

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ
ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»

На правах рукописи

КОПАЕВА МАРИНА ЮРЬЕВНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА
ПРИ РАДИАЦИОННОМ И НЕЙРОТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

КАРГАНОВ МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ
доктор биологических наук,
профессор

ЗАРАЙСКАЯ ИРИНА ЮРЬЕВНА
кандидат биологических наук

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Лактоферрин как полифункциональный белок и его участие в физиологических процессах организма.....	13
1.1.1. Структура и свойства белка лактоферрина	13
1.1.2. Рецепторы к лактоферрину и клетки-мишени	14
1.1.3. Гены <i>лактоферрина</i> и их регуляция	17
1.1.4. Экспрессия белка лактоферрина в организме	19
1.1.5. Метаболизм лактоферрина.....	21
1.1.6. Лактоферрин и метаболизм железа	23
1.1.7. Механизмы действия лактоферрина	24
1.1.8. Лактоферрин при нейродегенеративных заболеваниях	28
1.1.9. Потенциал лактоферрина в терапии радиационных поражений и нейродегенеративных заболеваний	29
1.2. Действие ионизирующего излучения на организмы	30
1.2.1. Патогенез лучевого поражения.....	31
1.2.2. Механизмы действия антиоксидантов	32
1.2.3. Физиологические и поведенческие изменения у мышей, вызванные острым воздействием сублетальных доз ионизирующего излучения	33
1.3. Нейроны <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> как модельный объект токсического и стимулирующего воздействий.....	35
1.3.1. Патогенез болезни Паркинсона и механизмы нейродегенерации.....	35
1.3.2. Нейротоксическая модель болезни Паркинсона на основе введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина	36
1.3.3. Динамика нейродегенеративных и поведенческих изменений у мышей, вызванных введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина	37
1.3.4. Экспрессия транскрипционного фактора <i>c-Fos</i> в нейрональных культурах.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Исследование эффектов лактоферрина человека после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе	41
2.1.1. Экспериментальные группы и воздействия	41
2.1.2. Измерение массы тела животных	42
2.1.3. Анализ поведения мышей в тесте «Открытое поле»	42

2.1.4. Сбор и анализ образцов	43
2.2. Изучение эффектов лактоферрина человека на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов в нигростриатной системе мозга мышей	45
2.2.1. Экспериментальные группы и воздействия	45
2.2.2. Измерение массы тела животных	47
2.2.3. Тест «Открытое поле»	47
2.2.4. Ротарод	47
2.2.5. Длина шага	48
2.2.6. Сбор образцов	48
2.2.7. Иммуногистохимия	49
2.2.8. Гистологический анализ	50
2.3. Изучение возможных путей транспорта человеческого лактоферрина в мозг мыши.....	51
2.3.1. Введение человеческого лактоферрина	51
2.3.2. Сбор образцов.....	51
2.3.3. Иммуногистохимическая детекция человеческого лактоферрина.....	52
2.3.4. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин	53
2.3.5. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин при прямой аппликации белка на срезы.....	53
2.3.6. Иммунофлуоресценция и анализ	54
2.4. Исследование влияния лактоферрина человека на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в первичных нейрональных культурах после физиологической стимуляции...	54
2.4.1. Экспериментальные группы и стимуляция	55
2.4.2. Оценка степени фрагментации геномной ДНК в клетках нейрональных культур после стимуляции.....	56
2.4.3. Динамика проникновения Лф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа.....	57
2.4.4. Иммуноцитохимическая детекция белков	57
2.5. Статистическая обработка данных	58
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОСТРОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ В СУБЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЕ	59
3.1. Выживаемость и средняя продолжительность жизни мышей после тотального гамма-облучения	59
3.2. Изменение массы тела животных	60
3.3. Оценка изменения поведения мышей в тесте «Открытое поле»	62
3.4. Исследование изменений показателей крови мышей после гамма-облучения	65

3.4.1. Уровень гемоглобина.....	65
3.4.2. Общее количество лейкоцитов	66
3.4.3. Лейкоцитарная формула крови.....	66
3.5. Исследование изменений в субфракционном составе сыворотки крови мышей после гамма-облучения	69
3.6. Гистологическое исследование динамики изменений тканей селезенки и печени мышей после тотального гамма-облучения.....	75
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ НА МОДЕЛИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ.....	85
4.1. Изменение прироста массы тела животных	85
4.2. Ротарод.....	86
4.3. Длина шага.....	87
4.4. Оценка изменения поведения мышей в тесте «Открытое поле».....	87
4.5. Гистологическое исследование нейродегенерации, вызванной МФТП.....	92
4.6. Корреляция между количеством стоек в тесте «Открытое поле» и количеством ТН-положительных иммунореактивных нейронов и волокон.....	94
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ТРАНСПОРТА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛАКТОФЕРРИНА В МОЗГ МЫШИ	96
5.1. Исследование распределения чЛф в мозге мышей после его введения	96
5.2. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин после введения его животным	97
5.3. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин при прямой аппликации белка на срезы.....	99
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА c-FOS В ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ.....	102
6.1. Динамика проникновения чЛф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа.....	102
6.2. Оценка степени фрагментации геномной ДНК в клетках нейрональных культур после стимуляции	103
6.3. Исследование влияния чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

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]. Биологические свойства Лф опосредованы специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней [Suzuki and Lönnerdal, 2002].

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], снижении повреждения эпителия тонкой кишки животных [Wei et al., 2019]. Применение Лф в качестве терапевтического средства для минимизации радиационно-индуцированных повреждений изучено недостаточно, в связи с чем необходимо комплексное исследование влияния Лф на динамику изменения интегральных и системных показателей состояния организма.

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 [Faucheux 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]. Нейропротекторный эффект экзогенного Лф при паркинсоническом синдроме в отдельно взятые сроки после введения нейротоксина получил широкое признание [Xu et al., 2019; Liu et al., 2020]. Для расширения и углубления представлений об участии Лф в защитных и компенсаторных механизмах в этой модели необходимо провести анализ его влияния на динамику изменения функциональной активности клеток нигростриатной системы, а также поведения животных (в острой фазе и в отдаленные сроки). 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

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.

Методология и методы исследования

Исследование включало в себя широкий спектр методов на организменном, органном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях биологической организации для понимания эффектов чЛф и его влияния на протекание как физиологических, так и патофизиологических процессов.

Работа выполнена на мышах самцах линии C57BL/6 и первичных клеточных культурах, полученных из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6. В работе был использован чЛф

(ООО «Лактобио», Россия), выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии.

Облучение животных проводили на установке ГУТ-200М (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва) от источника ^{60}Co . Нигростриатное дофаминергическое повреждение индуцировали однократным подкожным введением МФТП. Индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках культуры осуществляли путем трехкратного добавления 50 мМ KCl в среду.

Поведенческие функции животных оценивали с использованием тестов «Открытое поле» и ротарод, а также анализа длины шага. Изменение физиологических показателей оценивали с помощью лазерной корреляционной спектроскопии сыворотки крови, подсчета количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы крови, измерения уровня гемоглобина, гистологического исследования печени и селезенки на разных сроках после облучения. Структурный дефицит оценивали по количеству тирозингидроксилаза (ТГ) - позитивных клеток в черной субстанции и плотности ТГ-позитивных волокон в стриатуме на иммуногистохимически (ИГХ) окрашенных срезах мозга на 2-й и 28-й дни после введения МФТП. Для детекции чЛф в срезах мозга и исследования его влияния на экспрессию белка c-Fos в клетках культур применяли метод флуоресцентного ИГХ- анализа.

Статистический анализ полученных данных проводили в программном пакете GraphPad Prizm 6.01 (La Jolla, California, США) с использованием параметрических и непараметрических методов.

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.

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».

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных адекватных поставленным задачам лабораторных методов исследования, наличием обширного экспериментального материала, применением актуальных способов статистического анализа. Научные выводы и положения обоснованы. Результаты проведенных исследований объективно и полноценно отражены в выводах диссертационной работы и опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Апробация работы

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.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XIV, XV и XVII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 2018, 2019, 2021), VIII Научно-практической конференции с международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, Россия, 2019), II Объединенном научном форуме (Сочи-Дагомыс, Россия, 2019), VIII International Conference on Radiation in Various Fields of Research (Ниш, Сербия, 2020), VIII Съезде по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 2021).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Лактоферрин как полифункциональный белок и его участие в физиологических процессах организма

Лактоферрин (Лф) – полифункциональный белок из семейства трансферринов, обладающий высокой аффинностью к ионам железа (III). Впервые Лф был идентифицирован в 1939 году в коровьем молоке [Sørensen and Sørensen, 1939], а затем в 1958 году – в женском [Johansson, 1958]. Лф присутствует в различных секреторных жидкостях млекопитающих, таких как молоко, слюна, секреты носовых желез, слёзы, а также в гранулах нейтрофилов [Ward and Conneely, 2004; Johnson and Wessling-Resnick, 2012].

Лф 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 последнее время ведутся интенсивные исследования многочисленных функций Лф. Каждые два года, начиная с 1991, проводятся международные конференции, посвященные Лф, одной из целей которых является изучение потенциальных областей применения этого белка.

1.1.1. Структура и свойства белка лактоферрина

Лф является глобулярным гликопротеином с молекулярной массой около 80 кДа. Белок был классифицирован как представитель семейства трансферринов благодаря его 60%-ой идентичности с сывороточным трансферрином [Metz-Boutique et al., 1984]. Были выделены три различные изоформы Лф. Лф- α является железосвязывающей формой, но не обладает рибонуклеазной активностью. С

другой стороны, Лф-β и Лф-γ демонстрируют нуклеазную активность, но не способны связывать железо [Furmanski et al., 1989].

Лф состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 692-703 (у разных видов) аминокислотных остатка и образующей два гомологичных глобулярных домена. Эти домены, также называемые С – (карбокси) и N – (амино) долями, соединены α-спиралью [González-Chávez et al., 2009]. Каждая доля состоит из двух доменов (С1, С2 и N1, N2) и содержит один железосвязывающий сайт.

Способность Лф связывать железо в два раза выше, чем у трансферрина. Два иона железа могут быть обратимо связаны одной молекулой Лф. Белок может существовать в двух формах – железоненасыщенной (апо-Лф) и железонасыщенной (холо-Лф), третичные структуры которых различны [Baker and Baker, 2009; Anghel et al., 2018]. Лф проявляет высокую устойчивость к протеолитической деградации трипсином и трипсиноподобными ферментами, пропорциональную степени насыщения железом. Насыщенная железом форма более устойчива, чем обедненная [Brines and Brock, 1983]. Способность Лф удерживать железо связанным даже при низких значениях рН важна, особенно в местах инфекции и воспаления, где из-за метаболической активности бактерий рН может опускаться ниже 4,5. В такой ситуации Лф также связывает железо, высвобождаемое из трансферрина, что предотвращает дальнейшее использование железа бактериями для размножения [Valenti and Antonini, 2005].

Помимо железа Лф способен связывать липополисахариды, гепарин, гликозаминогликаны, ДНК или другие ионы металлов, такие как Al^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} [Adlerova et al., 2008]. Однако его сродство к этим ионам значительно ниже, чем к Fe^{3+} .

1.1.2. Рецепторы к лактоферрину и клетки-мишени

Биологические свойства Лф опосредованы специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Разные типы клеток экспрессируют собственные рецепторы к Лф, и их характеристики различаются [Suzuki and Lönnnerdal, 2002].

Впервые рецептор к Лф у млекопитающих был обнаружен на перитонеальных макрофагах мыши [Van Snick and Masson, 1976], затем - на эпителиальных клетках в тонком кишечнике человека при изучении доставки железа в слизистую оболочку двенадцатиперстной кишки [Cox et al., 1979]. Последующие исследования выявили рецепторы к Лф на В-клетках, Т-клетках, моноцитах [Suzuki et al., 2005; Legrand et al., 2006], тромбоцитах [Leveugle et al., 1993], гепатоцитах [Bennatt and McAbee, 1997], фибробластах [Takayama et al., 2003], остеобластах [Grey et al., 2004] и эндотелиальных клетках сосудов мозга [Fillebeen et al., 1999a]. Некоторые виды бактерий, включая семейство Neisseriaceae, экспрессируют специфические рецепторы, способные связывать Лф и вызывать изменения в третичной структуре его молекулы, приводящие к диссоциации железа [Ekins et al., 2004]. Рецепторы к N-концевой области Лф были обнаружены на поверхности некоторых микроорганизмов. Связывание Лф с этими рецепторами вызывает гибель грамотрицательных бактерий из-за нарушений в клеточной стенке [Adlerova et al., 2008].

Рецепторы к чЛф были охарактеризованы в различных типах клеток (энтероцитах, гепатоцитах, нейронах, фибробластах, моноцитах, лимфоцитах и т.д.). Основные из них это: интелектин-1 (ITLN1), белок, связанный с рецепторами липопротеинов низкой плотности 1 (LRP1), асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR), CD14 и нуклеолин [Mayeur et al., 2016; Lepanto et al., 2019]. Все рецепторы к чЛф дифференцированно экспрессируются в зависимости от типа ткани и клетки [Suzuki et al., 2005].

Интелектин-1, высокоаффинный Лф-рецептор, впервые обнаруженный в эпителии кишечника, участвует в поглощении Лф из пищеварительного тракта [Suzuki et al., 2008]. Этот рецептор также был выявлен на щеточной кайме энтероцитов, клетках Панета и бокаловидных клетках [Wrackmeyer et al., 2006], в желчном эпителии [Mancinelli et al., 2018]. Интелектин-1 является гликопротеином с молекулярной массой 120 кДа, состоит из трех субъединиц, связанных дисульфидными мостиками. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией было показано, что мРНК для интеллектина-1

экспрессируется во многих тканях: тонком кишечнике, сердце, семенниках, селезенке, легких, печени и др. [Suzuki et al., 2005]. Это объясняет широкий спектр функций Лф посредством активации внутриклеточных сигнальных путей [Mancinelli et al., 2018].

LRP1 в основном экспрессируется в гепатоцитах, нейронах, миоцитах, фибробластах и холангиоцитах [Suzuki et al., 2008]. Он является рецептором низкой специфичности для Лф, поскольку может связывать несколько мишеней. Это трансмембранный белок с молекулярной массой 600 кДа, состоящий из пяти субъединиц. Помимо связывания чЛф LRP1 выполняет широкий спектр функций: метаболизм липопротеинов и протеиназ, активация лизосомальных ферментов, проникновение вирусов и токсинов в клетки [Mancinelli et al., 2018].

Асиалогликопротеиновый рецептор – трансмембранный гликопротеин гепатоцитов, с молекулярной массой 33 кДа, состоящий из двух субъединиц. Этот белок играет важную роль в поддержании гомеостаза плазмы крови, участвуя в удалении гликопротеинов-лигандов из кровообращения.

CD14 экспрессируется моноцитами. Это рецептор для липополисахаридов, мембранный гликопротеин с молекулярной массой 55 кДа, который активирует иммунную систему [Suzuki et al., 2005].

Нуклеолин – многофункциональный белок с молекулярной массой 105 кДа, имеет три домена, в основном локализован в ядрышке (во всех эукариотических клетках), где он составляет 10% всех белков. Также нуклеолин был обнаружен на поверхности клеток, где он может действовать как корецептор многих лигандов и участвовать в их эндоцитозе [Legrand et al., 2004]. Он экспрессируется в большом количестве в пролиферирующих клетках и участвует в биогенезе рибосом, регуляции транскрипции, ремоделировании хроматина, пролиферации клеток, апоптозе и дифференцировке. Повышенную экспрессию нуклеолина наблюдали на поверхности активированных лимфоцитов, ангиогенных эндотелиальных клеток [Jia et al., 2017] и аксонов нейронов [Perry et al., 2016]. Сайт связывания нуклеолина расположен как на N-, так и на C-концевых долях Лф. Однако, для его связывания необходима только C-концевая область. После связывания с

поверхностью клетки Лф интернализуется и появляется в ядре, где он обнаруживается прикрепленным к ДНК. Следовательно, нуклеолин может представлять собой белок-кандидат для ядерного транспорта и транскрипционного действия Лф [Mayeur et al., 2016].

Следует отметить, что Лф после связывания с соответствующим рецептором интернализуется посредством эндоцитоза и переносится в ядро [Ashida et al., 2004], модулируя экспрессию генов [Liao et al., 2007] или запуская внутриклеточные сигнальные пути [Jiang et al., 2011]. Таким образом, благодаря специфичности рецепторов, чЛф может выполнять множество различных функций в зависимости от клеточной системы, на которую он воздействует.

Некоторые клетки имеют рецепторы, которые позволяют им связывать не только Лф, но и трансферрин или Лф других видов [Adlerova et al., 2008]. Так клетки кишечного эпителия человека связывают и интернализируют коровий Лф [Lönnerdal et al., 2011]. Мышинные перитонеальные макрофаги могут поглощать чЛф. Эндотелиальные капиллярные клетки головного мозга мышей и коров, гепатоциты крыс также способны усваивать этот экзогенный белок [Actor et al., 2009].

1.1.3. Гены лактоферрина и их регуляция

Ген *Лф* был идентифицирован у многих видов млекопитающих; у человека он расположен на 3-ей хромосоме, у мыши – на 9-ой, у коровы – на 22-й [García-Montoya et al., 2012]. Гены *Лф* имеют значительное сходство у разных видов - человека, коров, свиней и мышей (15 из 17 экзонов идентичны) [Teng, 2002]. Было проанализировано 60 последовательностей генов *Лф* 11-и видов млекопитающих с полными кодирующими областями и соответствующими аминокислотами. Результаты показали, что длина гена сильно варьирует от вида к виду (от 2055 до 2190 пар нуклеотидов), вследствие делеций, вставок и мутаций в стоп-кодоне. Наблюдаемое генетическое разнообразие было выше между видами, чем внутри видов [Kang et al., 2008].

Был охарактеризован промотор Лф, и обнаружено, что он обладает как конститутивными, так и индуцибельными элементами [Teng, 2002]. Достижения в области генной инженерии, в частности появление технологий целенаправленного редактирования генома, позволили получить трансгенных животных (козы, мыши, кролики, коровы), трансгенные растения (табак, рис, картофель, батат, томаты, кукуруза и др.), грибы, бактерии, дрожжи, которые производят рекомбинантный человеческий или коровий Лф [García-Montoya et al., 2012]. В 2003 г. была получена мышь с нокаутом гена *Лф* [Ward et al., 2003].

Как мы уже указывали, экспрессия гена *Лф* может быть конститутивной и индуцируемой. Регуляция синтеза Лф зависит от типа клеток, продуцирующих этот белок. Так количество Лф, синтезируемого в молочной железе, контролируется пролактином [Green and Pastewka, 1978], тогда как его выработка в репродуктивных тканях определяется эстрогенами [Teng, 2002].

В 2002 году в промоторе гена *Лф* у людей и мышей был идентифицирован эстрогенный элемент ответа. Эстроген является положительным регулятором транскрипции гена *Лф*, репрессор активности рецепторов эстрогена – негативным. Отсутствие репрессора увеличивает экспрессию эстроген-индуцированного Лф до 100 раз. На синтез Лф в эндометрии влияют не только эстрогены, но и эпидермальный фактор роста [Teng, 2002; García-Montoya et al., 2012].

Экзокринные железы непрерывно вырабатывают и секретируют Лф. В нейтрофилах этот белок синтезируется во время их дифференцировки (когда промиелоциты развиваются в миелоциты) и впоследствии хранится в специфических гранулах. Зрелые нейтрофилы перестают вырабатывать Лф [Masson et al., 1969].

Экспрессия гена *Лф* также может модулироваться транскрипционными факторами; окислительным стрессом, в ответ на инфекцию или на ранних стадиях эмбриогенеза [García-Montoya et al., 2012]. Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют об участии множества сигнальных путей в регуляции

экспрессии *Лф*, и дальнейшие исследования могут выявить еще большую детализацию конкретных молекулярно-генетических регуляторных механизмов.

1.1.4. Экспрессия белка лактоферрина в организме

Во время эмбрионального развития экспрессия *Лф* выявлена уже у двух- и четырехклеточных эмбрионов, а также на протяжении всей стадии бластоцисты вплоть до имплантации. *Лф* не был обнаружен с момента имплантации до середины беременности, однако его наличие было показано в нейтрофилах печени плода на 11,5-й эмбриональный день, а затем в эпителиальных клетках дыхательной и пищеварительной систем [Ward et al., 1999].

В большинство экзокринных жидкостей *Лф* секретируется эпителиальными клетками в форме, не содержащей железа [Montreuil et al., 1960]. В молоке концентрация *Лф* у людей колеблется от 1 до 7 г/л (зрелое молоко и молозиво, соответственно), у коров от 0,2 до 1,5 г/л (молоко и молозиво, соответственно) [Rascón-Cruz et al., 2021]. *Лф* содержится в большинстве выделений слизистых оболочек, таких как маточная жидкость, вагинальная секреция, семенная жидкость, слюна, желчь, сок поджелудочной железы, выделения тонкой кишки, носовые выделения и слезы [Adlerova et al., 2008]. Производство *Лф* почками человека было описано Abrink с соавт. *Лф* экспрессируется и секретируется по всем собирающим канальцам, а в дистальной части канальцев он может быть реабсорбирован. Показано, что лишь незначительная часть этого белка выделяется в мочу [Abrink et al., 2000].

Лф является основным компонентом вторичных гранул нейтрофилов [Masson et al., 1969]. Во время воспалительных и инфекционных процессов, при некоторых патологиях уровень *Лф* в биологических жидкостях значительно повышается [Birgens, 1985; Levay and Viljoen, 1995]. Это особенно заметно в плазме, где концентрация *Лф* может быть всего 0,4–2 мг/л в нормальных условиях, но увеличивается до 200 мг/л при инфекциях и иммунологических нарушениях [Rascón-Cruz et al., 2021]. Фактически, большая часть *Лф* доставляется в места воспаления нейтрофилами.

Количество Лф в организме может варьировать в зависимости от пола и возраста. Уровень Лф в плазме крови меняется с самого начала беременности. Наблюдается постепенное увеличение концентрации Лф вплоть до 29-й недели, после чего она остается на постоянном (выше среднего) уровне [Sykes et al., 1982]. Было обнаружено, что концентрация Лф в сыворотке крови выше в пролиферативной фазе менструального цикла, чем в секреторной [Kilver et al., 1996].

Экспрессия нативного Лф и Лф-рецептора была показана в нейронах среднего мозга как у здоровых людей, так и у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона. Количественный анализ выявил более высокий уровень иммуномеченного Лф в выживших нейронах пациентов по сравнению с контролем [Leveugle et al., 1996]. Экспрессия Лф-рецептора на нейронах и эндотелиальных клетках сосудов мозга была выше у пациентов с большей потерей дофаминергической активности в черной субстанции [Faucheux et al., 1995]. Лф+-иммунореактивность обнаружена у здоровых людей в отдельных пирамидных нейронах префронтальной коры, нейронах гиппокампа и энторинальной коры [Kawamata et al., 1993; Leveugle et al., 1994].

Сообщалось, что Лф может синтезироваться *in situ* в головном мозге [Fillebeen et al., 1999b; 2001; Siebert and Huang, 1997]. Хотя уровни мРНК Лф, обнаруженные в тканях мозга взрослых мышей, очень низки по сравнению с уровнями, обнаруженными в лактирующих молочных железах, МФТП может индуцировать увеличение как уровня РНК Лф, так и белка [Fillebeen et al., 1999b]. Последующие исследования показали, что эндогенный Лф секретируется в мозге только активированной микроглией, что до сих пор широко признается [Li and Guo, 2021]. Синтезируемый и высвобождаемый активированной микроглией Лф наблюдали в большинстве дофаминергических нейронов черной субстанции человека, в которые он поступал через Лф-рецепторы [Fillebeen et al., 2001].

Shimaoka с соавт. исследовали физиологическое распределение Лф-подобной иммунореактивности во всей ЦНС взрослых здоровых мышей. Интенсивное маркирование было обнаружено в нейронах обонятельных систем,

ядрах гипоталамуса, энторинальной коре, различных ядрах ствола головного мозга и отсутствовало или было очень слабым в большей части неокортекса, гиппокампе, стриатуме и ЧС [Shimaoka et al., 2021].

Нельзя исключать возможность того, что часть Лф транспортируется из периферического кровообращения в мозг. Предполагается, что циркулирующий в периферической крови белок поступает в мозг путем рецептор-опосредованного одностороннего трансцитоза [Fillebeen et al., 1999a]. LRP1, экспрессирующийся в эндотелиальных клетках церебральных сосудов и перицитах, может быть вовлечен в этот транспорт [Tooyama et al., 1995; Wang et al., 2015].

1.1.5. Метаболизм лактоферрина

Лф может проявлять различное воздействие на организм в зависимости от его эндогенного или экзогенного происхождения. Экзогенный нативный Лф может быть получен из коммерчески очищенного молока или молозива ряда млекопитающих, рекомбинантный Лф – путем использования трансгенных растений и животных, а также бактериальных, грибковых и вирусных систем экспрессии [García-Montoya et al., 2012].

Грудное вскармливание является примером экзогенного потребления Лф у младенцев. После отлучения от груди дети могут продолжать получать экзогенный Лф за счет потребления коровьего молока. Происхождение и форма Лф могут влиять на его усвояемость. У взрослых людей более 60% перорально полученного коровьего Лф сохраняется после переваривания в желудке [Troost et al., 2001]. Человеческий Лф более устойчив к желудочному протеолизу, чем коровий [Brines and Brock, 1983; Van Veen, 2004].

Последние данные показали, что чЛф не разрушается протеазами, содержащимися в молоке. Его переваривание скорее начинается в желудке ребенка и генерирует множество функциональных пептидов, которые биологически доступны в проксимальном отделе кишечника [Dallas et al., 2014]. Кроме того, может произойти перенос интактного Лф из просвета кишечника в кровь младенца, как сообщалось ранее для других белков [Casabiell et al., 1997].

В результате переваривания коровьего Лф в желудочно-кишечном тракте образуется ряд пептидов, наиболее известные из них – лактоферрицин и лактоферрампин. Лактоферрицин (аминокислотные остатки Лф 17-41) в некоторых случаях проявляет более мощную антибактериальную и противогрибковую активность, чем интактный Лф, обладает антимикробными, противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами. Лактоферрампин (аминокислотные остатки Лф 265-284) проявляет широкое антимикробное действие против бактерий, вирусов, дрожжей и паразитов [Superti, 2020]. На сегодняшний день разработаны и успешно протестированы различные синтетические аналоги лактоферрицинов человека и коровы [Zarzosa-Moreno et al., 2020].

Фармакокинетические исследования на мышах подтвердили, что введенный перорально коровий Лф быстро накапливается не только в печени, селезенке и почках, но и в головном мозге, что предполагает механизм его переноса через гематоэнцефалический барьер [Fischer et al., 2007]. Наконец, исследования на животных показали, что Лф может транспортироваться в кровоток из просвета кишечника, а затем выводиться с желчью, тем самым определяя энтерогепатическую циркуляцию этого белка [Mayeur et al., 2016].

Экзогенный чЛф имеет короткий период полураспада в организме, который оценивается примерно в 10 мин после внутривенного введения крысе, а через 3 часа в кровотоке остается 10 % белка [Ziere et al., 1992]. Существует мнение, что Лф, переносимый внутри лимфоцитов, сохраняется в течение более длительного времени [Takeuchi et al., 2006].

Существует два способа выведения Лф из организма: либо путем рецептор-опосредованного эндоцитоза фагоцитарными клетками (макрофагами, моноцитами и другими клетками, относящимися к ретикулоэндотелиальной системе) с последующим переводом железа в ферритин, либо путем прямого поглощения печенью [Adlerova et al., 2008]. Эндоцитоз, осуществляемый клетками Купфера, эндотелиальными клетками печени и гепатоцитами, способствует выведению Лф [Levay and Viljoen, 1995]. Почки, по-видимому,

также участвуют в его выведении из кровообращения, поскольку белок и его фрагменты, в основном материнского происхождения, были обнаружены в моче младенцев, находящихся на грудном вскармливании [Hutchens et al., 1991].

1.1.6. Лактоферрин и метаболизм железа

Во всех живых клетках железо необходимо для основных метаболических процессов, таких как производство энергии, синтез, восстановление, транскрипция ДНК, перенос и хранение кислорода, детоксикация лекарств. Железо поддерживает иммунологическую резистентность, активирует и ингибирует ферментативные системы организма. Эти биологические процессы основаны на способности железа принимать и отдавать электроны путем окислительно-восстановительных переходов между ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} [Lepanto et al., 2019].

При физиологических значениях pH Лф обладает очень высоким сродством к Fe^{3+} , он способен удерживать железо даже при pH 3.5 [Mayeur et al., 2016]. Только 5% Лф в женском молоке насыщено железом. Свободное железо может генерировать АФК, которые могут повредить желудочно-кишечный тракт в результате реакции Фентона. Роль Лф молока может заключаться в хелатировании железа, для удержания его в стабильной нереактивной форме и снижать локальную выработку АФК [Collard, 2009]. Кроме того, ограничивая количество железа, доступного для микроорганизмов, Лф молока может участвовать в формировании микробиоты младенцев и предотвращать инфицирование патогенами [Mayeur et al., 2016].

Лф из женского молока, по-видимому, влияет на всасывание железа в кишечнике у младенцев, это зависит от потребности организма в железе. Специфические рецепторы, присутствующие на энтероцитах (п. 1.1.2), опосредуют связывание Лф. После того, как Лф связывается с энтероцитом, 90% белка разлагается, и высвобождаются ионы Fe^{3+} . Оставшиеся 10% Лф транспортируется через клеточную мембрану. Недостаток внутриклеточного железа может вызывать повышенную экспрессию специфических рецепторов на

поверхности энтероцитов и, следовательно, повышенную абсорбцию железа, связанного с Лф [Suzuki et al., 2005].

При возникновении воспаления уровень Лф в плазме крови повышается, и благодаря более низкому значению рН обмен железа происходит легче. Это позволяет предположить, что Лф может способствовать локальному накоплению железа в местах воспаления [Brock, 2002]. Давно известно, что Лф отвечает за гипоферремию, связывая свободное железо и перенося его обратно в макрофаги [Van Snick et al., 1974].

Взаимосвязь между концентрацией Лф и состоянием железа в организме была описана в желчных путях кроликов. Значительное увеличение количества Лф в желчи было зарегистрировано у анемичных кроликов после острой кровопотери, что может быть объяснено мобилизацией железа, хранящегося в печени. Напротив, у кроликов, которым вводили железо, даже в низких дозах, наблюдалось ингибирование секреции Лф в желчи. Таким образом, Лф может выполнять функцию контроля в ситуациях, когда из его депо высвобождается повышенное количество железа [Van Vugt et al., 1975]. Аналогичная взаимосвязь между Лф в секрете двенадцатиперстной кишки и метаболизмом железа была обнаружена у людей [De Vet and Van Gool, 1974].

Способность Лф связывать ионы Fe^{3+} оказывает значительное влияние на другие защитные свойства этого белка.

1.1.7. Механизмы действия лактоферрина

Как уже отмечалось выше, Лф – полифункциональный белок. Благодаря многочисленным механизмам действия он участвует во многих физиологических процессах, осуществляет свою активность в отношении широкого спектра патогенных для человека микроорганизмов (бактерий, вирусов, паразитов и т.д.), модулирует врожденную иммунную реакцию.

Способность связывать свободное железо

Железо является одним из элементов, необходимых для роста бактерий. Его недостаток подавляет рост железозависимых бактерий, таких как *Escherichia*

coli [Brock, 1980]. Способность Лф связывать свободное железо обуславливает его бактериостатический эффект. Напротив, Лф может служить донором железа и, таким образом, поддерживать рост некоторых бактерий с более низкими потребностями в нем, таких как *Lactobacillus spp.* или *Bifidobacterium spp.*, которые считаются полезными [García-Montoya et al., 2012].

Некоторые бактерии способны адаптироваться к новым условиям и выделять сидерофоры (хелатирующие железо соединения бактериального происхождения), которые конкурируют с Лф за ионы Fe^{3+} [Ratledge and Dover, 2000].

Конкуренция за железо между паразитом и Лф является основой антипаразитарной активности белка против *Pneumocystis carinii* [Cirioni et al., 2000].

В результате слияния вторичных гранул с фагосомами Лф становится поставщиком железа для катализа образования свободных радикалов и тем самым повышает внутриклеточную бактерицидную активность нейтрофилов [Sánchez et al., 1992]. Было обнаружено, что лактоферрицин, катионный пептид, образующийся в результате расщепления Лф пепсином, обладает более мощной бактерицидной активностью, чем нативный белок [Bellamy et al., 1992].

Железо, как переходный металл, может быть медиатором в клеточном ответе на окислительный стресс. Лф является важной составной частью антиоксидантной системы организма, ингибируя реакцию Фентона через хелатирование железа [Nishimura et al., 2014; Ogasawara et al., 2014].

Нарушение целостности клеточных мембран

Лф через катионную N-концевую область может взаимодействовать с отрицательно заряженными липополисахаридами грамотрицательных бактерий, вызывая их гибель из-за нарушений в клеточной стенке. Последующее высвобождение липополисахарида приводит к нарушению проницаемости и повышению чувствительности к лизоциму и другим противомикробным агентам [Adlerova et al., 2008]. Бактерицидное действие Лф на грамположительные бактерии, опосредуется электростатическими взаимодействиями между

отрицательно заряженным липидным слоем и положительно заряженной поверхностью белка, которые вызывают изменения проницаемости мембраны [Valenti and Antonini, 2005].

Показано, что степень инфекционности спорозоитов *Toxoplasma gondii* и *Eimeria stiedai* снижается после их инкубации с лактоферрицином В. Считается, что лактоферрицин нарушает целостность мембраны паразита, вызывая изменения во взаимодействиях между хозяином и паразитом [Omata et al., 2001].

Основной вклад Лф в противовирусную защиту в отношении широкого спектра РНК- и ДНК-вирусов заключается в его связывании с гликозаминогликанами клеточной мембраны. Таким образом, Лф предотвращает проникновение вирусов в клетки, и инфекция прекращается на ранней стадии [Ward et al., 2005]. Было продемонстрировано, что такой механизм эффективен против вируса простого герпеса, цитомегаловирусов и вируса иммунодефицита человека [García-Montoya et al., 2012].

Связывание с рецепторами клеток-мишеней

Благодаря специфичности рецепторов, чЛф может выполнять множество различных функций в зависимости от клеточной системы, на которую он воздействует, поскольку рецепторы к Лф были выявлены на многих типах клеток. Этот механизм был подробно описан выше (п. 1.1.2).

Ферментативная и протеолитическая активности

Показано, что чЛф обладает ДНКазной, РНКазной, АТФазной, фосфатазной и амилазной активностями [Kanyshkova et al., 2003]. РНК- и ДНК-гидролизующие субфракции чЛф могут способствовать его защитной функции путем гидролиза вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот.

Рекомбинантный чЛф подавляет адгезию энтеропатогенной *Escherichia coli* к клеткам млекопитающих. Белок блокирует опосредованную кишечной палочкой полимеризацию актина в клетках HEp2 и индуцированный ею гемолиз. Механизмом этого ингибирования является опосредованная Лф деградация секретлируемых белков, необходимых для контакта с бактериями [Ochoa et al., 2003].

Лактоферрин как транскрипционный фактор

Действие Лф не ограничивается рецепторно-опосредованным ответом. После связывания на поверхности клетки этот белок может быть интернализован и перенесен в ядро [Ashida et al., 2004]. Лф может распознавать специфическую последовательность ДНК, и последующее взаимодействие может привести к активации транскрипции [He and Furmanski, 1995].

Защитное действие чЛф неоднократно было показано на химически индуцированных опухолях у лабораторных грызунов. Сообщалось также, что этот белок ингибирует развитие экспериментальных метастазов у мышей [Bezault et al., 1994; Wolf et al., 2003]. Лф способен остановить рост клеток рака молочной железы человека между стадией G1 и стадией S. Такое негативное влияние на пролиферацию клеток может быть объяснено измененными экспрессией или активностью регуляторных белков [Damiens et al., 1999].

В прошлом считалось, что Лф поддерживает пролиферацию клеток благодаря своей способности транспортировать железо в клетки. Однако позже было доказано, что белок действует как активатор фактора роста. Лф (без присутствия каких-либо других цитокинов и факторов) способен стимулировать пролиферацию клеток стромы эндометрия человека [Yanaihara et al., 2000].

Лф также был идентифицирован как фактор транскрипции. Он способен проникать в клетку и активировать транскрипцию определенных последовательностей ДНК [He and Furmanski, 1995]. Показано, что Лф модулирует широкий спектр нейрональных процессов, усиливает экспрессию генов, участвующих в выживании, дифференцировке и росте нейронов [Chen et al., 2015; Wang, 2016].

Активация клеточной иммунной системы

Воспаление представляет собой сложный патофизиологический процесс, включающий многочисленные медиаторы и различные типы клеток. Модуляция иммунного ответа лактоферрином включает совокупность механизмов.

Благодаря своей способности связывать железо и взаимодействию с клетками-мишенями Лф может как положительно, так и отрицательно влиять на

клетки иммунной системы и клетки, участвующие в реакции воспаления. Так Лф может поддерживать пролиферацию, дифференцировку и активацию клеток иммунной системы и усиливать иммунный ответ. С другой стороны, Лф действует как противовоспалительный фактор. Благодаря своей антимикробной активности и способности связывать компоненты бактериальных клеточных стенок или их рецепторы, Лф может предотвращать развитие воспаления и последующее повреждение тканей, вызванное высвобождением провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода [Legrand et al., 2005].

Защитный эффект Лф проявляется в снижении продукции некоторых провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли или интерлейкины -1 β и -6 [Haversen et al., 2002].

Лф-зависимая, опосредованная цитокинами стимуляция активности НК-клеток и лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺, представляет собой важный фактор защиты от роста опухоли. После перорального введения Лф количество этих клеток увеличивается как в крови, так и в лимфатической ткани [Damiens et al., 1998].

В дополнение к вышеупомянутым механизмам, другие потенциальные молекулярные механизмы все еще находятся в стадии изучения.

1.1.8. Лактоферрин при нейродегенеративных заболеваниях

Нейродегенеративные заболевания - это заболевания, вызванные потерей клеток и нейронов в головном или спинном мозге, и эти заболевания могут привести к когнитивным и поведенческим нарушениям, в тяжелых случаях даже к смерти [Chen et al., 2016]. Общие механизмы, лежащие в основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний, включают окислительный стресс, нейровоспаление, накопление железа, дисбаланс липидного обмена и т.д. [Chen et al., 2016; Rekatsina et al., 2020].

Лф был обнаружен в зонах поражения при различных нейродегенеративных заболеваниях. Повышенная экспрессия Лф-рецепторов в мозге пациентов, страдающих такими заболеваниями, позволяет предположить, что Лф может играть важную роль в их патогенезе и саногенезе [Faucheux et al., 1995].

Благодаря наличию Лф-рецепторов на эндотелиальных клетках капилляров головного мозга и нейронах экзогенный Лф может пересекать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и достигать клеток мозга [Fillebeen et al., 1999a; Suzuki et al., 2005; Huang et al., 2010].

Все большее число исследований косвенно подтверждают, что нейропротекция, опосредованная Лф, обусловлена его биологическими свойствами:

- в воспаленных тканях содержание Лф значительно увеличивается [Li et al., 2009], и он может снижать экспрессию провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкинов -1 и -6) [Spagnuolo and Hoffman-Goetz, 2008], оказывая противовоспалительное действие;

- Лф может значительно увеличивать содержание супероксиддисмутазы (СОД) и уменьшать образование АФК путем ингибирования реакции Фентона [Trentini et al., 2020], тем самым оказывая эффекты модулятора АФК;

- Лф может регулировать экспрессию белков, участвующих в деградации липидов, контролируя активность сигнального пути цАМФ/ЕРК через LRP1 [Ikoma-Seki et al., 2015], тем самым регулируя метаболизм липидов;

- Лф повышает уровни мРНК и белка нейротрофического фактора мозга (BDNF) и компонентов его сигнального пути в гиппокампе [Chen et al., 2015].

1.1.9. Потенциал лактоферрина в терапии радиационных поражений и нейродегенеративных заболеваний

Радиопротекторные и нейропротекторные свойства соединений нередко сочетаются. Это может быть обусловлено общими механизмами их действия: повышением устойчивости к клеточному стрессу, антиоксидантной активностью, ускорением репарации ДНК, снижением или предотвращением воспалительных реакций и канцерогенеза.

Существуют общие ключевые звенья патогенеза радиационного поражения и нейродегенеративных заболеваний, которые включают активацию реакций свободнорадикального окисления, воспаление, нарушение клеточного цикла и

регуляции репарации ДНК, апоптоз [Seed, 2005; Reisz et al., 2014; Simonian, 1996; Hald and Lotharius, 2005; Hartmann et al., 2000].

Лф 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].

Нейропротекторный эффект экзогенного Лф при паркинсоническом синдроме получил широкое признание [Xu et al., 2019; Liu et al., 2020]. Длительное получение диеты, содержащей коровий Лф, повышало выживаемость и стимулировало гемопоэз у мышей, подвергнутых тотальному рентгеновскому облучению [Nishimura et al., 2014; Feng et al., 2018]. 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 [Faucheux et al., 1995]. Это служит поводом для изучения потенциала Лф в борьбе с нейродегенерацией.

1.2. Действие ионизирующего излучения на организмы

Ионизирующее излучение – это явление, присутствующее в нашей повседневной жизни, происходящее как из природных, так и из искусственных источников. Все живые организмы подвержены радиационно-индуцированному повреждению клеток. Существует широкий диапазон реакций на излучение, который определяется источником излучения, полученной дозой облучения, продолжительностью воздействия, генетическими особенностями и индивидуальной чувствительностью организма [Roberts et al., 1999; Штемберг А.С. и др., 2021]. Действие ионизирующего излучения может проявляться на всех

уровнях биологической организации – молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном [Полякова М.В., 2019].

В настоящее время активно исследуются патогенные процессы, вызываемые ионизирующим излучением, и нетоксичные радиопротекторные соединения, способные защитить нормальные ткани от лучевого поражения [Feng et al., 2018].

1.2.1. Патогенез лучевого поражения

Согласно существующим представлениям о патогенезе лучевого поражения, ведущую роль в механизме его развития играет окислительный стресс [Seed, 2005]. Это резкое усиление окислительных процессов в организме при недостаточном функционировании антиоксидантной системы. Сигналом для запуска данного типа реакции может служить изменение внутриклеточной среды, приводящее к смещению равновесия концентраций прооксидантных и антиоксидантных компонентов с последующей активацией процессов окисления.

Окислительный стресс представляет собой состояние нарушенного баланса между свободными радикалами (окислителями, активными формами кислорода - АФК) и антиоксидантами в организме. Как свободные радикалы, так и антиоксиданты необходимы для правильного протекания многих жизненных процессов. Пока есть баланс между ними, организм функционирует должным образом. АФК могут нанести ущерб всем биомолекулам организма, в том числе белкам, жирам, а также клеточной ДНК (одно- и двунитевые разрывы, перекрестные сшивки), что приводит к мутациям [Asaithamby et. al., 2011; Reisz et al., 2014]. Двунитевые разрывы ДНК являются основным триггером, определяющим дальнейшую судьбу клетки, так как от их числа и эффективности процессов репарации зависит ответ клетки на действие ионизирующего излучения [Jackson and Bartek, 2009].

В условиях окислительного стресса происходят процессы окислительной модификации белковых молекул. Свободные радикалы способны атаковать белки в различных участках, приводя к нарушениям не только первичной, но и вторичной и третичной структур белков, что приводит к агрегации или

фрагментации, обуславливающей дальнейшую потерю функциональной активности биомолекулы [Reisz et al., 2014]. В крайних случаях окислители могут привести к гибели клеток. Роль конкретных форм АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности до конца неясны. Также нет однозначного ответа на вопрос, чем является окислительный стресс, следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие запрограммированной гибели клеток.

1.2.2. Механизмы действия антиоксидантов

Деструктивное действие свободных радикалов предотвращается антиоксидантами, которые удаляют их избыток из организма. Антиоксиданты – это вещества, которые способны снижать поражающее действие ионизирующего излучения на организм. Защитный эффект связан с их способностью подавлять процессы свободно-радикального окисления и повышать активность антиоксидантных систем организма [Weiss and Landauer, 2000]. По механизму действия антиоксиданты делятся на: (а) ингибиторы – соединения, тормозящие цепной радикальный процесс окисления органических веществ путем обрыва цепей за счет реакций со свободными радикалами (супероксиддисмутаза и каталаза); (б) хелаторы, дезактиваторы металлов (таких как железо, медь) – вещества, подавляющие процесс окисления субстрата путем образования с ионами переходных металлов комплексов, не активных в процессах окисления; (в) дезактиваторы пероксидов – вещества, подавляющие процесс окисления субстрата путем разрушения пероксидов преимущественно без образования свободных радикалов.

Переходные металлы могут быть медиаторами в ответе клетки на окислительный стресс. В нормальных физиологических условиях производство и нейтрализация АФК в значительной степени зависят от эффективности нескольких ключевых ферментов, включая супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Неэффективность этих ферментов приводит к перепроизводству гидроксил радикалов через реакцию Габера-Вейса,

катализируемую ионами железа, с последующим увеличением перекисного окисления липидов [Ogasawara et al., 2014]. Хелатные соединения, обладающие способностью связывать ионы металлов переменной валентности и, таким образом, препятствующие их вовлечению в реакции разложения пероксидов, являются важнейшей составной частью антиоксидантной системы организма в условиях воздействия ионизирующего излучения. Одним из таких антиоксидантных веществ является Лф, ингибирующий реакцию Фентона через хелатирование железа [Nishimura et al., 2014; Ogasawara et al., 2014].

1.2.3. Физиологические и поведенческие изменения у мышей, вызванные острым воздействием сублетальных доз ионизирующего излучения

Воздействие больших доз ионизирующего излучения может вызывать значительное снижение массы тела [Цыб А.Ф. и др., 2005; Liu et al., 2017] и приводить к гибели животного. После тотального гамма-облучения в дозе 8 Гр масса тела мышей снижалась на 15% к 14-му дню [Liu et al., 2017]. Показано, что на 30-й день после тотального гамма-облучения в дозе 8 Гр выживаемость мышей составляла 20% [Van der Meeren and Lebaron-Jacobs, 2001; Liu et al., 2017], а после рентгеновского облучения в дозе 7 Гр – 33% [Feng et al., 2018], при этом первая гибель животных происходила на 9-й, 5-й или 6-й дни, соответственно.

Одними из основных критериев оценки воздействия радиации на организм являются изменения в составе периферической крови [Шибкова Д.З. и др., 2006]. Ранее было установлено, что выживаемость мышей после воздействия сублетальной дозы радиации зависит от восстановления системы кроветворения [Liu et al., 2017; Li et al., 2017]. Также известно, что количество лейкоцитов коррелирует с дозой облучения [Erexson et al., 1991] и зависит от индивидуальной реактивности организма [Кузьменко Е.В., 2011]. Количество лейкоцитов в периферической крови значительно снижалось через 3 дня после тотального гамма-облучения в дозе 8 Гр и не возвращалось в нормальный диапазон через 21 день [Liu et al., 2017]. После тотального рентгеновского облучения в дозе 7 Гр количество лейкоцитов быстро снижалось до 14-го дня, затем начинало

постепенно расти, но и на 29-й день оставалось значимо меньшим, чем у контрольных животных [Feng et al., 2018]. Облучение также вызывало резкое снижение количества эритроцитов и тромбоцитов, которое достигало минимума на 9-й день, эти показатели не восстанавливались к 29-му дню [Feng et al., 2018].

Каждый тип клеток крови имеет свою собственную относительную радиочувствительность, и наибольшая она у лимфоцитов [Christensen et al., 2014]. Для последствий воздействия ионизирующего излучения в высокой дозе характерно истощение запаса лимфоцитов и увеличение относительного числа нейтрофилов [Christensen et al., 2014; Полякова М.В., 2019]. Содержание лимфоцитов и нейтрофилов в крови мышей не было восстановлено как через 3, так и через 6 недель после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр [Медведева Ю.С., 2017; Полякова М.В., 2019].

После рентгеновского облучения в дозе 6,8 Гр и 7 Гр уровень гемоглобина у мышей был значимо снижен на 15-й день [Nishimura et al., 2014] и между 7-м и 29-м днями [Feng et al., 2018].

Малоновый диальдегид возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, служит маркером перекисного окисления жиров (в том числе и при воздействии излучения) и окислительного стресса [El-Mihi et al., 2017]. Супероксиддисмутаза (СОД) вместе с каталазой и другими антиоксидантными ферментами защищает организм от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. Активность СОД является индикатором генерации окислительного стресса [Jindal et al., 2017]. На 30-й день после рентгеновского облучения в дозе 7 Гр уровень малонового диальдегида в ткани печени мышей был значительно повышен, а активность СОД снижена. Было также выявлено значительное увеличение количества повреждений ДНК лимфоцитов через 24, 48 и 72 ч после облучения [Feng et al., 2018].

Известно, что острое воздействие высоких доз ионизирующего излучения вызывает существенные морфологические изменения многих органов [Wang et al., 2013; Alchinova et al., 2015; Медведева Ю.С., 2017]. После тотального

однократного гамма-облучения в дозе 7,5 Гр через 3 и 6 недель в печени мышей наблюдали жировую дистрофию гепатоцитов, повышенный фиброз, увеличение количества клеток с фигурами митоза, увеличение количества апоптотических клеток и клеток с аномалиями ядра, расширение синусных сосудов, очаговый некроз гепатоцитов, множественные мононуклеарные инфильтраты в паренхиме органа [Медведева Ю.С., 2017; Полякова М.В., 2019]. В этих же исследованиях в ткани селезенки облученных мышей наблюдали отсутствие четкого разделения на белую и красную пульпу, полное отсутствие границ между фолликулами, повышенное содержание макрофагов и лейкоцитов, отдельные единичные мегакариоциты.

Центральная нервная система обладает высокой чувствительностью к воздействию ионизирующего излучения [Штемберг А.С. и др., 2021]. Тотальное гамма-облучение крыс в дозах 5 или 10 Гр приводило к нарушению поведения животных по критерию двигательного-оборонительных условных рефлексов активного избегания в «челночной камере» [Штемберг А.С., 2008]. Также сообщалось, что двигательная активность и агрессивное поведение мышей значительно снизились после рентгеновского облучения в дозе 10 Гр [Maier and Landauer, 1990]. Подавление двигательной и исследовательской активности наблюдали у мышей после гамма-облучения в дозе 8 Гр, медленное восстановление этих параметров начиналось только через 17 дней [Van der Meer and Lebaron-Jacobs, 2001]. Острое рентгеновское облучение в дозе 6 Гр снижало двигательную активность и координацию движений, повышало тревожность, тестируемую через 72 ч после воздействия [Soares et al., 2014].

1.3. Нейроны *in vivo* и *in vitro* как модельный объект токсического и стимулирующего воздействий

1.3.1. Патогенез болезни Паркинсона и механизмы нейродегенерации

Болезнь Паркинсона (БП), прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся 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 (затруднению инициации и замедленности движений) [Крыжановский Г.Н. и др., 2002; Kalia and Lang, 2015]. При БП начальные клинические симптомы нарушения двигательной функции появляются после деградации нигростриатной системы до порогового уровня, а именно дегенерации 50-60% дофаминергических (ДА-ергических) нейронов в ЧС и снижении концентрации ДА в стриатуме на 70-80% [Agid, 1991; Ehringer and Hornykiewicz, 1998].

Предыдущие исследования показали, что избыточная генерация АФК, окислительный стресс, образование эндогенных нейротоксинов, накопление ионов Fe^{2+} , нейровоспаление и митохондриальная дисфункция могут привести к потере ДА-ергических нейронов [Simonian, 1996; Hald and Lotharius, 2005; Vila et al., 2008; Youn et al., 2014]. Показано участие активированной микроглии в нейродегенерации в ЧС посредством выделения АФК и провоспалительных цитокинов [Кучеряну В.Г. и др., 2012]. В настоящее время вопрос о механизме гибели ДА-ергических нейронов нигростриатной системы при БП остается открытым, однако, данные о повышенном содержании активной каспазы-3 в нейронах ЧС пациентов с БП позволяют предположить, что апоптоз является основным [Hartmann et al., 2000].

1.3.2. Нейротоксическая модель болезни Паркинсона на основе введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина

Нейродегенерация, индуцированная МФТП у мышей, является одной из наиболее широко используемых моделей БП на животных [Dauer and Przedborski, 2003; Sedelis et al., 2001; Кучеряну В.Г. и др., 2020]. МФТП - это нейротоксин, который при системном введении проходит через гематоэнцефалический барьер и избирательно разрушает дофаминергические нейроны нигростриатной системы, вызывая ряд симптомов, наблюдаемых при идиопатической БП [Sedelis et al., 2001; Cao et al., 2017]. Однако эта мышьяная модель ограничена быстрым

развитием токсикоза, в то время как идиопатическая форма БП прогрессирует медленно, и ее неспособностью демонстрировать стойкий двигательный дефицит. Токсичность МФТП определяется его активным метаболитом 1-метил-4-фенилпиридинием (МФП+), который транспортируется в нейроны системой обратного захвата ДА и нарушает дыхательные процессы в митохондриях [Jackson-Lewis and Przedborski, 2007; Gubellini and Kachidian, 2015]. МФП+ также усиливает перекисное окисление липидов, процесс, запускаемый избыточной продукцией свободных радикалов [Knigh, 1997; Aguirre-Vidal, 2017].

Предыдущие исследования выявили накопление железа в мозге как у пациентов с БП [Dexter et al., 1991; Cheng et al., 2020], так и у мышей, получавших МФТП [You et al., 2015; Xu et al., 2019]. Повышенные концентрации железа могут индуцировать окислительный стресс благодаря генерации АФК и вызывать повреждение нейронов [You et al., 2015; Zecca et al., 2004; Acevedo et al., 2019].

1.3.3. Динамика нейродегенеративных и поведенческих изменений у мышей, вызванных введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина

Исследование динамики нейродегенеративных изменений на животной модели БП представляет особый интерес для изучения взаимосвязи между дегенерацией нейронов, процессами восстановления и проявляемым поведением.

Rosa и соавт. продемонстрировали, что острое введение МФТП вызывало долгосрочные изменения (30-45 дней после инъекции) в характере двигательной активности мышей [Rosa et al., 2018]. Ранее было показано, что МФТП (2×40 мг/кг, п/к) значительно снижает спонтанную двигательную активность. Мыши демонстрировали ее низкий уровень как через три недели, так и через 12 недель после введения нейротоксина [Fredriksson, 1990].

Предыдущие исследования также показали снижение количества стоек у мышей, получавших МФТП [Fredriksson and Archer, 1994; Schwarting et al., 1999; Sundström et al., 1990], и оно было более продолжительным, чем дефицит двигательной активности. Schwarting и соавт. показали, что существует корреляция между содержанием дофамина в стриатуме и количеством стоек,

когда животные уже восстановились в параметрах локомоции [Schwartz et al., 1999]. Таким образом, количество стоек, по-видимому, является чувствительным показателем повреждений у мышей, вызванных МФТП [Schwartz et al., 1999].

Ранее было показано [Saporito et al., 1999], что однократное введение МФТП в дозе 40 мг/кг вызывает существенную потерю ДА-ергических терминалей в стриатуме и ТГ-иммунореактивных нейронов в черной субстанции. Денситометрический анализ показал значительное снижение содержания ТГ+ волокон в стриатуме мыши на 52-е сутки после введения МФТП в том же режиме [Rosa et al., 2018]. Fredriksson и Archer обнаружили снижение содержания дофамина в стриатуме мышей через три недели и через три месяца после инъекций МФТП в разных дозах [Fredriksson and Archer, 1994]. МФТП, вводимый в серии инъекций (внутривенно, 20 мг/кг × 4) с интервалом 2 часа, приводил к 60-70% -ной потере нигростриатных нейронов и 80-90% -ному уменьшению уровня ДА в стриатуме, измеренных через 7 дней после введения нейротоксина [Jackson-Lewis et al., 1995; Jakowec et al., 2004]. Кроме того, Jakowec и соавт. не выявили существенных изменений уменьшившегося числа ТГ+ нейронов в компактной части ЧС на 30-й и 60-й день после введения МФТП, но уровень ТГ в стриатуме увеличивался через 30, 60 и 90 дней, хотя и оставался ниже исходного [Jakowec et al., 2004]. Показано, что потеря ТГ+ нейронов в ЧС была прогрессирующей и необратимой, но снижение количества ТГ+ волокон и уровня ДА в стриатуме частично восстановились к 28-му дню после инъекций МФТП (в/б, 30 мг/кг × 5, с интервалом 24 ч) [Derboylu et al., 2011].

1.3.4. Экспрессия транскрипционного фактора *c-Fos* в нейрональных культурах

Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию специфических генов-мишеней в ответ на сигнальные события на клеточной мембране, опосредованные рецепторами. 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]. Экспрессия немедленных ранних генов может быть индуцирована различными стимулами. Было показано, что электрическая стимуляция [Суханова А.Л. и др., 2012] и аппликация KCl [Bading et al., 1993] вызывают экспрессию белка c-Fos в нейрональной культуре.

Известно, что Лф способен модулировать многие нейрональные процессы посредством изменения экспрессии генов, участвующих в долговременной нейропластичности (BDNF, CREB и др.) [Chen et al., 2015; Wang, 2016]. В то же время возможная связь между Лф и индукцией c-Fos на уровне отдельных клеток еще не изучена.

Настоящее диссертационное исследование будет направлено на понимание роли Лф в саногенетических и патогенетических процессах в организме. Учитывая вышеизложенное, будет проведено комплексное исследование влияния чЛф на интегральные и системные показатели состояния организма мышей в двух экспериментальных моделях патологии: тотального острого гамма-облучения в сублетальной дозе и МФТП-индуцированной гибели нейронов. В нашем исследовании чЛф будет вводиться животным однократно или двукратно в отличие от большинства предыдущих работ, в которых использовали длительное многократное введение Лф.

Для выяснения механизмов действия Лф необходимо изучить вопрос о конечных клетках-мишенях для него в мозге, который до настоящего времени остается открытым. В настоящей работе будет проведен сравнительный анализ путей транспорта Лф, что позволит выявить наиболее эффективные способы доставки экзогенного белка в мозг. Будет изучен потенциал чЛф в качестве модулятора нейрональных процессов. Результаты настоящей работы приблизят нас к пониманию механизмов действия этого многофункционального белка и позволят судить о потенциальной возможности использования Лф в терапии нейродегенеративных заболеваний и последствий облучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование включало в себя четыре основных этапа. На первом этапе изучали эффекты чЛф на интегральные и системные показатели состояния организма после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе. На втором этапе исследовали влияние чЛф на поведение и экспрессию тирозингидроксилазы (ТГ) в нигростриатной системе мозга мышей на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов. Задачей третьего этапа стало изучение путей транспорта чЛф в головной мозг мышей при различных способах его введения. Кроме того, исследовали распределение чЛф в мозге и определяли фенотип клеток, включающих экзогенный белок. На завершающем этапе работы исследовали влияние чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции, определяли клеточную локализацию чЛф и колокализацию экзогенного белка с индуцированной экспрессией c-Fos.

Всего в работе было использовано 290 мышей самцов линии C57BL/6. Животные содержались в стандартных лабораторных клетках типа 1285L (Techniplast, Италия) по 5-6 особей в каждой при контролируемых температуре и влажности воздуха со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 часов при свободном доступе к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводили в светлой фазе цикла, между 9:00 и 18:00 ч. В работе также были использованы 52 первичные клеточные культуры, полученные из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», а также требованиями Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протоколы: № 6 от 22.11.2017, № 2 от 26.06.2019, № 1 от 13.02.2020) и Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП» (протоколы: № 3 от 11.06.2019, № 4 от 07.10.2021), одобрявших настоящую

работу. Соответствие экспериментальных исследований международным и российским законодательным актам о правилах проведения научной работы с использованием лабораторных животных подтверждено заключением Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП», протокол № 4-21 от 11.10.2021.

В работе был использован чЛф (ООО «Лактобио», Россия), выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии [Faraji et al., 2015] с последующей доочисткой на аффинном сорбенте гепарин-сефарозе [Kumar et al., 2008]. По результатам ВЭЖХ по методике Zhang Y. [Zhang et al., 2017] чистота полученного белкового препарата составляла 97%.

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

Исследование было проведено на 2-2,5-месячных мышах (n=238) (ФГБУН ФИБХ РАН питомник «Пушино», Россия) массой 20-28 г. Облучение животных проводили на установке ГУТ-200М (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва) от источника ^{60}Co . Влияние чЛф на поведенческие функции животных оценивали с использованием теста «Открытое поле». Изменение физиологических показателей оценивали с помощью лазерной корреляционной спектроскопии сыворотки крови, подсчета количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы крови, измерения уровня гемоглобина, гистологического исследования печени и селезенки на разных сроках после облучения. Были проведены три независимые серии экспериментов.

2.1.1. Экспериментальные группы и воздействия

Мыши в случайном порядке были разделены на 7 групп: опытные («Обл», n=50; «Обл+Лф», n=44; «Обл+Лфх2», n=45), активного контроля (ложнооблученные: «АК», n=28; «АК+Лф», n=28; «АК+Лфх2», n=27) и пассивного контроля (интактные: «ПК», n=16). Мыши из опытных групп были подвергнуты тотальному воздействию гамма-излучения в дозе 7,5 Гр при мощности дозы 0,6 Гр/мин. Данная доза является сублетальной и вызывает у мышей серьезные

изменения поведенческих и физиологических параметров, но вместе с тем позволяет сохранить достаточное для анализа количество животных в течение 30- и дневного эксперимента [Алчинова И.Б. и др., 2018; Liu et al., 2017].

Сразу после воздействия животные из групп «Обл+Лф», «Обл+Лфх2», «АК+Лф», «АК+Лфх2» получили инъекцию чЛф (внутрибрюшинно, 4 мг/животное в 0,3 мл физраствора (0,9% NaCl, Дальхимфарм, РФ). Через 24 ч после облучения мышам был повторно введен чЛф (группы «Обл+Лфх2», «АК+Лфх2») либо физраствор (группы «Обл+Лф», «АК+Лф»). Дозировка белка была основана на данных литературы [Nishimura et al., 2014] и результатах наших пилотных экспериментов. Животным из групп «Обл» и «АК» был дважды введен физраствор аналогичным образом. Порядок проведения эксперимента представлен на схеме (Рис. 1).

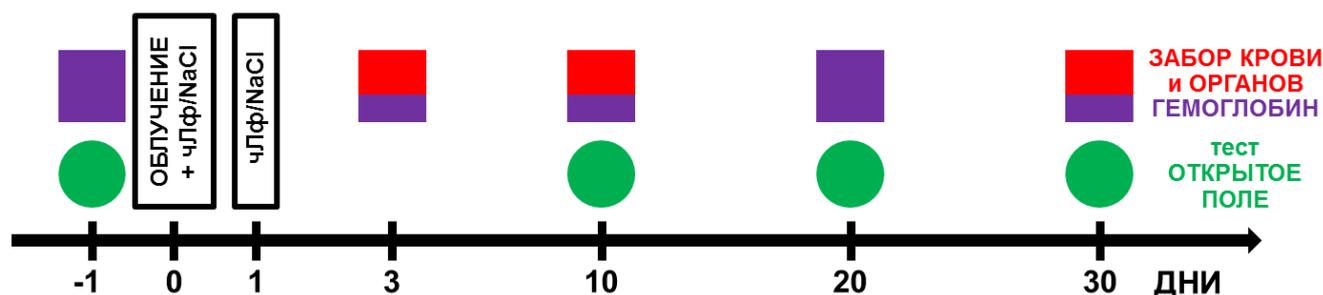


Рисунок 1. Схема эксперимента по исследованию эффектов лактоферрина после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе.

2.1.2. Измерение массы тела животных

Массу тела мышей измеряли каждые три дня на протяжении всего эксперимента на электронных весах Adventurer Pro (Ohaus, США). Цена деления весов – 0,01 г. Первое взвешивание проводили накануне облучения.

2.1.3. Анализ поведения мышей в тесте «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» (ОП) является стандартным методом, используемым для изучения спонтанной двигательной активности и исследовательского поведения грызунов [Gould et al., 2009]. В качестве открытого поля использовали круглую пластиковую арену ($d = 120$ см, $h = 45$ см), уровень освещенности

которой составлял 115 люкс. Центральная зона ($d = 60$ см) была определена как центр. Тестирование проводили накануне облучения и на 10-й, 20-й, 30-й день после него (Рис. 1). Каждое животное высаживали в центр и давали 5 мин для свободного обследования arenas. Во время тестирования проводили видеорегистрацию поведения животного при помощи цветной аналоговой видеокамеры WV-CP500G (Panasonic, Япония), установленной над центром arenas на высоте 2.5 м, и системы видеорегистрации поведения EthoVision XT 8.5 (Noldus Information Technology, Нидерланды). Полученные видеозаписи анализировали в программе EthoVision XT 8.5. После каждой экспериментальной сессии мышей вынимали из ОП и возвращали в домашнюю клетку, а внутренние стенки и дно arenas дезодорировали 70% раствором этанола (ЗАО «Брынцалов-А», РФ). На основе треков рассчитывали общую длину пройденного пути и длительность нахождения животных в центральной зоне, которую выражали в процентах от общего времени. Было подсчитано количество стоек.

2.1.4. Сбор и анализ образцов

Уровень гемоглобина и количество лейкоцитов определяли в периферической крови мышей. Кровь собирали из хвостовой вены после подрезания кончика хвоста. Через 3, 10 или 30 дней после облучения животных анестезировали изофлураном (Baxter, США) и декапитировали с последующим забором органов (печени, селезенки) и цельной крови.

Измерение уровня гемоглобина

Уровень гемоглобина измеряли с помощью автоматического анализатора Easy Touch GCHb (Bioptic Technology, Inc., Тайвань) до облучения и на 3-й, 10-й, 20-й, 30-й день после него (Рис. 1). Для этого каплю крови животного наносили на тест-полоску Easy Touch на гемоглобин.

Подсчет количества лейкоцитов

Количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике на 3-й, 10-й и 30-й день после облучения (Рис. 1). Образец крови (2,5 мкл) разводили 3% раствором уксусной кислоты с метиленовым синим в 20 раз.

Подсчитывали лейкоциты в 100 больших квадратах камеры. Количество лейкоцитов рассчитывали по формуле:

$$N = (n \times 4000 \times 20) / 1600, \text{ где}$$

n - количество лейкоцитов в 1600 малых (100 больших) квадратах;

4000 – коэффициент для приведения объема к 1 мм^3 ;

20 - степень разведения.

Подсчет лейкоцитарной формулы крови

Для подсчета процентного соотношения различных видов лейкоцитов готовили мазки крови по стандартной методике [Васильев А.В., 1956]. Мазки окрашивали по Паппенгейму (красители Мая-Грюнвальда и Романовского-Гимза, последовательно), затем промывали и высушивали [Любина А.Я. и др., 1984]. Мазки исследовали с помощью прямого микроскопа Zeiss Imager Z2 VivaTome (Carl Zeiss, Германия) с масляной иммерсией. Всего было подсчитано по 200 клеток на каждой мазке (в четырех полях по линии меандра), которые на основе морфологических критериев были классифицированы как нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы или базофилы.

Расчет абсолютного количества лейкоцитов разных типов

На основании общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы крови производили расчет абсолютного количества нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов для каждого животного.

Лазерная корреляционная спектроскопия сыворотки крови (ЛКС)

Сыворотку получали из цельной крови мышей на 3-й или 30-й день после облучения (Рис. 1). Образцы оставляли на 2 ч при 4°C , центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, отбирали супернатант и хранили при -20°C до момента анализа. Оценку изменений в субфракционном составе сыворотки крови проводили на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 («ИНТОКС», Санкт-Петербург) после размораживания образцов при комнатной температуре и разбавления физиологическим раствором в соотношении 1:10. Исследуемую сыворотку в объеме 0,2 мл заливали в кювету ЛКС. Измерения проводили при частоте 16384 кГц в количестве 2000 накоплений. Действие прибора ЛКС-03

основано на анализе спектров светорассеяния, получаемых на частицах, присутствующих в биологических жидкостях, когда через образец проходит луч лазера с когерентным монохроматическим излучением [Karganov et al., 2012]. Результатом обработки полученных спектров являлись гистограммы распределения вклада в светорассеяние частиц, присутствующих в жидкости.

Гистологическое исследование селезенки и печени

Селезенка и печень были извлечены и зафиксированы в 4% растворе нейтрального формалина на 3-й, 10-й или 30-й день после облучения (Рис. 1). Препараты готовили согласно принятой методике [Меркулов Г. А., 1969; Лилли Р., 1969]. Образцы заключали в парафин и на микротоме Leitz 1208 (Leitz, Германия) изготавливали срезы тканей (толщина 5 мкм). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Перлсу по стандартным методикам [Меркулов Г. А., 1969], по Ван-Гизону (Ван-Гизон; ООО «ЭргоПродакшн», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные срезы заключали в монтирующую среду (DiaPath, Италия) и исследовали с помощью светового микроскопа Zeiss Imager Z2 VivaTome (Carl Zeiss, Германия). В каждый из указанных моментов времени были исследованы органы 7-10 мышей в каждой группе.

2.2. Изучение эффектов лактоферрина человека на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов в нигростриатной системе мозга мышей

Исследование было проведено на 5-месячных мышах (n=38) (ФГБУН ФИБХ РАН питомник «Пушино», Россия) массой 27-35 г. Нигростриатное дофаминергическое повреждение индуцировали однократным введением МФТП. Экстрапирамидные нарушения оценивали с помощью тестов «Открытое поле» и ротарод, а также анализа длины шага. Структурный дефицит оценивали по количеству тирозингидроксилаза (ТГ) - позитивных клеток в ЧС и плотности ТГ-позитивных волокон в стриатуме.

2.2.1. Экспериментальные группы и воздействия

Мыши в случайном порядке были разделены на 3 группы: Контроль (введение физраствора, $n = 14$), МФТП ($n = 12$) и МФТП+Лф ($n = 12$). МФТП (40 мг/кг, ABCR, Германия, AV456164) вводили однократно подкожно (п/к) [Sedelis et al., 2001; Ferger et al., 2000; Миронов А.Н. и др., 2012]. Контрольные животные получили физраствор в том же режиме. чЛф (4,0 мг/животное), растворенный в 0.4 мл PBS (0.1 М; pH 7,4), или PBS вводили дважды внутрибрюшинно (в/б, за 24 и 3 часа до МФТП). Дозировка белка была основана на данных литературы [Xu et al., 2019] и результатах наших пилотных экспериментов. Для минимизации количества экспериментальных животных, согласно принципам 3Rs [Directive 2010/63/EU, 2014], мы не стали включать группу, получившую только чЛф, в эту часть исследования, поскольку аналогичная контрольная группа («АК+Лф») была нами изучена в первой части работы (п. 2.1.1.).

Во всех группах поведенческие и функциональные тесты проводились до инъекций и через 60 мин, 120 мин, 1, 2, 7 и 28 дней после введения МФТП/NaCl. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 2.

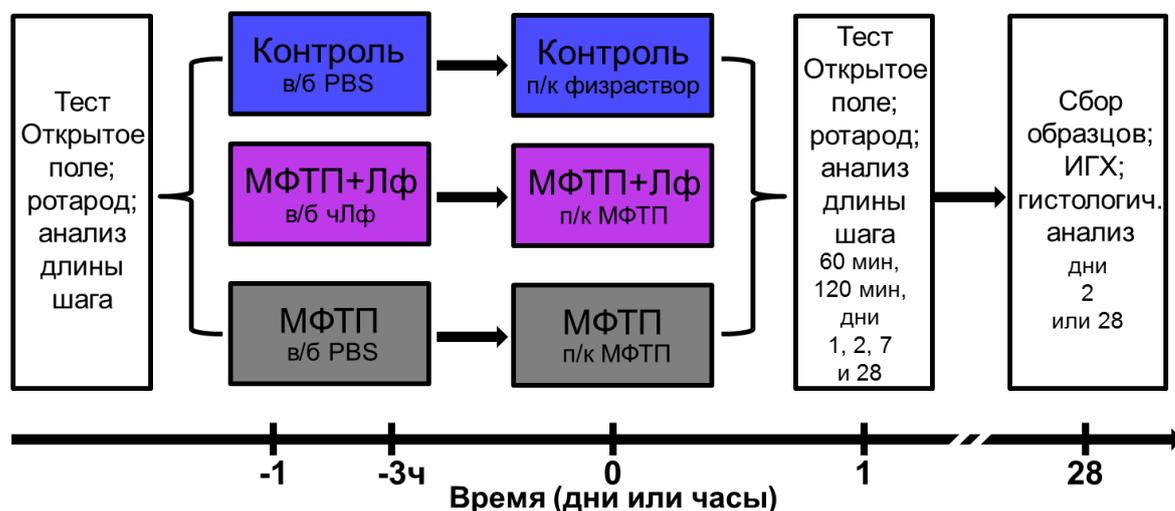


Рисунок 2. Схема эксперимента по изучению эффектов чЛф на модели МФТП-индуцированной гибели нейронов в нигростриатной системе мозга мышей [Кораяева М. Yu. et al., 2021].

При использовании нескольких тестов они выполнялись в одном и том же порядке для всех экспериментальных групп. Тест «Открытое поле» всегда проводился первым. На 2-й или 28-й день после введения МФТП/NaCl животных

транскардиально перфузировали, затем головной мозг был извлечен для иммуногистохимического (ИГХ) анализа.

2.2.2. Измерение массы тела животных

Массу тела мышей измеряли еженедельно по методике, описанной выше (п. 2.1.2): для определения исходного уровня в -1-й день (D_{-1}) перед инъекциями и в последующие дни (D_n) до 28 дня. Изменение массы тела определяли по следующей формуле:

$$\text{Изменение массы тела} = (M \text{ в } D_n - M \text{ в } D_{-1}) / (M \text{ в } D_{-1}) \times 100\%,$$

где M – масса тела животного.

2.2.3. Тест «Открытое поле»

Тестирование животных в ОП проводили по методике, описанной выше (п. 2.1.3). Были зарегистрированы следующие параметры: пройденный путь (общий и в центральной зоне), количество стоек, латентный период выхода из центральной зоны, % времени, проведенного в центре, и количество заходов в центральную зону.

2.2.4. Ротарод

Ротарод является одним из наиболее часто используемых тестов для оценки моторного дефицита и степени нарушения координации у мышей [Brooks, Dunnett, 2009]. Предварительно животные были обучены на автоматизированной установке ротарод 47600 Mouse Rota-Rod (UGO Basile, Италия) с пятью параллельными дорожками (барабаны диаметром 3 см с бороздками для улучшения сцепления) при постоянной скорости вращения 30 об/мин. Высота падения составляла 16 см. В тестовых сессиях латентность падения животных со стержня измерялась как время от начала сессии до момента падения мыши на рычаг, останавливающий таймер. Максимальная продолжительность сессии составляла 120 с. Каждое животное было протестировано дважды, и среднее значение использовалось для дальнейшего анализа.

2.2.5. Длина шага

Оценку выраженности ригидности проводили по длине шага мышей [Миронов А.Н. и др., 2012]. В день тестирования передние и задние лапы животных окрашивали нетоксичными красками разных цветов. Мышей помещали в узкий пенал (шириной 7 см, длиной 40 см, со стенками высотой 10 см), выстланный белой бумагой, и позволяли им свободно ходить. После выполнения задания животных немедленно возвращали в домашнюю клетку. Длина шага определялась путем измерения расстояния между отпечатками лап на одной и той же стороне тела (от среднего пальца первого отпечатка до пятки второго отпечатка). В анализ включались только шаги, сделанные при непрерывной ходьбе (без остановок). Шаги, сделанные в начале (7 см) и в конце (7 см) прохода, были исключены из анализа из-за изменения скорости движения животного [Fernagut et al., 2002; Fleming et al., 2004; Миронов А.Н. и др., 2012]. Длина шага измерялась в трех шагах животного, и в дальнейшем анализе использовалось среднее значение.

2.2.6. Сбор образцов

На 2-й (эти животные были случайным образом отобраны слепым методом) или 28-й день после введения МФТП/NaCl животных анестезировали. Для этого им вводили внутримышечно золетил (Virbac Sante Animale, Франция) и рометар (Bioveta, Чешская Республика) в 0,9% NaCl (Дальхимфарм, РФ). Объем инъекции составил 0,1 мл на 10 г веса животного. Затем мышей транскардиально перфузировали. Перфузию проводили с помощью перистальтического насоса Ecoline ISM1090 (Ismatec, Швейцария) сначала PBS (Sigma-Aldrich, США), имеющим pH 7,4 и комнатную температуру, затем 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в PBS. Головной мозг был извлечен и постфиксирован 4% раствором параформальдегида в PBS при 4°C в течение 24 ч. На вибратоме Leica VT1200S (Leica, Германия) были сделаны серийные фронтальные срезы мозга (толщина 40 мкм), содержащие стриатум (bregma от

+1.42 до -0.10 мм) и ЧС (bregma от -2.80 до -3.52 мм) согласно атласу головного мозга мышей [Franklin, Paxinos, 2008]. Для того, чтобы выбранная структура была представлена полностью, но при этом одни и те же клетки не были посчитаны дважды (что могло произойти в случае выбора соседних срезов) в анализе был использован каждый третий срез.

2.2.7. Иммуногистохимия

Тирозингидроксилаза (ТГ) является первым и лимитирующим ферментом, участвующим в биосинтезе катехоламинов из тирозина. Этот ключевой фермент биосинтеза дофамина в клетке считается специфическим маркером дофаминергических нейронов [Jackson-Lewis et al., 1995; Mengual, Pickel, 2004]. Для ИГХ анализа плавающие срезы сначала промывали (3 × 15 мин) в 1 мл 0,1 М PBS (рН 7.4). Блокировали эндогенную пероксидазную активность 0,3% раствором H₂O₂ (30 мин). Затем срезы отмывали в PBS (3 × 15 мин) и инкубировали в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) 10 мин при 95°C. Для снижения неспецифического окрашивания и пермеабиллизации мембран срезы преинкубировали с 2,5% нормальной козьей сывороткой (Abcam, ab7481) в 1,0% Triton X-100 (1% PBST) в течение часа при комнатной температуре и отмывали в 0,2% PBST (3 × 10 мин). Затем срезы инкубировали с первичными антителами кролика к ТГ (1:750; Abcam, ab112) в 0,2% PBST, содержащем 0,01% азид натрия и 2,5% нормальной козьей сыворотки в течение 16 ч при 4°C. Проводили доинкубацию в том же растворе антител в течение 2 ч при комнатной температуре и отмывали в 0,2% PBST (3 × 15 мин). Затем срезы инкубировали с вторичными антителами козы к антителам кролика (1:2000; Abcam, ab205718) в 0,2% PBST в течение 2 ч при комнатной температуре и отмывали в 0,2% PBST (3 × 15 мин). Реакцию визуализировали путем инкубации срезов в 3,3'-диаминобензидине (DAB substrate kit; Abcam, ab64238) под визуальным контролем. Срезы, содержащие ЧС, докрасивали крезил-виолетом. Затем срезы промывали, дегидратировали в 70%, 96%, 100% (2 раза) спирте, 100% ксилоле по 2 мин в каждом и заключали под покровные стёкла с использованием ксилольного

маунтинга (Mount-Quick, Daido Sangyo, Япония). Наличие специфической ИГХ окраски оценивали путем сравнения с изготовленными контролями. С этой целью использовали отрицательный контроль. При проведении иммуногистохимической реакции исключали инкубацию с первичными антителами, заменяя их неиммунной сывороткой.

2.2.8. Гистологический анализ

Срезы ЧС и стриатума после выявления ТГ оцифровывали с помощью прямого микроскопа Zeiss Imager Z2 VivaTome (Carl Zeiss, Германия). Для обработки и анализа полученных изображений использовали программный пакет AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия). Срезы мозга контрольных и экспериментальных животных были закодированы и изучались слепым методом. Был проведен количественный анализ ТГ+ нейронов и волокон.

Подсчет ТГ- положительных клеток в черной субстанции. На каждом изображении была обведена область интереса. ТГ+ клетки в выбранной области были выделены и подсчитаны полуавтоматически. Потерю дофаминергических нейронов определяли путем подсчета ТГ+ клеток в компактной части ЧС (5-7 репрезентативных срезов для каждой мыши). Анализ проводили путем подсчета ТГ+ нейронов (маркер фенотипа) и клеток, окрашенных крезил-виолетом (структурный маркер) в правой и левой компактных частях ЧС на каждом репрезентативном срезе. Для каждого животного рассчитывали среднее число ТГ+ нейронов. Количество нейронов определяли как среднее число нейронов на репрезентативный срез [Jackson-Lewis et al., 1995].

Измерение оптической плотности ТГ-положительных волокон в стриатуме. Содержание ТГ+ волокон в стриатуме оценивали путем измерения оптической плотности (ОП) специфического окрашивания в пяти срезах стриатума каждой мыши (по четыре области в каждом срезе) с помощью программного пакета ImageJ (Fiji version, США) [Schindelin et al., 2012]. Среднее значение фонового измерения оптической плотности (ОПк, сделанное в неокортексе также в четырех областях) вычиталось из среднего значения ОП

стриатума на каждом срезе [Yuan et al., 2005]. ОП в стриатуме была нормализована на ОПк.

2.3. Изучение возможных путей транспорта человеческого лактоферрина в МОЗГ МЫШИ

Работа выполнена на 2-2,5 месячных мышах (n=15) массой 25-29 г. Животные были получены из питомника Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

2.3.1. Введение человеческого лактоферрина

Мыши в случайном порядке были разделены на четыре группы:

1-ая группа: введение чЛф в физрастворе (20 мг/мл; n=3) или физраствора (n=1, контроль) однократно интраназально по 5 мкл раствора в каждую ноздрю (5 мкл x 2 = 10 мкл);

2-ая группа: введение чЛф в физрастворе (20 мг/мл; n=3) или физраствора (n=1, контроль) двукратно конъюнктивально по 2,5 мкл в каждый глаз (2,5 мкл x 4 = 10 мкл);

3-я группа: введение чЛф в физрастворе (20 мг/мл; n=3) или физраствора (n=1, контроль) однократно подъязычно 30 мкл;

4-ая группа: введение чЛф в растворе фосфатного буфера (PBS, pH 7,4) однократно внутрибрюшинно 0,4 мл (в концентрации 10 мг/мл; n=2).

Дополнительно было взято одно животное в качестве интактного контроля.

2.3.2. Сбор образцов

Мыши 1-й, 2-й и 3-й групп были анестезированы перед введением растворов, мыши 4-й группы и интактное животное - перед проведением перфузии. Через 5, 10 или 60 мин (для животных 1-й и 2-й группы), через 5, 15 или 30 мин (для животных 3-ей группы) и через 30 или 60 мин (для животных 4-й группы) после введения чЛф мышей транскардиально перфузировали. Анестезию и перфузию проводили по методикам, описанным выше (п. 2.2.6). Головной мозг

был извлечен и постфиксирован 4% раствором параформальдегида в PBS при 4°C в течение 24 ч. На вибраторе Leica VT1200S (Leica, Германия) были сделаны серийные парасагиттальные срезы толщиной 50 мкм. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 3.

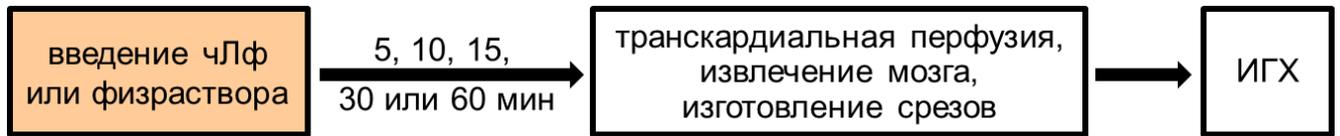


Рисунок 3. Схема эксперимента по изучению возможных путей транспортировки человеческого лактоферрина в мозг мыши.

2.3.3. Иммуногистохимическая детекция человеческого лактоферрина

Для ИГХ анализа использовали животных всех групп. Сначала проводили демаскирование антигенов. Плавающие срезы помещали в микропробирки с 10 мМ цитратным буфером (pH 6,0) с 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, США), инкубировали в термошейкере при 95°C 10 мин при постоянном перемешивании со скоростью 900 об/мин. Извлекали срезы из пробирок и отмывали в PBS (3 × 10 мин). Срезы прединкубировали с 2,5% нормальной сывороткой осла (Sigma-Aldrich, США) в 1,0% Triton X-100 в PBS (1% PBST) в течение часа при комнатной температуре для снижения неспецифического окрашивания и пермеабиллизации мембран, отмывали в 0,2% PBST (3 × 10 мин). Затем срезы инкубировали с первичными антителами кролика к чЛф (1:150; Abcam, ab15811) в 0,2% PBST, содержащем 0,01% азида натрия и 2,5% нормальной сыворотки осла, в течение 12-18 ч при 4°C. Проводили доинкубацию в том же растворе антител в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем отмывали в 0,2% PBST (3 × 15 мин). Срезы инкубировали в растворе вторичных антител осла к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с флуорофором Alexa Fluor 568 (1:500; Abcam, ab175470), в 0,2% PBST в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре. Отмывали в 0,2% PBST (3 × 15 мин). Срезы докрашивали флуоресцентным ядерным красителем DAPI (1:1000; Abcam, ab228549).

Наличие специфического флуоресцентного сигнала оценивали путем сравнения с изготовленными контролями. С этой целью использовали отрицательный контроль. При проведении ИГХ реакции исключали инкубацию с первичными антителами, заменяя их нормальной сывороткой.

Для выявления распределения чЛф в головном мозге проводили ИГХ анализ каждого шестого среза мозга, взятого через 10 мин после интраназального введения.

2.3.4. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин

Для фенотипирования клеток была проведена оценка колокализации чЛф и маркеров разного типа клеток на срезах мозга мыши. Колокализацию антигенов оценивали с помощью ИГХ-анализа. Для двойного окрашивания использовали комбинацию первичных антител к чЛф с антителами к следующим белкам: NeuN - маркеру зрелых нейронов (1:500; Millipore, MAB377), GFAP - маркеру астроцитов (1:250; Abcam, ab4674), Iba1 - маркеру клеток микроглии (1:200; Abcam, ab48004), CD31 - маркеру клеток эндотелия (1:100; Abcam, ab24590), а также соответствующих им вторичных антител (1:500), конъюгированных с Alexa Fluor 568 (Abcam, ab175470), Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A-21450) или Alexa Fluor 488 (Abcam, ab150173; Abcam, ab150129; Abcam, ab150117). Срезы докрашивали DAPI.

2.3.5. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин при прямой аппликации белка на срезы

Для ИГХ-анализа использовали срезы мозга интактного животного. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 4.

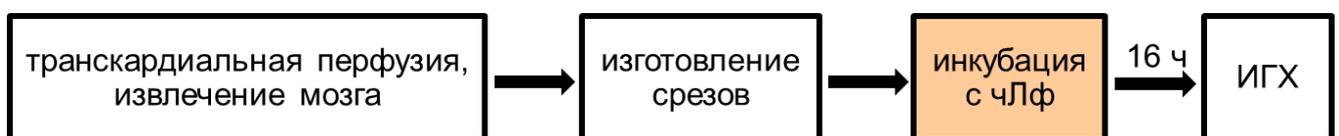


Рисунок 4. Схема эксперимента по фенотипированию клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин при прямой аппликации белка на срезы.

Сначала проводили демаскирование антигенов, как описано выше. Затем плавающие срезы инкубировали в растворе чЛф (10 мг/мл) в PBS, содержащем 0,01% азида натрия, в течение 16 ч при 4°C. Проводили доинкубацию в том же растворе в течение 2 ч при комнатной температуре, затем отмывали в PBS (3 × 15 мин). После пермеабиллизации мембран срезы отмывали.

Для двойного окрашивания использовали те же комбинации первичных и соответствующих им вторичных антител (п. 2.3.4). Срезы докрашивали DAPI. Была проведена оценка колокализации чЛф и маркеров разного типа клеток.

2.3.6. Иммунофлуоресценция и анализ

Срезы мозга заключали под покровные стекла с использованием среды на водной основе Fluoromount (Sigma-Aldrich, США). 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).

2.4. Исследование влияния лактоферрина человека на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в первичных нейрональных культурах после физиологической стимуляции

Первичные диссоциированные клеточные культуры получали из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6 в стерильных условиях. Гиппокампы извлекали, измельчали, трипсинизировали (0,25%, 20 мин, 37°C; Sigma-Aldrich, США, T4049) [Kaech et al, 2006; Широкова О.М. и др., 2013]. Клетки дважды отмывали в полной культуральной среде. Подсчет клеток производили в камере Горяева, доводили их концентрацию до 3 млн/мл. Затем клетки (по 50 мкл суспензии) высаживали на стекла, предварительно обработанные 0,05% полиэтиленгликолем (Supelco, США), помещенные в 35-мм чашки Петри (Greiner Bio-One, Германия). Плотность составляла не менее 1200 клеток/мм². Культуры клеток инкубировали при 37°C, 100% влажности и 5% CO₂ (инкубатор Galaxy 170 S, New Brunswick Scientific,

США), в среде Neurobasal (Gibco, 21103-049), содержащей биоактивную добавку B27 (2%, Gibco, 17504-044), L-глутамин (0,5 мМ, Gibco, 25030-024), 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco, 15140-122, Великобритания) [Barykina et al., 2016]. Смену культуральной жидкости (половину объема) производили через 24 ч после посадки и затем каждые 3 дня.

2.4.1. Экспериментальные группы и стимуляция

Нейрональные культуры случайным образом были разделены на 7 групп: три опытные (КСI, КСИ+Лф, КСИ+Лфпост, $n = 10, 8, 6$, соответственно), две активного (АК, АК+Лф, $n = 6$ в каждой) и две пассивного (ПК, ПК+Лф, $n = 7, 9$, соответственно) контроля. На 8-й день культивирования *in vitro* осуществляли индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках путем добавления 50 мМ КСИ (3x2 мин, интервал 5 мин) в культуральную среду с полной сменой среды между стимуляциями [Schoenenberger et al., 2012]. В качестве активного контроля

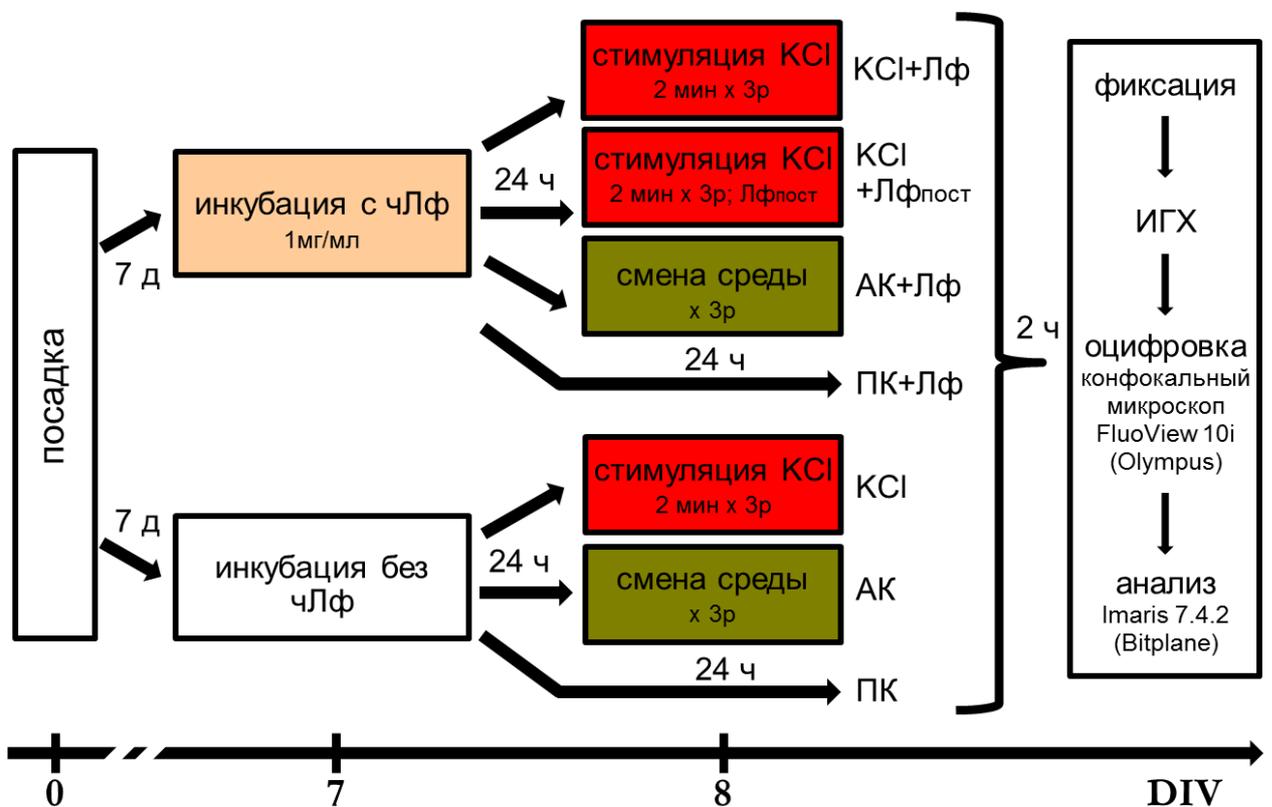


Рисунок 5. Схема эксперимента по исследованию влияния лактоферрина человека на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в первичных нейрональных культурах после физиологической стимуляции.

использовали культуры с трехкратной сменой среды. За 24 ч до стимуляции, смены среды или фиксации в культуральную среду групп КС1+Лф, КС1+Лф_{пост}, АК+Лф и ПК+Лф добавляли чЛф до конечной концентрации 1 мг/мл. Дозировка белка была выбрана по данным литературы [Tamman et al., 2018]. При смене среды между стимуляциями в группе КС1+Лф_{пост} концентрацию чЛф поддерживали постоянной до момента фиксации культур. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 5.

Через 2 ч после стимуляции или смены среды культуры отмывали 0,1 М PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в PBS (10 мин на хладагенте). Группы пассивного контроля фиксировали одновременно с остальными без дополнительных манипуляций. Были проведены три независимые серии экспериментов.

2.4.2. Оценка степени фрагментации геномной ДНК в клетках нейрональных культур после стимуляции

Выявление фрагментации ДНК проводили с помощью набора In situ BrdU-Red DNA fragmentation (TUNEL) (Abcam, ab66110) в соответствии с инструкциями производителя. TUNEL-метод основан на флуоресцентном мечении 3'-гидроксильных концов в двухцепочечных разрывах ДНК, образовавшихся в результате фрагментации, с использованием 5-Бром-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфата (Br-dUTP) в реакции, катализируемой экзогенной терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазой (TdT), с последующей детекцией с помощью антител к бромдезоксинуридину, меченных красным флуорохромом [Шмаров Д.А. и др., 2013; Chen et al, 2020].

Культуры групп КС1 (через 2 или 24 ч после стимуляции) и ПК отмывали 0,1 М PBS, фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в PBS (10 мин на хладагенте), затем дважды отмывали в PBS. Клетки инкубировали в 0,03% Тритон X-100 в PBS (0,03% PBST) в течение 10 мин при комнатной температуре для пермеабиллизации мембран, отмывали в PBS (1 × 10 мин) и наносили по 100 мкл промывочного буфера (2 × 5 мин). Культуры инкубировали в темноте при 37°C с TdT и Brd-UTP в течение 1 ч, отмывали в PBS

(2 × 5 мин), а затем окрашивали антителами к бромдезоксипуридину, меченными красным флуорохромом, в течение 30 мин при комнатной температуре. Отмывали в PBS (1 × 5 мин). Ядра клеток докрашивали ДНК-специфическим маркером Hoechst 33258 (1:1000; Invitrogen, H-1398). Окрашенные культуры оцифровывали с помощью конфокального микроскопа FV10i (Olympus, Япония) и анализировали в программных пакетах Imaris 7.4.2 (Bitplane, Швейцария) и Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США). Количество TUNEL+ - ядер было нормализовано на общее количество ядер [Maiti et al., 2017; Ben Yakir-Blumkin et al., 2014], среднее арифметическое рассчитано по 10-15 полям зрения в каждой культуре.

2.4.3. Динамика проникновения Лф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа

На 7-й день культивирования *in vitro* в среду добавляли чЛФ до конечной концентрации 1 мг/мл. Через 2, 24 или 72 ч культуры отмывали 0,1 М PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида (10 мин на хладагенте). Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием кроличьих моноклональных антител (EPR4338) к лактоферрину (1:150; Abcam, ab109000), с последующей детекцией с помощью ослиных противокроличьих антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 568 (1:500; Abcam, ab175470). Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258. Окрашенные культуры оцифровывали и анализировали (аналогично п. 2.4.2). Количество Лф+ - клеток (отдельно с цитоплазматической и ядерной локализациями экзогенного белка) было нормализовано на общее количество ядер, среднее арифметическое рассчитано по 5-6 полям зрения в каждой культуре.

2.4.4. Иммуноцитохимическая детекция белков

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием козьих поликлональных антител к белку c-Fos (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-52-G), кроличьих моноклональных антител (EPR4338) к лактоферрину (1:150; Abcam, ab109000) и мышинных моноклональных антител к NeuN (clone A60) (1:500; Millipore, MAB377) с последующей детекцией с помощью ослиных

противокозбых антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 488 (1:500; Abcam, ab150129), ослиных противокроличьих антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 568 (1:500; Abcam, ab175470) и ослиных противомышиных антител, меченных флуорофором Alexa Fluor 647 (1:500; Invitrogen, A-21450). Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258. Окрашенные культуры оцифровывали и анализировали (аналогично п. 2.4.2). Количество c-Fos+ - ядер было нормализовано на общее количество ядер [Суханова А.Л. и др., 2012] среднее арифметическое рассчитано по 10 полям зрения в каждой культуре.

2.5. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, California, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова в зависимости от размеров выборок. При нормальном характере распределения исследуемых параметров применяли однофакторный дисперсионный анализ One-Way ANOVA с последующим *post hoc* анализом по критерию Тьюки или критерию Шидака для множественных сравнений. В случаях, когда результаты проверки не позволяли принять гипотезу о нормальном характере распределения данных, для сравнительного анализа 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 U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных. Для выявления корреляционной взаимосвязи между параметрами рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции рангов Спирмена. Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Мейера (критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего или в виде медиан, квартилей, минимального и максимального значений. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОСТРОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ В СУБЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЕ

Задачей первой части работы было исследовать эффекты чЛф на интегральные и системные показатели состояния организма после острого гамма-облучения мышей в сублетальной дозе.

3.1. Выживаемость и средняя продолжительность жизни мышей после тотального гамма-облучения

Влияние чЛф на выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) 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. 6а), а СПЖ - $16,0 \pm 1,7$ дней (Рис. 6б) [Копаева М.Ю. и др., 2020]. Это согласуется с опубликованными ранее данными (п. 1.2.3.).

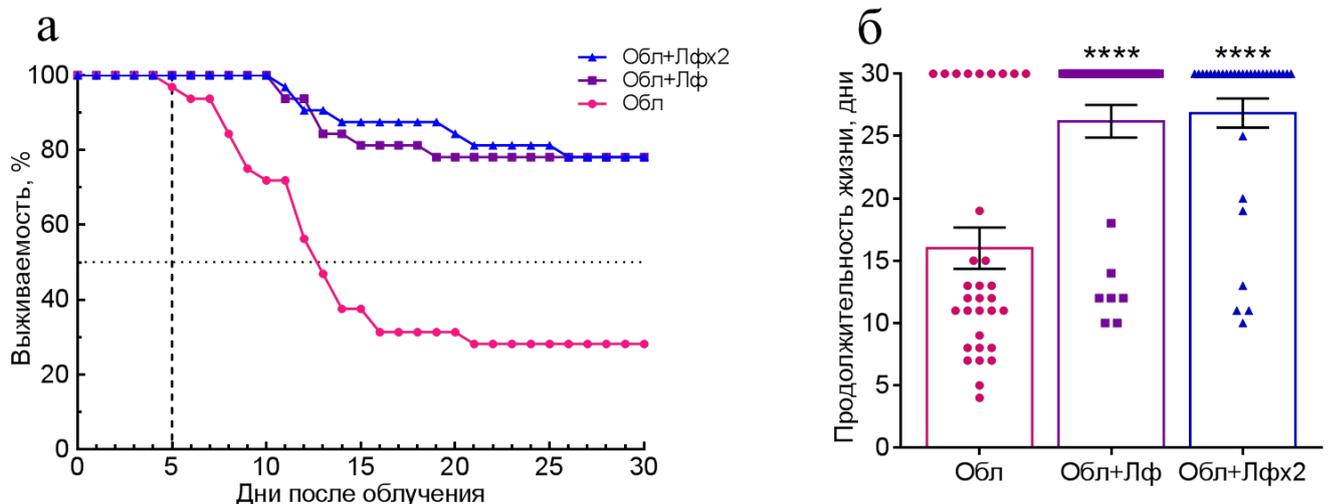


Рисунок 6. Выживаемость (а) и средняя продолжительность жизни (б) мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. **** $p < 0,0001$ - отличия от группы Обл [Копаева М.Ю. и др., 2020].

В группах Обл+Лф и Обл+Лфх2 первая гибель мышей произошла на 11-й день после облучения и носила постепенный характер. Обнаружено, что введение чЛф увеличило выживаемость облученных животных до 78,1% в обеих группах (Рис. 6а), а СПЖ – до $26,8 \pm 1,2$ (Обл+Лфх2) и $26,2 \pm 1,3$ (Обл+Лф) дней (Рис. 6б) [Копеева М.Ю. и др., 2020].

Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. На 30-й день после тотального рентгеновского облучения в дозе 6,8 Гр или 7 Гр выживаемость мышей, получавших диету, содержащую 0,1% коровьего Лф, в течение 7-и дней до облучения и 30-ти дней после него, была выше: 85% и 62%, соответственно [Nishimura et al., 2014] или 50% и 33%, соответственно [Feng et al., 2018]. Коровий Лф (4 мг/животное, в/б), введенный сразу после рентгеновского облучения в дозе 6,8 Гр, увеличил 30-ти дневную выживаемость мышей с 50% до 92% [Nishimura et al., 2014]. Введение Лф (65 или 300 мкг/кг, п/к, ежедневно с 1-го по 14-й день), полученного биотехнологическим методом из молозива кроликов, после тотального гамма-облучения морских свинок в дозе 2,5 Гр повышало выживаемость животных к 30-му дню с 54% до 86% или 100%, соответственно [Иванов А.А. и др., 2009].

Таким образом, введение чЛф позволило увеличить выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных мышей в течение эксперимента.

3.2. Изменение массы тела животных

Воздействие больших доз ионизирующего излучения может вызывать значительное снижение массы тела [Цыб А.Ф. и др., 2005; Liu et al., 2017]. После облучения масса тела мышей начала уменьшаться, в то время как у контрольных животных она постепенно увеличивалась. У контрольных мышей чЛф не оказал заметного влияния на изменение массы тела, не было выявлено различий между группами активного (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) и пассивного контроля (ПК) в течение эксперимента по этому показателю. Во всех трех опытных группах наблюдали снижение массы тела на 3-й день после облучения, хотя в группе Обл+Лфх2 оно было менее значительным (Рис. 7) [Копеева М.Ю. et al., 2020]. В

опытных группах динамика изменения массы тела была разной. Масса тела животных группы Обл уменьшалась до 12-го дня и между 21-м и 24-м днями, оставалась приблизительно постоянной между 12-м - 15-м и 27-м - 30-м днями, увеличивалась между 15-м - 21-м и 24-м - 27-м днями. Это согласуется с опубликованными ранее данными (п. 1.2.3.).

Масса облученных животных, получивших чЛф, уменьшалась до 6-го дня, оставалась в основном постоянной между 6-м и 15-м днями и далее постепенно увеличивалась.

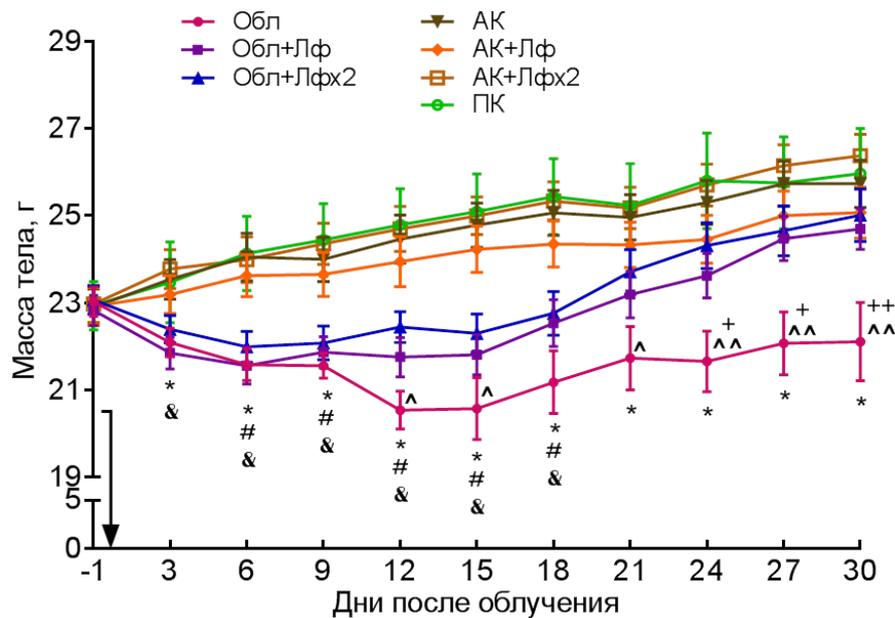


Рисунок 7. Изменение массы тела мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр в течение эксперимента. Стрелка указывает день, когда было проведено облучение. * $p < 0,05$ – Обл vs АК; # $p < 0,05$ – Обл+Лф vs АК+Лф; & $p < 0,05$ – Обл+Лфх2 vs АК+Лфх2; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ – Обл vs Обл+Лф;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

В группе Обл масса тела была значимо меньше, чем в группе АК, начиная с 3-го дня и до конца эксперимента, а также чем в группах Обл+Лф с 24-го по 30-й дни и Обл+Лфх2 на 12-й, 15-й и с 21-го по 30-й дни (Рис. 7). Животные всех опытных групп значимо отличались от соответствующих контролей с 6-го по 18-й день по этому показателю. К 30-му дню масса мышей группы Обл не восстановилась даже до исходного уровня [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Напротив, уже к 21-му дню масса тела животных в группах Обл+Лф и Обл+Лфх2 достигла исходного уровня и значимо не отличалась от соответствующих контролей. Ранее

сообщалось, что после рентгеновского облучения в дозе 7 Гр масса тела мышей снижалась до 10-го дня, затем начинала увеличиваться, и у животных, облученных на фоне диеты, содержащей 0,1% коровьего Лф (7 дней до и 30 дней после), этот показатель был значимо выше между 20-м и 30-м днями [Feng et al., 2018].

Одной из основных причин снижения массы тела облученных животных является лучевое поражение слизистой оболочки тонкого кишечника. Коровий Лф (2 или 4 мг/животное, в/б, за 4 ч до и 1р/день 3 дня после облучения) ослаблял повреждение эпителия тонкой кишки (показатели: длина ворсинок и отношение длины ворсинки к глубине крипты) у мышей после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр [Wei et al., 2019].

Представленные данные свидетельствуют о том, что чЛф оказал компенсаторное действие на изменение массы тела облученных животных.

3.3. Оценка изменения поведения мышей в тесте «Открытое поле»

Известно, что острое воздействие высоких доз ионизирующего излучения вызывает существенные изменения поведения (п. 1.2.3). Все группы мышей показали сходную двигательную активность и исследовательское поведение перед экспериментальным воздействием. Повторное тестирование в ОП приводило к зависящим от времени изменениям в поведении животных контрольных групп. Поведенческие реакции, связанные со страхом в ответ на новизну, наблюдаемые на начальных этапах, проявлялись слабее, а благодаря привыканию двигательная активность снижалась.

Общий пройденный путь отражает горизонтальную двигательную активность животных [Mandillo et al., 2008]. Результаты измерения пройденного пути в ОП показали, что на 10-й и 20-й дни после облучения общая двигательная активность мышей опытных групп была снижена по сравнению с соответствующими контролями (Рис. 8а) [Копеева М.Ю. и др., 2020]. На 30-й день облученные животные не отличались от контрольных по этому показателю. Однако на 30-й день были выявлены значимые различия между группами Обл и

Обл+Лф, а также АК и АК+Лф (Рис. 8а, б). Мыши, однократно получившие чЛф, прошли большее расстояние в ОП при финальном тестировании.

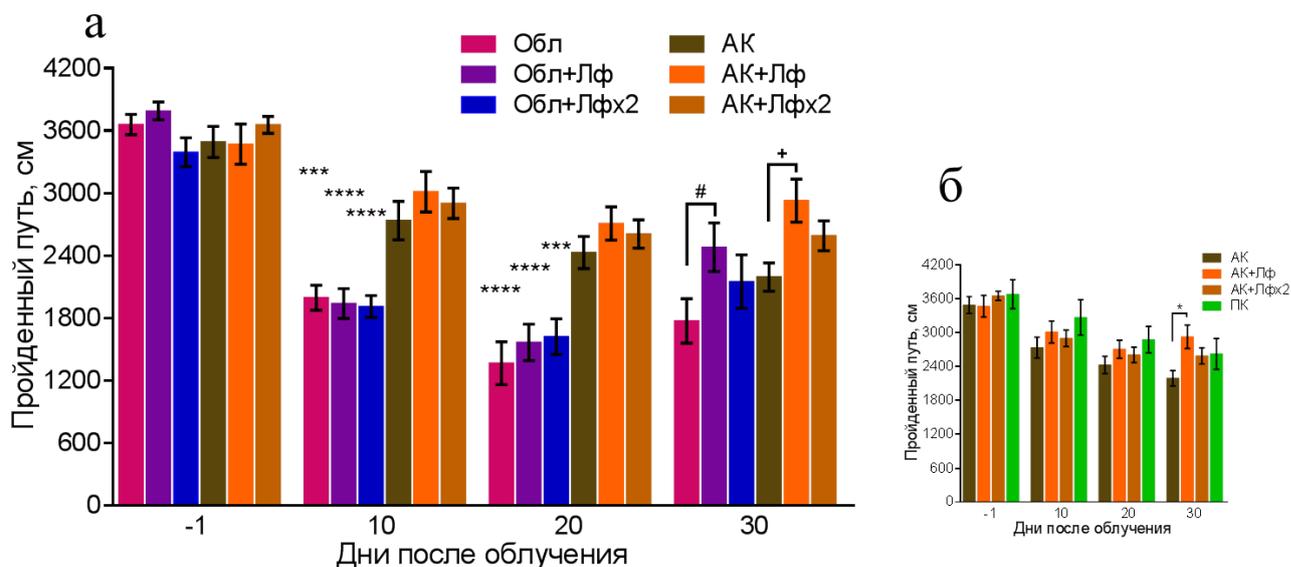


Рисунок 8. Общий пройденный путь мышей в тесте «Открытое поле» после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Все группы, кроме ПК (а). Все контрольные группы (б). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ - отличия от соответствующих контрольных групп в тот же день; # $p < 0,05$; + $p < 0,05$.

Количество стоек является мерой исследовательской активности [Carola et al., 2002]. У облученных мышей выявили уменьшение количества стоек на 10-й день после воздействия по сравнению с контрольными животными (Рис. 9) [Копаева М.Ю. и др., 2020].

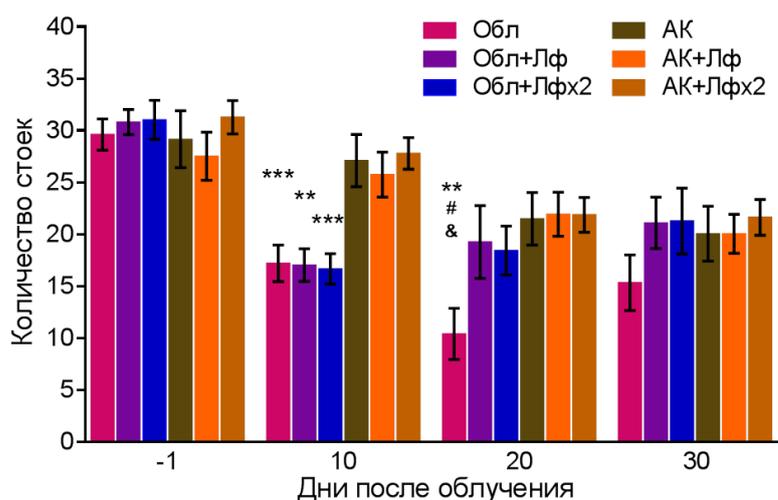


Рисунок 9. Поведение мышей в тесте «Открытое поле» после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Количество стоек. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - отличия от соответствующих контрольных групп в тот же день; # $p < 0,05$ – отличия от группы Обл+Лф, & $p < 0,05$ - отличия от группы Обл+Лфх2 на 20-й день [Копаева М.Ю. и др., 2020].

На 20-й день этот показатель в группе Обл был значимо 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 [Копеева М.Ю. и др., 2020]. На 30-й день значимых различий по этому параметру между группами выявлено не было.

Время, проведенное в центре ОП, может служить параметром, отражающим уровень тревожности животного [Carola et al., 2002; Prut and Belzung, 2003; Zhang et al., 2018]. Мыши группы Обл уже к 10-му дню проводили в центральной зоне значимо меньше времени, чем контрольные (Рис. 10). 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. По времени, проведенному животными в центральной зоне, обе опытные группы, получившие чЛф, не отличались от контрольных на всех этапах тестирования [Копеева М.Ю. и др., 2020].

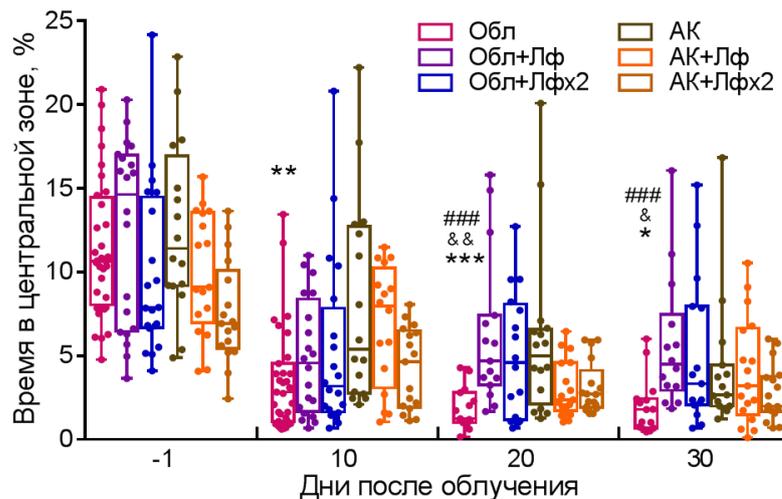


Рисунок 10. Поведение мышей в тесте «Открытое поле» после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Время, проведенное в центральной зоне, %. Каждая точка представляет одно животное. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - отличия от группы АК; ### $p < 0,001$ – отличия от группы Обл+Лф; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$ – отличия от группы Обл+Лфх2 в тот же день.

Полученные нами данные по группе Обл согласуются с результатами других исследователей (п. 1.2.3). Данные о влиянии чЛф на поведение мышей в тесте ОП после острого гамма-облучения в сублетальной дозе (группы Обл+Лф и Обл+Лфх2) получены впервые. Таким образом, наши результаты показали, что

введение чЛф оказало компенсаторное действие на индуцированные облучением изменения в поведении животных.

3.4. Исследование изменений показателей крови мышей после гамма-облучения

В настоящей работе образцы крови использовали для определения следующих параметров: уровень гемоглобина (до облучения и на 3-й, 10-й, 20-й, 30-й дни после него), общее количество лейкоцитов (3-й, 10-й, 30-й дни) и лейкоцитарная формула (3-й и 30-й дни). Гематологические параметры мышей контрольных групп (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) не отличались от референтных значений [Bella et al., 2017; Feng et al., 2018]. Не было выявлено различий по показателям крови между группами активного контроля (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) в течение эксперимента.

3.4.1. Уровень гемоглобина

Результаты показали, что облучение вызвало значительное снижение уровня гемоглобина. Мыши всех опытных групп отличались по этому параметру от соответствующих контролей на 10-й и 20-й дни (Рис. 11). Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами (п.1.2.3). К 30-му дню уровень гемоглобина у облученных животных был практически восстановлен.

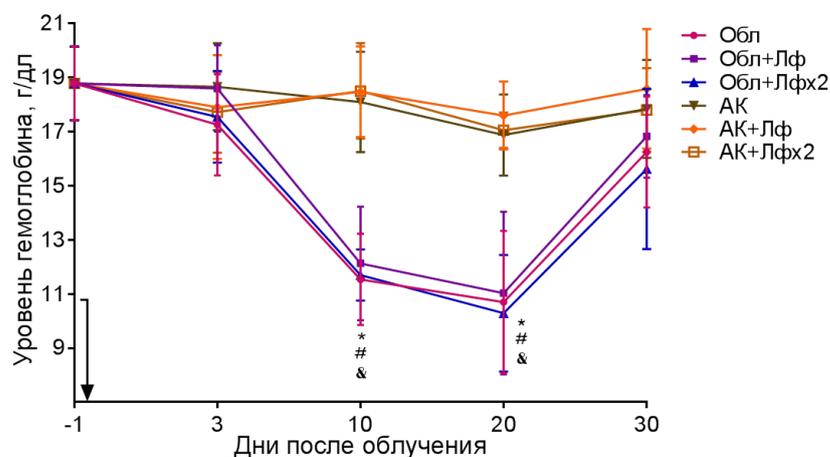


Рисунок 11. Динамика изменения уровня гемоглобина в крови мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Стрелка указывает день, когда было проведено облучение. * $p < 0,05$ – Обл vs АК; # $p < 0,05$ – Обл+Лф vs АК+Лф; & $p < 0,05$ – Обл+Лфх2 vs АК+Лфх2 в тот же день.

3.4.2. Общее количество лейкоцитов

Облучение вызвало резкое снижение количества лейкоцитов во всех опытных группах. На 3-й и 10-й дни группы Обл, Обл+Лф и Обл+Лфх2 значительно отличались от соответствующих контролей (Рис. 12).

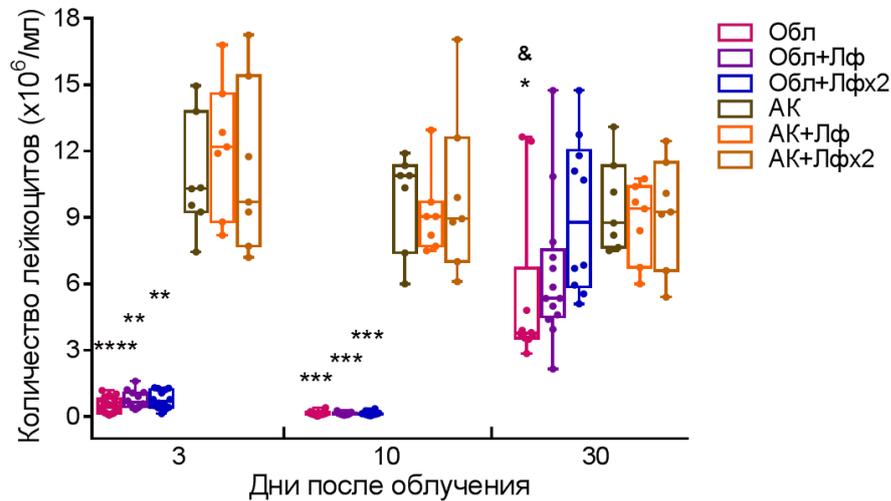


Рисунок 12. Динамика изменения количества лейкоцитов в крови мышей после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Каждая точка представляет одно животное. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ***** $p < 0,00001$ - отличия от соответствующих контрольных групп в тот же день; & $p < 0,05$ – отличия от группы Обл+Лфх2 на 30-й день.

На 30-й день количество лейкоцитов в опытных группах увеличилось, хотя в группе Обл продолжало оставаться значимо меньшим, чем в контроле. Обе опытные группы, получившие чЛф, не отличались от соответствующих контролей на 30-й день после облучения. Кроме того, в группе Обл+Лфх2 количество лейкоцитов в этот день было значимо выше, чем в группе Обл.

Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами (п.1.2.3). После тотального рентгеновского облучения в дозе 7 Гр количество лейкоцитов у мышей быстро снижалось до 14-го дня, затем начинало постепенно расти [Feng et al., 2018]. Животные, получавшие коровий Лф в течение 7 дней до облучения и 30-ти дней после него, восстанавливались по этому показателю быстрее и на 29-й день не отличались от контрольных [Feng et al., 2018].

3.4.3. Лейкоцитарная формула крови

В картине крови опытных групп мы наблюдали истощение запаса лимфоцитов и увеличение относительного числа нейтрофилов на 3-й день после

облучения (Рис. 13, слева). Относительное содержание лимфоцитов в группе Обл+Лфх2 было значимо выше, чем в группе Обл. 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 (Рис. 13, справа). Относительное количество моноцитов у животных группы Обл в этот день было выше, чем у контроля. В группе Обл динамика изменения лейкоцитарной формулы имела восстановительный характер. Однако мыши этой группы значимо отличались как от контроля, так и от групп Обл+Лф и Обл+Лфх2 по относительному содержанию лимфоцитов и нейтрофилов на 30-й день после облучения. Это может означать, что к этому сроку не произошло достаточного обновления лейкоцитов после радиационного поражения [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Абсолютное количество лейкоцитов разных типов в крови мышей на 3-й и 30-й дни после облучения приведено в Таблице 1 и Таблице 2, соответственно. Выявлен дозозависимый эффект чЛф при восстановлении количества лимфоцитов и базофилов на 30-й день.

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей. Уровень гемоглобина и количество лейкоцитов у мышей, получавших диету, содержащую 0,1% коровьего Лф (7 дней до и 30 дней после), были значимо снижены на 15-й день после рентгеновского облучения в дозе 6,8 Гр [Nishimura et al., 2014]. В другой работе после рентгеновского облучения в дозе 7 Гр у мышей, получавших такую же диету, количество лейкоцитов прогрессивно снижалось до 3-го дня, между 9-м и 14-м днем оставалось низким, а к 29-му дню возрастало и стабилизировалось в пределах нормы. Между 9-м и 29-м днем оно было достоверно выше по сравнению с облученной группой, не получавшей Лф [Feng et al., 2018]. В этой же работе было показано, что облучение значимо снизило уровень гемоглобина между 7-м и 29-м днями после воздействия. У животных, получавших Лф, этот показатель восстанавливался несколько быстрее.

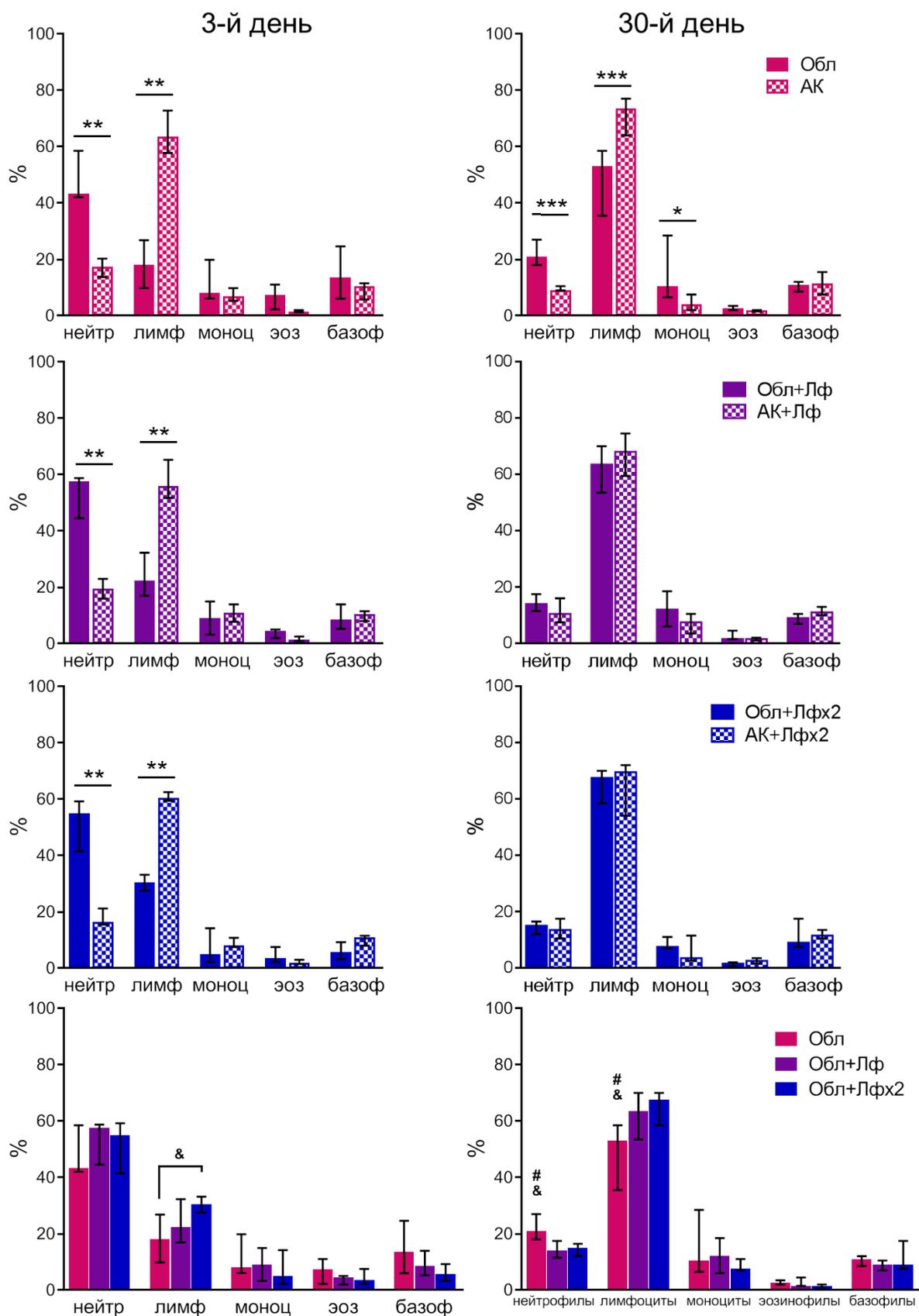


Рисунок 13. Лейкоцитарная формула крови мышей на 3-й (слева) и 30-й (справа) дни после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. По оси ординат – относительное содержание клеток крови. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ – отличия от группы Обл+Лф; & $p < 0,05$ – отличия от группы Обл+Лфх2.

Таблица 1. Абсолютное количество лейкоцитов разных типов в крови мышей на 3-й день после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр ($\times 10^6/\text{мл}$), Mean \pm SEM

Группа	3-й день				
	Нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Базофилы
Обл	0,24 \pm 0,02*	0,09 \pm 0,02*	0,06 \pm 0,02*	0,03 \pm 0,01*	0,07 \pm 0,02*
Обл+Лф	0,41 \pm 0,03*	0,19 \pm 0,03*	0,07 \pm 0,02*	0,03 \pm 0,01*	0,07 \pm 0,02*
Обл+Лфх2	0,39 \pm 0,03*	0,23 \pm 0,01*	0,06 \pm 0,03*	0,03 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01*
АК	1,85 \pm 0,20	7,02 \pm 0,39	0,80 \pm 0,11	0,17 \pm 0,03	0,97 \pm 0,15
АК+Лф	2,38 \pm 0,21	7,07 \pm 0,41	1,33 \pm 0,20	0,21 \pm 0,05	1,21 \pm 0,05
АК+Лфх2	2,01 \pm 0,16	6,81 \pm 0,11	1,00 \pm 0,09	0,25 \pm 0,04	1,12 \pm 0,09

Примечание: * $p < 0,01$ - отличия от соответствующих контрольных групп (по U - критерию Манна-Уитни).

Таблица 2. Абсолютное количество лейкоцитов разных типов в крови мышей на 30-й день после острого гамма-облучения в дозе 7,5 Гр ($\times 10^6/\text{мл}$), Mean \pm SEM

Группа	30-й день				
	Нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Базофилы
Обл	1,22 \pm 0,12*	2,54 \pm 0,29*	0,91 \pm 0,32	0,13 \pm 0,02	0,69 \pm 0,12*
Обл+Лф	0,90 \pm 0,10	4,05 \pm 0,24*	0,84 \pm 0,16	0,18 \pm 0,04	0,56 \pm 0,05*
Обл+Лфх2	1,34 \pm 0,11	5,79 \pm 0,36	0,87 \pm 0,16	0,14 \pm 0,03	1,00 \pm 0,16
АК	0,97 \pm 0,08	6,90 \pm 0,23	0,43 \pm 0,09	0,16 \pm 0,01	1,07 \pm 0,13
АК+Лф	1,03 \pm 0,14	5,91 \pm 0,27	0,70 \pm 0,13	0,14 \pm 0,02	1,00 \pm 0,08
АК+Лфх2	1,28 \pm 0,17	6,06 \pm 0,31	0,54 \pm 0,16	0,22 \pm 0,04	1,11 \pm 0,05

Примечание: * $p < 0,01$ - отличия от соответствующих контрольных групп (по U - критерию Манна-Уитни).

Введение Лф (65 или 300 мкг/кг, п/к, ежедневно с 1-го по 14-й день), полученного из молозива кроликов, способствовало нормализации клеточного состава периферической крови морских свинок после глубокого угнетения кроветворения, вызванного гамма-облучением в дозе 2,5 Гр, повышая содержание лимфоцитов (12-й день) и нейтрофилов (16-й и 18-й дни), но не оказывало влияния на уровень гемоглобина [Иванов А.А. и др., 2009].

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

3.5. Исследование изменений в субфракционном составе сыворотки крови мышей после гамма-облучения

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), основанный на измерении спектральных характеристик рассеяния света, позволяет определять размер частиц в биологических жидкостях и их соотношение [Киселев М.Ф. и др., 1999]. Результаты измерений обычно представляют в виде гистограммы, где на оси абсцисс отражен размер частиц в нм, а на оси ординат - их вклад в светорассеяние в процентах.

Проведенные нами исследования показали, что лазерно-корреляционные спектры (ЛК-спектры) сыворотки крови мышей имели вид трехмодального распределения (Рис. 14а, 15а, 16а). При их анализе выделяли три дискретные зоны по размерам светорассеивающих частиц: мелкие - до 20,58 нм, средние – от 20,58 до 91,26 нм, крупные - свыше 91,26 нм [Архипова Е.Н. и др., 2011; Полякова М.В., 2019]; и оценивали суммарный вклад в светорассеяние частиц в каждой из этих зон.

Проанализированные ЛК-спектры сыворотки крови мышей группы АК сохраняли постоянство в течение эксперимента. Распределение частиц в сыворотке не изменилось на 30-й день по сравнению с показателями 3-го дня (Рис. 14а, б). При введении чЛф контрольным животным вне зависимости от кратности введения (группы АК+Лф и АК+Лфх2) наблюдали значимое уменьшение процентного вклада в светорассеяние мелких частиц на 3-й день (Рис. 14б). Этот показатель восстанавливался до уровня группы АК к 30-му дню.

В группах АК+Лф и АК+Лфх2 было отмечено различие в динамике распределения средних и крупных частиц. Однократное введение чЛф увеличило вклад частиц среднего размера (67,75-91,26 нм) и уменьшило вклад крупных частиц (122,92-165,57 нм) на 3-й день. При этом в группе АК+Лф был выражен только один пик крупномолекулярной фракции, положение которого было смещено в сторону частиц среднего размера (Рис. 14а). Распределение частиц сыворотки крови в этой группе восстановилось к 30-му дню.

Повторное введение белка меняло эффект первого, проявившийся на 3-й день. Вклады средних и крупных частиц в группе АК+Лфх2 не отличались от соответствующих показателей группы АК в этой временной точке. Вклад в

светорассеяние частиц крупного размера несколько уменьшился, а вклад частиц среднего размера увеличился на 30-й день, при этом оба показателя не отличались от соответствующих показателей группы АК. Таким образом, ЛК-спектры сыворотки крови мышей контрольных групп значимо не различались между собой по суммарным значениям во всех трех спектральных зонах на 30-й день. Максимальный вклад в светорассеяние во всех трех контрольных группах вносили частицы среднего размера как на 3-й, так и на 30-й день (Рис. 14б).

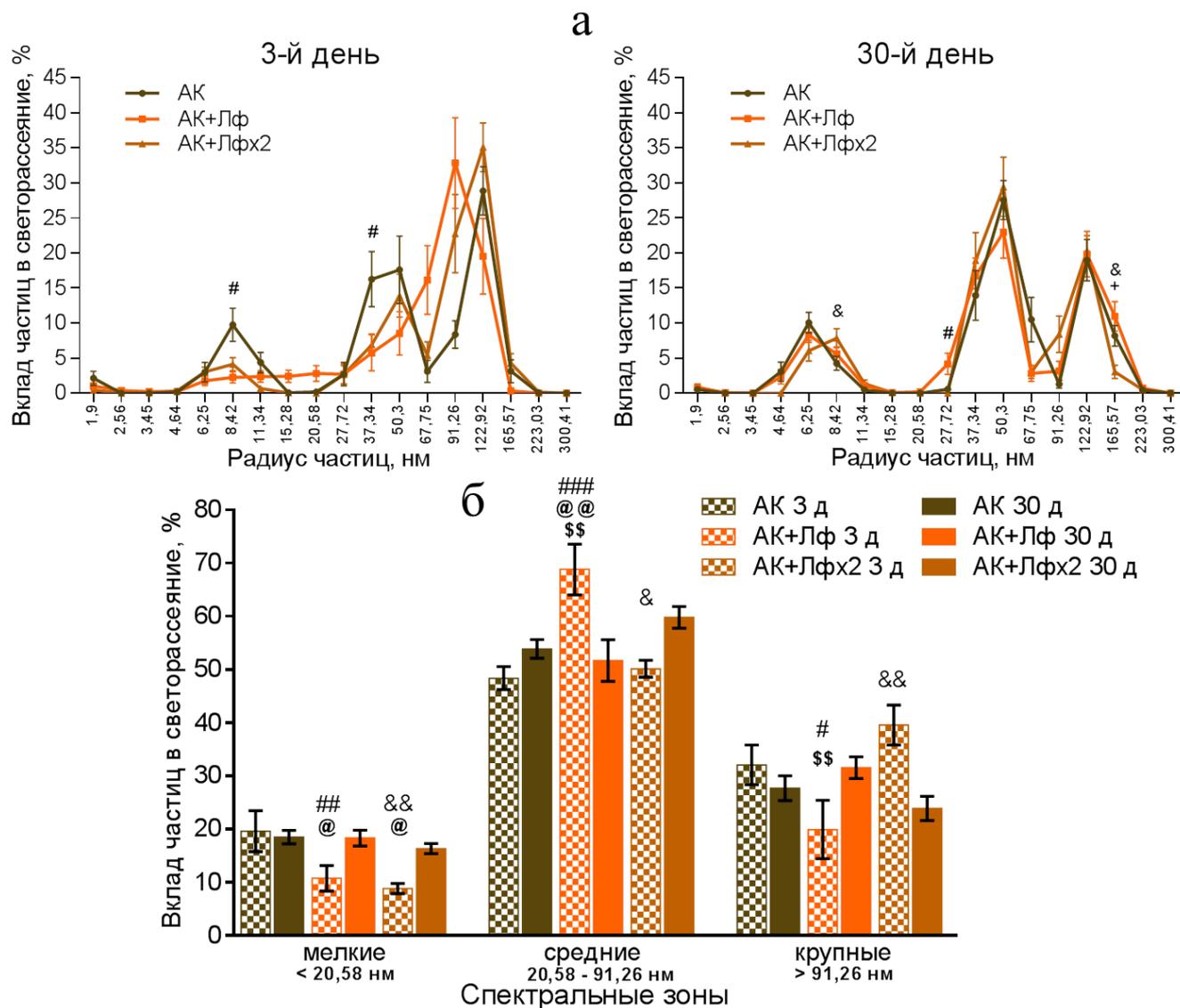


Рисунок 14. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей контрольных групп на 3-й и 30-й день после ложного облучения. Распределение частиц по размерам (а). # $p < 0,05$ – АК+Лф vs АК, & $p < 0,05$ – АК+Лфх2 vs АК, + $p < 0,05$ – АК+Лф vs АК+Лфх2. Распределение частиц по спектральным зонам (б). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ – отличия от той же группы на 30-й день; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$ – отличия от группы АК на 3-й день; \$\$ $p < 0,01$ – отличия от группы АК+Лфх2 на 3-й день.

Результаты показали, что облучение вызвало значительные изменения ЛК-спектров. Общей закономерностью изменений субфракционного состава сыворотки крови мышей после облучения является увеличение вклада в светорассеяние частиц свыше 122,92 нм [Алчинова И.Б. и др., 2014]. Такую реакцию мы наблюдали во всех опытных группах на 3-й день после облучения (Рис. 15а, б).

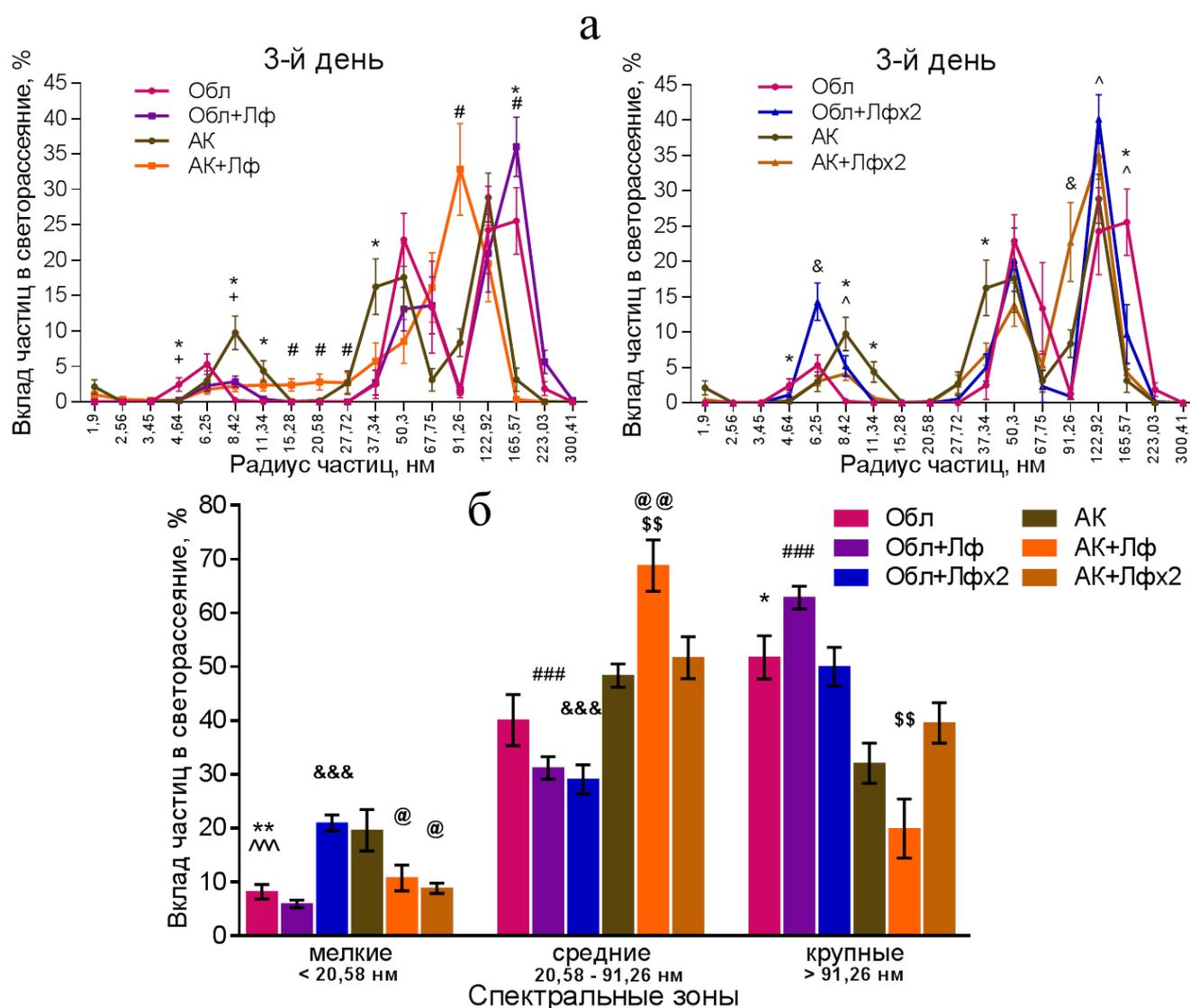


Рисунок 15. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей на 3-й день после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Распределение частиц по размерам (а). Распределение частиц по спектральным зонам (б). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – Обл vs АК, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ – Обл+Лф vs АК+Лф, & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ – 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.

У облученных животных однократное введение чЛф привело к увеличению вклада в светорассеяние крупных частиц (165,57-223,03 нм) и уменьшению вклада частиц среднего размера (Рис. 15а слева, б) [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Двукратное введение белка привело к некоторому увеличению вклада частиц размером 122,92 нм и значительному увеличению вклада мелких частиц (6,25-8,42 нм) (Рис. 15а справа, б). В облученных группах (Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2) на 3-й день максимальный вклад в светорассеяние вносили частицы крупного размера. Двукратное введение чЛф (группа Обл+Лфх2) привело к незначительному изменению в сторону контрольных ЛК-гистограмм и сформировало преимущественный пик в зоне крупных частиц на 122,92 нм, положение и процентный вклад в светорассеяние которого соответствовали значениям контрольных групп (Рис. 15а справа).

На 30-й день в группе Обл вклад в светорассеяние частиц среднего размера был значимо меньшим, а вклад частиц крупного размера продолжал оставаться значимо большим по сравнению с контролем (Рис. 16а, б). Кроме того вклад крупных частиц у облученных животных был больше, чем у мышей обеих групп, получивших чЛф после облучения [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Положение пика мелких частиц было сдвинуто в группе Обл (4,64 нм) по сравнению с контролем (6,25 нм), а вклад в светорассеяние пика частиц среднего размера (50,3 нм) в этой опытной группе был значимо меньше соответствующего значения в группе АК (Рис. 16а). Таким образом, у облученных животных (группа Обл) распределение субфракционных частиц сыворотки крови не вернулось к нормальным значениям к концу эксперимента, что находится в соответствии с ранее опубликованными данными [Медведева Ю.С. и др., 2013; Алчинова И.Б. и др., 2014].

ЛК-спектры сыворотки крови мышей опытных групп (Обл+Лф, Обл+Лфх2), получивших чЛф, и контрольных групп (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) практически не различались между собой по суммарным значениям во всех трех спектральных зонах, а также по положению пиков и их процентному вкладу в светорассеяние на 30-й день [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Между тем, отмечали уменьшение вклада в светорассеяние частиц среднего размера в группе Обл+Лфх2 по сравнению с

группой АК+Лфх2. Положение пика в зоне мелких частиц было несколько сдвинуто в сторону частиц среднего размера (8,42 нм) в группах Обл+Лф (Рис. 16а слева) и АК+Лфх2 (Рис. 16а справа).

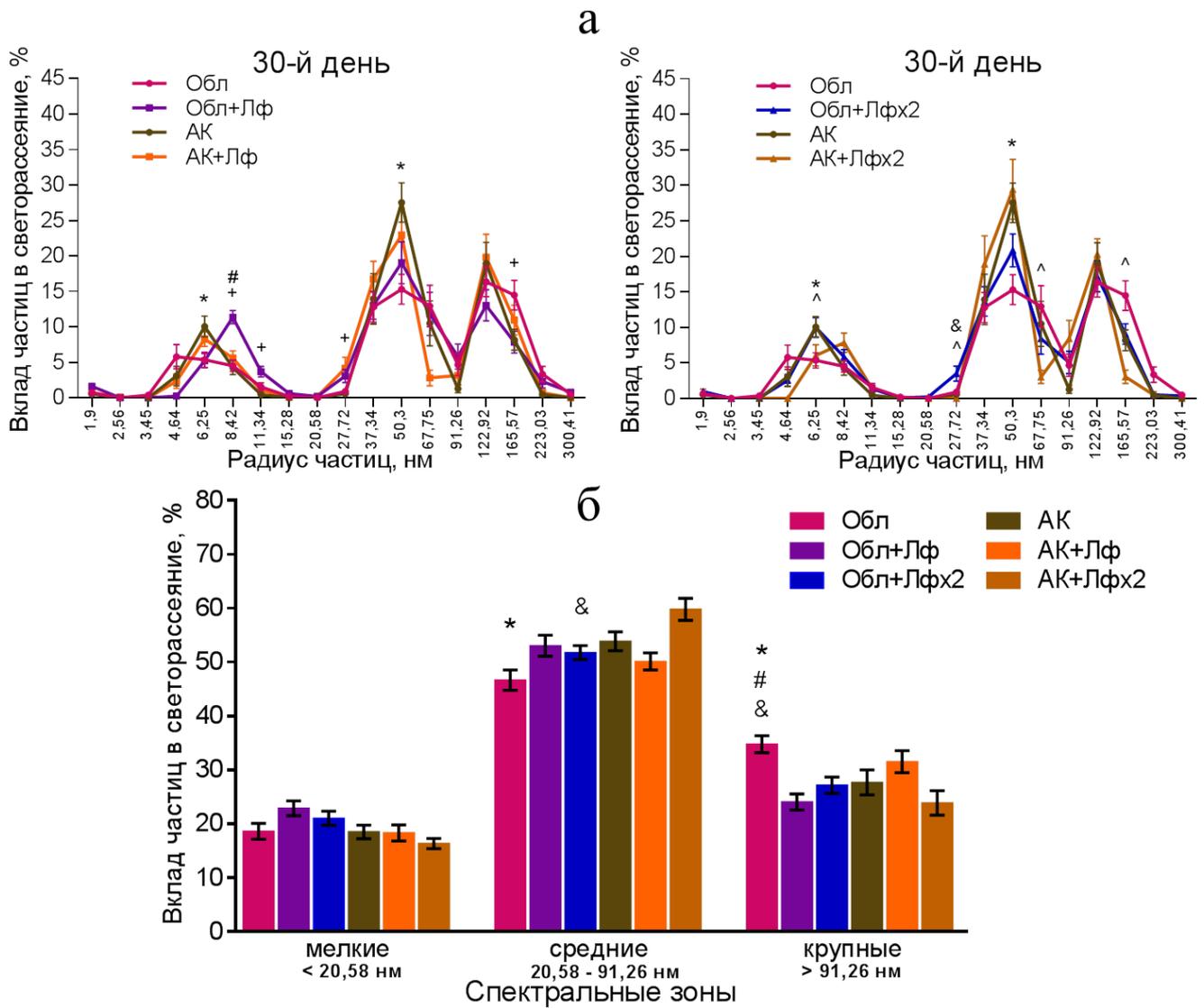


Рисунок 16. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей на 30-й день после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Распределение частиц по размерам (а). Распределение частиц по спектральным зонам (б). * $p < 0,05$ – Обл vs АК, # $p < 0,05$ – Обл+Лф vs АК+Лф, & $p < 0,05$ – Обл+Лфх2 vs АК+Лфх2, + $p < 0,05$ – Обл vs Обл+Лф, ^ $p < 0,05$ – Обл vs Обл+Лфх2 .

Таким образом, облучение вызвало значительные изменения в распределении субфракционных частиц сыворотки крови мышей. Введение чЛф привело к возвращению параметров сывороточного гомеостаза в пределы их нормальных значений к концу эксперимента [Кораева М.Yu. et al., 2020]. Кроме того выявлен собственный эффект чЛф на сывороточный гомеостаз на различных стадиях после его введения.

3.6. Гистологическое исследование динамики изменений тканей селезенки и печени мышей после тотального гамма-облучения

В нашей работе было проведено гистологическое исследование селезенки и печени на 3-й, 10-й и 30-й дни после облучения. Известно, что острое воздействие высоких доз ионизирующего излучения вызывает существенные морфологические изменения данных органов [Alchinova et al., 2015; Медведева Ю.С., 2017; Wang et al., 2013].

Селезенка

У животных контрольных групп (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) селезенка имела гладкие четко очерченные контуры на всех изученных сроках (3-й, 10-й и 30-й дни) (Рис. 17, 18, 19). На срезах хорошо различались основные структурные элементы - белая и красная пульпа, трабекулы. Лимфатические узелки (фолликулы) в белой пульпе были среднего размера с четкими границами. В центральной части фолликулов располагались более светлые участки герминативных центров. Стенки сосудов не были изменены, наблюдали умеренное кровенаполнение красной пульпы. Обнаружено небольшое количество гемосидерина в макрофагах в красной пульпе. Введение чЛф (группы АК+Лф, АК+Лфх2) не вызвало гистологических изменений в ткани органа.

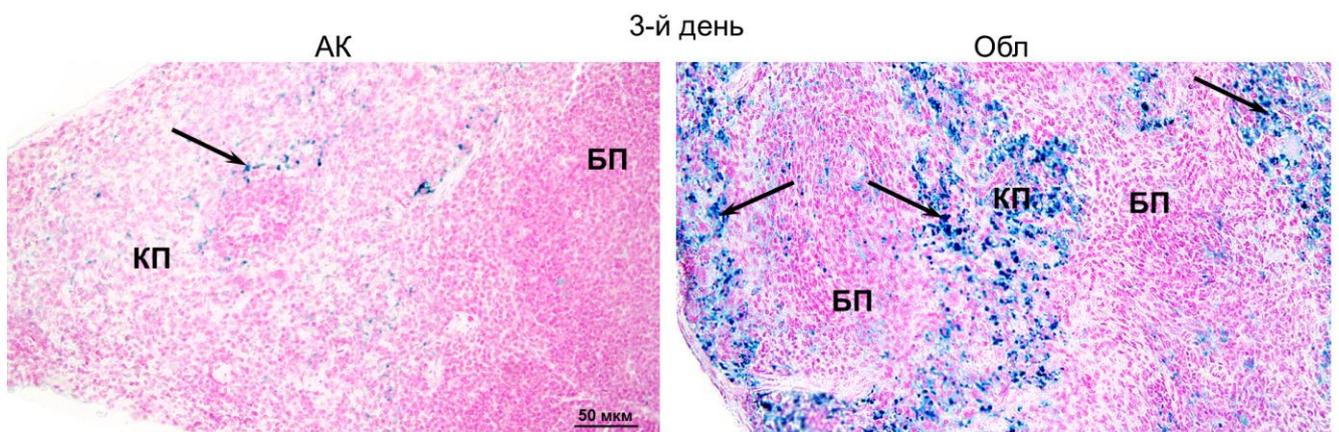


Рисунок 17. Репрезентативные микрофотографии срезов селезенки мышей на 3-й день после ложного (группа АК, слева) и тотального (группа Обл, справа) гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Окраска по Перлсу на железо (Ш). БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, стрелки указывают на гранулы гемосидерина.

Облучение привело к накоплению гемосидерина в красной пульпе селезенки у мышей всех опытных групп (Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2), уровень которого значительно повышался от 3-го к 10-му дню, а затем снижался, но оставался выше контрольного на 30-й день (Рис. 17, 18).

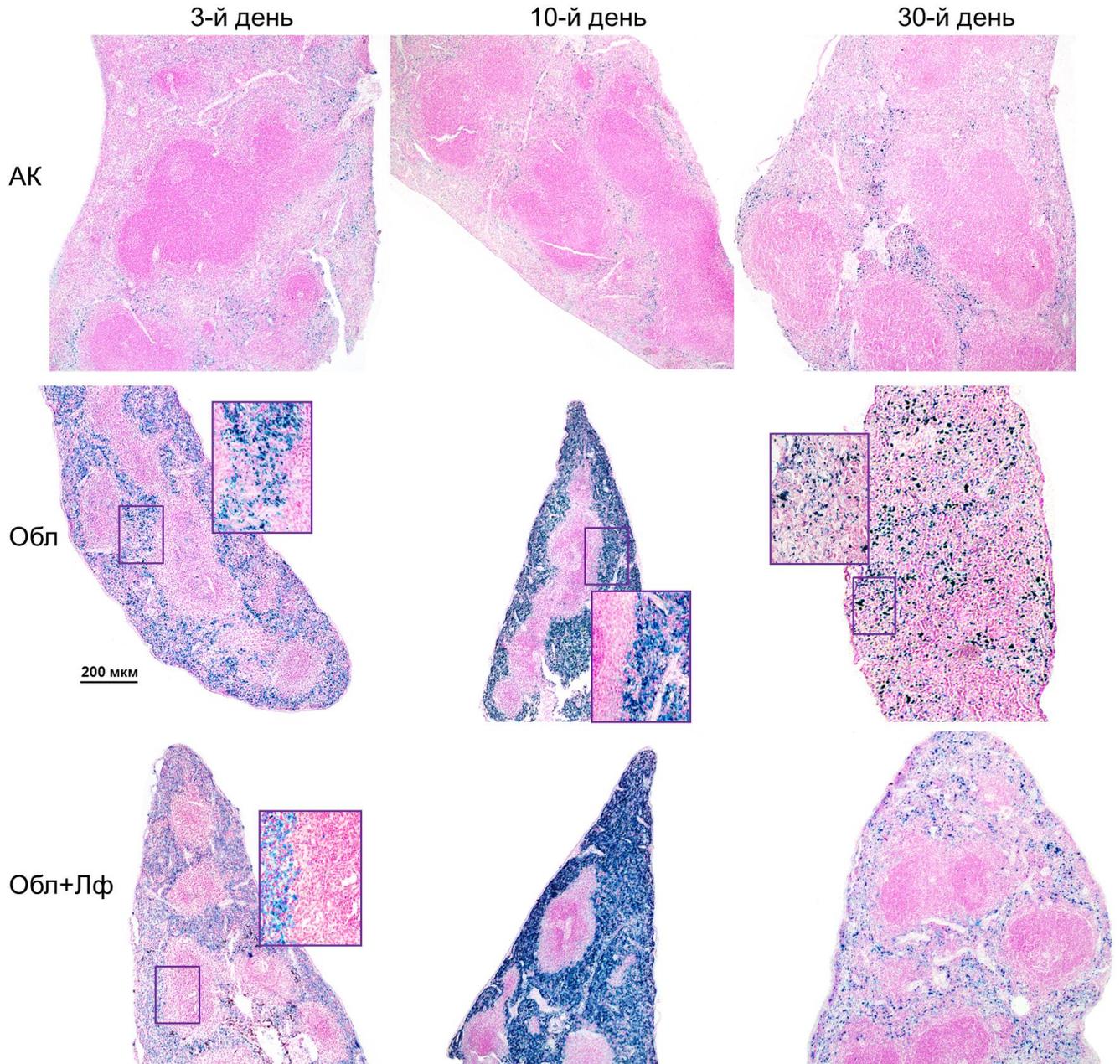


Рисунок 18. Репрезентативные микрофотографии срезов селезенки мышей на 3-й (левый ряд), 10-й (средний ряд) и 30-й (правый ряд) дни после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Группы: АК, Обл, Обл+Лф. Окраска по Перлсу на железо (III).

Гистологический анализ выявил, что у мышей группы Обл уже на 3-й день после воздействия изменялось соотношение между белой и красной пульпой, на 10-й день начиналась редукция фолликулов, границы фолликулов отсутствовали

(Рис. 18). На 30-й день селезёнка животных группы Обл не имела четкого разделения на белую и красную пульпу, фолликулы были редуцированы, наблюдали следы белой пульпы, красная пульпа была слабо выражена. Встречались отдельные неправильной формы гигантские клетки, по морфологическим признакам похожие на мегакариоциты (Рис. 19). На поверхности органа были видны складки, связанные с общим уменьшением его объема. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей (п. 1.2.3).

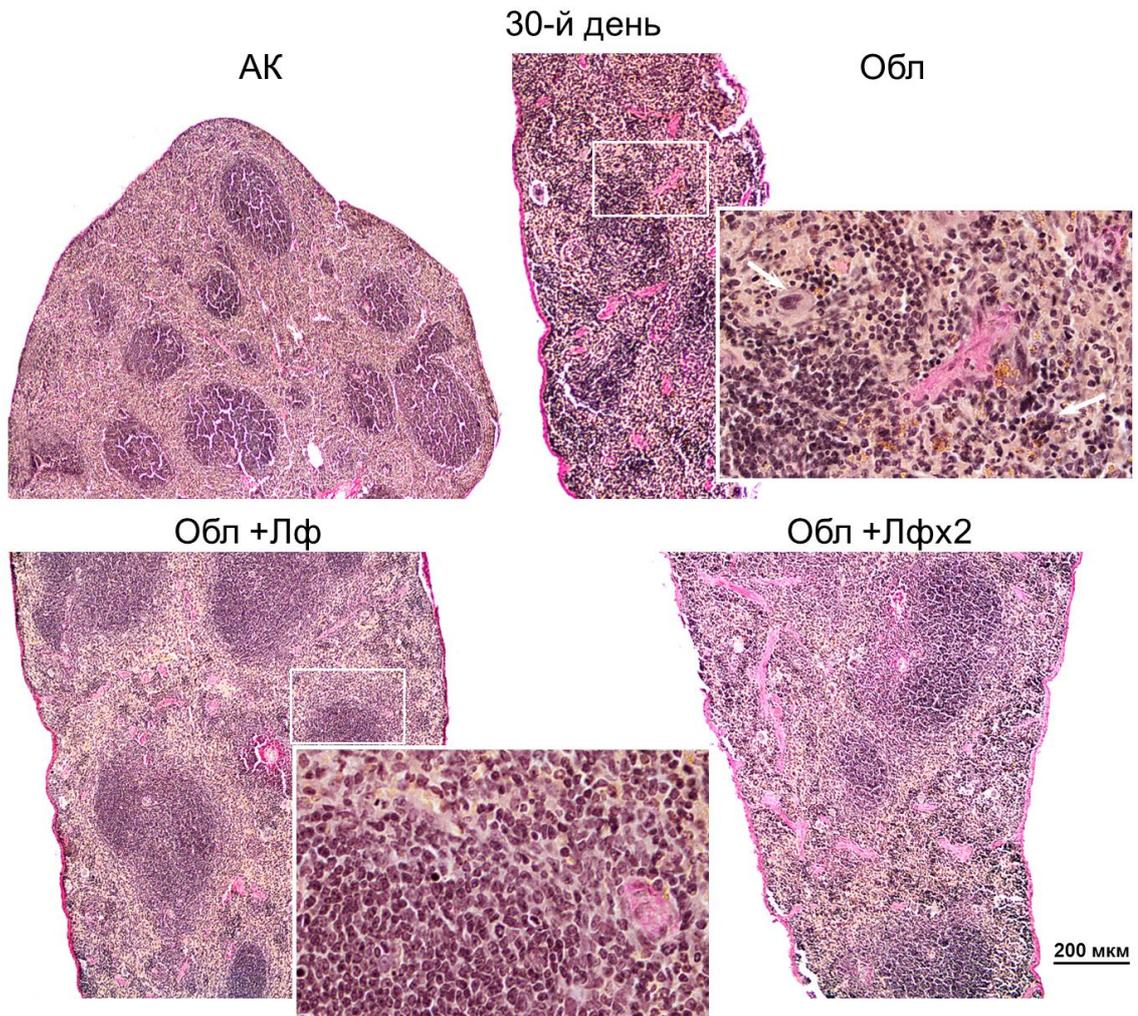


Рисунок 19. Репрезентативные микрофотографии срезов селезенки мышей на 30-й день после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Группы: АК, Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2. Окраска по Ван-Гизону. Стрелки указывают на мегакариоциты.

В обеих опытных группах, получивших чЛф (Обл+Лф, Обл+Лфх2), структурная организация селезенки сохранялась в течение эксперимента (Рис. 18, 19).

Печень

У животных контрольных групп (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) ткань печени имела балочное строение, между клетками были отчетливо видны границы на всех изученных сроках (3-й, 10-й и 30-й дни). Гепатоциты имели полигональную форму, гранулярную цитоплазму, одно, иногда два ядра округлой или вытянутой формы с четкими контурами и глыбками хроматина. Введение чЛф (группы АК+Лф, АК+Лфх2) не вызвало изменений вышеперечисленных признаков (Рис. 20 верхний ряд).

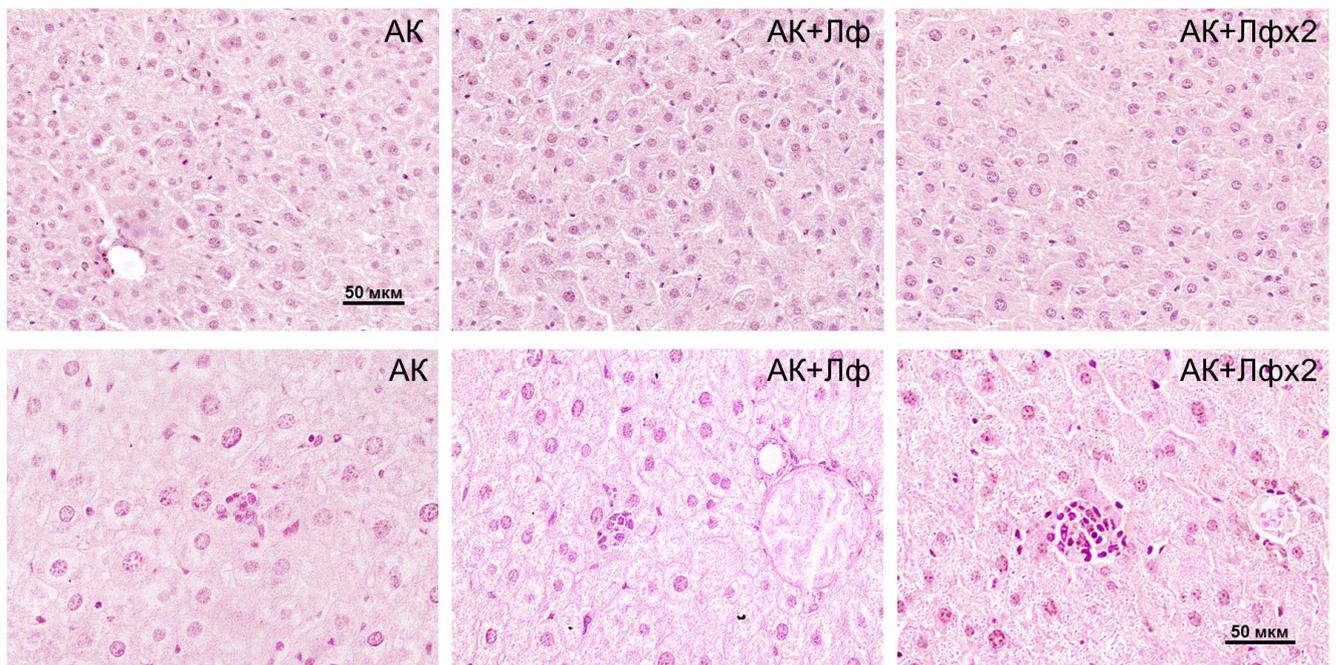


Рисунок 20. Репрезентативные микрофотографии срезов печени мышей контрольных групп на 30-й день после ложного облучения. Группы: АК, АК+Лф, АК+Лфх2. Окраска гематоксилином и эозином.

В паренхиме органа контрольных животных (группа АК) наблюдали единичные места скопления мононуклеарных клеток. Введение чЛф (группы АК+Лф, АК+Лфх2) привело к увеличению частоты встречаемости и размера таких участков уже на 3-й день, что сохранялось и на 10-й день эксперимента. На 30-й день участки скопления у животных всех контрольных групп (АК, АК+Лф, АК+Лфх2) были близкими по размеру, но частота их встречаемости оставалась выше в группе АК+Лфх2 (Рис. 20 нижний ряд).

Гистологическое исследование показало, что у мышей группы Обл уже на 3-й день после воздействия были выражены дегенеративные изменения ткани печени различной тяжести, которые сохранялись на 10-й и 30-й дни. Наблюдали многочисленные аномалии ядра гепатоцитов: вакуолизацию, пикноз, конденсацию хроматина; образование трехъядерных и увеличение количества двуядерных клеток; паренхиматозную вакуолярную дистрофию. Синусные сосуды были расширены, диаметр центральных вен увеличен, междольковая соединительная ткань слабо развита. Наблюдали очаговый некроз гепатоцитов и множественные мононуклеарные инфильтраты в перипортальной зоне, развивающиеся на фоне нарушения кровообращения (Рис. 21).

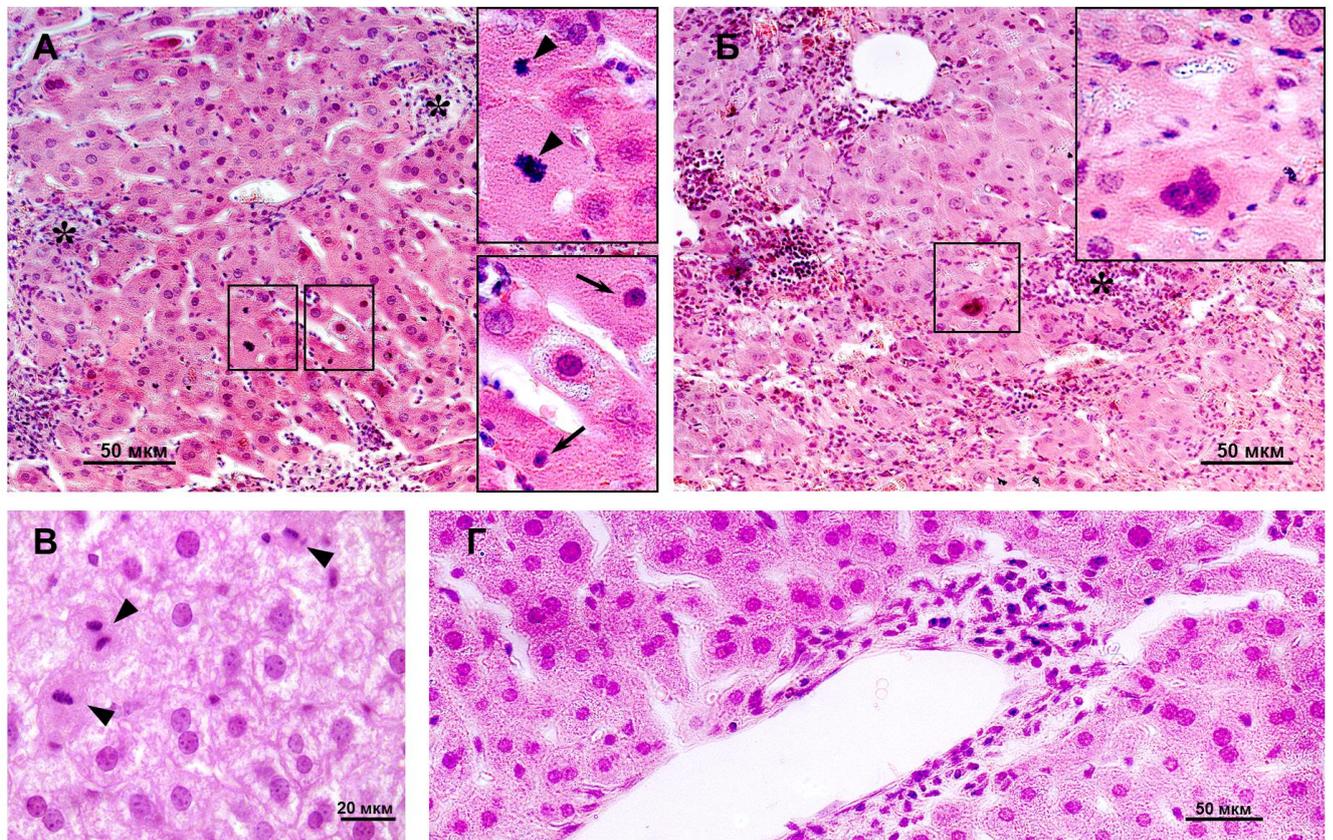


Рисунок 21. Репрезентативные микрофотографии срезов печени мышей (Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2) после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Примеры дегенеративных изменений: некрозы (А, Б, звездочки), пикнотические ядра (А, стрелки), многочисленные митозы (А, В, стрелки-треугольники), вакуолярная дистрофия гепатоцитов (В), мононуклеарный инфильтрат (Г). Мегакариоцит (Б). Окраска гематоксилином и эозином.

Отмечали увеличение количества митозов в гепатоцитах, часть из которых проходила с нарушением веретена деления [Кораева М.Ю. et al., 2020].

Максимальное количество митозов наблюдали на 10-й день эксперимента. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей (п. 1.2.3). В ткани печени встречали отдельные неправильной формы гигантские клетки, по морфологическим признакам похожие на мегакариоциты (Рис. 21Б).

Введение чЛф облученным животным (группы Обл+Лф, Обл+Лфх2) не влияло на выраженность вышеперечисленных реактивных изменений на изученных нами сроках (3-й, 10-й и 30-й дни), в связи с этим Рисунок 21 представлен без разделения на группы.

Облучение привело к исчезновению участков скопления мононуклеарных клеток в паренхиме печени животных всех опытных групп (Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2) на 3-й день после воздействия. Эти структуры начали восстанавливаться на 10-й день эксперимента (Рис. 22 верхний ряд).

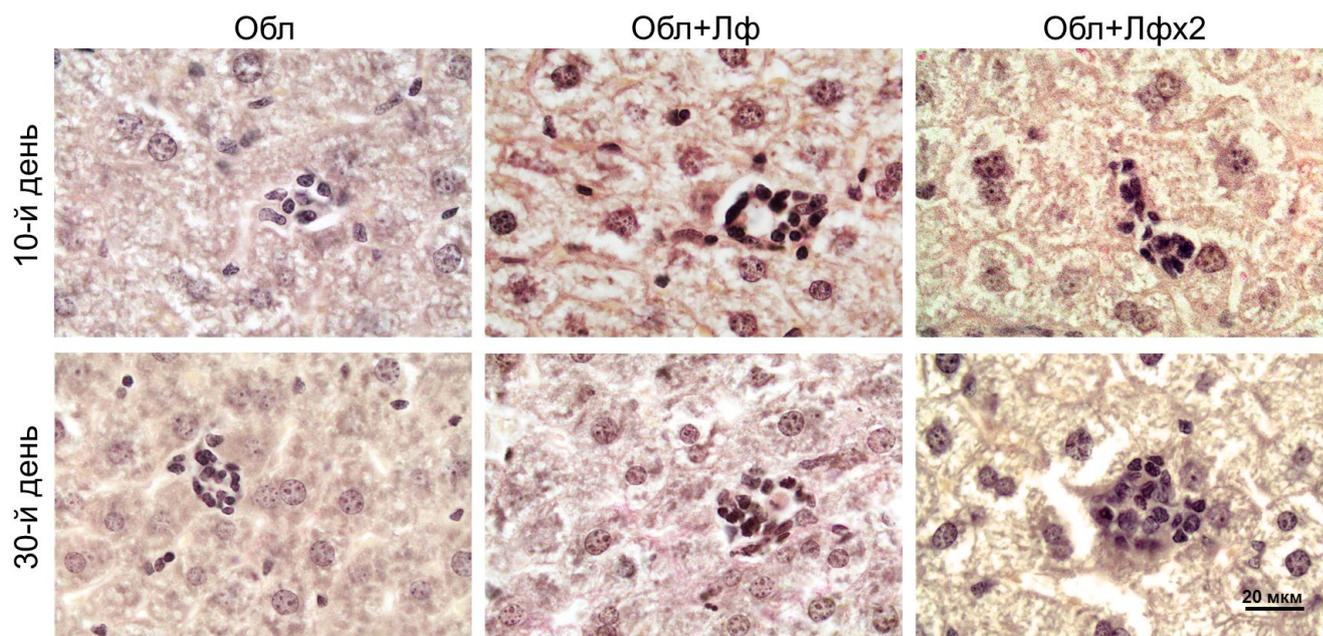


Рисунок 22. Репрезентативные микрофотографии срезов печени мышей на 10-й (верхний ряд) и 30-й (нижний ряд) дни после тотального гамма-облучения в дозе 7,5 Гр. Группы: Обл, Обл+Лф, Обл+Лфх2. Окраска по Ван-Гизону.

К 30-му дню частота встречаемости и размеры таких участков были значительно выше у облученных мышей, получивших чЛф (Обл+Лф, Обл+Лфх2), по сравнению с животными группы Обл (Рис. 22 нижний ряд) и при этом близки к контрольным значениям (группы АК+Лф, АК+Лфх2, соответственно).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что чЛф оказал компенсаторное действие на изменения в поведении животных после острого гамма-облучения в сублетальной дозе. Введение чЛф позволило увеличить выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных мышей в течение эксперимента, оказало компенсаторное действие на индуцированные облучением снижение массы тела и общего количества лейкоцитов, изменение лейкоцитарной формулы крови и параметров сывороточного гомеостаза, защитное действие на структурную организацию селезенки. Основные результаты раздела опубликованы [Копеева М.Ю. и др., 2020; Kopeeva M.Yu. et al., 2020].

В нашем исследовании чЛф оказал ряд плеiotропных эффектов на мышей после гамма-облучения, что предполагает его влияние на несколько мишеней, запускающее различные биохимические процессы в организме животных. В настоящее время механизм действия Лф после воздействия гамма-излучения еще недостаточно понятен. Положительное действие Лф может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами (п. 1.2.2). 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 (п. 1.1.7). В нашем исследовании чЛф оказал защитное действие на структурную организацию селезенки – одного из органов иммунной системы. Ранее было показано, что Лф ослаблял повреждение эпителия тонкой кишки [Wei et al., 2019], повышал выживаемость, стимулируя восстановление кишечной микрофлоры и тормозя развитие и обострение инфекционных заболеваний [Nishimura et al., 2014] у мышей после облучения.

Степень повреждения кроветворной функции положительно коррелирует с дозой облучения [Liu et al., 2017]. Костный мозг, являющийся первичной кроветворной тканью, - наиболее чувствительный орган-мишень, подверженный повреждению при облучении. Даже небольшая доза ионизирующего излучения может нарушить гемопоетический баланс костного мозга, в то время как возникающие в результате анемия, кровотечение и инфекции оказывают

серьезное влияние на выживаемость животных. Известно, что выживаемость мышей после воздействия сублетальной дозы радиации зависит от восстановления системы кроветворения [Liu et al., 2017; Li et al., 2017].

Кроветворение - сложный процесс, регулируемый множеством факторов. Хотя костный мозг является основным местом кроветворения, оно может происходить во многих других тканях как во время внутриутробного развития, так и после рождения. Селезенка остается кроветворным органом у мышей на протяжении всей их жизни, хотя и на низком уровне. В течение взрослой жизни печень поддерживает гемопоэтические стволовые клетки, эритропоэз и миелопоэз также на низком уровне [Wolber et al., 2002; Golden-Mason and O'Farrelly, 2002]. Экстрamedуллярное кроветворение, наблюдается после рождения у млекопитающих (в частности у грызунов), когда иммунные реакции возникают на периферии, в качестве нормальной реакции на инфекцию и воспаление; в ответ на кровотечение, гемолиз, радиационное облучение. Печень и селезенка являются основными органами, которые могут стать местами экстрamedуллярного кроветворения [Kim, 2010].

В отличие от быстрого усиления эритропоэза в селезенке, наблюдаемого в ответ на периферический анемический стресс, восстановление эритропоэза после острого радиационного стресса в этом органе происходит только после первоначального восстановления костного мозга. Базальный уровень эритропоэза в селезенке мышей отсутствовал через 6 дней после тотального острого гамма-облучения в дозе 4 Гр, несмотря на быстрое восстановление костного мозга, а через 10 дней произошло значительное увеличение красной пульпы, и гистологический анализ показал наличие экстрamedуллярного эритропоэза в селезенке [Peslak et al., 2012]. Обширный экстрamedуллярный гемопоэз наблюдали в селезенке мышей на 10-й день восстановления после гамма-облучения в дозе 6 Гр [Masutani et al., 2000].

В нашем исследовании мыши были подвергнуты тотальному воздействию гамма-излучения в большей дозе (7,5 Гр), чем в вышеупомянутых работах. Мы полагаем, это явилось причиной того, что количество лейкоцитов в крови

животных опытных групп увеличилось только на 30-й день (а не на 10-й, как в вышеупомянутых работах). Для уточнения динамики восстановления животных по этому показателю в дальнейшем необходимо исследовать образцы крови на дополнительных сроках между 10-м и 30-м днями после облучения. На 30-й день в гистологических срезах селезенки (группа Обл) и печени (группы Обл, Обл+Лф и Обл+Лфх2) нами были идентифицированы мегакариоциты, что может указывать на наличие активного экстрамедуллярного гемопоэза в этих органах [Volinsky et al., 2020]. Также можно предположить, что единичные участки скопления мононуклеарных клеток в паренхиме печени животных являлись очагами экстрамедуллярного кроветворения, которые исчезали на 3-й и начинали восстанавливаться на 10-й день после облучения. Введение чЛф приводило к увеличению частоты встречаемости и размера таких скоплений.

В здоровой печени постоянно меняющаяся активность метаболизма и ремоделирования тканей в сочетании с систематическим воздействием микробных продуктов приводит к стойкому, регулируемому воспалению [Robinson et al., 2016]. Активация воспалительных процессов тесно связана с механизмами, которые устраняют воспаление и способствуют регенерации тканей. В нашем исследовании гибель лимфоцитов после облучения приводила к угнетению местного иммунитета печени и исчезновению участков скопления мононуклеарных клеток в паренхиме органа. Введение чЛф стимулировало местный иммунитет, привлекая в ткани печени иммунокомпетентные клетки, как только их количество в кровеносном русле начинало возрастать. Можно предположить, что эти единичные участки скопления в паренхиме печени животных состояли из иммунокомпетентных клеток.

Регенерационный потенциал печени определяется медиаторами воспаления (например, IL-1 α , TNF α и IL-6), факторами роста (например, фактором роста гепатоцитов) и популяциями иммунных клеток, локализованных в печени [Michalopoulos and Bhushan, 2021]. Клетки Купфера играют центральную роль в этой регенерации посредством высвобождения IL-6 и TNF α , что способствует пролиферации гепатоцитов, а истощение Купферовских клеток препятствует

последующей регенерации печени [Selzner et al., 2003]. Известно, что Лф может связываться с макрофагами и активировать их [Birgens et al., 1983; Crouch et al., 1992]. Кроме того на мышинной модели повреждения печени ацетаминофеном (300 мг/кг, в/б), который поражает непосредственно гепатоциты в результате митохондриальной дисфункции, перекисного окисления липидов, окислительного стресса и фрагментации ДНК, было показано, что коровий Лф (50 мг/кг, внутривенно), введенный через 1 и 4 часа после ацетаминофена ингибировал повреждение печени у животных [Yin et al., 2010]. Гепатопротекторный эффект Лф был возможен только в присутствии клеток Купфера. Исследователи полагают, что Лф защищает гепатоциты путем стимуляции Купферовских клеток к выработке защитных медиаторов.

Как уже отмечалось выше (п.п. 1.1.2), Лф может выполнять множество различных функций в зависимости от клеточной системы, на которую он воздействует, благодаря специфичности рецепторов. Известно, что экзогенный Лф в основном утилизируется в печени [Levay and Viljoen, 1995; Adlerova et al., 2008]. Здесь он может оказывать прямое действие на гепатоциты, эндотелиальные клетки и клетки Купфера, которые экспрессируют рецепторы к нему (LRP1 и асиалогликопротеиновый рецептор, интелектин-1, CD14, соответственно).

Связывание Лф с поверхностью иммунных клеток предполагает, что он может запускать такие клеточные реакции, как дифференцировка, активация и пролиферация [Legrand et al., 2006]. Было показано, что чЛф ускоряет процесс дифференцировки незрелых В- и Т-лимфоцитов и стимулирует процесс созревания В-клеток селезенки мыши [Zimecki et al., 1995; Suzuki et al., 2005]. Специфические рецепторы нуклеолин, экспрессирующийся в В- и Т-лимфоцитах, и CD14, экспрессирующийся в моноцитах, могут быть вовлечены в запуск клеточного ответа на стимуляцию экзогенным чЛф. Поскольку нуклеолин является мультилигандным белком, известным своей челночной функцией между клеточной поверхностью и ядром [Legrand et al., 2004; Jia et al., 2017], можно ожидать, что многие биологические функции Лф имеют отношение к связыванию с этим рецептором.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ НА МОДЕЛИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ

Задачей данной части работы было исследование влияния чЛф на поведение и экспрессию тирозингидроксилазы (ТГ) в нигростриатной системе мозга 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.

4.1. Изменение прироста массы тела животных

В группе МФТП наблюдали достоверное снижение массы тела на 7-й день после введения нейротоксина (Рис. 23). Прирост массы в группе МФТП был ниже по сравнению с контрольной группой на 7-ой, 14-ый, 21-ый, 28-ой дни, и по сравнению с группой МФТП+Лф на 28-ой день.

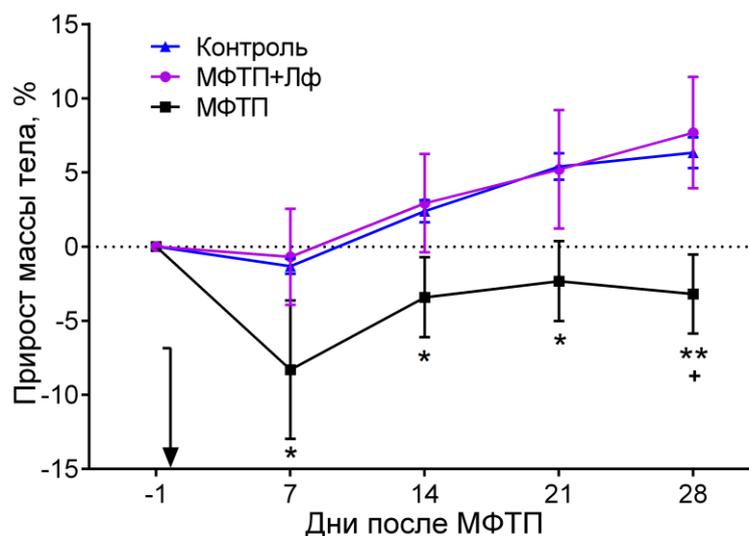


Рисунок 23. Изменение прироста массы тела мышей, получивших МФТП/физраствор, в течение эксперимента. Стрелка указывает на день, когда были введены МФТП или физраствор. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – отличия от группы Контроль; + $p < 0.05$ – отличия от группы МФТП+Лф в каждый момент времени [Кораева М.Yu. et al., 2021].

В группах Контроль и МФТП+Лф масса тела мышей постепенно увеличивалась с 7-го по 28-й день. К 14-му дню масса тела в обеих группах (Контроль и МФТП+Лф) начала превышать исходную. В течение всего эксперимента не наблюдали различий в приросте массы между группами Контроль и МФТП+Лф. Таким образом, чЛф, введенный до нейротоксина, оказал защитное действие на изменение массы тела.

4.2. Ротарод

Мы использовали ротарод для выявления моторного дефицита. Все мыши успешно обучились и достигли стабильного уровня результативности за 1 день до введения МФТП/физраствора (Рис. 24а). В последующие дни контрольные животные сохраняли равновесие на ротароде практически на протяжении всего времени тестирования (120 с). МФТП уменьшил время, проведенное животными на стержне, через 60 мин, 120 мин и 2 дня после его введения. Однако в 1-й день этот параметр был значимо ниже по сравнению с контролем только в группе МФТП, но не в группе МФТП+Лф. Достоверных различий между группами, получившими МФТП, и контрольной группой в тестах, проведенных на 7-й и 28-ой дни, не наблюдали.

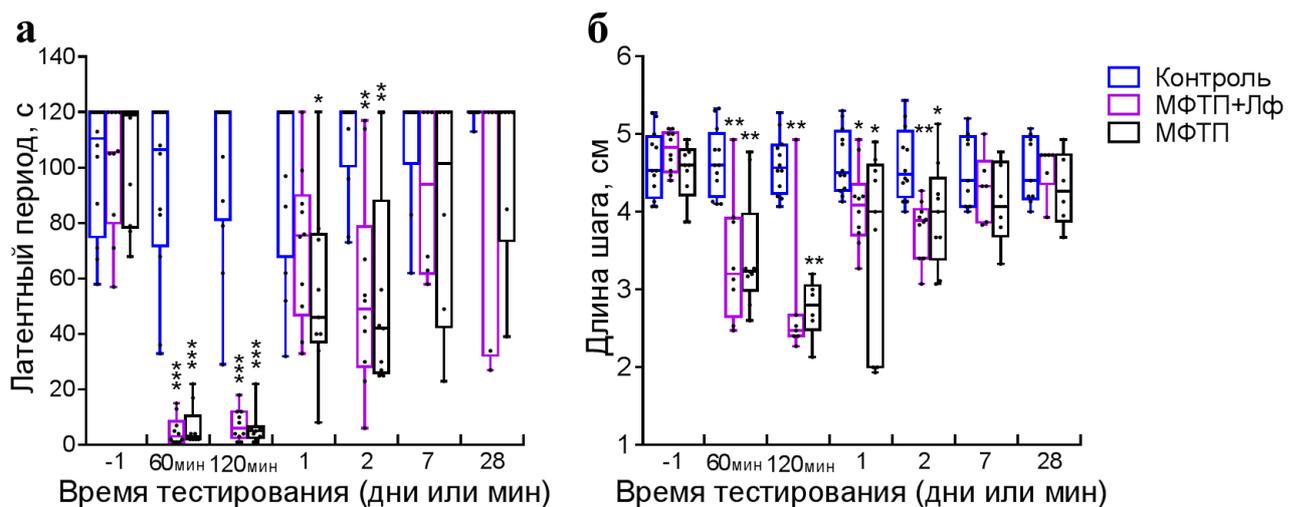


Рисунок 24. Латентный период падения в тесте ротарод (а) и длина шага (б) мышей, получивших МФТП/физраствор. Каждая точка представляет одно животное. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - отличия от группы Контроль в каждый момент времени [Кораева М.Yu. et al., 2021].

4.3. Длина шага

За день до введения МФТП/физраствора достоверных различий в длине шага между группами не зафиксировали (Рис. 24б). Средняя длина шага в группе Контроль была практически постоянной на протяжении всего периода эксперимента. Острая интоксикация МФТП вызвала уменьшение средней длины шага. У животных групп МФТП и МФТП+Лф этот показатель был ниже по сравнению с Контролем через 60 мин, 120 мин, 1 день и 2 дня. Восстановление длины шага наблюдалось в обеих группах, получивших МФТП, на 7-й и 28 дни.

Таким образом, у мышей, получивших МФТП, наблюдали значительное нарушение координации движений (тест ротарод) и уменьшение средней длины шага через 60 мин, 120 мин, один и два дня после инъекции. Предварительное введение чЛф не предотвращало эти острые эффекты МФТП. Восстановление параметров наблюдали в обеих группах, получивших нейротоксин, на 7-й день. Наши данные согласуются с результатами, полученными ранее. Rosa и соавт. не обнаружили различий между группами МФТП и контрольной в тесте ротарод (на 14-й, 37-й и 52-й дни) и при анализе длины шага (на 7-й, 30-й и 45-й дни) [Rosa et al., 2018].

4.4. Оценка изменения поведения мышей в тесте «Открытое поле»

Все группы мышей показали сходную двигательную активность и исследовательское поведение перед инъекцией МФТП/физраствора. Повторное тестирование в ОП приводило к зависящим от времени изменениям в поведении животных контрольной группы. Поведенческие реакции, связанные со страхом в ответ на новизну, наблюдаемые на начальных этапах, проявлялись слабее, а двигательная активность снижалась благодаря привыканию.

Острая интоксикация МФТП снижала двигательную активность мышей. Репрезентативные 5-минутные треки поведения в ОП на 7-й и 28-й дни показаны на Рис. 25а (левая и правая панели, соответственно). 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. 25б). На более поздних сроках тестирования различий по этому параметру между всеми тремя группами не наблюдали. Было выявлено увеличение общего пройденного пути в группе МФТП на 28-й день по сравнению с 7-м днем.

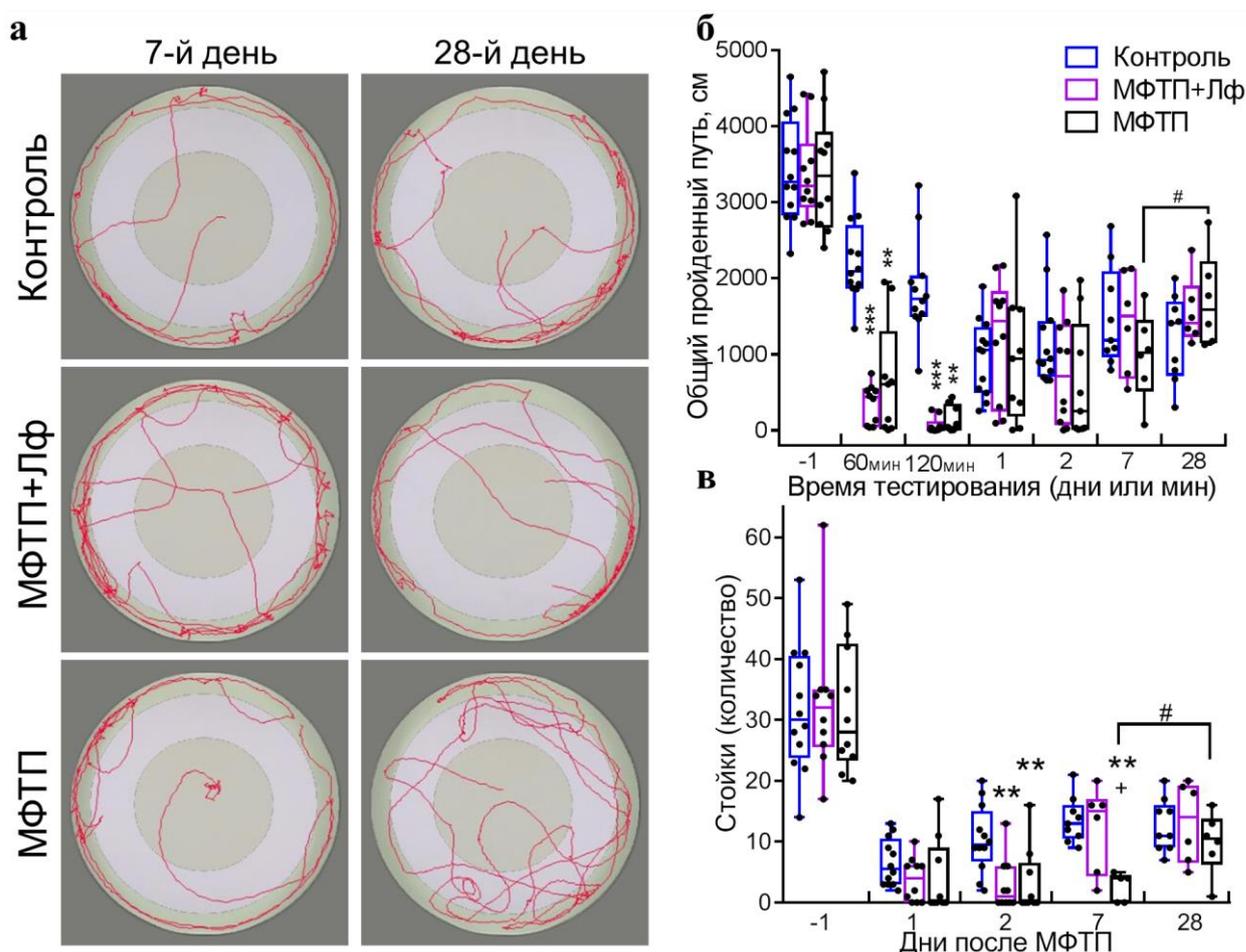


Рисунок 25. Поведение мышей в тесте «Открытое поле» после введения МФТП/физио раствора. Репрезентативные пятиминутные треки движения мышей в открытом поле на 7-й (слева) и 28-й (справа) дни (а). Общий пройденный путь (б). Количество стоек (в). Каждая точка представляет одно животное. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - отличия от группы Контроль, + $p < 0.05$ - отличия от группы МФТП+Лф в каждый момент времени; # $p < 0.05$ по сравнению с той же группой в предыдущий момент времени [Кораева М. Yu. et al., 2021].

Интоксикация, вызванная МФТП, сильно подавляла поведенческую активность животных в день его введения. Поэтому мы не сравнивали группы мышей через 60 и 120 мин по следующим параметрам: латентному периоду выхода из центральной зоны, проценту времени пребывания в центре, количеству выходов в центральную зону и количеству стоек.

В 1-й день не было обнаружено различий между группами по количеству стоек (Рис. 25в). На 2-й день количество стоек в обеих группах, получивших МФТП, было меньше, чем в контрольной, но на 7-й день этот показатель был достоверно ниже контроля только в группе МФТП. В группе МФТП различия по количеству стоек наблюдались между 28-м и 7-м днем. На 28-й день различий по этому параметру между группами выявлено не было.

Мы не выявили различий по расстоянию, пройденному в центре, между группами МФТП+Лф и Контроль в течение эксперимента, за исключением интервала 120 мин после введения МФТП (Рис. 26а). В этот момент времени мыши обеих групп, получивших МФТП, прошли меньшее расстояние в центре, чем контрольные. Однако на 28-й день в группе МФТП этот показатель был выше по сравнению с контролем. В группе МФТП отмечали выраженную тенденцию к увеличению расстояния, пройденного в центре, на 28-й день по сравнению с 7-м днем.

Не было обнаружено различий между группами по количеству выходов в центр в 1-й день (Рис. 26б). На 7-й день количество выходов в центр в группе МФТП было меньше, чем в группах Контроль и МФТП+Лф, хотя разница в последнем случае не достигла уровня статистической значимости ($p = 0.069$). Напротив, на 28-й день количество выходов в центр в группе МФТП было выше, чем в группах Контроль и МФТП+Лф. Было выявлено увеличение этого параметра в группе МФТП на 28-й день по сравнению с 7-м днем. Мы не обнаружили различий в количестве выходов в центр между группами МФТП+Лф и Контроль на протяжении всего экспериментального периода.

Животные, получившие МФТП, проводили больше времени в центре ОП, чем контрольные в 1-й и во 2-й дни (Рис. 26в). Однако, только в группе МФТП наблюдали значительное увеличение этого параметра по сравнению с контрольной группой на 7-й и 28-й дни. Такая же тенденция зафиксирована по сравнению с группой МФТП+Лф ($p = 0,065$) на 28-й день.

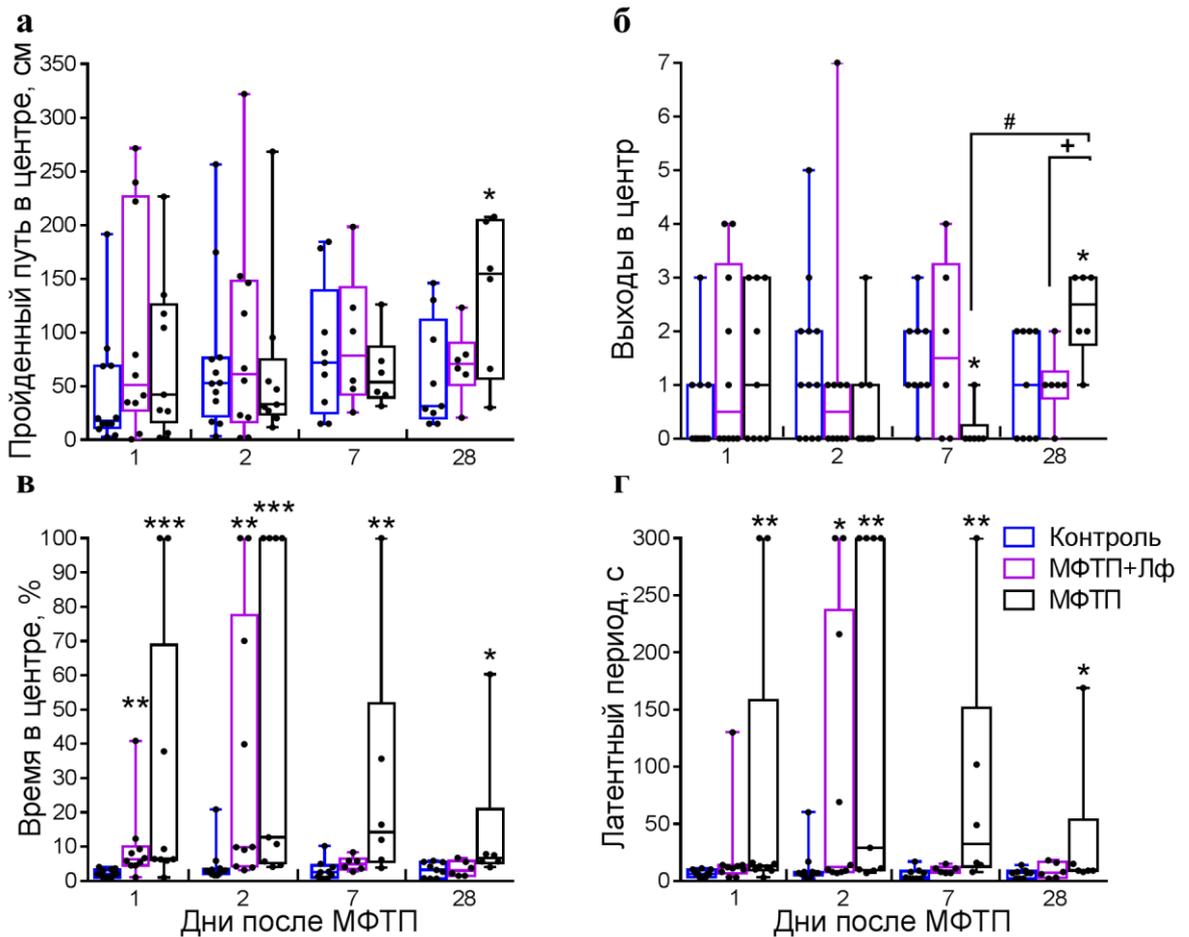


Рисунок 26. Поведение мышей в центре открытого поля после введения МФТП/физио­раствора. Пройденный путь в центре поля (а). Количество выходов в центральную зону (б). Время, проведенное в центральной зоне, % (в). Латентный период выхода из центральной зоны (г). Каждая точка представляет одно животное. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - отличия от группы Контроль, + $p < 0.05$ по сравнению с группой МФТП+Лф в каждый момент времени; # $p < 0.05$ по сравнению с той же группой в предыдущий момент времени [Кораева М.Ю. et al., 2021].

Наконец, группа МФТП показала большую латентность выхода из центральной зоны, чем контрольная группа, в течение всего экспериментального периода в 1-й, 2-й, 7-й и 28-й дни после введения МФТП/физио­раствора (Рис. 26г). Группы МФТП+Лф и Контроль демонстрировали схожую латентность выхода из центральной зоны в течение всего периода эксперимента, за исключением 2-го дня.

Показатели “процент времени, проведенного в центре” и “латентный период выхода из центра” дополняют друг друга и, в совокупности с количеством

выходов в центр и дистанцией, пройденной в центральной зоне, отражают стратегию поведения животного. Известно, что разные показатели поведения восстанавливаются с разной скоростью. Поведение в тесте ОП отражает баланс между страхом, исследовательским поведением и моторными возможностями животного.

Постепенное восстановление моторной и исследовательской активности происходило у мышей, получивших МФТП, после их сильнейшего подавления, которое наблюдали на 60 и 120 мин после введения нейротоксина. Это согласуется с опубликованными ранее данными [Ferber, 2000; Rosa et al., 2018] о снижении двигательной активности при использовании аналогичной схемы введения МФТП. Моторный дефицит у этих животных исчезал к 7-му дню. Однако в группе МФТП действие нейротоксина на поведение наблюдали более длительно, чем моторный дефицит.

Представленные данные свидетельствуют о том, что мыши, предварительно получившие чЛф, полностью восстановились по изученным показателям на 7-й день, некоторые параметры (общее и пройденное в центре расстояние, количество выходов в центр) вернулись к нормальному (контрольному) уровню на следующий день после введения МФТП (Рис. 25, 26). Животные, получившие чЛф, так же как и контрольные мыши, демонстрировали стабильный уровень всех зарегистрированных параметров поведения на 7-й и 28-й дни. Представленные результаты свидетельствуют о том, что двукратное введение чЛф стимулировало быстрое восстановление поведения в ОП, нарушенного нейротоксином. Это согласуется с результатами Ху 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 шестимесячных мышей, вызванные МФТП [Xu et al., 2019]. Liu и соавт. также продемонстрировали, что предварительное введение чЛф (внутрижелудочно в различных дозах; за 2-а дня до и в течение 5-и 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.

Таким образом, наши результаты показали, что двукратное введение чЛф способствовало восстановлению двигательных функций и исследовательского поведения, нарушенных МФТП.

4.5. Гистологическое исследование нейродегенерации, вызванной МФТП

МФТП индуцировал потерю ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС (Рис. 27а,в,д) и ДА-ергических волокон в стриатуме (Рис. 27ж,и,л) на 2-й день после его введения. Гистологический анализ выявил уменьшение количества ТГ+ клеток в компактной части ЧС (Рис. 27н) и уменьшение оптической плотности ТГ-специфического окрашивания в стриатуме (Рис. 27о) 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.

В группе МФТП потеря ТГ+ нейронов в компактной части ЧС была необратимой. На 28-й день количество ТГ+ клеток у животных этой группы оставалось ниже, чем в контроле. Напротив, группа МФТП+Лф продемонстрировала увеличение этого параметра на 28-й день (Рис. 27б,г,е,н), и количество ТГ+ клеток в группе МФТП+Лф было значимо больше, чем в группе МФТП (Рис. 27н).

Что касается ТГ+ волокон в стриатуме, то в группе МФТП оптическая плотность ТГ-специфического окрашивания оставалась значимо ниже по сравнению с группой Контроль на 28-й день. Существенно, что на 28-й день в группе МФТП+Лф этот показатель значительно увеличился по сравнению со 2-м днем (Рис. 27з,к,м,о). Оптическая плотность ТГ+ волокон в группе МФТП+Лф была значимо больше, чем в группе МФТП на 28-й день (Рис. 27о). На 28-й день не было обнаружено значимых различий как в количестве ТГ-позитивных клеток

в компактной части ЧС, так и в количестве ТГ-позитивных волокон в стриатуме между группами МФТП+Лф и Контроль.

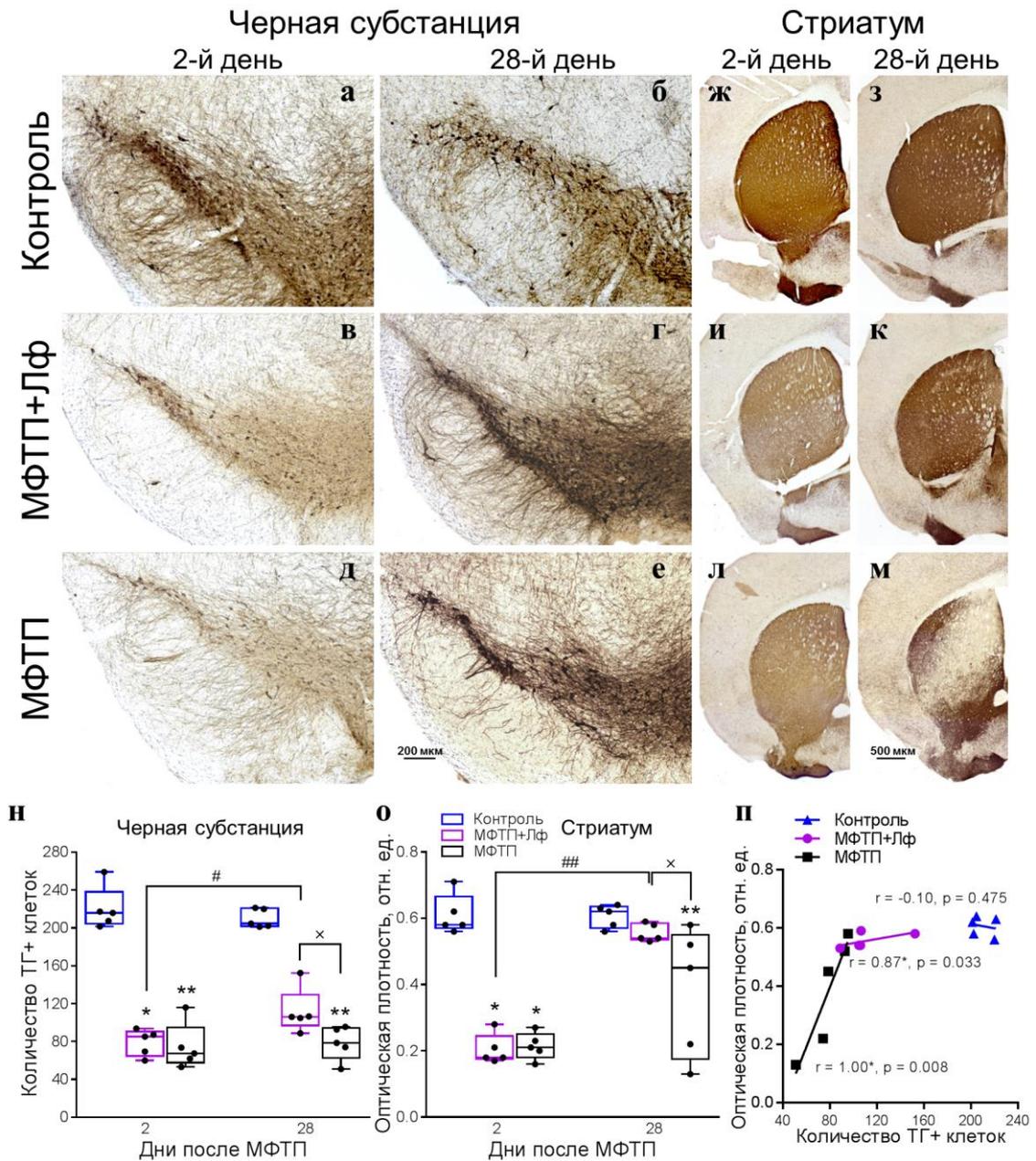


Рисунок 27. Эффекты Лф на нейродегенерацию, вызванную введением МФТП. Репрезентативные микрофотографии срезов компактной части ЧС (а–е) и стриатума (ж–м) после ИГХ-окрашивания на ТГ. Количество ТГ+ нейронов в компактной части ЧС (н). Оптическая плотность ТГ+ волокон в стриатуме (о). Каждая точка представляет одно животное. Корреляционная связь между количеством ТГ+ нейронов в ЧС и оптической плотностью ТГ+ волокон в стриатуме на 28-й день (п). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ - отличия от группы Контроль в каждый момент времени; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с той же группой в предыдущий момент времени; $x p < 0.05$ [Кореева М.Ю. et al., 2021].

Анализ показал, что на 28-й день положительная корреляция между количеством ТГ+ нейронов в компактной части ЧС и оптической плотностью ТГ+ волокон в стриатуме существовала в обеих группах, получивших МФТП (Рис. 27п). В контрольной группе подобных корреляций выявлено не было.

Ранее было обнаружено, что Лф существенно снижает вызванную МФТП потерю ДА-нейронов в ЧС и истощение ДА в стриатуме [Xu et al., 2019; Liu et al., 2020]. Как уже было отмечено, в обеих работах Лф вводили в течение семи последовательных дней (на фоне введения МФТП и до него), гистологические и биохимические анализы проводили только в один момент времени - на следующий день после последнего введения. В нашем исследовании животные получали чЛф только дважды и только до введения нейротоксина. Представленные данные свидетельствуют о том, что у мышей, двукратно получивших чЛф, происходило восстановление нигростриатной системы на 28-й день, которое выражалось в увеличении количества ТГ+ клеток и оптической плотности ТГ+ волокон до 53% и 92% от контроля, соответственно.

В данной работе впервые было исследовано влияние чЛф на динамику восстановления двигательных функций, исследовательского поведения и дегенеративных изменений в нигростриатной системе после острого введения МФТП мышам.

4.6. Корреляция между количеством стоек в тесте «Открытое поле» и количеством ТН-положительных иммунореактивных нейронов и волокон

В группе МФТП выявили положительную корреляцию как между количеством ТГ+ нейронов в компактной части ЧС, так и оптической плотностью ТГ-иммунореактивных волокон в стриатуме на 28-й день с количеством стоек в тесте ОП в тот же день (Рис. 28а,б). В группах МФТП+Лф и Контроль подобных корреляций выявлено не было.

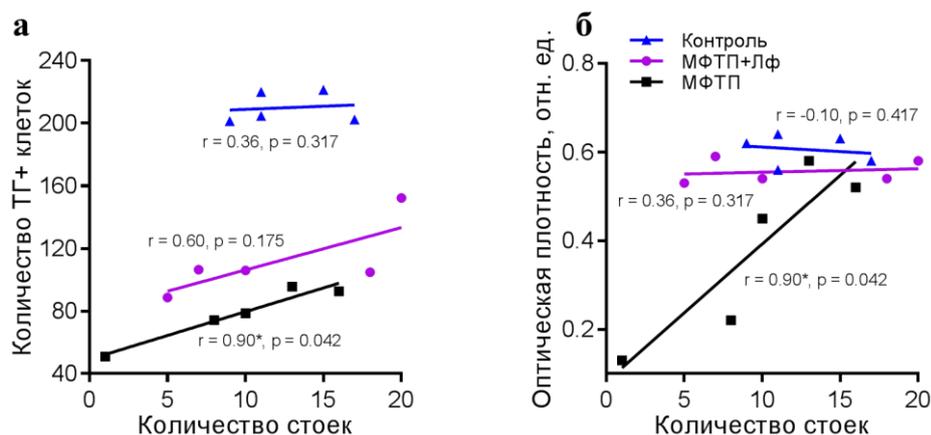


Рисунок 28. Корреляционная связь между количеством стоек в тесте «Открытое поле» и количеством ТГ+ нейронов в черной субстанции (а) и оптической плотностью ТГ+ волокон в стриатуме (б) мышей через 28 дней после введения МФТП/NaCl. * - достоверная корреляция [Кораева М.Ю. et al., 2021].

Ранее была выявлена высокая степень корреляции между дефицитом результативности в тесте ротород и потерей ТГ-иммунореактивности в стриатуме [Rozas et al., 1998]. Schwarting и соавт. показали, что дефицит в количестве стоек был связан со степенью истощения ДА в стриатуме мышей, как сразу после поражения, так и через четыре дня после него [Schwartz et al., 1999].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что чЛФ оказал защитное действие на изменение массы тела и способствовал восстановлению двигательных функций, исследовательского поведения мышей и функциональной активности ТГ+ клеток нигростриатной системы после острого воздействия МФТП. Основные результаты раздела опубликованы [Кораева М.Ю. et al., 2021].

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ТРАНСПОРТА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛАКТОФЕРРИНА В МОЗГ МЫШИ

Данные о позитивных эффектах чЛф при экспериментальной патологии, приведенные в Главах 3 и 4, обусловили выяснение механизмов его действия. Задачей, поставленной в этой части работы, было изучение путей транспорта чЛф в головной мозг мышей при различных способах введения раствора этого белка. Кроме того, исследовали распределение чЛф в мозге и определяли фенотип клеток, включающих чЛф. Колокализацию чЛф и маркеров разного типа клеток оценивали с помощью флуоресцентного иммуногистохимического анализа.

5.1. Исследование распределения чЛф в мозге мышей после его введения

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что чЛф детектировался в мозге мышей через 10 и 60 мин после интраназального (и/н) (Рис. 29), через 5, 15 и 30 мин после подъязычного, через 30 и 60 мин после внутрибрюшинного введения. Через 5 мин после и/н введения и через 5, 10 и 60 мин после конъюнктивального введения локализации чЛф в мозге мыши не обнаружили. Вне зависимости от способа введения и временного интервала белок детектировался в цитоплазме эндотелиальных клеток сосудов головного мозга. 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. 29б).

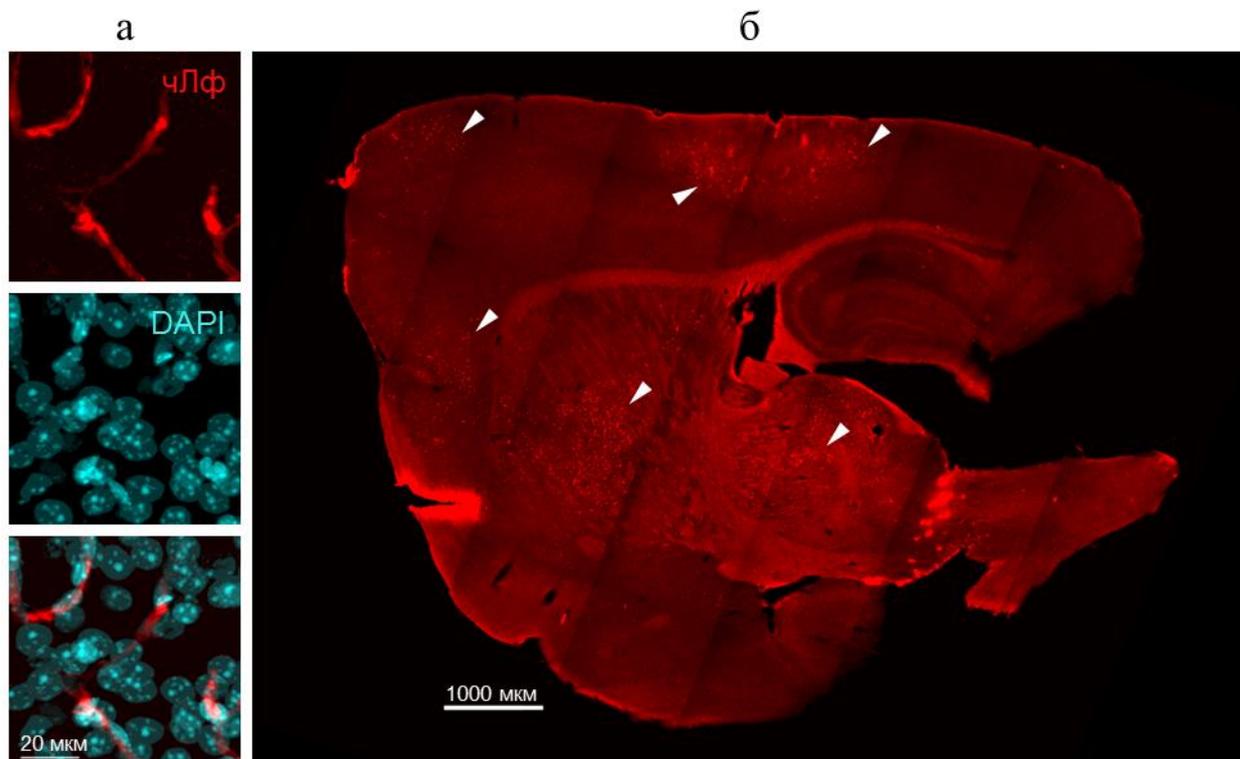


Рисунок 29. Репрезентативные микрофотографии срезов мозга мыши через 10 минут после однократного интраназального введения чЛф. Иммунофлуоресцентная детекция чЛф (красный). Ядра клеток докрашены DAPI (голубой) (а). Визуализация распределения чЛф+клеток (стрелки) в структурах мозга (б) [Копеева М.Ю. и др., 2019].

Флуоресцентно окрашенные комплексы коровьего Лф с наночастицами были использованы ранее для исследования транспорта экзогенного белка. После и/н введения конъюгата Лф и наночастицы на основе поли(этиленгликоль)–поли(лактида) белок был обнаружен в обонятельных луковицах, мозжечке и стриатуме мыши [Vi et al., 2016], а после введения аналогичного комплекса в хвостовую вену - в стриатуме, коре и перивентрикулярной области третьего желудочка головного мозга мыши [Hu et al., 2009]. Клеточная локализация Лф в этих работах не была показана.

5.2. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин после введения его животным

Иммунофлуоресцентный анализ срезов мозга мыши выявил цитоплазматическую локализацию чЛф в клетках и его колокализацию с маркером эндотелиальных клеток CD31 после и/н введения белка. Колокализации включения чЛф с маркерами зрелых нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) не наблюдали (Рис. 30).

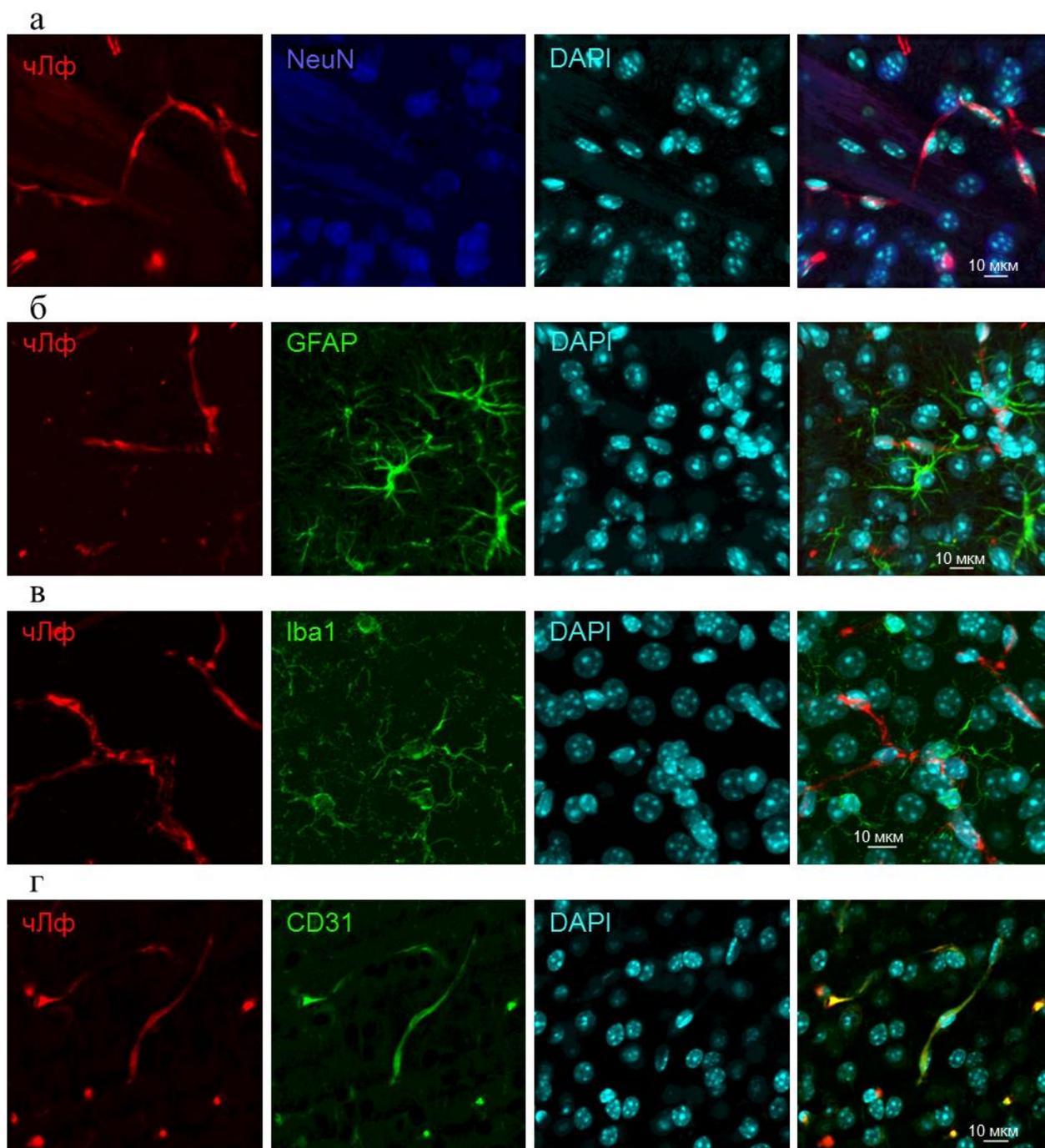


Рисунок 30. Иммунофлуоресцентная детекция маркеров зрелых нейронов (NeuN, синий) (а), астроцитов (GFAP, зеленый) (б), микроглии (Iba1, зеленый) (в), эндотелиальных клеток (CD31, зеленый) (г) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши через 10 мин после интраназального введения белка. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой) [Копеева М.Ю. и др., 2019].

Наши данные согласуются с результатами, полученными ранее на крысах. После введения через хвостовую вену коровьего Лф белок детектировался в везикулярных мембранах эндотелиальных клеток кровеносных сосудов мозга животных [Kamemori et al., 2008].

В данной работе впервые экзогенный чЛф был детектирован в мозге мыши с помощью флуоресцентного ИГХ анализа.

5.3. Фенотипирование клеток мозга мыши, включивших человеческий лактоферрин при прямой аппликации белка на срезы

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. 31, 32).

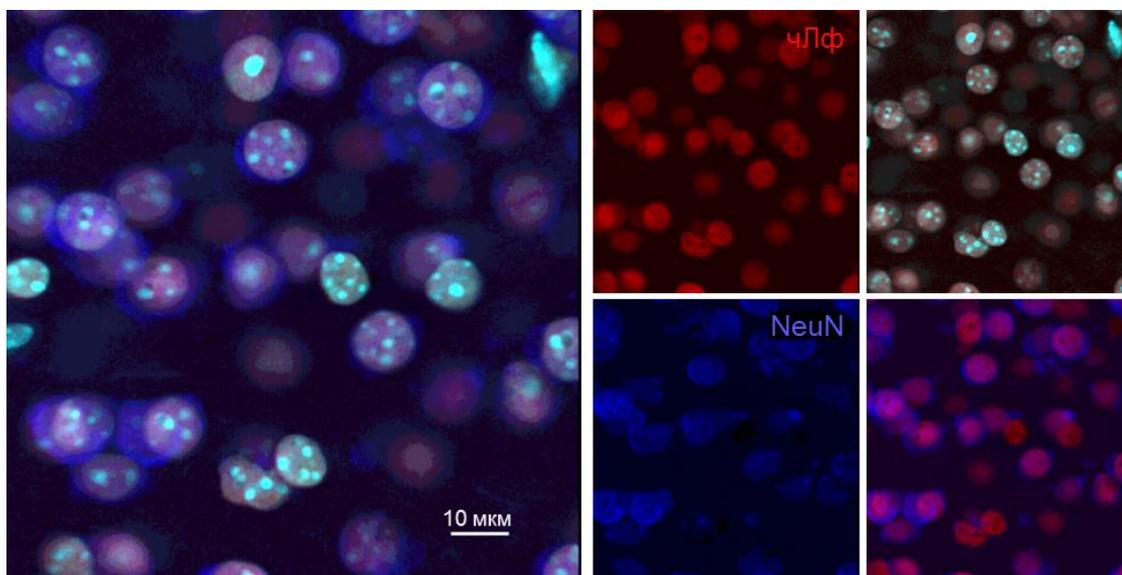


Рисунок 31. Иммунофлуоресцентная детекция маркера зрелых нейронов (NeuN, синий) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши после 16 ч инкубации срезов с экзогенным белком. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой) [Копеева М.Ю. и др., 2019].

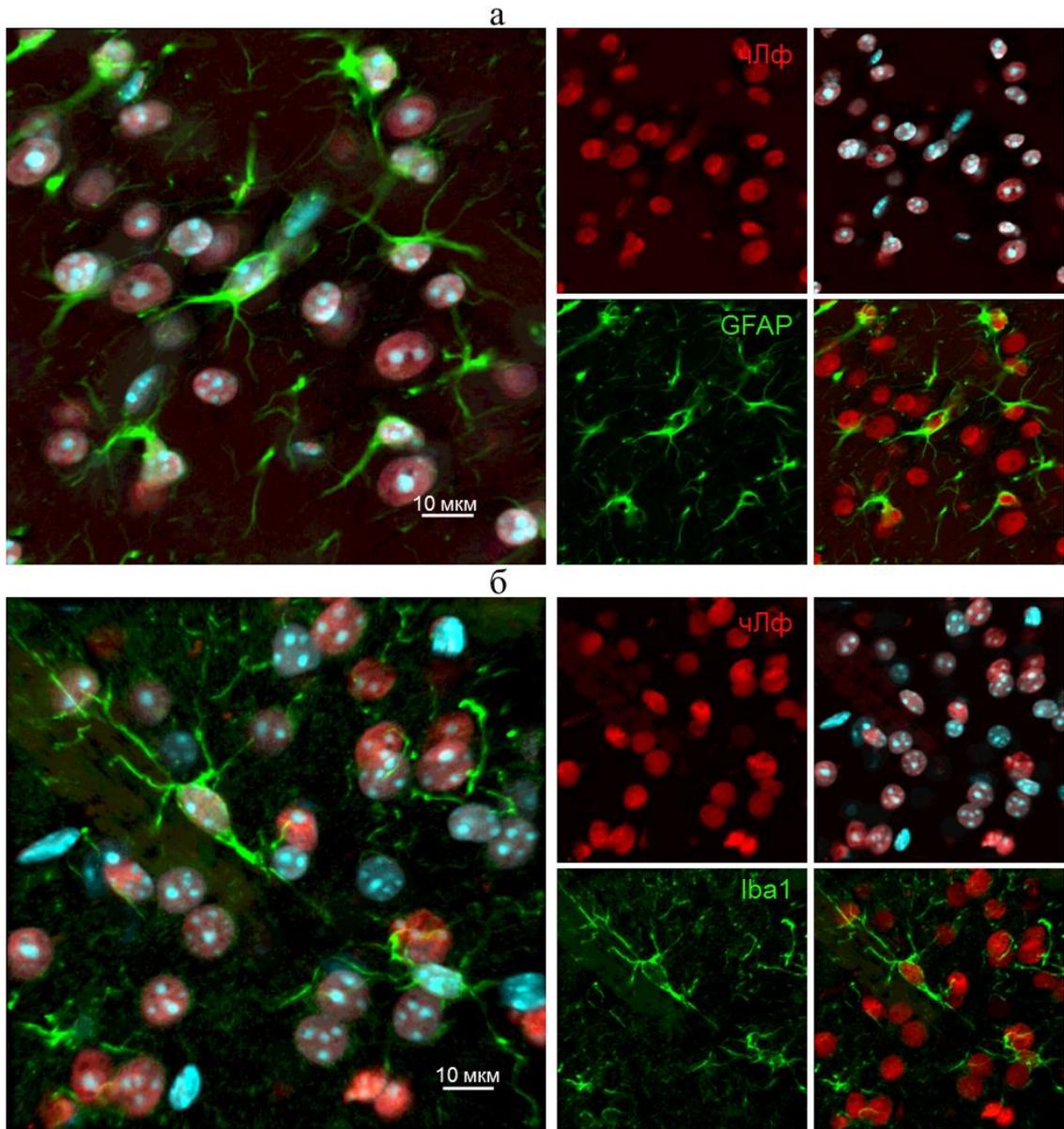


Рисунок 32. Иммунофлуоресцентная детекция маркеров астроцитов (GFAP, зеленый) (а) и микроглии (Iba1, зеленый) (б) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши после 16 ч инкубации срезов с экзогенным белком. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой) [Копеева М.Ю. и др., 2019].

Лф+ клетки не экспрессировали маркер эндотелиальных клеток (Рис. 33), что указывало на отсутствие биоспецифичности чЛф к ядрам этих клеток. Основные результаты раздела опубликованы [Копеева М.Ю. и др., 2019; Копеева М.Ю. et al., 2019].

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. Как уже отмечалось выше (п.п. 1.1.2, 1.1.4), LRP1, экспрессирующийся в эндотелиальных клетках церебральных сосудов и перицитах, мог быть вовлечен в этот транспорт. Лф не был обнаружен ни в нейронах, ни в астроцитах, ни в клетках микроглии после его введения животным. Это может быть объяснено недостаточным сроком для прохождения ГЭБ белком или недостаточной концентрацией чЛф после прохождения ГЭБ для ИГХ детектирования. Еще одним объяснением может быть медленная диффузия белка во внеклеточном матриксе нервной ткани [Thorne et al., 2008].

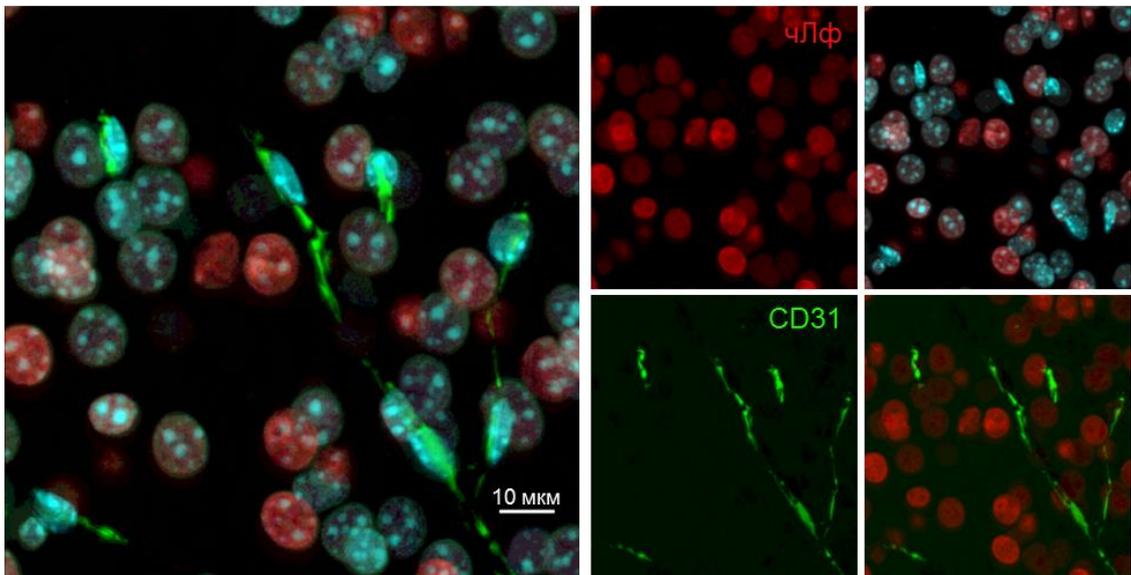


Рисунок 33. Иммунофлуоресцентная детекция маркера эндотелиальных клеток (CD31, зеленый) и чЛф (красный) в клетках мозга мыши после 16 ч инкубации срезов с экзогенным белком. Ядра клеток докрашены DAPI (голубой) [Копеева М.Ю. и др., 2019].

Однако, используя прямое нанесение чЛф на фиксированные плавающие срезы, мы обнаружили высокоспецифичные сайты связывания белка в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши. Ядерный нуклеолин может представлять собой белок-кандидат на роль этих сайтов. По-видимому, именно нейроны, астроциты и клетки микроглии являются конечной мишенью для Лф в мозге, поскольку он не был обнаружен в ядрах эндотелиальных клеток.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА c-FOS В ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Данные о позитивных эффектах чЛф при экспериментальной патологии, приведенные в Главах 3 и 4, а также данные о наличии высокоспецифичных сайтов связывания чЛф в ядрах нейронов, приведенные в Главе 5, обусловили дальнейшее выяснение механизмов его действия. Задачей, поставленной в этой части работы, было исследование влияния чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции, определение клеточной локализации чЛф и возможной колокализации экзогенного белка с индуцированной экспрессией c-Fos.

6.1. Динамика проникновения чЛф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа

Иммунореактивность клеток культуры к нейрональному маркеру NeuN указала на то, что около 85% из них были нейронами на 7-й день культивирования *in vitro*, что находится в соответствии с опубликованными ранее данными [Silva et al., 2001; Горбачева Л.Р. и др., 2006; Resende et al., 2007].

Иммунофлуоресцентное окрашивание интактных культур 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. 34а). Проникновение чЛф в ядро происходило медленнее. Количество иммунореактивных ядер зависело от времени инкубации культуры с белком. Через 2 ч чЛф детектировался в ядрах 22%, через 24 ч - 48%, через 72 ч - 77% клеток интактной культуры (Рис. 34а).

Кроме того, через 24 ч иммунореактивность чЛф была локализована в цитоплазме 97% и ядрах 61% NeuN+ клеток. Стимуляция 50 мМ KCl ускоряла

проникновение белка в ядро и значимо увеличивала этот показатель до 98% через 2 ч (Рис. 34б).

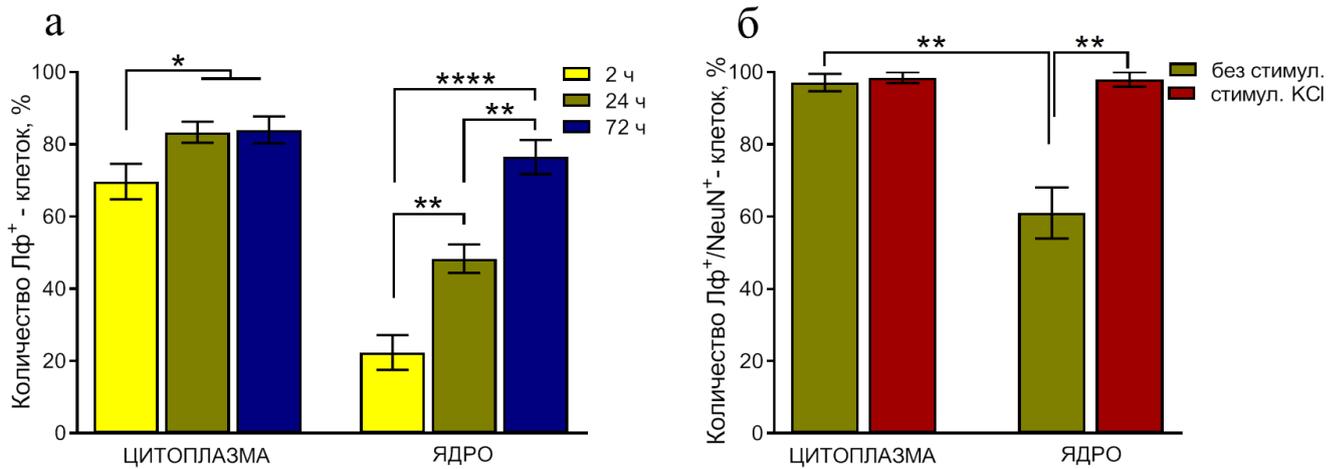


Рисунок 34. Динамика проникновения чЛф в цитоплазму и ядро клеток первичной культуры гиппокампа. чЛф был добавлен на 2, 24 или 72 ч (а). Через 2 ч после стимуляции КСІ, Лф был предварительно добавлен на 24 ч (б). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Ранее было показано, что в большинстве случаев иммунореактивность Лф локализована в цитоплазме [Tuccari and Barresi, 2011]. После введения коровьего Лф в культуральную среду, белок был детектирован в цитоплазме клеток линии NT29 [Akiyama et al., 2013], HeLa [Liu et al., 2003], MCF-7, первичной эпителиальной культуры ткани молочной железы коровы [Baumrucker et al., 2006], фибробластов мыши линии L929 и клеток глиомы мыши линии GL-261 [Tammam et al., 2018], и только в клетках линии Caco-2 – в ядре [Akiyama et al., 2013]. Синтезированный пентапептид, соответствующий части N-концевой области чЛф, богатой основными аминокислотами, при добавлении в культуральную среду детектировался в ядре (в основном в ядрышках) клеток линий HeLa, глиобластомы человека U87MG и карциномы мочевого пузыря человека 5637 уже через несколько минут инкубации [Penco et al., 2001].

6.2. Оценка степени фрагментации геномной ДНК в клетках нейрональных культур после стимуляции

Стимуляция, как стрессорный фактор, может вызывать повреждение клеток нейрональной культуры. В нашей работе для оценки степени повреждения был

использован анализ количества клеток с фрагментацией геномной ДНК, отнесенного к общему количеству клеток в культуре [Maiti et al., 2017]. Мы провели сравнительное исследование групп КС1 (через 2 и 24 ч после стимуляции) и ПК.

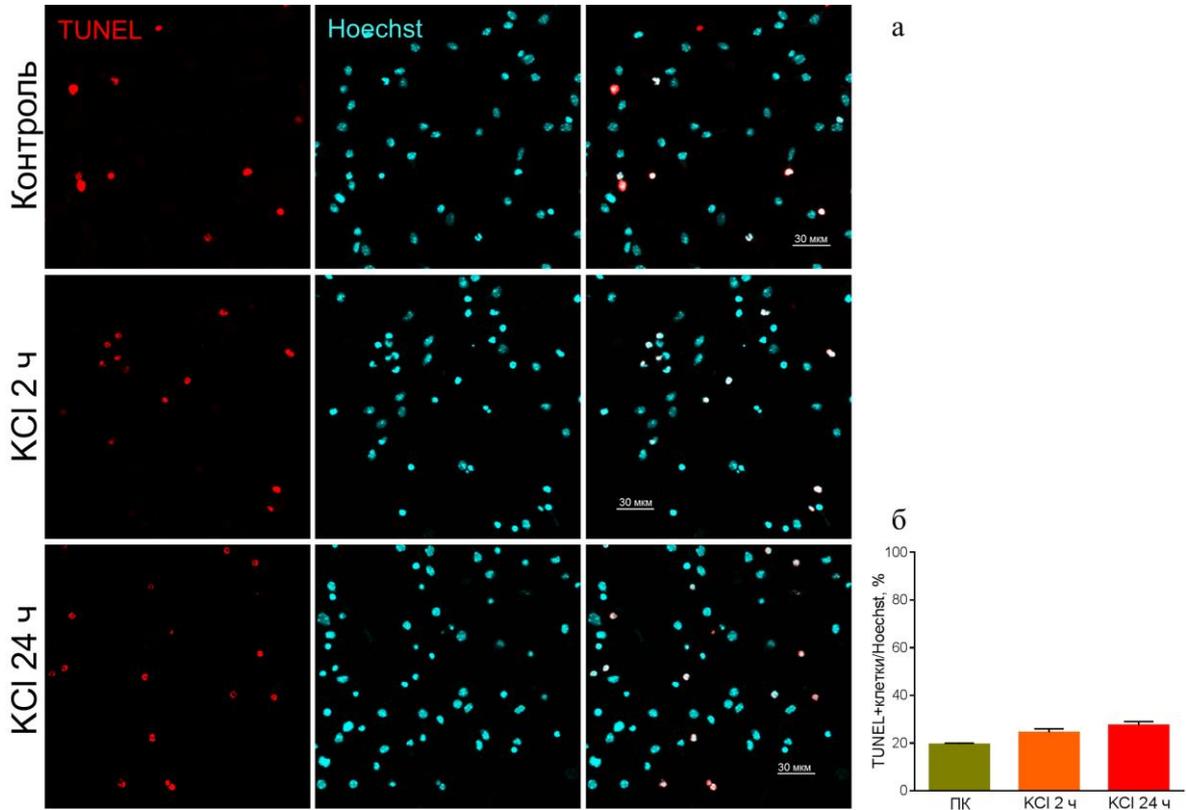


Рисунок 35. Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания культур клеток гиппокампа методом TUNEL через 2 и 24 ч после стимуляции 50 мМ КС1. Репрезентативные микрофотографии культур клеток гиппокампа, окрашенных методом TUNEL (красный). Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой) (а). Количественный анализ TUNEL⁺ клеток (б).

Иммунофлуоресцентный анализ выявил, что на 8-й день культивирования *in vitro* спонтанный уровень TUNEL⁺ клеток в группе ПК составлял 20%. Через 2 и 24 ч после стимуляции 50 мМ КС1 этот показатель значимо не увеличился и составлял 25% и 28%, соответственно (Рис. 35а, б). Полученные данные позволяют заключить, что выбранная схема стимуляции не вызывала дополнительных повреждений клеток и носила физиологический характер.

6.3. Исследование влияния чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos

Иммунофлуоресцентное окрашивание выявило, что чЛф детектировался в цитоплазме всех c-Fos⁺ клеток в группе КС1+Лф через 2 ч после стимуляции 50 мМ КС1 (Рис. 36а). Кроме того, наблюдали колокализацию включения чЛф и экспрессии c-Fos в ядрах некоторых клеток культуры (Рис. 36б). Через 2 ч после стимуляции 69 % NeuN⁺ клеток экспрессировали белок c-Fos.

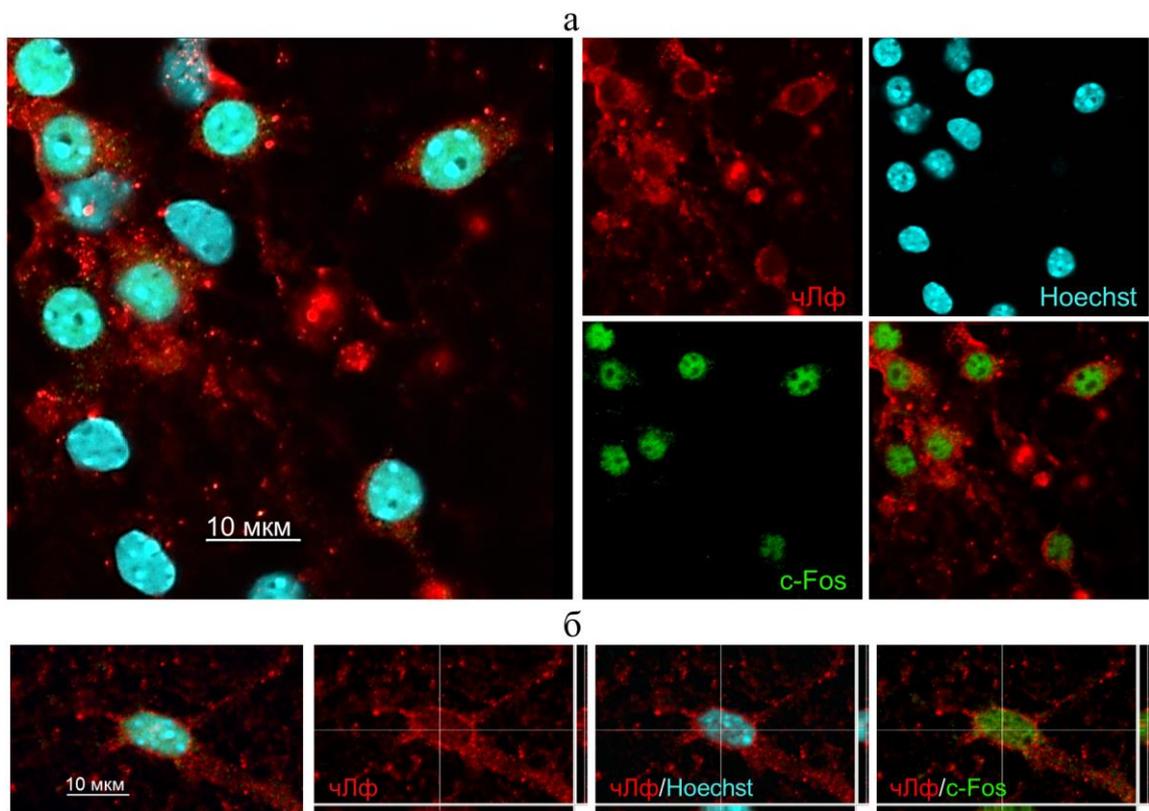


Рисунок 36. Иммунофлуоресцентная детекция белка c-Fos (зеленый) и лактоферрина (красный) в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 ч после стимуляции 50 мМ КС1. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой) [Копаева М.Ю. и др., 2021].

В группах ПК и ПК+Лф экспрессии c-Fos не наблюдали (Рис. 37, 38а). Через 2 ч после смены среды в обеих группах активного контроля около 15% клеток экспрессировали этот белок. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в клетках культур опытных групп стимуляция 50 мМ КС1 вызвала индукцию экспрессии белка c-Fos, значительно отличающуюся как от пассивного, так и от активного контролей (Рис. 38а). Это согласуется с данными, опубликованными

ранее. Трехкратная аппликация 50 мМ КСl вызывала экспрессию белка c-Fos в пирамидных нейронах переживающих срезов гиппокампа крыс [Schoenenberger et al., 2012], а добавление 170 мМ КСl – в нейронах культуры гиппокампа [Bading et al., 1993].

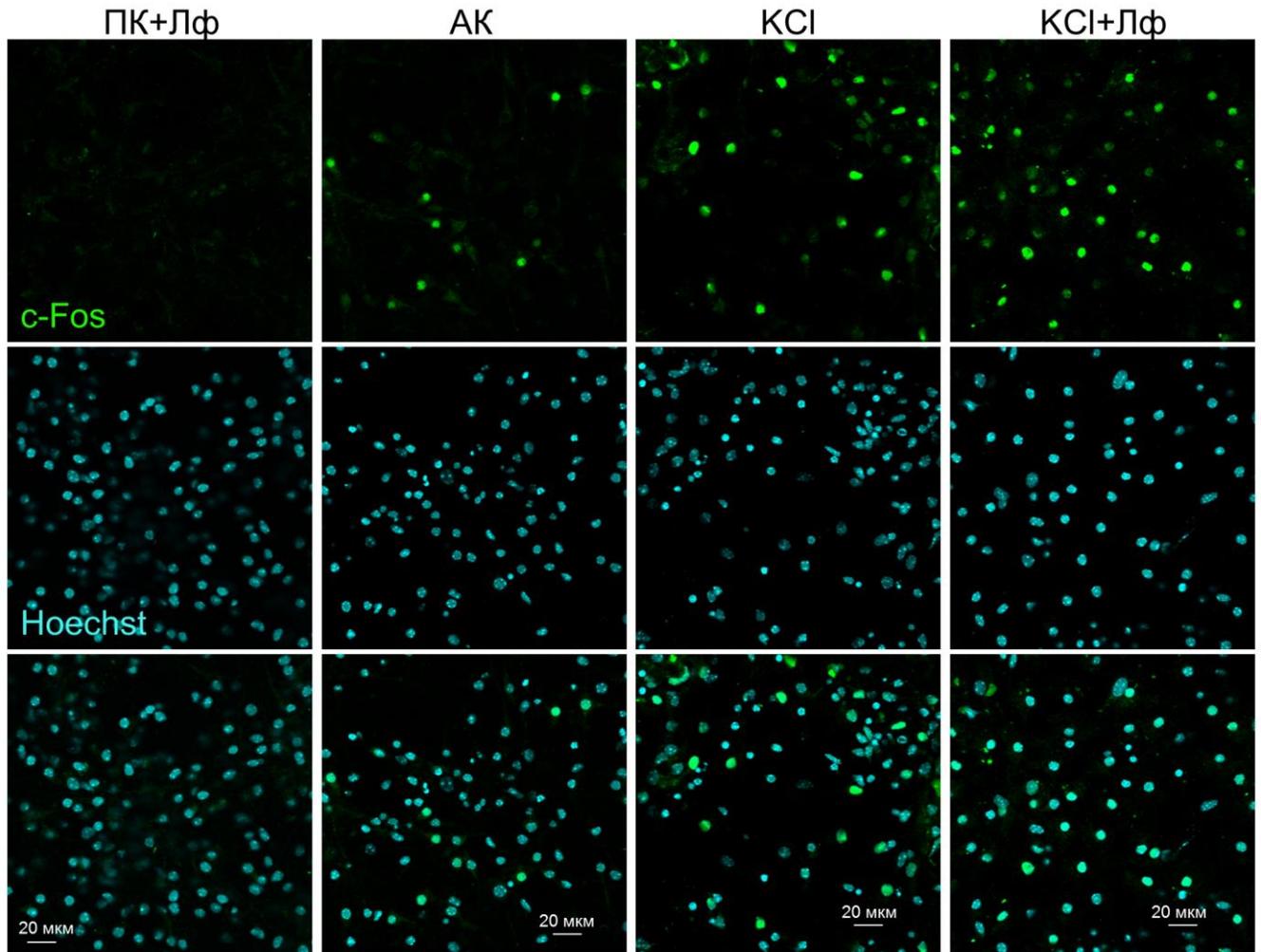


Рисунок 37. Иммунофлуоресцентная детекция белка c-Fos (зеленый) в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 ч после стимуляции 50 мМ КСl. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой) [Копаева М.Ю. и др., 2021].

Кроме того нами было обнаружено, что предварительное введение чЛф значительно увеличивало количество клеток, экспрессирующих c-Fos через 2 ч после аппликации 50 мМ КСl (Рис. 38а, б). Так в группе КСl этот параметр составлял 35%, а в группах КСl+Лф и КСl+Лфпост - 50% и 47%, соответственно. Дополнительное присутствие чЛф в культуральной среде во время и после стимуляции существенно не влияло на количество клеток, экспрессирующих с-

Fos (группа КСІ+Лфпост vs КСІ+Лф) (Рис. 38а, б). Основные результаты раздела опубликованы [Копаева М.Ю. и др., 2021].

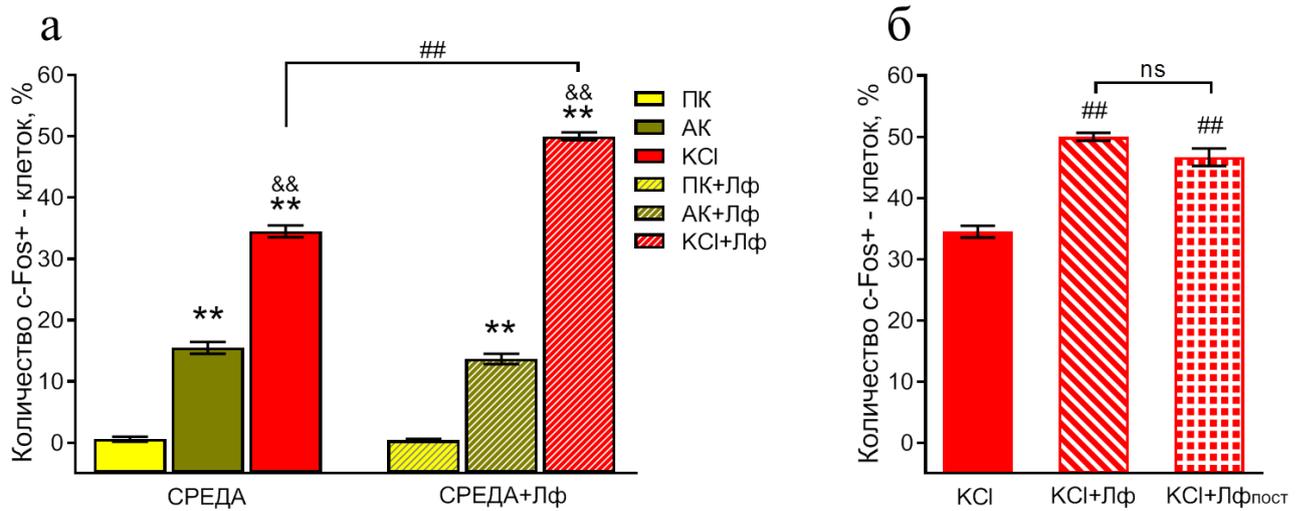


Рисунок 38. Количественный анализ экспрессии белка c-Fos в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 ч после стимуляции 50 мМ КСІ. ** $p < 0,0001$ – отличия от соответствующих групп пассивного контроля; && $p < 0,0001$ – отличия от соответствующих групп активного контроля; ## $p < 0,0001$ – отличия от группы КСІ [Копаева М.Ю. и др., 2021].

Наши данные свидетельствуют о том, что предварительное введение чЛф усиливало экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в первичных нейрональных культурах в ответ на физиологическую стимуляцию 50 мМ КСІ, которая в свою очередь способствовала проникновению чЛф в ядра клеток культуры. В настоящей работе впервые изучено влияние чЛф на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в гиппокампальных культурах клеток мозга мышей после стимуляции 50 мМ КСІ. Также впервые показана колокализация экзогенного чЛф с белком c-Fos после стимуляции.

Как уже отмечалось выше, введение экзогенного Лф вызывало увеличение экспрессии Лф-рецептора в первичной культуре нейронов [Wang et al., 2015]. В нашем исследовании чЛф быстро проникал в цитоплазму клеток культуры, как мы предполагаем, благодаря рецепторным белкам LRP1 и нуклеолину, экспрессирующимся в них. Проникновение чЛф в ядро происходило медленнее, этот процесс мог быть опосредован ядерным нуклеолином.

Лф может иметь различные схемы действия в зависимости от его клеточной локализации. Так при использовании одной и той же дозы коровьего Лф он оказывал цитотоксическое действие при проникновении в цитоплазму клеток глиомы мыши GL-261, а при доставке в ядро с помощью наночастиц хитозана наблюдали пролиферативный эффект [Tammam et al., 2018]. После введения коровьего Лф в культуральную среду, белок был детектирован в цитоплазме клеток линии MCF-7 и первичной эпителиальной культуры ткани молочной железы коровы. Однако при совместном применении с ретиноидами Лф был способен проникать в ядро, что совпадало со снижением цитотоксических эффектов последних [Baumrucker et al., 2006].

Убедительные доказательства свидетельствуют о том, что экзогенный Лф может быть интернализован в ядре с последующим связыванием с ДНК и непосредственным действием в качестве активатора транскрипции. Показано, что Лф усиливает экспрессию нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) через ERK/CREB-путь и экспрессию полисиалирированной молекулы адгезии нервных клеток (PSA-NCAM) [Chen et al., 2015; Wang, 2016; Xu et al., 2019]. Лф, получаемый в течение 4-х недель в составе диеты, повышал уровни мРНК c-Fos, BDNF и субъединицы GluN1 NMDA-рецептора в префронтальной коре молодых крыс, но в то же время снижал уровень мРНК c-Fos в миндалине [Mika et al., 2018]. Для полного понимания значения Лф в регулировании клеточных функций необходимо прояснить вопросы, связанные с потенциальным взаимодействием между ним и другими факторами транскрипции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость поиска новых средств профилактики и лечения социально-значимых заболеваний, связанных с действием радиации на организм, а также с нейродегенеративными процессами является актуальной. Особый интерес представляют молекулы эндогенного происхождения, участвующие в регуляции физиологических процессов в организме. В этой связи исследование Лф как полифункционального белка расширяет возможности и открывает новые перспективы для терапии различных заболеваний. Использование чЛф в экспериментальных моделях патологических состояний на лабораторных животных позволяет изучать его влияние на механизмы патогенеза и саногенеза в ответ на воздействие повреждающих факторов. Для комплексного исследования эффектов чЛф на интегральные и системные показатели работа включала в себя широкий спектр методов на организменном, органном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях биологической организации.

Моделирование острого лучевого поражения с помощью тотального гамма-облучения мышей в сублетальной дозе [Alchinova et al., 2015; Медведева Ю.С., 2017; Полякова М.В., 2019] позволило выявить полисистемное действие чЛф на организм экспериментальных животных. Одними из основных критериев оценки воздействия радиации являются изменения в составе периферической крови [Шибкова Д.З. и др., 2006]. Ранее было установлено, что выживаемость мышей после воздействия сублетальных доз радиации зависит от скорости развития восстановительных процессов в кроветворной ткани [Liu et al., 2017; Li et al., 2017].

В нашем исследовании в первые 6 дней после облучения наблюдали сходную умеренную потерю массы тела во всех опытных группах. При этом в группе Обл первая волна интенсивной гибели животных началась на 5-й день, и к 9-му дню в живых оставалось 75% мышей. Масса тела животных этой группы резко уменьшилась между 9-м и 12-м днями, после чего наблюдали вторую волну интенсивной гибели с 12-го по 16-й день (выживаемость 31%), затем погибло еще

несколько животных. К 30-му дню масса выживших мышей группы Обл не восстановилась даже до исходного уровня. Введение чЛф позволило продлить период, в течение которого облученные мыши продолжали жить. Первая гибель в обеих опытных группах, получивших чЛф, произошла только на 11-й день. Потеря массы тела в этих группах практически прекратилась к 6-му дню, и животные прогрессивно набирали вес с 15-го дня до конца эксперимента. Облучение вызвало резкое снижение количества лейкоцитов в периферической крови животных всех опытных групп (3-й и 10-й дни). Введение чЛф позволило восстановить этот показатель до уровня контролей к концу эксперимента.

Противолучевое действие Лф может быть основано на его иммуномодулирующей функции [Garcia-Montoya et al., 2012]. В нашем исследовании чЛф оказал защитное действие на структурную организацию селезенки – одного из органов иммунной системы. Известно, что Лф может запускать такие клеточные реакции, как дифференцировка, активация и пролиферация, связываясь с поверхностью иммунных клеток [Legrand et al., 2006], стимулирует процесс созревания В-клеток селезенки [Zimecki et al., 1995; Suzuki et al., 2005].

В настоящей работе впервые продемонстрировано компенсаторное действие чЛф на индуцированные облучением снижение исследовательской активности мышей, снижение массы тела и общего количества лейкоцитов, изменение лейкоцитарной формулы крови. Показано, что однократное и двукратное введение чЛф увеличило выживаемость облученных мышей с 28% до 76% в течение эксперимента. С помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии получены оригинальные данные о положительном влиянии чЛф на параметры сывороточного гомеостаза.

Экспериментальное моделирование гибели нейронов с помощью однократного введения нейротоксина МФТП мышам [Sedelis et al., 2001; Ferger et al., 2000; Миронов А.Н. и др., 2012] позволило выявить защитное действие чЛф на изменение массы тела. Экзогенный белок способствовал восстановлению двигательных функций, исследовательского поведения животных и

функциональной активности клеток nigростриатной системы мозга мышей, которое проявлялось в увеличении количества ТГ-положительных клеток в черной субстанции (с 36% до 53% относительно контрольных животных) и оптической плотности ТГ-положительных волокон в стриатуме (с 33% до 92% относительно контрольных животных). В настоящей работе впервые исследовано влияние чЛф на динамику восстановления вышеперечисленных параметров в токсической модели МФТП.

Функциональное нарушение нейрона предшествует его гибели. МФТП может вызвать потерю ТГ-иммунореактивности, не обязательно уничтожив нейрон [Jackson-Lewis et al., 1995]. Xu и соавт. показали, что МФТП значительно снижает экспрессию гена ТГ [Xu et al., 2005]. В процессе нейродегенерации потеря волокон предшествует фактической гибели нейронов [Aguirre et al., 2015], а интоксикация МФТП вызывает у мышей компенсаторное ветвление сохранившихся нервных волокон [Bezard et al., 2000]. Можно предположить, что введенный чЛф способствует процессу ветвления, связываясь с белком нуклеолином, находящимся на поверхности аксонов нейронов [Perry et al., 2016]. Затем благодаря этому рецепторному белку чЛф может транспортироваться в ядро и там осуществлять транскрипционное действие, модулируя экспрессию генов [Maueur et al., 2016]. Chen и соавт. показали, что Лф оказывал воздействие на более чем 10 генов, вовлеченных в регуляцию сигнального пути нейротрофического фактора мозга (BDNF), который участвует в выживании, дифференцировке и росте нейронов [Chen et al., 2015].

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]. Показано, что введение экзогенного Лф вызывает увеличение экспрессии Лф-рецептора в первичной культуре нейронов вентрального среднего мозга [Wang et al., 2015]. LRP1 и нуклеолин,

экспрессирующиеся в нейронах, могут быть вовлечены в запуск клеточного ответа на стимуляцию экзогенным чЛф [Maueur et al., 2016].

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. Механизм действия Лф в этой модели нейротоксичности еще недостаточно ясен. Однако предыдущие исследования показали, что этот белок ингибирует МФТП-индуцированный окислительный стресс и нейровоспаление [Xu et al., 2019; Liu et al., 2020], защищает от нарушения обмена железа [Liu et al., 2020] и митохондриальной дисфункции [Rousseau et al., 2013].

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. [Seed, 2005; Reisz et al., 2014; Simonian, 1996; Hald and Lotharius, 2005]. Следует отметить, что в настоящем исследовании чЛф вводили животным однократно или двукратно в отличие от большинства предыдущих работ, в которых использовали длительное многократное введение Лф.

Благодаря уникальным плейотропным свойствам, которые опосредованы специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней [Suzuki and Lönnnerdal, 2002], в изученных нами экспериментальных моделях чЛф оказывает положительное полисистемное действие на организм животных и позитивное влияние на общий гомеостаз, способствует восстановлению поведения мышей

после острого воздействия патогенных факторов. При системном введении чЛф проникает в мозг мыши, пересекает гематоэнцефалический барьер [Fillebeen et al., 1999a; Suzuki et al., 2005] и способствует ускоренному восстановлению функциональной активности клеток нигростриатной системы после воздействия нейротоксина.

Таким образом, введение чЛф во временных окнах, совпадающих с воздействием патогенных факторов, позволило снизить негативные последствия в обеих экспериментальных моделях. Экзогенный белок проявил положительный эффект в условиях как профилактического применения (при воздействии нейротоксина), так и как средство ранней терапии (при остром гамма-облучении), причем во втором случае – уже после его однократного введения.

В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ путей транспорта чЛф, что позволило выявить наиболее эффективные способы доставки экзогенного белка в мозг. Нам удалось прояснить вопрос о конечных клетках-мишенях для Лф в мозге, который до настоящего времени оставался открытым. Обнаружены высокоспецифичные сайты связывания чЛф в ядрах нейронов, астроцитов и клеток микроглии в мозге мыши. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования Лф для неинвазивного транспорта новых терапевтических препаратов, разработанных на его основе, в головной мозг.

Данные о позитивных эффектах чЛф при экспериментальной патологии и наличие высокоспецифичных сайтов связывания чЛф в ядрах нейронов обусловили дальнейшее выяснение механизмов его действия. Одним из механизмов нейропластичности является изменение активности ТГ при дегенерации нигростриатных ДА-ергических нейронов и при частичном функциональном восстановлении выживших нейронов [Kolacheva and Ugrumov, 2018]. Известно, что Лф способен модулировать многие нейрональные процессы посредством изменения экспрессии генов, участвующих в долговременной нейропластичности (BDNF, CREB и др.) [Chen et al., 2015; Wang, 2016]. 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]. В качестве модельного объекта в этой части исследования нами были выбраны гиппокампальные культуры клеток мозга мышей. Получены оригинальные данные, демонстрирующие, что физиологическая стимуляция 50 мМ КСl усиливает проникновение чЛф в ядра клеток нейрональной культуры. Впервые показана колокализация экзогенного чЛф с белком c-Fos после стимуляции. Выявлена способность чЛф усиливать экспрессию этого транскрипционного фактора. Наши данные открывают новые возможности для изучения механизмов действия Лф по регулированию клеточных функций.

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 СОКРАЩЕНИЙ

АК – активный контроль

АФК – активные формы кислорода

БП – болезнь Паркинсона

в/б – внутривнутрибрюшинное введение

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДА – дофамин

ДА-ергический нейрон – дофаминергический нейрон

ИГХ анализ – иммуногистохимический анализ

ЛКС – лазерная корреляционная спектроскопия

ЛК-спектры – лазерно-корреляционные спектры

МФТП – 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридин

Обл – облучение

ОП – тест «Открытое поле»

п/к – подкожное введение

ПК – пассивный контроль

СОД – супероксиддисмутаза

СПЖ – средняя продолжительность жизни

ТГ – тирозингидроксилаза

ЦНС – центральная нервная система

чЛф – человеческий лактоферрин

ЧС – черная субстанция

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор

dUTP – дезоксиурединтрифосфат

ITLN1 – интелектин-1

LRP1 – белок, связанный с рецепторами липопротеинов низкой плотности 1

TdT – дезоксинуклеотидилтрансфераза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С., Черепов А.Б., Карганов М.Ю. Динамика изменения физиологических показателей мышей с различной радиочувствительностью после острого гамма-облучения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 2. – С. 150-153.
2. Алчинова И.Б., Полякова М.В., Яковенко Е.Н., Медведева Ю.С., Сабурова И.Н., Карганов М.Ю. Введение внеклеточных везикул из клеток костного мозга способствует восстановлению физиологических параметров облученных мышей // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 237-240.
3. Анохин К.В. Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. - 1997. - Т. 47, № 2. - С. 261-279.
4. Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Хлебникова Н.Н., Егорова И.Ю., Бобе А.С., Семенов Х.Х., Антипов А.А., Содбоев Ц.Ц., Карганов М.Ю. Межлинейные особенности физиологических реакций на разных уровнях организации у мышей при остром облучении // Биомедицина. – 2011. – Т.1, № 4. – С. 43- 48.
5. Васильев А.В. Диагностика внутренних болезней домашних животных: уч. рук-во / А. В. Васильев. – М.: Сельхозгиз, 1956. – 467 с.
6. Горбачева Л.Р., Сторожевых Т.П., Пинелис В.Г., Ишивата С., Струкова С.М. Модуляция тромбином и фактором Ха выживаемости гиппокампальных нейронов // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 10. – С. 1338–1346.
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. Радиэкология. – 2009. – Т. 49, № 4. – С. 456-461.
8. Киселев М.Ф., Аклеев А.В., Пашков И.А., Клопов Н.В., Носкин В.А., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия плазмы крови для диагностики пострadiационных последствий // Радиационная биология. Радиэкология. – 1999. – Т. 39, № 1. – С. 64-78.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В., Кучеряну В.Г., Карабань Н.В. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, лечение, профилактика) / Г. Н. Крыжановский, И. Н. Карабань, С. В. Магаева [и др.]. — М.: Медицина, 2002. — 334 с.
13. Кузьменко Е.В. Современные подходы к определению групповой и индивидуальной радиочувствительности организма // Ученые записки крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. – 2011. – Т. 24(63), № 1, Серия «Биология, химия». – С. 109-122.
14. Кучеряну В.Г., Бочаров Е.В., Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Полещук В.В. Механизмы нейродегенерации при болезни Паркинсона. Активация микроглии // Патогенез. - 2012. - Т. 10, №3. - С. 30-34.
15. Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Воронина Н.А. Антитела к глутамату при моделировании паркинсонического синдрома // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. - Т. 169, № 4. - С. 411-415.
16. Лилли Р.Д. Патологическая техника и практическая гистохимия / Р.Д. Лилли; пер. с англ. под ред. В. В. Португалова. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
17. Литвицкий П.Ф. Патифизиология: учебник в 2 т. Т. 1 / П.Ф. Литвицкий. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 752 с.
18. Любина А.Я. Клинические лабораторные исследования / А.Я. Любина, Л.П. Ильичева, Т.В. Катасонова, С.А.Петросова. – М.: Медицина, 1984. – 288 с.
19. Медведева Ю.С. Полисистемная оценка генетически обусловленной радиочувствительности организма (экспериментальное исследование): дис. ... канд. биол. наук: 14.03.03 / Медведева Юлия Сергеевна. — М., 2017. — 133 с.
20. Медведева Ю.С., Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Озерова М.А., Бобе А.С., Содбоев Ц.Ц., Антипов А.А., Карганов М.Ю. Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение // Биомедицина. – 2013. – Т. 1, №. 2 – С. 61-73.

21. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
22. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н. Васильева [и др.]. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
23. Полякова М.В. Использование мезенхимных стромальных стволовых клеток для минимизации последствий действия облучения экспериментальных животных: дис. ... канд. биол. наук: 14.03.03 / Полякова Маргарита Вячеславовна. — М., 2019. — 137 с.
24. Суханова А.Л., Минеева О.А., Киселев И.И., Бурцев М.С., Анохин К.В. Выявление следовых процессов в системах нейронов, культивируемых на микроэлектродных матрицах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 5. – С. 538-541.
25. Цыб А.Ф. Радиация и патология: учебн. пособие / А.Ф. Цыб, Р.С. Будагов, И.А. Замулаева [и др.]. – М.: Высш. шк., 2005. – 341 с.
26. Шибкова Д.З., Аклеев А.В. Адаптационно-компенсаторные реакции системы кроветворения при хроническом радиационном воздействии / Д. З. Шибкова, А. В. Аклеев. – Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2006. – 346 с.
27. Широкова О.М., Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Захаров Ю.Н., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Морфофункциональные закономерности развития нейронных сетей в диссоциированных культурах клеток гиппокампа // Современные технологии в медицине. - 2013. - Т. 5, № 2. - С. 6-13.
28. Шмаров Д.А., Погорелов В.М., Козинец Г.И. Современные аспекты оценки пролиферации и апоптоза в клинико-лабораторной диагностике (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – Т. 1. – С. 36-39.
29. Штемберг А.С. Динамика нарушений высшей нервной деятельности крыс, подвергнутых тотальному воздействию электронного и γ -излучения в дозах 5-100 Гр // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2008. - Т. 48, № 3. - С. 335-341.
30. Штемберг А. С. Физиология: реактивность и резистентность организма млекопитающих : учебник для вузов / А. С. Штемберг, И. Б. Ушаков, А. В. Шафиркин. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Юрайт, 2021. — 471 с.
31. Abrink M., Larsson E., Gobl A., Hellman L. Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism // *Kidney Int.* – 2000. – Vol. 57, № 5. – P. 2004-2010.

32. Acevedo K., Masaldan S., Opazo C.M., Bush A.I. Redox active metals in neurodegenerative diseases // *J Biol Inorg Chem.* – 2019. – Vol. 24, № 8. – P. 1141–1157.
33. Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator // *Curr Pharm Des.* – 2009. – Vol. 15, № 17. – P. 1956-1973.
34. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M. Lactoferrin: a review // *Veterinární Medicína.* – 2008. – Vol. 53, № 9. – P. 457-468.
35. Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology // *Lancet.* – 1991. – Vol. 337, № 8753. – P. 1321-1324.
36. Aguirre P., Mena N.P., Carrasco C.M., Muñoz Y., Pérez-Henríquez P., Morales R.A., Cassels B.K., Méndez-Gálvez C., García-Beltrán O., González-Billault C., Núñez M.T. Iron chelators and antioxidants regenerate neuritic tree and nigrostriatal fibers of MPP+/MPTP-lesioned dopaminergic neurons // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10, № 12. – P. e0144848.
37. Aguirre-Vidal Y., Monroy-Noyola A., Anaya-Ramos L., Arteaga-Silva M., Mendez-Armenta M., Ostoa-Saloma P., Díaz-Zaragoza M., Morales-Montor J., Ríos C., Montes S. β -Estradiol-3-benzoate confers neuroprotection in Parkinson MPP + rat model through inhibition of lipid peroxidation // *Steroids.* – 2017. – Vol. 126. – P. 7–14.
38. Akiyama Y., Oshima K., Shin K., Wakabayashi H., Abe F., Nadano D., Matsuda T. Intracellular retention and subsequent release of bovine milk lactoferrin taken up by human enterocyte-like cell lines, Caco-2, C2BBel1 and HT-29 // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2013. – Vol. 77, № 5. – P. 1023-1029.
39. Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M. The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals // *Am J Life Sci.* – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 5-12.
40. Alchinova I.B., Polyakova M.V., Yakovenko E.N., Medvedeva Y.S., Saburina I.N., Karganov M.Y. Effect of extracellular vesicles formed by multipotent mesenchymal stromal cells on irradiated animals // *Bull Exp Biol Med.* – 2019. – Vol. 166, № 4. – P. 574-579.
41. Anghel L., Radulescu A., Erhan R.V. Structural aspects of human lactoferrin in the iron-binding process studied by molecular dynamics and small-angle neutron scattering // *Eur Phys J E Soft Matter.* – 2018. – Vol. 41, № 9. – P. 109.

42. Asaithamby A., Hu B., Chen D.J. Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – Vol. 108, № 20. – P. 8293-8298.
43. Ashida K., Sasaki H., Suzuki Y.A., Lönnnerdal B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells // *Biometals*. – 2004. – Vol. 7, № 3. – P. 311-315.
44. Bading H., Ginty D.D., Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways // *Science*. – 1993. – Vol. 260, № 5105. – P. 181–186.
45. Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, № 1. – P. 3-10.
46. Barykina N.V., Subach O.M., Doronin D.A., Sotskov V.P., Roshchina M.A., Kunitsyna T.A., Malyshev A.Y., Smirnov I.V., Azieva A.M., Sokolov I.S., Piatkevich K.D., Burtsev M.S., Varizhuk A.M., Pozmogova G.E., Anokhin K.V., Subach F.V., Enikolopov G.N. A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 28, № 6. – P. 34447.
47. Baumrucker C.R., Schanbacher F., Shang Y., Green M.H. Lactoferrin interaction with retinoid signaling: cell growth and apoptosis in mammary cells // *Domest Anim Endocrinol*. – 2006. – Vol. 30, № 4. – P. 289-303.
48. Bella L.M., Fieri I., Tessaro F.H.G., Nolasco E.L., Nunes F.P.B., Ferreira S.S., Azevedo C.B., Martins J.O. Vitamin D modulates hematological parameters and cell migration into peritoneal and pulmonary cavities in alloxan-diabetic mice // *Biomed Res Int*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 7651815.
49. Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin // *Biochim Biophys Acta*. – 1992. – Vol. 1121, № 1-2. – P. 130-136.
50. Ben Yakir-Blumkin M., Loboda Y., Schächter L., Finberg J.P. Neuroprotective effect of weak static magnetic fields in primary neuronal cultures // *Neuroscience*. – 2014. – Vol. 278. – P. 313-326.
51. Bennett D.J., McAbee D.D. Identification and isolation of a 45-kDa calcium-dependent lactoferrin receptor from rat hepatocytes // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, № 27. – P. 8359-8366.
52. Bezard E., Dovero S., Imbert C., Boraud T., Gross C.E. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice // *Synapse*. – 2000. – Vol. 38, № 3. – P. 363-368.

53. Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 9. – P. 2310-2312.
54. Bi C., Wang A., Chu Y., Liu S., Mu H., Liu W., Wu Z., Sun K., Li Y. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment // *Int J Nanomedicine.* - 2016. - Vol. 11. - P. 6547-6559.
55. Birgens H.S. (1985): Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia // *Scand J Haematol.* – 1985. – Vol. 34, № 4. – P. 326–331.
56. Birgens H.S., Hansen N.E., Karle H., Kristensen L.O. Receptor binding of lactoferrin by human monocytes // *Br J Haematol.* – 1983. – Vol. 54, № 3. – P. 383-391.
57. Brines R.D., Brock J.H. The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion // *Biochim Biophys Acta.* – 1983. – Vol. 59, № 3. – P. 229-235.
58. Brock J.H. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant // *Arch Dis Child.* – 1980. – Vol. 55, № 6. – P. 417-421.
59. Brock J.H. The physiology of lactoferrin // *Biochem Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 1-6.
60. Brooks S.P., Dunnett S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide // *Nat Rev Neurosci.* – 2009. – Vol. 10, № 7. – P. 519–529.
61. Cao Q., Qin L., Huang F., Wang X., Yang L., Shi H., Wu H., Zhang B., Chen Z., Wu X. Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2017. – Vol. 319. – P. 80–90.
62. Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Mangia F., Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice // *Behav Brain Res.* – 2002. – Vol. 134, № 1-2. - P. 49–57.
63. Casabiell X., Pinheiro V., Tome' M.A., Peino' R., Die'guez C., Casanueva F.F. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1997. – Vol. 82, № 12. – P. 4270–4273.

64. Chen W.K., Feng L.J., Liu Q.D., Ke Q.F., Cai P.Y., Zhang P.R., Cai L.Q., Huang N.L., Lin W.P. Inhibition of leucine-rich repeats and calponin homology domain containing 1 accelerates microglia-mediated neuroinflammation in a rat traumatic spinal cord injury model // *J Neuroinflammation*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 202.
65. Chen W.W., Zhang X., Huang W.J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review) // *Mol Med Rep*. – 2016. – Vol. 13, № 4. – P. 3391-3396.
66. 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. – Vol. 52, № 1. – P. 256-269.
67. Cheng Q., Huang J., Liang J., Ma M., Zhao Q., Lei X., Shi C., Luo L. Evaluation of abnormal iron distribution in specific regions in the brains of patients with Parkinson's disease using quantitative susceptibility mapping and R2* mapping // *Exp Ther Med*. – 2020. – Vol. 19, № 6. – P. 3778-3786.
68. Christensen D.M., Iddins C.J., Sugarman S.L. Ionizing radiation injuries and illnesses // *Emerg Med Clin North Am*. – 2014. – Vol. 32, № 1. – P. 245-265.
69. Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G. Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline // *J Antimicrob Chemother*. – 2000. – Vol. 46, № 4. – P. 577-582.
70. Collard K.J. Iron homeostasis in the neonate // *Pediatrics*. – 2009. – Vol. 123, № 4. – P. 1208-1216.
71. Cox T.M., Mazurier J., Spik G., Montreuil J., Peters T.J. Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine // *Biochim Biophys Acta*. – 1979. – Vol. 588, № 1. – P. 120-128.
72. Crouch S.P., Slater K.J., Fletcher J. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin // *Blood*. – 1992. – Vol. 80, № 1. – P. 235-240.
73. Dallas D.C., Guerrero A., Khaldi N., Borghese R., Bhandari A., Underwood M.A., Lebrilla C.B., German J.B., Barile D. A peptidomic analysis of human milk digestion in the infant stomach reveals protein-specific degradation patterns // *J Nutr*. – 2014. – Vol. 144, № 6. – P. 815-820.

74. Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells // *J Cell Biochem.* – 1999. – Vol. 74, № 3. – P. 486-498.
75. Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models // *Neuron.* – 2003. – Vol. 39, № 6. – P. 889–909.
76. de Vet B.J., van Gool J. Lactoferrin and iron absorption in the small intestine // *Acta Med Scand.* – 1974. – Vol. 196, № 5. – P. 393-402.
77. Depboylu C., Kliez M., Maurer L., Oertel W.H., Kobayashi K., Weihe E., Höglinger G.U., Schäfer M.K.-H. Transcriptional and structural plasticity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in both striatum and nucleus accumbens following dopaminergic denervation // *J Chem Neuroanat.* – 2014. – Vol. 61–62. – P. 169–175.
78. Depboylu C., Schorlemmer K., Kliez M., Oertel W.H., Weihe E., Höglinger G.U., Schäfer M.K.-H. Upregulation of microglial C1q expression has no effects on nigrostriatal dopaminergic injury in the MPTP mouse model of Parkinson disease // *J Neuroimmunol.* – 2011. – Vol. 236, № 1-2. – P. 39–46.
79. Dexter D.T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells F.R., Daniel S.E., Lees A.J., Jenner P., Marsden C.D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia // *Brain.* – 1991. – Vol. 114, Pt 4. – P. 1953–1975.
80. Ehringer H., Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system // *Parkinsonism Relat Disord.* – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 53-57.
81. Ekins A., Khan A.G., Shouldice S.R., Schryvers A.B. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process // *Biometals.* – 2004. – Vol. 17, № 3. – P. 235–243.
82. El-Mihi K.A., Kenawy H.I., El-Karef A., Elsherbiny N.M., Eissa L.A. Naringin attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats through modulation of the PI3K/Akt pathway // *Life Sci.* – 2017. – Vol. 187. – P. 50-57.
83. Erexson G.L., Kligerman A.D., Bryant M.F., Sontag M.R., Halperin E.C. Induction of micronuclei by X-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes // *Mutat Res.* – 1991. – Vol. 253, № 2. – P. 193-198.
84. 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. – Vol. 1412. – P. 67–74.

85. Faucheux B.A., Nillesse N., Damier P., Spik G., Mouatt-Prigent A., Pierce A., Leveugle B., Kubis N., Hauw J.J., Agid Y. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1995. – Vol. 92, № 21. – P. 9603–9607.
86. Feng L., Li J., Qin L., Guo D., Ding H., Deng D. Radioprotective effect of lactoferrin in mice exposed to sublethal X-ray irradiation // *Exp Ther Med*. – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 3143-3148.
87. Ferger B. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping // *Pharmacol Biochem Behav*. – 2000. – Vol. 65, № 3. – P. 425–431.
88. Fernagut P.O., Diguët E., Labattu B., Tison F. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice // *J Neurosci Methods*. – 2002. – Vol. 113, № 2. – P. 123–130.
89. Fillebeen C., Ruchoux M.M., Mitchell V., Vincent S., Benaïssa M., Pierce A. Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment // *Brain Res Mol Brain Res*. – 2001. – Vol. 96, № 1-2. – P. 103-113.
90. Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., Fenart L., Benaïssa M., Spik G., Cecchelli R., Pierce A. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood–brain barrier // *J Biol Chem*. – 1999a. - Vol. 274, № 11. - P. 7011-7017.
91. Fillebeen C., Mitchell V., Dexter D., Benaïssa M., Beauvillain J., Spik G., Pierce A. Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment // *Brain Res Mol Brain Res*. – 1999b. – Vol. 72, № 2. – P. 183–194.
92. Fischer R., Debbabi H., Blais A., Dubarry M., Rautureau M., Boyaka P.N., Tome D. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues // *Int Immunopharmacol*. – 2007. – Vol. 7, № 10. – P. 1387–1393.
93. Fleming S.M. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein // *J Neurosci*. – 2004. – Vol. 24, № 42. – P. 9434–9440.
94. Franklin K.B.J., Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. / K.B.J. Franklin, G. Paxinos. - Academic Press: San Diego, CA, USA, 2008. – 250 p.

95. Fredriksson A., Archer T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: A parametric analysis // *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* – 1994. – Vol. 7, № 2. – P. 123–132.
96. Fredriksson A., Plaznik A., Sundström E., Jonsson G., Archer T. MPTP-induced hypoactivity in mice: reversal by L-dopa // *Pharmacol Toxicol.* – 1990. – Vol. 67, № 4. – P. 295–301.
97. Furmanski P., Li Z.P., Fortuna M.B., Swamy C.V., Das M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity // *J Exp Med.* – 1989. – Vol. 170, № 2. – P. 415–429.
98. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – Vol. 1820, № 3. – P. 226–236.
99. Golden-Mason L., O'Farrelly C. Having it all? Stem cells, haematopoiesis and lymphopoiesis in adult human liver. *Immunol // Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 45–51.
100. González-Chávez S.A., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications // *Int J Antimicrob Agents.* – 2009. – Vol. 33, № 4. – P. 301.e1–8.
101. Gould T.D., Dao D.T., Kovacsics C.E. The Open Field Test. In mood and anxiety related phenotypes in mice; Gould, T.D., Ed. // *Neuromethods*, Humana Press: Totowa, NJ. – 2009. - Vol. 42. – P. 1–20.
102. Green M.R., Pastewka J.V. Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants // *Endocrinology.* – 1978. – Vol. 103, № 4. – P. 151–103.
103. Grey A., Banovic T., Zhu Q., Watson M., Callon K., Palmano K., Ross J., Naot D., Reid I.R., Cornish J. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells // *Mol Endocrinol.* – 2004. – Vol. 18, № 9. – P. 2268–2278.
104. Gubellini P., Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview // *Revue Neurologique.* – 2015. – Vol. 171, № 11. – P. 750–761.
105. Hald A., Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? // *Exp Neurol.* – 2005. – Vol. 193, № 2. – P. 279–290.
106. Hartmann A., Hunot S., Michel P.P., Muriel M.P., Vyas S., Faucheux B.A., Mouatt-Prigent A., Turmel H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G.I., Agid Y., Hirsch

- E.C. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, № 6. – P. 2875-2880.
107. Haversen L., Ohlsson B.G., Hahn-Zoric M., Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B // *Cell Immunol.* – 2002. – Vol. 220, № 2. – P. 83-95.
108. Hayashi T., To M., Saruta J., Sato C., Yamamoto Y., Kondo Y., Shimizu T., Kamata Y., Tsukinoki K. Salivary lactoferrin is transferred into the brain via the sublingual route // *Biosci Biotechnol Biochem.* - 2017. - Vol. 81, № 7. - P. 1300-1304.
109. He J., Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA // *Nature.* – 1995. – Vol. 373, № 6516. – P. 721-724.
110. Hu K., Li J., Shen Y., Lu W., Gao X., Zhang Q., Jiang X. Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: in vitro and in vivo evaluations // *J Control Release.* - 2009. - Vol. 134, № 1. - P. 55-61.
111. Huang R., Ke W., Han L., Liu Y., Shao K., Jiang C., Pei Y. Lactoferrin-modified nanoparticles could mediate efficient gene delivery to the brain in vivo // *Brain Res Bull.* - 2010. – Vol. 81, № 6. – P. 600–604.
112. Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T., Hachey D.L., Schanler R.J., Motil K.J., Garza C. Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment // *Pediatr Res.* – 1991. – Vol. 29, № 3. – P. 243–250.
113. Ikoma-Seki K., Nakamura K., Morishita S., Ono T., Sugiyama K., Nishino H., Hirano H., Murakoshi M. Role of LRP1 and ERK and cAMP signaling pathways in lactoferrin-induced lipolysis in mature rat adipocytes // *PLoS ONE.* - 2015. – Vol. 10, № 10. – P. e0141378.
114. Jackson S.P., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease // *Nature.* – 2009. – Vol. 461(7267). – P. 1071-1078.
115. Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R.E., Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Neurodegeneration.* – 1995. – Vol. 4, № 3. – P. 257-269.
116. Jackson-Lewis V., Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Nat Protoc.* – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 141–151.

117. Jakowec M.W., Nixon K., Hogg E., McNeill T., Petzinger G.M. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway // *J Neurosci Res.* – 2004. – Vol. 76, № 4. – P. 539–550.
118. Jia W., Yao Z., Zhao J., Guan Q., Gao L. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL) // *Life Sci.* – 2017. – Vol. 186. – P. 1-10.
119. Jiang R., Lopez V., Kelleher S.L., Lönnnerdal B. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells // *J Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 226, № 11. - P. 3022-3031.
120. Jindal A., Mahesh R., Bhatt S., Pandey D. Molecular modifications by regulating cAMP signaling and oxidant-antioxidant defence mechanisms, produce antidepressant-like effect: A possible mechanism of etazolate aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rat model // *Neurochem Int.* – 2017. – Vol. 111. – P. 3-11.
121. Johansson B. Chromatographic separation of lactalbumin from human milk whey on calcium phosphate columns // *Nature.* – 1958. – Vol. 181. – P. 996–997.
122. Johnson E.E., Wessling-Resnick M. Iron metabolism and the innate immune response to infection // *Microbes and Infection.* – 2012. – Vol. 14, № 3. – P. 207–216.
123. Kaech S., Banker G. Culturing hippocampal neuron // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1. – P. 2406–2415.
124. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease // *The Lancet.* – 2015. – Vol. 386, № 9996. – P. 896–912.
125. Kamemori N., Takeuchi T., Sugiyama A., Miyabayashi M., Kitagawa H., Shimizu H., Ando K., Harada E. Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats // *J Vet Med Sci.* – 2008. – Vol. 70, № 3. – P. 313–315.
126. Kang J.F., Li X.L., Zhou R.Y., Li L.H., Feng F.J., Guo X.L. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species // *Biochem Genet.* – 2008. – Vol. 46, № 5-6. – P. 312-22.
127. Kanyshkova T.G., Babina S.E., Semenov D.V., Isaeva N., Vlassov A.V., Neustroev K.N., Kul'minskaya A.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin // *Eur J Biochem.* – 2003. – Vol. 270, № 16. – P. 3353-3361.

128. Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Skalny A. Laser correlation spectroscopy: nutritional, ecological and toxic aspects // Biophysics ed. A N Misra (InTech). – 2012. – P. 1-16.
129. Kawamata T., Tooyama I., Yamada T., Walker D.G., McGeer P.L. Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain // Am J Pathol. – 1993. – Vol. 142, № 5. – P. 1574-1585.
130. Kelder M.E., Kaul A., Nowicki B., Findley W.E., Hutchens T.W., Nagamani M. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium // Am J Reprod Immunol. – 1996. – Vol. 36, № 5. – P. 243-247.
131. Kim C.H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis // J Blood Med. – 2010. – Vol. 1. – P. 13-19.
132. Knight J.A. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders // Ann Clin Lab Sci. – 1997. – Vol. 27, № 1. – P. 11–25.
133. Kolacheva A.A., Ugrumov M.V. Dopamine synthesis as a mechanism of brain plasticity in nigrostriatal system pathology // Dokl Biochem Biophys. – 2018. – Vol. 479, № 1. – P. 83–86.
134. Kopaeva M.Y., 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.
135. Kopaeva M.Y., 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.
136. Kopaeva M.Y., 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.
137. Kumar V., Hassan M.I., Kashav T., Singh T.P., Yadav S. Heparin-binding proteins of human seminal plasma: purification and characterization // Mol Reprod Dev. – 2008. – Vol. 75, № 12. – P. 1767–1774.
138. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function // Biochem Cell Biol. – 2006. – Vol. 84, № 3. – P. 282–290.

139. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2549-2559.
140. Legrand D., Vigié K., Said E.A., Ellass E., Masson M., Slomianny M.C., Carpentier M., Briand J.P., Mazurier J., Hovanessian A.G. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells // *Eur J Biochem.* – 2004. – Vol. 271, № 2. – P. 303-317.
141. Lepanto M.S., Rosa L., Paesano R., Valenti P., Cutone A. Lactoferrin in aseptic and septic inflammation // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, № 7. – P. 1323.
142. Levay P.F., Viljoen M. Lactoferrin: a general review // *Haematologica.* – 1995. – Vol. 80, № 3. – P. 252–267.
143. Leveugle B., Mazurier J., Legrand D., Mazurier C., Montreuil J., Spik G. Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation // *Eur J Biochem.* – 1993. – Vol. 213, № 3. – P. 1205-1211.
144. Leveugle B., Spik G., Perl D.P., Bouras C., Fillit H.M., Hof P.R. The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis // *Brain Res.* – 1994. – Vol. 650, № 1. – P. 20-31.
145. Leveugle B., Faucheux B.A., Bouras C., Nillesse N., Spik G., Hirsch E.C., Agid Y., Hof P.R. Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases // *Acta Neuropathol.* – 1996. – Vol. 91, № 6. – P. 566–572.
146. Li Y.Q., Guo C. A review on lactoferrin and central nervous system diseases // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 1810.
147. Li Z.T., Wang L.M., Yi L.R., Jia C., Bai F., Peng R.J., Yu Z.Y., Xiong G.L., Xing S., Shan Y.J., Yang R.F., Dong J.X., Cong Y.W. Succinate ester derivative of δ -tocopherol enhances the protective effects against ^{60}Co γ -ray-induced hematopoietic injury through granulocyte colony-stimulating factor induction in mice // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 40380.
148. Li Y., Limmon G.V., Imani F., Teng C. Induction of lactoferrin gene expression by innate immune stimuli in mouse mammary epithelial HC-11 cells // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91, № 1. – P. 58–67.
149. Liao Y., Lopez V., Shafizadeh T.B., Halsted C.H., Lönnerdal B. Cloning of a pig homologue of the human lactoferrin receptor: expression and localization during

- intestinal maturation in piglets // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* – 2007. – Vol. 148, № 3. – P. 584-590.
150. 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. – Vol. 93, № 8. – P. 793-802.
151. Liu D., Wang X., Zhang Z., Teng C.T. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 301, № 2. – P. 472-479.
152. Liu H., Wu H., Zhu N., Xu Z., Wang Y., Qu Y., Wang J. Lactoferrin protects against iron dysregulation, oxidative stress, and apoptosis in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease in mice // *J Neurochem.* – 2020. – Vol. 152, № 3. – P. 397–415.
153. Lönnerdal B., Jiang R., Du X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* – 2011. – Vol. 53, № 6. – P. 606-614.
154. Maier D.M., Landauer M.R. Onset of behavioral effects in mice exposed to 10 Gy ⁶⁰Co radiation // *Aviat Space Environ Med.* – 1990. – Vol. 61, № 10. – P. 893-898.
155. Maiti P., Al-Gharaibeh A., Kolli N., Dunbar G.L.. Solid lipid curcumin particles induce more DNA fragmentation and cell death in cultured human glioblastoma cells than does natural curcumin // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 9656719.
156. Mancinelli R., Olivero F., Carpino G., Overi D., Rosa L., Lepanto M.S., Cutone A., Franchitto A., Alpini G., Onori P., Valenti P., Gaudio E. Role of lactoferrin and its receptors on biliary epithelium // *Biometals.* – 2018. – Vol. 31, № 3. – P. 369-379.
157. Mandillo S., Tucci V., Hölter S. M., Meziane H., Banhaabouchi M. A., Kallnik M., Lad H. V., Nolan P. M., Ouagazzal A.-M., Coghill E. L., Gale K., Golini E., Jacquot S., Krezel W., Parker A., Riet F., Schneider I., Marazziti D., Auwerx J., Brown S. D. M., Chambon P., Rosenthal N., Tocchini-Valentini G., Wurst W. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study // *Physiol Genomics.* – 2008. – Vol. 34, № 3. - P. 243–255.
158. Masson P.L., Heremans J.F., Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes // *J Exp Med.* – 1969. – Vol. 130, № 3. – P. 643-658.

159. Masutani M., Nozaki T., Nakamoto K., Nakagama H., Suzuki H., Kusuoka O., Tsutsumi M., Sugimura T. The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents // *Mutat Res.* – 2000. – Vol. 462, № 2-3. – P. 159-166.
160. Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., Levy E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. – Vol. 24, № 14. – P. 813-836.
161. Mengual E., Pickel V.M. Regional and subcellular compartmentation of the dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in the rat ventral pallidum // *J Comp Neurol.* – 2004. – Vol. 468, № 3. – P. 395-409.
162. Metz-Boutigue M.H., Jollès J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J., Jollès P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins // *Eur J Biochem.* – 1984. – Vol. 145, № 3. – P. 659-676.
163. Michalopoulos G.K., Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – Vol. 18, № 1. – P. 40-55.
164. Mika A., Gaffney M., Roller R., Hills A., Bouchet C.A., Hulen K.A., Thompson R.S., Chichlowski M., Berg B.M., Fleshner M. Feeding the developing brain: Juvenile rats fed diet rich in prebiotics and bioactive milk fractions exhibit reduced anxiety-related behavior and modified gene expression in emotion circuits // *Neurosci Lett.* – 2018. – Vol. 677. – P. 103-109.
165. Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S. Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk // *Biochim Biophys Acta.* – 1960. – Vol. 45. – P. 413–421.
166. 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. – Vol. 55, № 2. – P. 277-282.
167. Ochoa T.J., Noguera-Obenza M., Ebel F., Guzman C.A., Gomez H.F., Cleary T.G. Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli* // *Infect Immun.* – 2003. – Vol. 71, № 9. – P. 5149-5155.
168. 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. – Vol. 15, № 1. – P. 1003-1013.

169. Omata Y., Satake M., Maeda R., Saito A., Shimazaki K., Yamauchi K., Uzuka Y., Tanabe S., Sarashina T., Mikami T. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin // *J Vet Med Sci.* – 2001. – Vol. 63, № 2. – P. 187-190.
170. On Protection of Animals Used for Scientific Purposes: Education and Training; Framework National Competent Authorities for the Implementation of Directive 2010/63/EU on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes // Brussels. 19–20 February 2014. – Текст: электронный. – URL: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/education_training/en.pdf (дата обращения: 05.05.2022).
171. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives // *Biometals.* – 2004. - Vol. 17, № 3. - P. 189–196.
172. Penco S., Scarfi S., Giovine M., Damonte G., Millo E., Villaggio B., Passalacqua M., Pozzolini M., Garrè C., Benatti U. Identification of an import signal for, and the nuclear localization of, human lactoferrin // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2001. – Vol. 34, № 3. – P. 151-159.
173. Perry R.B., Rishal I., Doron-Mandel E., Kalinski A.L., Medzihradzsky K.F., Terenzio M., Alber S., Koley S., Lin A., Rozenbaum M., Yudin D., Sahoo P.K., Gomes C., Shinder V., Geraisy W., Huebner E.A., Woolf C.J., Yaron A., Burlingame A.L., Twiss J.L., Fainzilber M. Nucleolin-mediated RNA localization regulates neuron growth and cycling cell size // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16, № 6. – P. 1664-1676.
174. Peslak S.A., Wenger J., Bemis J.C., Kingsley P.D., Koniski A.D., McGrath K.E., Palis J. EPO-mediated expansion of late-stage erythroid progenitors in the bone marrow initiates recovery from sublethal radiation stress // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, № 12. – P. 2501-2511.
175. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur J Pharmacol.* – 2003. – Vol. 463, № 1-3. – P. 3-33.
176. Rascón-Cruz Q., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Nakamura-Bencomo S.I., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. Lactoferrin: a glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 205.
177. Ratledge C., Dover L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria // *Annu Rev Microbiol.* – 2000. – Vol. 54. – P. 881-941.

178. Reisz J.A., Bansal N., Qian J., Zhao W., Furdui C.M. Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 260-292.
179. Rekatsina M., Paladini A., Piroli A., Zis P., Pergolizzi J.V., Varrassi G. Pathophysiology and therapeutic perspectives of oxidative stress and neurodegenerative diseases: a narrative review // *Adv Ther.* – 2020. – Vol. 37, № 1. – P. 113-139.
180. Resende R., Pereira C., Agostinho P., Vieira A.P., Malva J.O., Oliveira C.R. Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1143. – P. 11-21.
181. Roberts S.A., Spreadborough A.R., Bulman B., Barber J.B., Evans D.G., Scott D. Heritability of cellular radiosensitivity a marker of low penetrance predisposition genes in breast cancer? // *Am J Hum Genet.* – 1999. – Vol. 65, № 3. – P. 784-794.
182. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13, № 3. – P. 267-276.
183. Rosa A.I., Duarte-Silva S., Silva-Fernandes A., Nunes M.J., Carvalho A.N., Rodrigues E., Gama M.J., Rodrigues C.M.P., Maciel P., Castro-Caldas M. Tauroursodeoxycholic acid improves motor symptoms in a mouse model of Parkinson's disease // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55, № 12. – P. 9139–9155.
184. Rousseau E., Michel P.P., Hirsch E.C. The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 84, № 6. – P. 888–898.
185. Rozas G., López-Martín E., Guerra M.J., Labandeira-García J.L. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism // *J Neurosci Methods.* – 1998. – Vol. 83, № 2. – P. 165–175.
186. Sánchez L., Calvo M., Brock J.H. Biological role of lactoferrin // *Arch Dis Child.* – 1992. – Vol. 67, № 5. – P. 657-661.
187. Saporito M.S., Brown E.M., Miller M.S., Carswell S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in vivo // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1999. – Vol. 288, № 2. – P. 421–427.
188. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein

- V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat Methods*. – 2012. – Vol. 9, №7. – P. 676–682.
189. Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. Temporal control of immediate early gene induction by light // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4, № 12. – P. e8185.
190. Schwarting, R.K.W., Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G.W., Huston, J.P. Strain-dependent recovery of open-field behavior and striatal dopamine deficiency in the mouse MPTP model of Parkinson's disease // *Neurotox Res*. – 1999. – Vol. 1, № 1. – P. 41–56.
191. Sedelis M., Schwarting R.K., Huston J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Behav Brain Res*. – 2001. – Vol. 125, № 1-2. – P. 109–125.
192. Seed T.M. Radiation protectants: current status and future prospects // *Health Phys*. – 2005. – Vol. 89, № 5. – P. 531-545.
193. Selzner N., Selzner M., Odermatt B., Tian Y., Van Rooijen N., Clavien P.A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice // *Gastroenterology*. – 2003. – Vol. 124, № 3. – P. 692-700.
194. Shimaoka S., Hamaoka H., Inoue J., Asanuma M., Tooyama I., Kondo Y. Lactoferrin-like immunoreactivity in distinct neuronal populations in the mouse central nervous system // *Acta Med Okayama*. – 2021. – Vol. 75, № 2. – P.153-167.
195. Siebert P.D., Huang B.C. Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94, № 6. – P. 2198–2203.
196. Silva A.P., Malva J.O., Ambrósio A.F., Salgado A.J., Carvalho A.P., Carvalho C.M. Role of kainate receptor activation and desensitization on the $[Ca^{2+}]_i$ changes in cultured rat hippocampal neurons // *J Neurosci Res*. – 2001. – Vol. 65, № 5. – P. 378-386.
197. Simonian N.A., Coyle J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 1996. – Vol. 36. – P. 83-106.
198. Soares F.A., Dalla Corte C.L., Andrade E.R., Marina R., González P., Barrio J.P. Purple grape juice as a protector against acute x-irradiation induced alterations on mobility, anxiety, and feeding behaviour in mice // *Nutr Hosp*. – 2014. – Vol. 29, № 4. – P. 812-821.

199. Sørensen M., Sørensen S.P.L. The proteins in whey // CR Trav Lab Carlsberg. – 1939. – Vol. 23. – P. 55-99.
200. Spagnuolo P.A., Hoffman-Goetz L. Dietary lactoferrin does not prevent dextran sulfate sodium induced murine intestinal lymphocyte death // Exp Biol Med (Maywood). – 2008. – Vol. 233, № 9. – P. 1099-1108.
201. Sundström E., Fredriksson A., Archer T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease // Brain Res. – 1990.- Vol. 528, № 2. – P. 181–188.
202. Superti F. Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life // Nutrients. – 2020. – Vol. 12, № 9. – P. 2562.
203. Suzuki Y. A., Lönnerdal B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin // Biochem Cell Biol. – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 75–80.
204. Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function // Cell Mol Life Sci. – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2560–75.
205. Suzuki Y.A., Wong H., Ashida K.Y., Schryvers A.B., Lönnerdal B. The N1 domain of human lactoferrin is required for internalization by caco-2 cells and targeting to the nucleus // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47, № 41. – P. 10915-20.
206. Sykes J.A., Thomas M.J., Goldie D.J., Turner G.M. Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis // Clin Chim Acta. – 1982. – Vol. 122, № 3. – P. 385-393.
207. Takayama Y., Takahashi H., Mizumachi K., Takezawa T. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced collagen gel contractile activity of human fibroblasts // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, № 24. – P. 22112-22118.
208. Takeuchi T., Jyonotsuka T., Kamemori N., Kawano G., Shimizu H., Ando K., Harada E. Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats // Exp Physiol. – 2006. – Vol. 91, № 6. – P. 1033-1040.
209. Tammam S.N., Azzazy H.M.E., Lamprecht A. Nuclear and cytoplasmic delivery of lactoferrin in glioma using chitosan nanoparticles: Cellular location dependent-action of lactoferrin // Eur J Pharm Biopharm. – 2018. – Vol. 129. – P. 74-79.
210. Teng C.T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview // Biochem Cell Biol. – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 7-16.

211. Thorne R.G., Lakkaraju A., Rodriguez-Boulan E., Nicholson C. In vivo diffusion of lactoferrin in brain extracellular space is regulated by interactions with heparan sulfate // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2008. - Vol. 105, № 24. - P. 8416-8421.
212. Tooyama I., Kawamata T., Akiyama H., Kimura H., Moestrup S.K., Gliemann J., Matsuo A., McGeer P.L. Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain // *Brain Res*. - 1995. - Vol. 691, № 1-2. - P. 235-238.
213. Trentini A., Maritati M., Rosta V., Cervellati C., Manfrinato M.C., Hanau S., Greco P., Bonaccorsi G., Bellini T., Contini C. Vaginal lactoferrin administration decreases oxidative stress in the amniotic fluid of pregnant women: an open-label randomized pilot study // *Front Med (Lausanne)*. - 2020. - Vol. 7. - P. 555.
214. Troost F.J., Steijns J., Saris W.H., Brummer R.J. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults // *J Nutr*. - 2001. - Vol. 131, № 8. - P. 2101-2104.
215. Tuccari G., Barresi G. Lactoferrin in human tumours: immunohistochemical investigations during more than 25 years // *Biometals*. - 2011. - Vol. 24, № 5. - P. 775-784.
216. Valenti P., Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack // *Cell Mol Life Sci*. - 2005. - Vol. 62, № 22. - P. 2576-2587.
217. 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. - Vol. 79, № 2. - P. 140-143.
218. Van Snick J.L., Masson P.L. The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells // *J Exp Med*. - 1976. - Vol. 144, № 6. - P. 1568-1580
219. Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.F. The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation // *J Exp Med*. - 1974. - Vol. 140, № 4. - P. 1068-1084.
220. van Veen H.A., Geerts M.E., van Berkel P.H., Nuijens J.H. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis // *Eur J Biochem*. - 2004. - Vol. 271, № 4. - P. 678-684.
221. van Vugt H., van Gool J., Ladiges N.C., Boers W. Lactoferrin in rabbit bile: its relation to iron metabolism // *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. - 1975. - Vol. 60, № 2. - P. 79-88.
222. Vila M., Ramonet D., Perier C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues // *J Neurochem*. - 2008. - Vol. 107, № 2. - P. 317-328.

223. Volinsky E., Lazmi-Hailu A., Cohen N., Adani B., Faroja M., Grunewald M., Gorodetsky R. Alleviation of acute radiation-induced bone marrow failure in mice with human fetal placental stromal cell therapy // *Stem Cell Res Ther.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 337.
224. Wang J., Bi M., Liu H., Song N., Xie J. The protective effect of lactoferrin on ventral mesencephalon neurons against MPP + is not connected with its iron binding ability // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 10729.
225. Wang S., Hyun J., Youn B., Jung Y. Hedgehog signaling regulates the repair response in mouse liver damaged by irradiation // *Radiat Res.* – 2013. – Vol. 179, № 1. – P. 69-75.
226. Wang B. Molecular determinants of milk lactoferrin as a bioactive compound in early neurodevelopment and cognition // *J Pediatr.* – 2016. – Vol. 173, Suppl. – P. S29-S36.
227. Ward P.P., Mendoza-Meneses M., Cunningham G.A., Conneely O.M. Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin // *Mol Cell Biol.* – 2003. – Vol. 23, № 1. – P. 178-185
228. Ward P.P., Mendoza-Meneses M., Mulac-Jericevic B., Cunningham G.A., Saucedo-Cardenas O., Teng C.T., Conneely O.M. Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development // *Endocrinology.* – 1999. – Vol. 140, № 4. – P. 1852-1860.
229. Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2540-2548.
230. Ward P.P., Conneely O.M. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection // *Biometals.* – 2004. – Vol. 17, № 3. – P. 203–208.
231. Wei Y.L., Xu J.Y., Zhang R., Zhang Z., Zhao L., Qin L.Q. Effects of lactoferrin on X-ray-induced intestinal injury in Balb/C mice // *Appl Radiat Isot.* – 2019. – Vol. 146. – P. 72-77.
232. Weiss J.F., Landauer M.R. Radioprotection by antioxidants // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 44-60.
233. Wolber F.M., Leonard E., Michael S., Orschell-Traycoff C.M., Yoder M.C., Srour E.F. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system // *Exp Hematol.* – 2002. – Vol. 30, № 9. – P. 1010-1019.

234. Wolf J.S., Li D., Taylor R.J., O'Malley B.W. Jr. Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck // *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* – 2003. – Vol. 65, № 5. – P. 245-249.
235. Wrackmeyer U., Hansen G.H., Seya T., Danielsen E.M. Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45, № 30. – P. 9188-9197.
236. Xu S.F., Zhang Y.H., Wang S., Pang Z.Q., Fan Y.G., Li J.Y., Wang Z.Y., Guo C. Lactoferrin ameliorates dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in MPTP-treated mice // *Redox Biol.* – 2019. – Vol. 21. – P. 101090.
237. Xu Z., Cawthon D., McCastlain K.A., Slikker W.Jr., Ali S.F. Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP // *Synapse.* – 2005. – Vol. 55, № 1. – P. 45-51.
238. Yanaihara A., Toma Y., Saito H., Yanaihara T. Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells // *Mol Hum Reprod.* – 2000. – Vol. 6, № 5. – P. 469-473.
239. Yin H., Cheng L., Holt M., Hail N.Jr., Maclaren R., Ju C. Lactoferrin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 51, № 3. – P. 1007-1016.
240. You L.H., Li F., Wang L., Zhao S.E., Wang S.M., Zhang L.L., Zhang L.H., Duan X.L., Yu P., Chang Y.Z. Brain iron accumulation exacerbates the pathogenesis of MPTP-induced Parkinson's disease // *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 284. – P. 234-246.
241. Youn J.K., Kim D.W., Kim S.T., Park S.Y., Yeo E.J., Choi Y.J., Lee H.-R., Kim D.-S., Cho S.-W., Han K.H., Park J., Eum W.S., Hwang H.S., Choi S.Y. PEP-1-HO-1 prevents MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in a Parkinson's disease mouse model // *BMB Reports.* – 2014. – Vol. 47, № 10. – P. 569–574.
242. Yuan H., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease // *J Neurosci Methods.* – 2005. – Vol. 144, № 1. – P. 35-45.
243. Zarzosa-Moreno D., Avalos-Gómez C., Ramírez-Texcalco L.S., Torres-López E., Ramírez-Mondragón R., Hernández-Ramírez J.O., Serrano-Luna J., de la Garza M. Lactoferrin and its derived peptides: an alternative for combating virulence mechanisms developed by pathogens // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25, № 24. – P. 5763.

244. Zecca L., Youdim M.B., Riederer P., Connor J.R., Crichton R.R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders // *Nat Rev Neurosci.* – 2004. – Vol. 5, № 11. – P. 863–873.
245. Zhang Y.H., Wang D.W., Xu S.F., Zhang S., Fan Y.G., Yang Y.Y., Guo S.Q., Wang S., Guo T., Wang Z.Y., Guo C. α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 14. – P. 535-548.
246. Zhang Y., Lou F., Wu W., Dong X., Ren J., Shen Q. Determination of bovine lactoferrin in food by HPLC with a heparin affinity column for sample preparation // *J AOAC Int.* – 2017. – Vol. 100, № 1. – P. 133–138.
247. Ziere G.J., van Dijk M.C., Bijsterbosch M.K., van Berkel T.J. Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues // *J Biol Chem.* – 1992. – Vol. 267, № 16. – P. 11229-11235.
248. Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells // *Immunology.* – 1995. – Vol. 86, № 1. – P. 122-127.