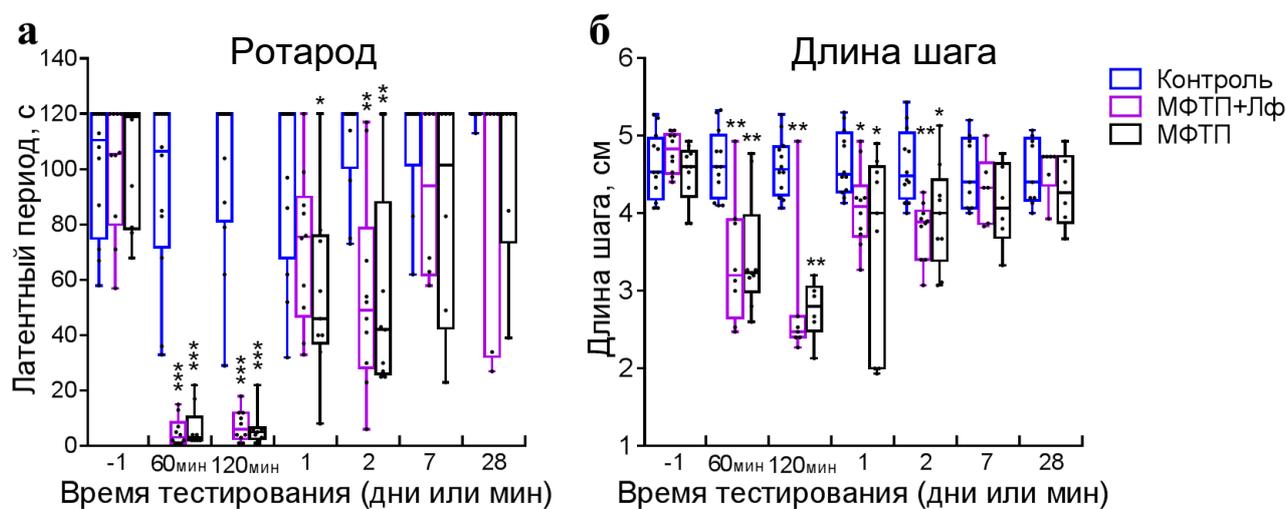
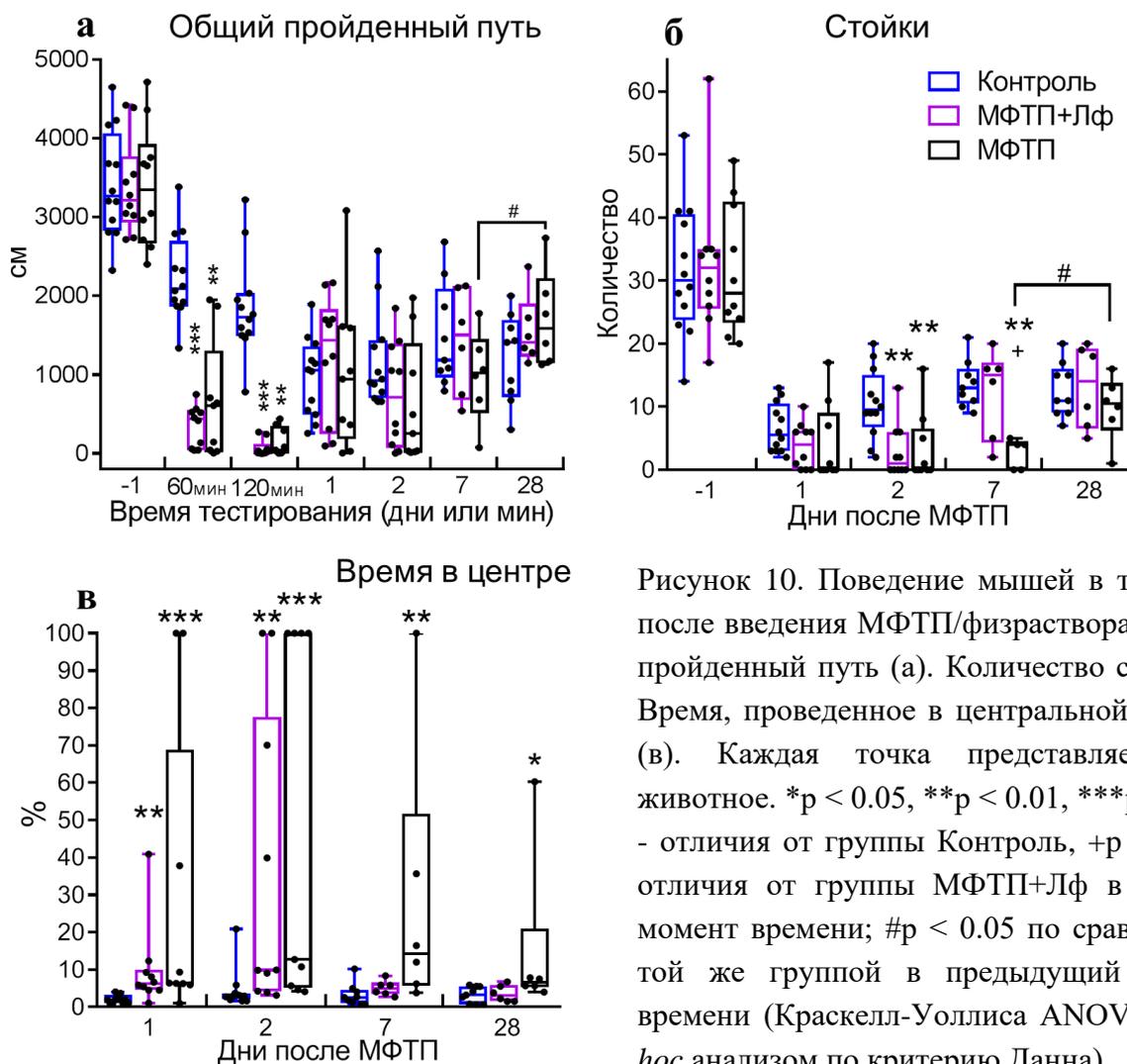


Рисунок 9. Латентный период падения в тесте ротарод (а) и длина шага (б) мышей, получивших МФТП/физраствор. Каждая точка представляет одно животное. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  - отличия от группы Контроль в каждый момент времени (Краскелл-Уоллиса ANOVA с *post hoc* анализом по критерию Данна).

#### **Оценка изменения поведения мышей в тесте «Открытое поле»**

Все группы мышей показали сходную двигательную активность и исследовательское поведение перед инъекцией МФТП/физраствора. Интоксикация, вызванная МФТП, сильно подавляла поведенческую активность животных в день его введения. Общий пройденный путь в ОП уменьшился как в группе МФТП, так и в МФТП+Лф по сравнению с контролем через 60 мин и 120 мин после введения нейротоксина (Рис. 10а). На более поздних сроках тестирования различий по этому параметру между группами не наблюдали.

На 2-й день количество стоек в обеих группах, получивших МФТП, было меньше, чем в контрольной (Рис. 10б). На 7-й день в группе МФТП+Лф наблюдали увеличение этого показателя до уровня контроля. В то время как в группе МФТП количество стоек не увеличилось и было ниже, чем в 2-х других группах. Мы не выявили различий между группами Контроль и МФТП+Лф по расстоянию, пройденному в центре, количеству выходов в центр и латентному периоду выхода из центральной зоны на протяжении всего эксперимента. Животные, получившие МФТП, проводили больше времени в центре ОП, чем контрольные в 1-й и во 2-й дни (Рис. 10в). Однако, на 7-й и 28-й дни только в группе МФТП этот параметр был больше по сравнению с контролем. Мыши, предварительно получившие Лф, полностью восстановились по изученным показателям на 7-й день.



Представленные результаты свидетельствуют о том, что двукратное введение чЛф стимулировало быстрое восстановление поведения в ОП, нарушенного нейротоксином. Это согласуется с результатами Xu и соавт., которые показали, что введение рекомбинантного чЛф, экспрессированного в рисе (в/б, 4 мг/кг x 7 дней), может эффективно корректировать двигательные и поведенческие расстройства у шестимесечных мышей, вызванные МФТП [Xu et al., 2019]. Liu и соавт. также продемонстрировали, что предварительное введение чЛф (внутрижелудочно в различных дозах; за 2 дня до и в течение 5 дней во время введения МФТП) ослабляло эффект МФТП в тесте «Вертикальный стержень» на следующий день после последнего введения [Liu et al., 2020]. Однако следует отметить, что схожие эффекты восстановления в нашей работе и работах указанных авторов были опосредованы разными протоколами введения Лф: двукратным предварительным по сравнению с длительным как предваряющим введение нейротоксина, так и на фоне его введения.

### ***Гистологическое исследование нейродегенерации, вызванной МФТП***

Нейротоксин индуцировал потерю ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС (Рис. 11а, в, д) и ДА-ергических волокон в стриатуме (Рис. 11ж, и, л) на 2-й день. Анализ выявил уменьшение количества ТГ+ клеток в компактной части ЧС (Рис. 11н) и уменьшение оптической плотности ТГ-специфического окрашивания в стриатуме (Рис. 11о) мышей, получивших МФТП, по сравнению с контролем. Количество ТГ+ клеток было снижено до 34% и 36%, а оптическая плотность ТГ+ волокон - до 35% и 33% от контроля в группах МФТП и МФТП+Лф соответственно.

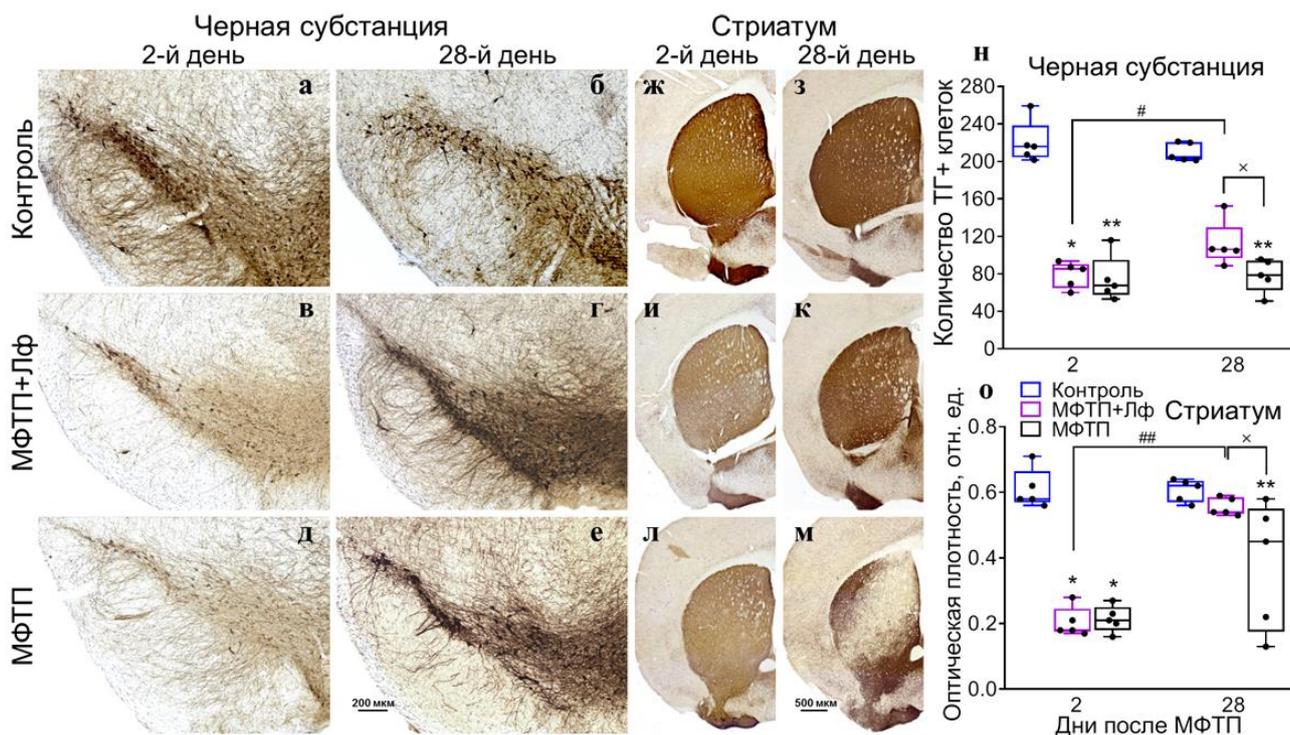


Рисунок 11. Эффекты чЛф на нейродегенерацию, вызванную введением МФТП. Репрезентативные микрофотографии срезов компактной части ЧС (а–е) и стриатума (ж–м) после ИГХ-окрашивания на ТГ. Количество ТГ+ нейронов в компактной части ЧС (н). Оптическая плотность ТГ+ волокон в стриатуме (о). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  - отличия от группы Контроль в каждый момент времени; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  по сравнению с той же группой в предыдущий момент времени;  $\chi p < 0.05$  (Краскелл-Уоллиса ANOVA с *post hoc* анализом по критерию Данна).

В группе МФТП потеря ТГ+ нейронов была необратимой (Рис. 11е, н), а оптическая плотность ТГ-специфического окрашивания в стриатуме (Рис. 11м, о) на 28-й день была ниже как по сравнению с Контролем, так и с группой МФТП+Лф. чЛф способствовал ускоренному восстановлению функциональной активности клеток нигростриатной системы мозга мышей после острого воздействия нейротоксина, которое проявлялось в увеличении количества ТГ+-клеток в ЧС (с 36% до 53% относительно контрольных животных) и оптической плотности ТГ+ волокон в стриатуме (с 33% до 92%) (Рис.11).

Эффект функционального восстановления может быть вызван увеличением оборота ДА в оставшихся ДА-ергических нейронах или увеличением количества ДА-ергических рецепторов в постсинаптических клетках. Кроме того, возможно, что новые нейроны подключаются к выработке ТГ путем изменения собственного фенотипа [Derboylu et al., 2014]. Введение чЛф, вероятно, привело к восстановлению, индуцировав один или несколько из этих процессов. Мы предполагаем, что чЛф запускает каскад долговременных событий в клетке, которые помогают ей пережить острое нейротоксическое воздействие и впоследствии восстановить свою функциональную активность. Это могут быть механизмы, опосредованные изменением экспрессии генов [Chen et al., 2015] и вследствие этого долговременными изменениями в клетках, подвергшихся воздействию как чЛф, так и нейротоксина.

### **Изучение возможных путей транспорта человеческого лактоферрина в МОЗГ МЫШИ**

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что чЛф детектировался в мозге мышей через 10 и 60 мин после интраназального (и/н), через 5, 15 и 30 мин после подъязычного, через 30 и 60 мин после внутрибрюшинного введения. При конъюнктивальном введении белок в анализируемых образцах не наблюдали. При и/н введении интенсивность флуоресцентного сигнала была значительно сильнее через 10 мин, чем через 60 мин после введения. Ранее коровий Лф был выявлен с помощью иммуноферментного анализа в гомогенатах мозга мышей после введения белка перорально [Fischer et al., 2007] и мозга крыс — после подъязычного введения [Hayashi et al., 2017].

Для дальнейшего исследования нами был выбран и/н путь введения. При соразмерной интенсивности флуоресцентного сигнала в этом случае детекция чЛф в мозге мышей происходила после введения значительно меньшего количества белка. Иммунофлуоресцентное исследование парасагиттальных срезов мозга выявило, что через 10 мин после и/н введения Лф детектировался в цитоплазме ряда клеток в соматосенсорной, моторной, инсулярной, париетальной пириформной областях неокортекса, в СА2 и СА3 зонах гиппокампа, в стриатуме, в оgrade, вентральном постеромедиальном и боковом коленчатом ядрах таламуса, в задней таламической ядерной группе (Рис. 12).

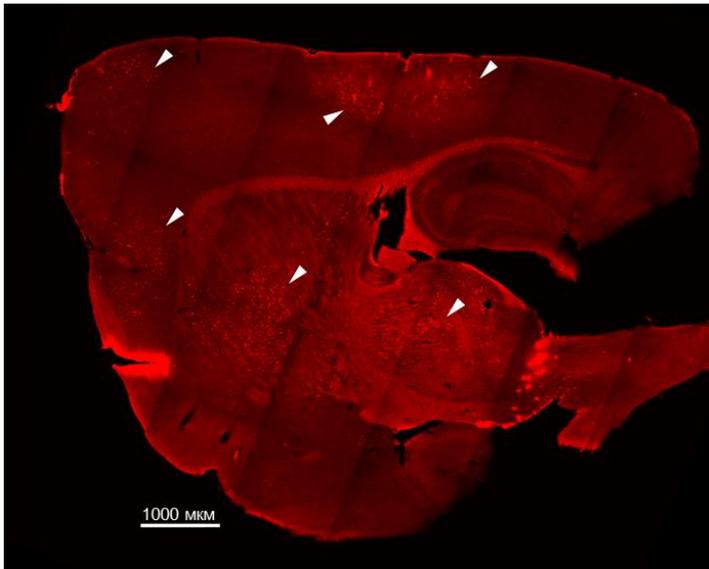


Рисунок 12.  
Иммунофлуоресцентная детекция чЛф через 10 минут после однократного интраназального введения. Визуализация распределения чЛф+ клеток (стрелки) в структурах мозга.

Была проведена оценка колокализации чЛф и маркеров разного типа клеток. Иммунофлуоресцентный анализ выявил цитоплазматическую локализацию чЛф и его колокализацию с маркером эндотелиальных клеток CD31 (Рис. 13). Колокализации включения Лф с маркерами зрелых нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) не наблюдали.

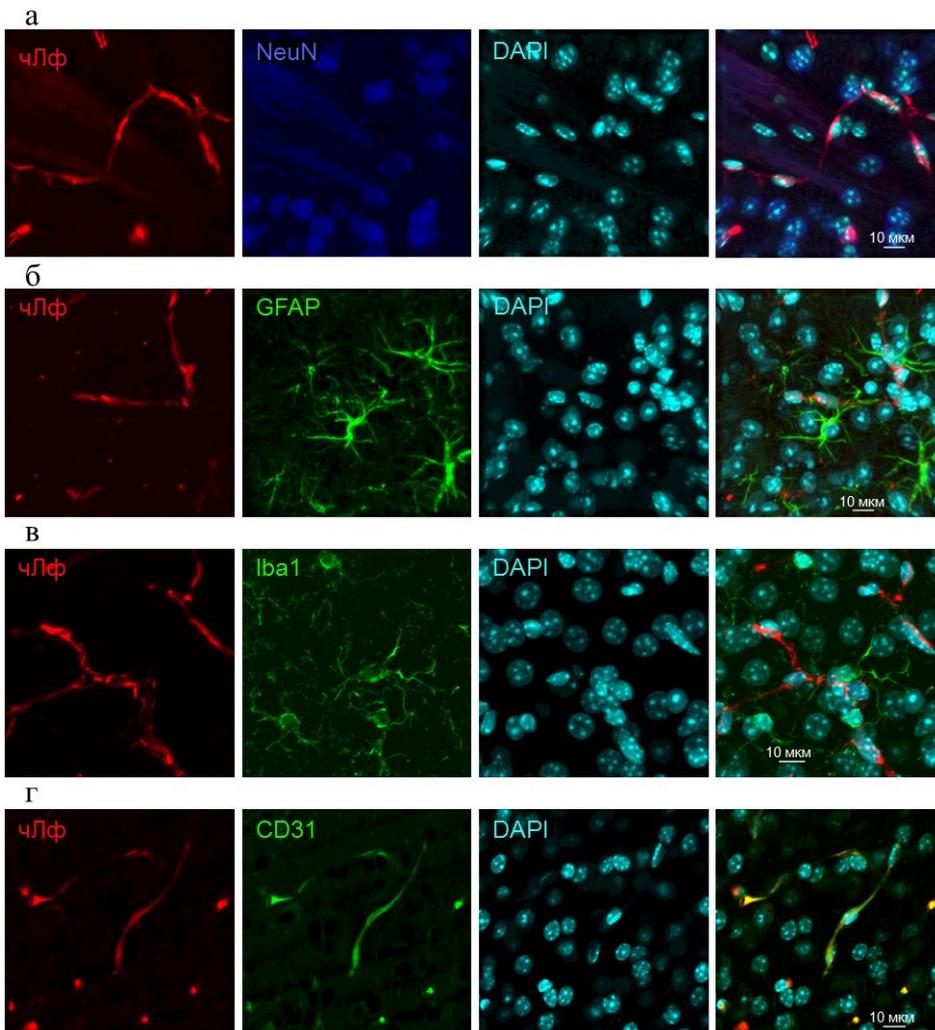


Рисунок 13. Иммунофлуоресцентная детекция маркеров зрелых нейронов (NeuN, синий) (а), астроцитов (GFAP, зеленый) (б), микроглии (Iba1, зеленый) (в), эндотелиальных клеток (CD31, зеленый) (г) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши через 10 мин после интраназального введения белка. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой).

Мы предположили, что в клетках мозга мыши могут существовать специфические места связывания чЛф, и использовали прямое нанесение раствора белка на фиксированные плавающие срезы для проверки этой гипотезы. Иммунофлуоресцентный анализ клеток мозга мыши, включивших чЛф, выявил колокализацию белка с маркерами зрелых нейронов, астроцитов и микроглии. В этом случае чЛф имел ядерную локализацию (Рис. 14). Лф+ клетки не экспрессировали маркер эндотелиальных клеток, что указывало на отсутствие биоспецифичности чЛф к ядрам этих клеток.

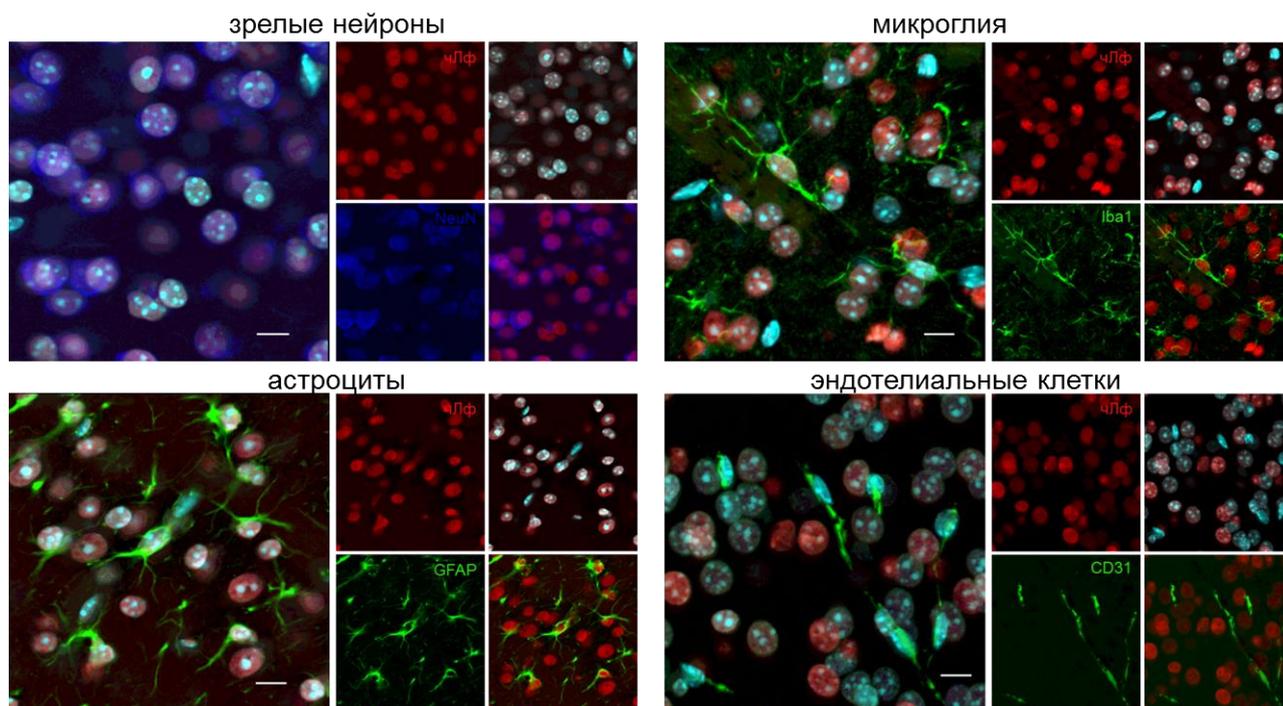


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентная детекция маркеров зрелых нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP), микроглии (Iba1), эндотелиальных клеток (CD31) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши после 16 ч инкубации срезов с экзогенным белком. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при интраназальном, подъязычном и внутрибрюшинном способах введения чЛф проникал в мозг мыши. После интраназального введения экзогенный белок быстро попадал в мозг и накапливался в цитоплазме эндотелиальных клеток сосудов в определенных областях неокортекса, гиппокампе, стриатуме и таламусе. Используя прямое нанесение чЛф на фиксированные плавающие срезы, мы обнаружили высокоспецифичные сайты связывания белка в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши. По-видимому, именно эти клетки являются конечными мишенями для Лф в мозге, поскольку он не был обнаружен в ядрах эндотелиальных клеток.

## Исследование влияния лактоферрина человека на экспрессию транскрипционного фактора c-fos в первичных нейрональных культурах в условиях физиологической стимуляции

ИГХ окрашивание выявило как цитоплазматическую, так и ядерную локализацию чЛф в клетках через 2, 24 и 72 ч после его введения в культуральную среду. Белок быстро проникал в цитоплазму. Уже через 2 ч чЛф детектировался в цитоплазме 70%, через 24 ч - 83% и через 72 ч - 84% клеток культуры (Рис. 15а). Проникновение чЛф в ядро происходило медленнее. Через 2 ч он детектировался в ядрах 22%, через 24 ч – 48%, через 72 ч - 77% клеток культур. Иммунореактивность клеток культуры к нейрональному маркеру NeuN указала на то, что на 7-й день культивирования *in vitro*, около 85% из них были нейронами. Через 24 ч иммунореактивность чЛф была локализована в цитоплазме 97% и ядрах 61% NeuN+ клеток (Рис. 15б). Стимуляция 50 мМ KCl ускоряла проникновение белка в ядро и значительно увеличивала этот показатель до 98% через 2 ч.

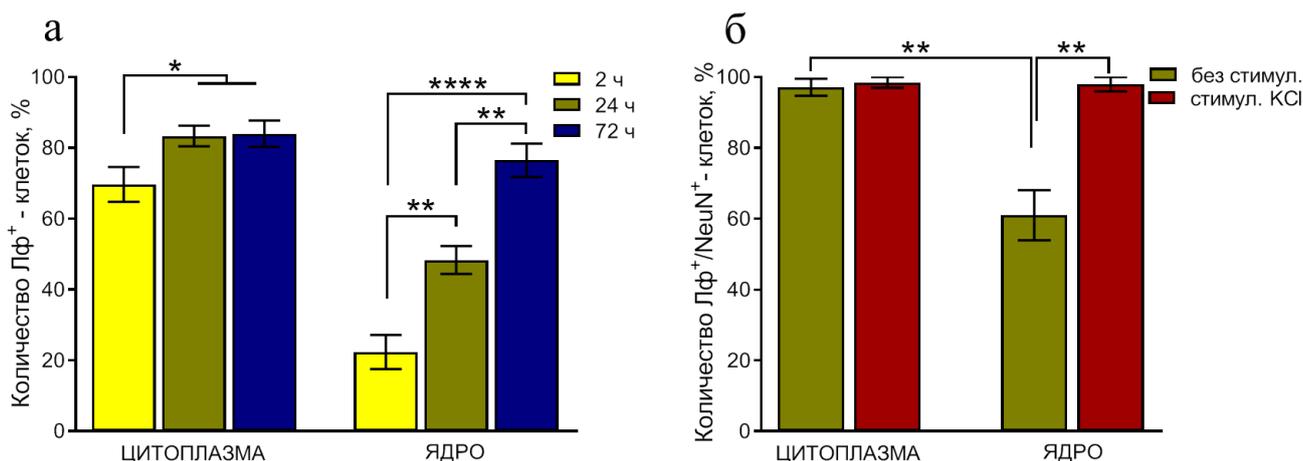


Рисунок 15. Динамика проникновения чЛф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа. чЛф был добавлен на 2, 24 или 72 ч (а). Через 2 ч после стимуляции KCl, чЛф был предварительно добавлен на 24 ч (б). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . One-way ANOVA с последующим *post hoc* анализом по критерию Шидака.

чЛф детектировался в цитоплазме всех c-Fos+ клеток в группе KCl+Лф через 2 ч после стимуляции (Рис. 16а). Наблюдали колокализацию включения Лф и экспрессии c-Fos в ядрах некоторых клеток культуры (Рис. 16б).

В группах ПК и ПК+Лф экспрессии c-Fos не наблюдали (Рис. 17). Через 2 ч после смены среды в обеих группах активного контроля около 15% клеток экспрессировали этот белок. В клетках культур опытных групп стимуляция вызвала индукцию экспрессии белка c-Fos, значительно отличающуюся как от пассивного, так и от активного контролей. При этом предварительное введение чЛф увеличивало количество клеток, экспрессирующих c-Fos с 35 до 50%.

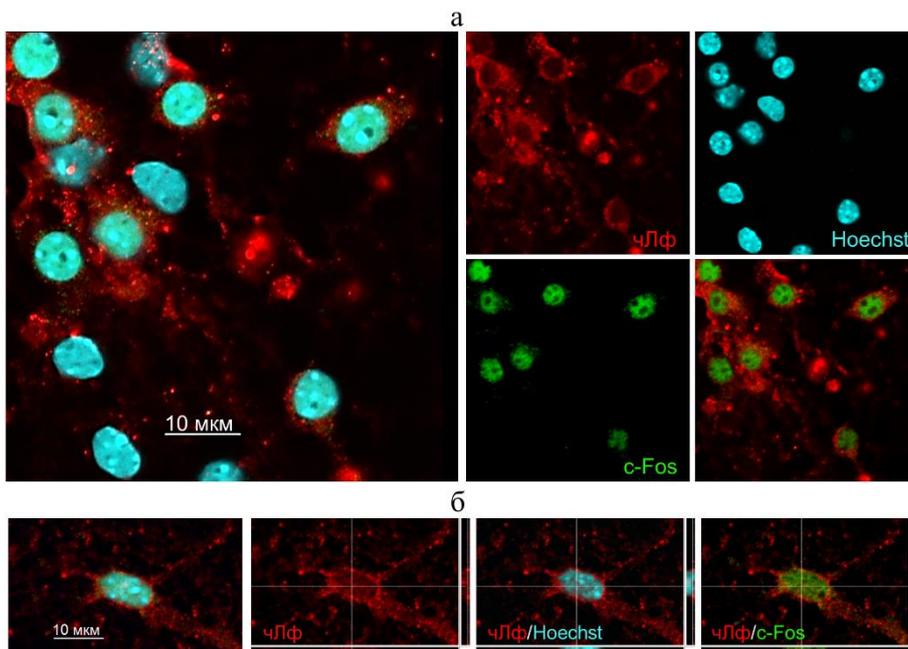


Рисунок 16. Иммунофлуоресцентная детекция белка c-Fos (зеленый) и чЛф (красный) в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 ч после стимуляции 50 мМ КС1. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой).

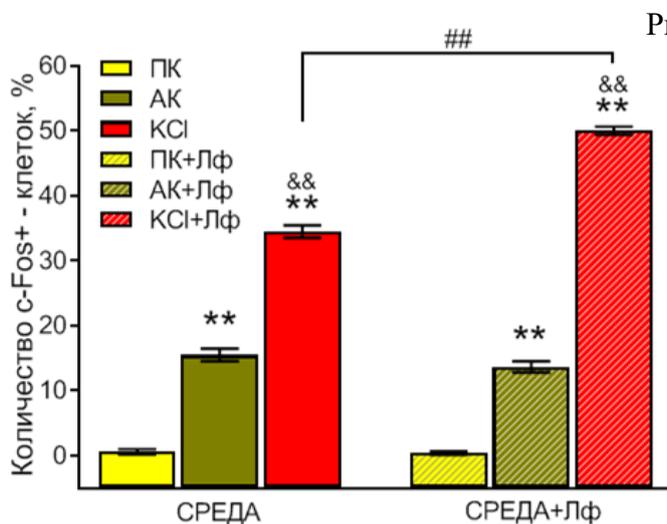


Рисунок 17. Количественный анализ экспрессии белка c-Fos в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 ч после стимуляции 50 мМ КС1. \*\* $p < 0,0001$  – отличия от соответствующих групп пассивного контроля; && $p < 0,0001$  – отличия от соответствующих групп активного контроля; ## $p < 0,0001$  – отличия от группы КС1. One-way ANOVA с *post hoc* анализом по критерию Тьюки

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования демонстрируют положительное влияние чЛф на компенсаторные механизмы, активирующиеся при облучении в сублетальной дозе и остром воздействии нейротоксина. Механизм действия чЛф в этих экспериментальных моделях, по-видимому, связан с прерыванием одного или сразу нескольких звеньев патогенеза, общих для радиационного и нейротоксического поражений: активации реакций свободнорадикального окисления, воспаления, нарушения регуляции репарации ДНК и т.д. При системном введении чЛф проникает в мозг мыши и способствует ускоренному восстановлению функциональной активности клеток нигростриатной системы после воздействия нейротоксина. чЛф усиливает экспрессию белка c-Fos, обеспечивающего долговременную пластичность, в ядрах клеток нейрональной культуры в ответ на стимуляцию.

Полученные результаты расширяют представление об участии Лф в защитных и компенсаторных механизмах систем организма. Они свидетельствуют о перспективности разработки на основе Лф радиопротекторных препаратов для профилактики и лечения осложнений при профессиональном облучении, для снижения побочных эффектов лучевой терапии, о возможности потенциального использования Лф в качестве терапевтического средства при лечении нейродегенеративных заболеваний.

## **ВЫВОДЫ**

1. Человеческий Лф оказывает полисистемное влияние на организм экспериментальных животных при облучении в сублетальной дозе, которое проявляется в увеличении выживаемости с 28% до 76%, компенсаторном действии на индуцированные облучением снижение массы тела и общего количества лейкоцитов, изменение лейкоцитарной формулы крови и параметров сывороточного гомеостаза, защитном эффекте на структурную организацию селезенки, восстановлении поведения облученных мышей.
2. В экспериментальной модели гибели нейронов чЛф оказывает защитное действие и способствует ускоренному восстановлению функциональной активности клеток нигростриатной системы мозга мышей, которое проявляется в увеличении количества тирозингидроксилаза-позитивных (ТГ+) клеток в черной субстанции (с 36% до 53% относительно контрольных животных) и оптической плотности ТГ+ волокон в стриатуме (с 33% до 92% относительно контрольных животных), и связанного с ней поведения после острого воздействия нейротоксина МФТП.
3. Человеческий Лф проникает в мозг мыши при интраназальном, подъязычном и внутрибрюшинном способах введения, избирательно накапливаясь в цитоплазме эндотелиальных клеток сосудов в ряде структур. В ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши существуют высокоспецифичные сайты связывания чЛф.
4. Физиологическая стимуляция усиливает проникновение чЛф в ядра клеток нейрональной культуры, что коррелирует с усилением экспрессии транскрипционного фактора c-Fos и сопровождается ядерной колокализацией этих белков.

## **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**

**Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности**  
**3.3.3. Патологическая физиология, и приравненные к ним публикации**

1. **Копаева 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. – С. 106-113. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3. Переводная версия: **Кораева М.Ю.**, Cherepov A.B., Zarayskaya I.Y., Nesterenko M.V. Transport of human lactoferrin into mouse brain: administration routes and distribution // Bull Exp Biol Med. – 2019. – Vol. 167, № 4. – P. 561-567. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3
2. **Копаева 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. – Т. 18, № 1. – С. 29-33. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33
3. **Кораева М.Ю.**, Alchinova I.B., Nesterenko M.V., Cherepov A.B., Demorzhi M.S., Zarayskaya I.Y., Karganov M.Y. Radioprotective effect of human lactoferrin against gamma-irradiation with sublethal dose // RAD Conf Proc. – 2020. – Vol. 4. – P. 45-49. DOI: 10.21175/RadProc.2020.09
4. **Кораева М.Ю.**, Cherepov A.B., Nesterenko M.V., Zarayskaya I.Y. Pretreatment with human lactoferrin had a positive effect on the dynamics of mouse nigrostriatal system recovery after acute MPTP exposure // Biology. – 2021. – Vol. 10, № 1. – P. 24. DOI: 10.3390/biology10010024
5. **Копаева М.Ю.**, Азиева А.М., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Лактоферрин человека усиливает экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции // Патогенез. – 2021. – Т. 19, № 1. – С. 74-78. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.01.74-78

#### **Материалы конференций (тезисы)**

1. **Копаева М.Ю.**, Зарайская И.Ю., Черепов А.Б., Нестеренко М.В. Проникновение лактоферрина человека в мозг мыши при различных путях введения. // XIV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Россия, 2018, Труды конгресса. – С. 267-268.
2. **Копаева М.Ю.**, Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. Использование различных методов введения лактоферрина человека мышам с последующей его локализацией в мозге. // XV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Россия, 2019, Труды конгресса. – С. 234-235.
3. **Копаева М.Ю.**, Азиева А.М., Смирнова А.В., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Клеточная локализация лактоферрина человека в культуре

клеток головного мозга мышей в условиях стимуляции. // VIII Научно-практическая конференция с международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». Ростов-на-Дону, 2019, Материалы конференции. – С. 166-167.

4. **Копаева М.Ю.**, Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. Лактоферрин эффективно влияет на уровень восстановления экспрессии тирозингидроксилазы в нигростриатной системе мышей в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма // VI Съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс. ActaNaturae, спецвыпуск, 2019, Научные труды. – Т. 1. – С. 39.
5. **Копаева М.Ю.**, Alchinova I.B., Nesterenko M.V., Cherepov A.B., Karganov M.Yu. Radioprotective effect of human lactoferrin against gamma-irradiation with sublethal dose // Eighth International Conference on Radiation in Various Fields of Research, Virtual Conference. RAD Centre, Niš, Serbia, 2020, Book of abstracts. – P. 118.
6. **Копаева М.Ю.**, Азиева А.М., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Лактоферрин человека увеличивает экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в культуре клеток головного мозга мышей в условиях стимуляции // XVII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Россия, 2021, Труды конгресса. – С. 200.
7. **Копаева М.Ю.**, Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Деморжи М.С. Зарайская И.Ю., Карганов М.Ю. Компенсаторное действие лактоферрина при остром гамма-облучении мышей // VIII Съезд по радиационным исследованиям. Москва, 2021, Материалы съезда. – С. 222.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – активный контроль  
БП – болезнь Паркинсона  
в/б – внутривенное введение  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная  
хроматография  
ДА – дофамин  
ДА-ергический нейрон –  
дофаминергический нейрон  
ИГХ анализ – иммуногистохимический  
анализ

ЛК-спектры – лазерно-корреляционные  
спектры  
МФТП – 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-  
тетрагидропиридин  
Обл – облучение  
ОП – тест «Открытое поле»  
СПЖ – средняя продолжительность жизни  
ТГ – тирозингидроксилаза  
чЛф – человеческий лактоферрин  
ЧС – черная субстанция