

А.В. Родина<sup>1</sup>, О.В. Высоцкая<sup>1</sup>, А.С. Жирник<sup>1</sup>, О.Д. Смирнова<sup>1</sup>, А.А. Парфёнова<sup>1</sup>,  
А.Н. Стрепетов<sup>1</sup>, Ю.П. Семочкина<sup>1</sup>, М.В. Нестеренко<sup>2</sup>, Е.Ю. Москалева<sup>1</sup>

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА ПОСЛЕ $\gamma$ , $n$ -ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ МЫШЕЙ И МОДИФИКАЦИЯ УРОВНЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛАКТОФЕРРИНА

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup>ООО «Лактобио», Москва

Контактное лицо: Елизавета Юрьевна Москалева, e-mail: moskalevaey@mail.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Исследование влияния  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей на повреждение клеток мозга, поведение и когнитивные функции и изучение возможности снижения пострadiационных нарушений в мозге при введении лактоферрина (ЛФ).

**Материал и методы:** Облучение головы мышей проводили в пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного реактора ИР-8. Клетки головного мозга контрольных и облученных мышей выделяли с использованием перколлы. Нейроны и клетки покоящейся и активированной микроглии анализировали с использованием флуоресцентно меченных антител при проточной цитометрии. Уровень двунитевых разрывов (ДР) ДНК в нейронах определяли по содержанию гистона  $\gamma$ H2AX. Уровень экспрессии генов цитокинов в гиппокампе исследовали с помощью ОТ/ПЦР. Для анализа поведения и когнитивных функций использовали тесты «открытое поле», «водный лабиринт Морриса» и «распознавание нового объекта». ЛФ выделяли из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии с последующей доочисткой на аффинном сорбенте гепарин-сефарозе.

**Результаты:**  $\gamma$ ,  $n$ -Облучение головы мышей в дозе 1,5 Гр приводило к повышению уровня ДР ДНК в нейронах. Через 24 ч снижалось общее количество клеток и количество нейронов в выделенной фракции, но не клеток микроглии. Количество клеток покоящейся и активированной микроглии через 3–72 ч после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения не изменялось. Уровень экспрессии генов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр повышался, что свидетельствует о развитии нейровоспаления. В этот период у облученных мышей показано повышение тревожности и нарушение пространственной и эпизодической памяти. Однократное в/б введение мышам ЛФ человека сразу после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы не влияло на изученные пострadiационные нарушения, но приводило к снижению уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 и повышению экспрессии гена противовоспалительного цитокина TGF $\beta$  в гиппокампе через 2 мес после воздействия. Полученные результаты свидетельствуют о частичном снижении уровня нейровоспаления в гиппокампе облученных животных, получавших ЛФ.

**Заключение:**  $\gamma$ ,  $n$ -Облучение головы мышей в дозе 1,5 Гр приводит к повреждению нейронов и снижению их количества. Клетки микроглии более устойчивы к облучению. В отдаленный период после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы у мышей развивается нейровоспаление, регистрируемое по повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе, повышение тревожности и нарушение когнитивных функций. Однократное введение ЛФ приводит к частичному снижению уровня нейровоспаления, но не влияет на остальные исследованные показатели. Необходима оптимизация схемы использования ЛФ для сохранения когнитивных функций после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения мозга.

**Ключевые слова:** головной мозг, нейроны, микроглия, активированная микроглия, двунитевые разрывы, ДНК, нейтроны, гамма-кванты, локальное облучение, мыши, лактоферрин

**Для цитирования:** Родина А.В., Высоцкая О.В., Жирник А.С., Смирнова О.Д., Парфёнова А.А., Стрепетов А.Н., Семочкина Ю.П., Нестеренко М.В., Москалева Е.Ю. Характеристика повреждения мозга после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей и модификация уровня нейровоспаления при введении лактоферрина // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 2. С. 21–28. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-2-21-28

A.V. Rodina<sup>1</sup>, O.V. Vysotskaya<sup>1</sup>, A.S. Zhirnik<sup>1</sup>, O.D. Smirnova<sup>1</sup>, A.A. Parfenova<sup>1</sup>,  
A.N. Strepetov<sup>1</sup>, Yu.P. Semochkina<sup>1</sup>, M.V. Nesterenko<sup>2</sup>, E.Yu. Moskaleva<sup>1</sup>

## Features of Brain Damage after Gamma-Neutron Irradiation of the Head and Modification of the Damage by Lactoferrin

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

LLC “Laktobio”, Moscow, Russia

Contact person: E.Yu. Moskaleva, e-mail: moskalevaey@mail.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** To investigate the effect of  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation of the mice head on the brain cells damage, behavior and cognition, and to examine the possibility of using lactoferrin (LF) to alleviate radiation-induced impairments.

**Material and methods:** Mice heads were irradiated in a beam of neutrons and gamma rays from the IR-8 nuclear reactor. The brain cells of control and irradiated mice were isolated using Percoll. Neurons and resting and activated microglia cells were analyzed using the fluorescently labeled antibodies and flow cytometry. The level of DNA double-strand breaks in neurons was determined by  $\gamma$ H2AX histone content. Cytokine gene expression in the hippocampus was studied by RT-PCR. Behavior and cognitive functions were studied using the open field, Morris water maze and novel object recognition tests. LF was isolated from female colostrum by preparative ion-exchange chromatography and purified by affinity chromatography on heparin-sepharose.

**Results:**  $\gamma$ ,  $n$ -Irradiation of the mice head at a dose of 1.5 Gy led to an increase in the level of DNA double-strand breaks in neurons. Twenty-four hours after irradiation the total number of cells and the number of neurons in the isolated fraction of brain cells decreased, but the number of microglial cells remained unchanged. The number of resting and activated microglia did not change within 3–72 h after  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation. The expression level of the TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 genes increased 2 months after  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation of the mice head at a dose of 1.5 Gy, indicating the development of neuroinflammation. At this time, irradiated mice demonstrated the anxiety-like behavior and impaired spatial and recognition memory. A single i.p. administration of human LF to mice immediately after  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation of the head did not affect the observed radiation-induced disturbances, but decreased the gene expression levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 pro-inflammatory cytokines and increased the gene expression level of TGF $\beta$  anti-inflammatory cytokine in the hippocampus 2 months after radiation exposure. The obtained results indicate a partial decrease in the level of hippocampal neuroinflammation of irradiated animals treated with LF.

**Conclusion:**  $\gamma$ ,  $n$ -Irradiation of the mice head at a dose of 1.5 Gy leads to DNA damage of neurons and the decrease in the number of neurons. Microglia cells are more resistant to such radiation exposure. Late after head-only  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation, mice develop neuroinflammation, which is detected by an increase in the pro-inflammatory cytokine gene expression in the hippocampus and also by anxiety-like behavior and impaired cognitive functions. A single LF administration leads to a partial decrease in the neuroinflammation level, but does not affect the other studied parameters. The optimal dosing regimen of LF remains to be determined to preserve cognitive functions after  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation of the brain.

**Keywords:** brain, neurons, microglia, activated microglia, double-strand breaks, DNA, neutrons, photons, local irradiation, mice, lactoferrin

**For citation:** Rodina AV, Vysotskaya OV, Zhirnik AS, Smirnova OD, Parfenova AA, Strepetov AN, Semochkina YuP, Nesterenko MV, Moskaleva EYu. Features of Brain Damage after Gamma-Neutron Irradiation of the Head and Modification of the Damage by Lactoferrin. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(2):21–28. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-2-21-28

## Введение

Нейтронная лучевая терапия в России имеет 35-летний успешный опыт лечения радиорезистентных опухолей [1–3]. Её преимущество в терапии резистентных опухолей головы и шеи, щитовидной железы и рецидивов рака молочной железы в сравнении с фотонной терапией показано как при комбинированном использовании, так и в виде самостоятельного метода лечения по критериям достигаемой резорбции опухоли, продолжительности безрецидивного периода и 5-летней выживаемости пациентов. Разовая очаговая доза смешанного  $\gamma$ ,  $n$ -излучения при нейтронной терапии составляла от 1,2 до 2,4 Гр, суммарная доза – до 16–60 изоГр [4].

Эффективность действия нейтронов определяется высоким коэффициентом ОБЭ и, в отличие от  $\gamma$ -излучения, не зависит от присутствия кислорода и поэтому одинакова для гипоксических и оксигенированных клеток, и одинакова для разных стадий клеточного цикла [1, 5]. Кроме того, к преимуществам терапии с использованием нейтронов относится высокая чувствительность опухолевых стволовых клеток к этому типу излучения, в отличие от  $\gamma$ -излучения, что было показано на примере клеток меланомы [6] и аденокарциномы молочной железы [7].

В то же время из-за высокой ОБЭ нейтронов возможно более тяжелое повреждение нормальных тканей, в частности, повреждение мозга при облучении опухолей в области головы и шеи, что может приводить к развитию когнитивных нарушений в отдаленный период после воздействия. В основе этих нарушений лежит повреждение клеток мозга как в результате радиационного воздействия, так и под действием факторов развивающегося в отдаленный период нейровоспаления, обусловленного активацией клеток микроглии, затем астроцитов и секрецией этими клетками провоспалительных цитокинов [8].

Клетки микроглии выполняют защитные функции, распознавая и фагоцитируя различные патогены, погибающие клетки и фрагменты миелина. Кроме того, эти клетки участвуют в процессах ремоделирования и устранения ненужных синапсов, в регуляции нейрогенеза, в ремоделировании сосудистой сети и секретируют нейротрофины, оказывая нейропротективное действие [9]. Клетки покоящейся микроглии имеют большое количество разветвленных отростков, и их идентифицируют как клетки с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>. При активации они приобретают амебоидную или округлую форму и фенотип CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> и начинают секретировать активные метаболиты кислорода, провоспалительные

цитокины и хемокины, инициируя развитие нейровоспаления [8]. Клетки активированной микроглии могут непосредственно повреждать нейроны с участием системы комплемента [10, 11]. Одним из показателей развития нейровоспаления, который коррелирует с появлением когнитивных нарушений у мышей, является повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе – области активного нейрогенеза в мозге [12]. Поэтому анализ состояния микроглии и уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов может быть использован для характеристики признаков нейровоспаления в отдаленный период после облучения.

Актуальным является также поиск препаратов, которые позволили бы предотвратить или снизить развитие нейровоспаления и когнитивных нарушений после облучения мозга при действии излучений разных типов. Перспективным препаратом для этих целей представляется лактоферрин (ЛФ) – полифункциональный глобулярный гликопротеин из семейства трансферринов с молекулярной массой около 80 кДа, который обладает антибактериальной и противовирусной активностью, противовоспалительным, иммунорегулирующим и радиозащитным действием [13–15]. Повышение выживаемости животных и более быстрое восстановление кроветворения было показано даже при однократном внутривентральном введении ЛФ мышам сразу после  $\gamma$ -облучения в сублетальной дозе [14].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния реакторного  $\gamma$ ,  $n$ -излучения на степень повреждения клеток мозга, на поведение и когнитивные функции мышей после облучения головы и изучение возможности снижения пострадиационных нарушений в мозге с помощью ЛФ.

Для этого проводили исследование степени повреждения ДНК и количества нейронов, анализировали состояние микроглии, экспрессию генов про- и противовоспалительных цитокинов в наиболее радиочувствительной области мозга – гиппокампе, оценивали поведение и когнитивные функции мышей после облучения головы и изучали возможность снижения пострадиационных нарушений в мозге в отдаленный период при введении мышам сразу после облучения ЛФ человека.

## Материал и методы

### Лабораторные животные

В экспериментах использовали 60 мышей самцов линии C57Bl/6 в возрасте 7–8 нед, массой 18–21 г, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в

стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № НГ-1/109ПР от 13.02.2020). При исследовании поведения и когнитивных функций в каждой экспериментальной группе было по 12–15 животных, при остальных исследованиях – по 6–8 животных.

#### **Облучение и расчёт доз облучения**

Облучение головы мышей в дозе 1,5 Гр проводили в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного реактора ИР-8. Условия облучения и расчёт поглощённых доз подробно изложены в работе [16]. Плотность нейтронного потока, приведённая к 1 МВт мощности реактора, равнялась  $(4,4 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$ , энергетический диапазон нейтронов – от 0,5 эВ до 10 МэВ. Энергетический диапазон гамма-квантов составлял от 0,1 до 4,0 МэВ. В разных сериях облучения мощность реактора менялась от 4,5 до 6,5 МВт. В этом диапазоне плотности нейтронного и гамма-потоков пропорциональны мощности реактора. Расчётная (с использованием программного пакета Geant4) мощность поглощённой в образце дозы, приведённая к 1 МВт мощности реактора, равнялась  $0,6 \pm 0,1 \text{ Гр/ч}$ . Из них  $0,2 \text{ Гр/ч}$  обусловлено облучением нейтронами, а  $0,4 \text{ Гр/ч}$  – гамма-квантами.

#### **Режим введения ЛФ мышам**

В работе использовали лактоферрин (ООО «Лактобио», Россия), выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии с последующей доочисткой на аффинном сорбенте гепарин-сефарозе. По результатам ВЭЖХ гомогенность полученного белкового препарата составляла 97 %. Препарат вводили животным внутрибрюшинно в  $0,4 \text{ мл}$  физиологического раствора с концентрацией ЛФ  $10 \text{ мг/мл}$  ( $4 \text{ мг/мышь}$ ) однократно сразу после облучения. Контрольным мышам вводили  $0,4 \text{ мл}$  физиологического раствора, не содержащего препарат.

#### **Выделение клеток из головного мозга мышей и их фенотипирование**

Выделение клеток из головного мозга контрольных и облученных мышей проводили, как описано ранее [17]. Для каждого срока исследования одновременно анализировали мозг контрольных и облученных животных. Для идентификации клеток микроглии клетки головного мозга окрашивали антителами к CD11b, конъюгированными с фикоэритрином (BioLegend, США), и к CD45, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (BioLegend, США). Клетки покоящейся и активированной микроглии идентифицировали как субпопуляции  $\text{CD11b}^+/\text{CD45}^{\text{low}}$  и  $\text{CD11b}^+/\text{CD45}^{\text{high}}$  соответственно после двойного окрашивания антителами к CD11b и к CD45. Кроме того, для определения активированной микроглии анализировали количество  $\text{TSPO}^+$  клеток. Их фиксировали в растворе 2 % формальдегида в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывали ФСБ и пермеабелизировали в ФСБ, содержащем 0,1 % Triton X-100 и 1 % бычьего сывороточного альбумина в течение 30 мин. Далее образцы окрашивали антителами к  $\text{TSPO}$  18 кДа, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Abcam, США) при комнатной температуре в течение 45 мин, после чего дважды отмывали в ФСБ. Долю клеток активированной микроглии рассчитывали в процентах от общего количества микроглии. Флуоресценцию кле-

ток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США), оснащённом аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и диодным красным лазером с длиной волны 635 нм (Ресурсный центр молекулярной и клеточной биологии).

#### **Анализ уровня двунитевых разрывов ДНК в нейронах**

Уровень двунитевых разрывов (ДР) ДНК в нейронах определяли по увеличению содержания в клетках маркера ДР ДНК гистона  $\gamma\text{H2AX}$ , зрелые нейроны идентифицировали по присутствию белка NeuN. Для окрашивания клеток антителами к внутриклеточным антигенам NeuN и  $\gamma\text{H2AX}$  клетки фиксировали в растворе 2 % параформальдегида в ФСБ при комнатной температуре, отмывали ФСБ и пермеабелизировали в ФСБ, содержащем 0,1 % Triton X-100 и 1 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), в течение 30 мин. Иммуоцитохимическое окрашивание белков  $\gamma\text{H2AX}$  и NeuN в суспензии клеток проводили в блокирующем буфере (ФСБ, содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина) с использованием прямых моноклональных антител к  $\gamma\text{H2AX}$ , конъюгированных с Alexa Fluor 488 (BD Pharmingen, США), в разведении 1:200 и мышинных моноклональных антител к мышинному белку NeuN (Merck, Германия) в разведении 1:200 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы трижды отмывали в ФСБ и окрашивали вторичными козьими антителами против мышинного иммуноглобулина, мечеными Alexa Fluor 647 (Biolegend, США), в разведении 1:1000 в течение 1 ч при комнатной температуре, затем образцы трижды отмывали в ФСБ. Для измерения использовали не менее 300 тыс. клеток на пробу в виде суспензии в ФСБ. В каждом образце анализировали 10000 клеток. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria Fusion (BD Biosciences, США), оснащённом диодными лазерами с длинами волн 355 нм, 405 нм, 488 нм, 561 нм, 640 нм (Ресурсный центр молекулярной и клеточной биологии).

#### **Анализ экспрессии мРНК генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе мышей**

Анализ экспрессии мРНК исследуемых генов в гиппокампе мышей проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, как описано ранее [18]. Уровень экспрессии мРНК генов исследуемых цитокинов в гиппокампе измеряли относительно экспрессии конститутивного гена  $m\text{GAPDH}$ , которая в образцах контрольной и облучённой группы мышей была одинакова. Анализ результатов проводили с использованием программы Bio-Rad CFX Manager 2.0.

#### **Анализ поведения и когнитивных функций мышей**

Для анализа поведения, пространственной памяти и эпизодической памяти контрольных и облученных животных использовали тесты «открытое поле», «водный лабиринт Морриса» и «распознавание нового объекта» соответственно, которые проводили, как описано ранее в [18]. Индекс распознавания, характеризующий степень предпочтения нового объекта в тесте «распознавание нового объекта», рассчитывали по формуле: индекс распознавания = (время исследования нового объекта – время исследования знакомого объекта) / (время исследования нового объекта + время исследования знакомого объекта).



**Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы OriginPro 9.1. При оценке статистической значимости различий использовали t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Для оценки повреждения нейронов мозга при облучении головы мышей в дозе 1,5 Гр анализировали уровень образования ДР ДНК в этих клетках после выделения суспензии клеток мозга с использованием градиента перколла. В качестве маркера ДР ДНК анализировали уровень гистона  $\gamma$ H2AX. Полученные результаты представлены на рис. 1.

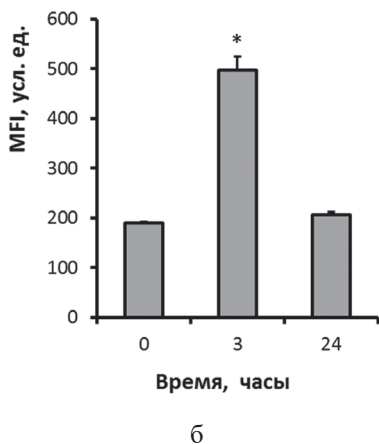
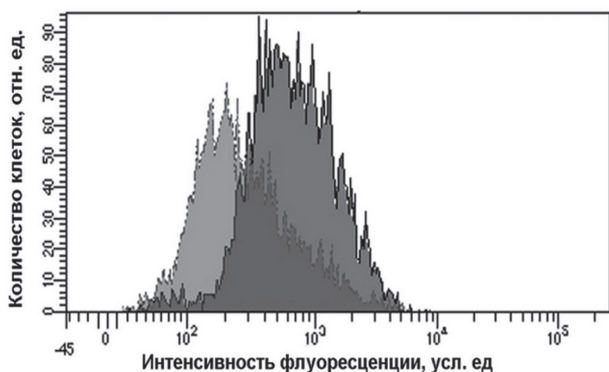


Рис. 1. Содержание гистона  $\gamma$ H2AX в нейронах мозга мышей после  $\gamma$ , n-облучения головы в дозе 1,5 Гр. а – гистограмма аутофлуоресценции и флуоресценции  $\gamma$ H2AX<sup>+</sup> клеток (левый и правый пик соответственно); б – средняя интенсивность флуоресценции (MFI)  $\gamma$ H2AX в контрольных и облученных клетках через 3 и 24 ч после воздействия; \* – изменения статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

Fig. 1. Histone  $\gamma$ H2AX in mouse brain neurons after  $\gamma$ , n-irradiation of the head at a dose of 1.5 Gy. а – histogram of autofluorescence and fluorescence of  $\gamma$ H2AX<sup>+</sup> cells (left and right peaks, respectively); б – mean fluorescence intensity (MFI) of  $\gamma$ H2AX in control and irradiated cells 3 and 24 h after exposure; \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$

Показано, что через 3 ч после воздействия MFI нейронов возрастает в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1б), а через 24 ч этот показатель возвращается к уровню контроля, что свидетельствует о достаточно высокой активности процессов репарации ДР ДНК в ней-

ронах. Близкий уровень увеличения и восстановления MFI обнаружен и при  $\gamma$ -облучении культивируемых нейральных [19] и мезенхимальных [20] стволовых клеток мыши. В то же время необходимо отметить, что полное восстановление ДР ДНК, регистрируемое по восстановлению MFI нейронов через 24 ч после облучения, нельзя рассматривать как свидетельство полной репарации ДР ДНК, поскольку чувствительность проточной цитометрии недостаточна для регистрации остаточных повреждений ДНК, идентифицировать которые можно только при определении количества фокусов  $\gamma$ H2AX при использовании флуоресцентной микроскопии, как показано в цитированных выше и ряде других работ. Поэтому вопрос о длительности сохранения остаточных повреждений ДНК в нейронах мозга при этих условиях  $\gamma$ , n-облучения нуждается в дальнейшем исследовании.

$\gamma$ , n-Облучение головы мышей приводило к снижению общего количества клеток и количества нейронов, выделяемых из мозга мышей через 24 ч после облучения животных (табл. 1).

Таблица 1

Количество клеток мозга и количество нейронов, выделенных через 24 ч после  $\gamma$ , n-облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр  
The number of brain cells and the number of neurons isolated 24 hours after  $\gamma$ , n-irradiation of the head of mice at a dose of 1.5 Gy

Группа	Количество клеток, млн	Количество нейронов, млн
Контроль	4,3±0,2	3,4±0,2
Облучение	3,2±0,1*	2,3±0,1*

Примечание: \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

При анализе состояния микроглии в динамике после облучения головы в дозе 1,5 Гр показано (рис. 2), что клетки микроглии устойчивы к этой дозе, и количество клеток покоящейся и активированной микроглии значимо не ме-

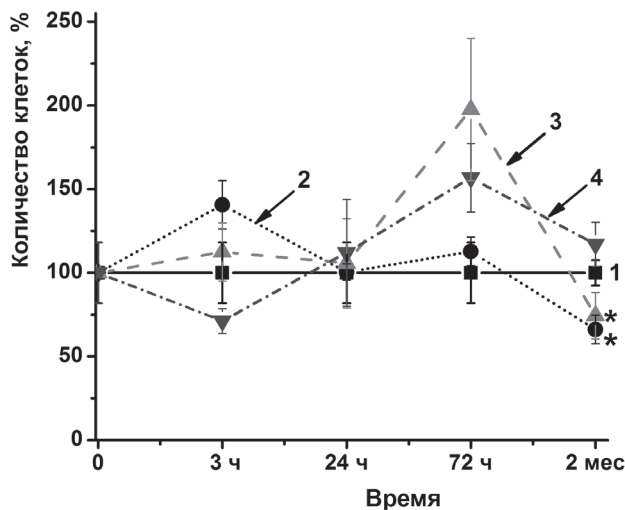


Рис. 2. Динамика изменения содержания клеток покоящейся CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> (2) и активированной CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> (3) микроглии и доли активированной микроглии (4) в препаратах клеток мозга после  $\gamma$ , n-облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр по сравнению с контрольными препаратами (1), полученными из мозга необлученных мышей. \* – изменения статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

Fig. 2. Changes in the content of resting CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> (2) and activated CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> (3) microglia and in the proportion of activated microglia (4) in brain samples obtained from mice after head  $\gamma$ , n-irradiation at a dose of 1.5 Gy compared with control samples (1) obtained from the brains of non-irradiated mice. \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$

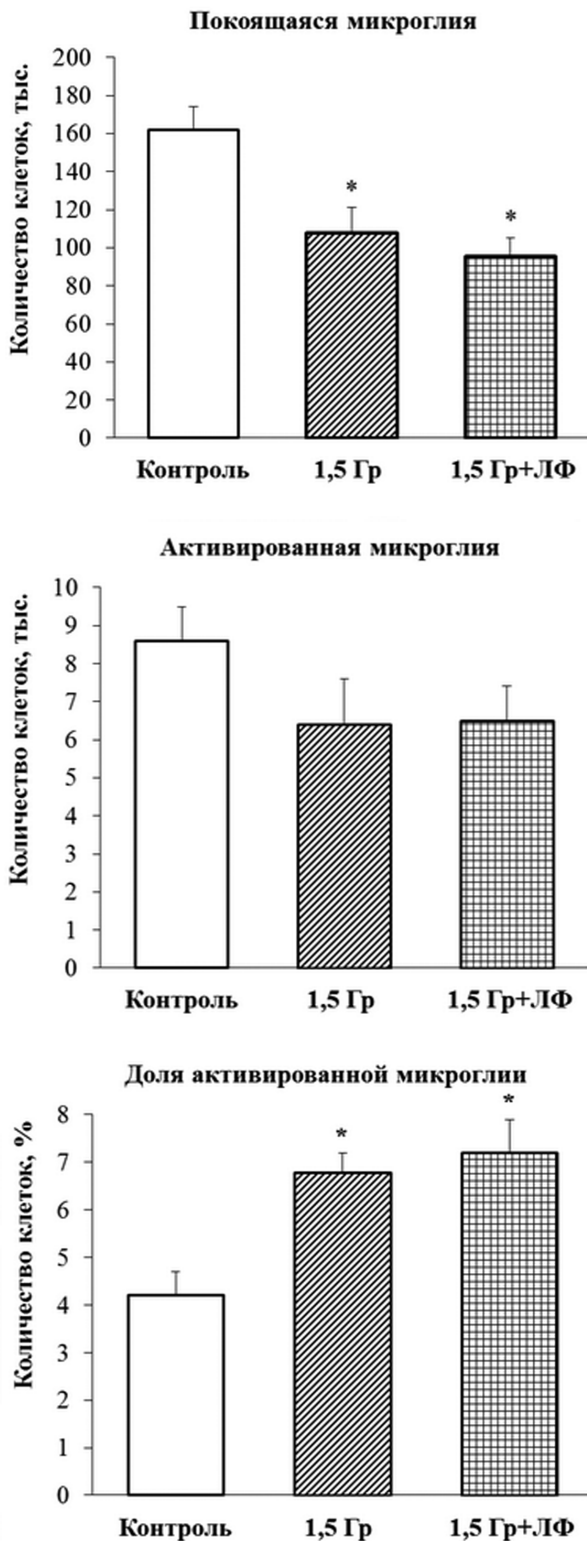


Рис. 3. Содержание клеток покоящейся CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> и активированной CD11b<sup>+</sup>/TSPO<sup>+</sup> микроглии и доля активированной микроглии в препаратах клеток мозга контрольных и облученных мышей через 2 мес после облучения головы в дозе 1,5 Гр или облучения головы и в/б введения ЛФ сразу после воздействия. \* – изменения статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

Fig. 3. The content of resting CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> and activated CD11b<sup>+</sup>/TSPO<sup>+</sup> microglia and the proportion of activated microglia in brain samples of control and irradiated mice 2 months after irradiation of the head at a dose of 1.5 Gy or irradiation of the head and the intraperitoneal administration of LF immediately after exposure. \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$

няется в период 3–72 ч после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения, что свидетельствует о более высокой устойчивости клеток микроглии к  $\gamma$ ,  $n$ -облучению по сравнению с нейронами, количество которых в выделенной фракции клеток снижалось на 25,6 % уже через 24 ч после такого воздействия.

В то же время в отдаленный период – через 2 мес после облучения – обнаружено статистически значимое снижение количества клеток и покоящейся, и активированной микроглии (рис. 2, кривые 2 и 3). Повышение доли активированной микроглии при её анализе как клеток с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> не было статистически значимым (рис. 2, кривая 4), но было достоверным при определении клеток активированной микроглии как клеток с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/TSPO<sup>+</sup>. Изменения состояния микроглии через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения при введении ЛФ обнаружено не было (рис. 3).

Использование определения молекулы TSPO в качестве более чувствительного маркера активированной микроглии позволило констатировать, что через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр имеет место статистически значимое повышение доли активированной микроглии, что может свидетельствовать о развитии нейровоспаления в этих условиях. Поэтому далее было проведено исследование уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе мышей через 2 мес после облучения и после облучения и введения ЛФ.

Показано (рис. 4), что через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр обнаружено статистически значимое повышение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, в то время как уровень экспрессии генов цитокинов TGF $\beta$  и IL-4 не отличается от контроля (рис. 4, столбики 1), что свидетельствует о развитии воспаления в этот период. Введение ЛФ сразу после облучения головы мышей нейтронами через 2 мес после воздействия приводило к снижению экспрессии генов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 и статистически значимому повышению уровня экспрессии гена TGF $\beta$  (рис. 4, столбики 2). Экспрессия генов IL-1 $\beta$  и IL-6 снижалась до уровня контроля. Уровень экспрессии гена TNF $\alpha$  также снижался, но отличия от уровня, на-

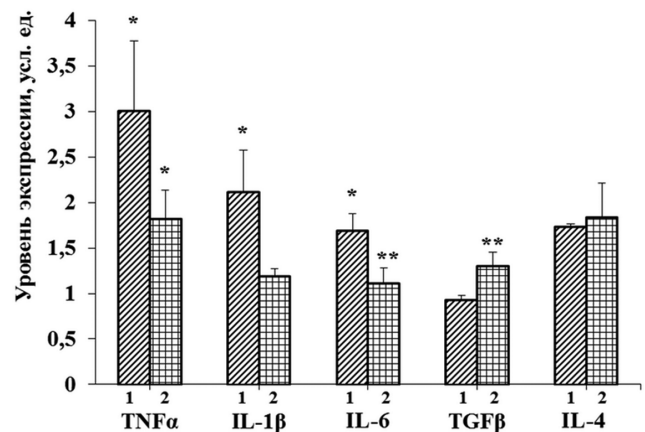


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в гиппокампе через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр (1) и после облучения и в/б введения ЛФ сразу после воздействия (2). \* – изменения статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – изменения статистически значимы по сравнению с облучением без введения ЛФ,  $p < 0,05$

Fig. 4. Relative levels of cytokine gene expression in the hippocampus of mice 2 months after head  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation at a dose of 1.5 Gy (1) and after irradiation and the intraperitoneal administration of LF immediately after exposure (2). \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$ ; \*\* – differences are significant compared to irradiation without the intraperitoneal administration of LF

блюдаемого у облученных мышей, были статистически мало значимы. Таким образом, однократное введение ЛФ способствовало частичному, но не полному снижению признаков нейровоспаления.

Для того, чтобы оценить патофизиологическую роль наблюдаемых провоспалительных изменений в мозге после облучения головы мышей нейтронами и гамма-квантами, исследовали поведение мышей и состояние их когнитивных функций через 2 мес после облучения и после облучения и введения ЛФ. В табл. 2 приведены результаты исследования поведения мышей. Показано, что облучение головы мышей приводило к увеличению времени пребывания в пристеночной зоне и уменьшению времени, проведенного в промежуточной зоне, что указывает на повышение тревожности мышей через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр. Количество стоек у облученных мышей не отличалось от контроля. В группе мышей, которым сразу после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в/б вводили 4 мг ЛФ человека, время, проведенное в пристеночной и в промежуточной зоне, не отличалось от контроля, но обнаружено статистически значимое снижение количества стоек.

Таблица 2

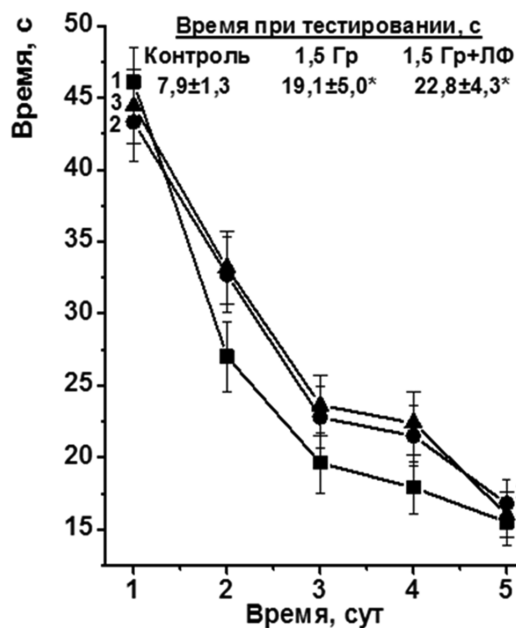
**Параметры поведения мышей в тесте «открытое поле» через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр и в/б введения ЛФ**  
**Parameters of mice behavior in the «open field» test 2 months after  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation of the head at a dose of 1.5 Gy and intraperitoneal administration of LF**

Группа	Контроль	$\gamma$ , $n$ -облучение 1,5 Гр	$\gamma$ , $n$ -облучение 1,5 Гр + ЛФ	
Общий пройденный путь, см	2918,9±183,8	2889,2±166,7	2502,0±197,8	
Средняя скорость, см/с	9,7±0,6	9,6±0,6	8,4±0,7	
Время пребывания, с	в пристеночной зоне	177,6±8,8	205,9±8,0*	197,6±10,8
	в промежуточной зоне	89,0±7,3	67,3±5,1*	72,6±6,8
	в центральной зоне	33,4±3,2	26,8±4,1	29,9±6,8
Количество стоек, ед.	25±3	24±3	15±2*	

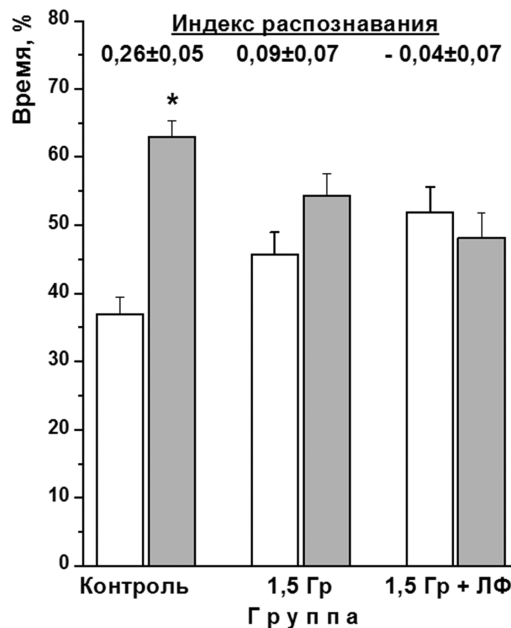
**Примечание:** \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Результаты исследования обучения и пространственной памяти мышей в тесте «водный лабиринт Морриса» и эпизодической памяти в тесте «распознавание нового объекта» представлены на рис. 5а и 5б соответственно. Показано, что облученные животные демонстрировали схожую с контролем динамику обучения в тесте «водный лабиринт Морриса», оцениваемую по времени достижения платформы (рис. 5а, линии 1 и 2), но при тестировании через 24 ч после окончания обучения время достижения платформы было значимо выше у облученных мышей (рис. 5а, вставка). Полученные результаты свидетельствуют о развитии нарушений пространственной памяти через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы мышей в дозе 1,5 Гр. Введение ЛФ сразу после облучения головы мышей не привело к нормализации состояния пространственной памяти (рис. 5а, линия 3 и вставка).

На рис. 5б показано, что при исследовании эпизодической памяти в тесте «распознавание нового объекта» через 24 ч после обучения контрольные мыши демонстрировали большее время обследования нового объекта в сравнении со знакомым (63,0±2,4 % и 37,0±2,4 % соответственно) в отличие от мышей, подвергавшихся воздействию  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр (54,3±3,3 % и 45,7±3,3 % для нового и знакомого объектов соответственно). Индекс распознавания, харак-



а



б

Рис. 5. Анализ состояния пространственной (а) и эпизодической (б) памяти контрольных (1) и облученных мышей в тестах «водный лабиринт Морриса» (а) и «распознавание нового объекта» (б) через 2 мес после  $\gamma$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр (2) и после облучения и в/б введения ЛФ сразу после воздействия (3). \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Fig. 5. Analysis of spatial (a) and recognition memory (b) of control (1) and irradiated mice using «Morris water maze» (a) and «novel object recognition» (b) 2 months after head  $\gamma$ ,  $n$ -irradiation at a dose of 1.5 Gy (2) and after irradiation and the intraperitoneal administration of LF immediately after exposure (3). \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$

теризующий степень предпочтения нового объекта, у облученной группы был снижен (рис. 5б, вставка). Полученные данные указывают на развитие нарушений долговременной эпизодической памяти у мышей через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр. В группе мышей, которым сразу после облучения головы вводили препарат ЛФ, эти показатели составили 45,7±3,3 %



и  $54,3 \pm 3,3$  % для нового и знакомого объектов соответственно, а индекс распознавания был также снижен (рис. 5б, вставка). Таким образом, обнаруженные нарушения эпизодической памяти после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр сохранялись и у тех животных, которым вводили ЛФ.

Сравнивая обнаруженное влияние  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы в дозе 1,5 Гр и  $\gamma$ -облучения головы в дозе 2,0 Гр [17] на поведение животных, следует отметить, что, несмотря на меньшую величину дозы,  $\gamma$ ,  $n$ -облучение вызывало более глубокие изменения в поведении (табл. 2) и когнитивных функциях у животных (рис. 5а и 5б). При этом воздействии обнаружено повышение тревожности облученных мышей и снижение пространственной и эпизодической памяти, в то время как при  $\gamma$ -облучении головы животных в дозе 2,0 Гр нарушения когнитивных функций через 2 мес после воздействия отсутствовали [17]. Выше было указано, что при  $\gamma$ ,  $n$ -облучении на долю нейтронов приходилась только 1/3 дозы [16], то есть 0,5 Гр, что свидетельствует о высокой чувствительности мозга к этому типу излучения. В настоящей работе не исследовано повреждение эндотелиальных клеток кровеносных сосудов мозга и состояния ГЭБ при  $\gamma$ ,  $n$ -облучении мозга животных в дозе 1,5 Гр, хотя такие нарушения могли бы вносить весомый вклад в развитие нейровоспаления и нарушение когнитивных функций. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

При исследовании влияния ЛФ на изученные показатели состояния клеток мозга, уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов и когнитивные функции после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения обнаружено снижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6 до значений контроля, хотя уровень TNF $\alpha$  не достигал контроля, и повышение экспрессии противовоспалительного цитокина TGF $\beta$ , что свидетельствует о частичном снижении уровня нейровоспаления в гиппокампе облученных животных, получавших ЛФ. Необходимо отметить, что в работе было исполь-

зовано только однократное внутривентриальное введение ЛФ мышам сразу после облучения. И, хотя такая схема была выбрана в связи с тем, что при этих условиях было показано повышение выживаемости животных и более быстрое восстановление кроветворения [14], полученные нами результаты свидетельствуют о том, что использованной дозы ЛФ недостаточно для сохранения когнитивных функций при  $\gamma$ ,  $n$ -облучении мозга. Учитывая, что даже при этих условиях обнаружено снижение нейровоспаления при введении ЛФ, представляется целесообразным разработку схемы применения ЛФ до и после облучения при сочетании его внутривентриального и интраназального введения для предотвращения развития пострадиационных когнитивных нарушений.

### Заключение

Реакторное  $\gamma$ ,  $n$ -облучение головы мышей в дозе 1,5 Гр – разовой дозе, которая используется при лучевой терапии опухолей нейтронами, – приводит к повреждению ДНК нейронов и снижению их количества через сутки после воздействия. Клетки микроглии более устойчивы к  $\gamma$ ,  $n$ -облучению. В отдаленный период – через 2 мес после  $\gamma$ ,  $n$ -облучения головы – у мышей развивается нейровоспаление, регистрируемое по повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе и повышению доли активированной микроглии в мозге, а также повышение тревожности животных и нарушение когнитивных функций. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности мозга к  $\gamma$ ,  $n$ -облучению и необходимости максимальной защиты головного мозга при нейтронной лучевой терапии опухолей в области головы и шеи.

Однократное введение ЛФ приводило к частичному снижению уровня нейровоспаления, но не влияло на остальные исследованные показатели. Необходима оптимизация схемы использования ЛФ для создания способа медикаментозной защиты клеток мозга и сохранения когнитивных функций в случае облучения мозга.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гулидов И.А., Асланиди И.П. О состоянии и перспективах развития дистанционной нейтронной терапии // Вопросы онкологии. 2014. Т.60, № 4. С. 408–412.
2. Мусабаева Л.И., Лисин В.А., Старцева Ж.А., Грибова О.В., Великая В.В., Мельников А.А. Нейтронная терапия на циклотроне U-120. К 30-летию применения нейтронной терапии – обзор результатов научных исследований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2013. Т.58, № 2. С. 53–61.
3. Великая В.В., Старцева Ж.А., Лисин В.А., Гольдберг В.Е., Попова Н.О. Адывантная нейтронная терапия в комплексном лечении больных первично-метастатическим раком молочной железы // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Т.67, № 5. С. 64–68. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-5-64-68.
4. Мусабаева Л.И., Чойнзонов Е.Л., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Великая В.В., Лисин В.А. Нейтронная терапия в лечении радиорезистентных злокачественных новообразований // Сибирский онкологический журнал. 2016. Т.15, № 3. С. 67–71. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-3-67-71.
5. Walenta S., Mueller-Klieser W. Differential Superiority of Heavy Charged-Particle Irradiation to X-Rays: Studies on Biological Effectiveness and Side Effect Mechanisms in Multicellular Tumor and Normal Tissue Models // Front Oncol. 2016. No. 6. P. 30. DOI: 10.3389/fonc.2016.00030.
6. Матчук О.Н., Замулаева И.А., Селиванова Е.И., Липунов Н.М., Пронюшкина К.А., Ульяненко С.Е. и др. Чувствительность клеток SP линии меланомы В16 к действию редко- и плотной ионизирующего излучений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т.52, № 3. С. 261–267.
7. Shuvatova V.G., Semochkina Y.P., Strepetov A.N., Moskaleva E.Y. Sensitivity of MCF-7 Mammosphere CSCs to Neutron Radiation // Journal of Cancer Metastasis and Treatment. 2022. V.8, No. 5. P. 23. DOI: 10.20517/2394-4722.2022.29.
8. Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., et al. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury // Mol. Neurobiol. 2017. V.54, No. 2. P. 1022–1032. DOI: 10.1007/s12035-015-9628-x.
9. Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology // J. Neuroimmune Pharmacol. 2013. V.8, No. 3. P. 494–509. DOI: 10.1007/s11481-013-9434-z.
10. Thompson K.K., Tsirka S.E. The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity // Int. J. Mol. Sci. 2017. V.18, No. 3. P. 504. DOI: 10.3390/ijms18030504.
11. Kalm M., Andreasson U., Bjork-Eriksson T., Zetterberg H., Pekny M., Blennow K., et al. C3 Deficiency Ameliorates the Negative Effects of Irradiation of the Young Brain on Hippocampal Development and Learning // Oncotarget. 2016. V.7, No. 15. P. 19382–19394. DOI: 10.18632/oncotarget.8400.
12. Rodina A.V., Semochkina Y.P., Vysotskaya O.V., Romantsova A.N., Strepetov A.N., Moskaleva E.Y. Low Dose Gamma Irradiation Pretreatment Modulates the Sensitivity of CNS to Subsequent Mixed Gamma and Neutron Irradiation of the Mouse Head // Int. J. Radiat. Biol. 2021. V.97, No. 7. P. 926–942. DOI: 10.1080/09553002.2021.1928787.
13. 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. V.16, No. 4. P. 3143–3148. DOI: 10.3892/etm.2018.6570.
14. Kopaeva M.Y., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Demorzi M.S., Nesterenko M.V., Zarayskaya I.Y., et al. New Properties of a Well-Known Antioxidant: Pleiotropic Effects of Human Lactoferrin in Mice Exposed to Gamma Irradiation in a Sublethal Dose // Antioxidants (Basel). 2022. V.11, No. 9. P. 1833. DOI: 10.3390/antiox11091833.
15. Иванов А.А., Уланова А.М., Дешевой Ю.Б., Мальцев В.Н. Пат. 2294755 Рос. Федерация, МПК А61К38/40, А61Р7/06, А61Р37/02, А61Н5/10. Средство лечения лучевой болезни. Заявитель и патен-

- тообладатель ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА Рос-  
сии. № RU2294755C1; заявл. 21.06.2005; опубл. 10.03.2007, Бюл.  
№ 7. – 6 с.
16. Arzumov S.S., Safronov V.V., Strepetov A.N. Determination of a Dose Absorbed in a Biological Sample under Mixed Gamma–Neutron Irradiation // *Technical Physics*. 2018. V.63, No. 10. P. 1533–1536. DOI: 10.1134/S1063784218100031.
  17. Жирник А.С., Смирнова О.Д., Семочкина Ю.П., Шибаева К.Д., Родина А.В., Ратушняк М.Г. и др. Нарушение когнитивных функций и развитие нейровоспаления в отдаленный период после однократного  $\gamma$ -облучения головы мышей // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021. Т.61, № 1. С. 32–43. DOI: 10.31857/S0869803121010112.
  18. Жирник А.С., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В., Смирнова О.Д., Ратушняк М.Г. и др. Когнитивные нарушения и состояние глиальных клеток мозга в отдаленный период после гамма-облучения головы мышей // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2022. Т.67, № 5. С. 10–17. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-5-10-17. 23.
  19. Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., Абишева А.А., Москалева Е.Ю. Чувствительность культивируемых нейральных стволовых клеток мыши к действию ионизирующего излучения // *Цитология*. 2019. Т.61, № 10. С. 806–816. DOI: 10.1134/S0041377119100067.
  20. Москалева Е.Ю., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. Влияние облучения на мезенхимальные стволовые клетки костного и головного мозга мыши и их способность индуцировать опухоли // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017. Т.57, № 3. С. 245–256. DOI: 10.7868/S0869803117030018.

## REFERENCES

1. Gulidov I.A., Aslanidi I.P. On the State and Prospects of Development of Remote Neutron Therapy. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2014;60;4:408–412 (In Russ.).
2. Musabayeva L.I., Lisin V.A., Startseva Zh.A., Gribova O.V., Velikaya V.V., Melnikov A.A. Neutron Therapy at the U-120 Cyclotron. On the Occasion of the 30th Anniversary of the Use of Neutron Therapy - a Review of the Results of Scientific Research. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2013;58;2:53–61 (In Russ.).
3. Velikaya V.V., Startseva Zh.A., Lisin V.A., Goldberg V.Ye., Popova N.O. Adjuvant Neutron Therapy in Combined Modality Treatment of Patients with Primary-Metastatic Breast Cancer. *Medical radiology and radiation safety*. 2022;67;5:64–68. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-5-64-68 (In Russ.).
4. Musabayeva L.I., Choyzonov Ye.L., Gribova O.V., Startseva Zh.A., Velikaya V.V., Lisin V.A. Neutron Therapy in the Treatment of Radioresistant Malignant Tumors. *Sibirskiy Onkologicheskii Zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2016;15(3):67–71. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-3-67-71. (In Russ.).
5. Walenta S., Mueller-Klieser W. Differential Superiority of Heavy Charged-Particle Irradiation to X-Rays: Studies on Biological Effectiveness and Side Effect Mechanisms in Multicellular Tumor and Normal Tissue Models. *Front Oncol*. 2016;6:30. DOI: 10.3389/fonc.2016.00030.
6. Matchuk O.N., Zamulayeva I.A., Selivanova Ye.I., Lipunov N.M., Pronyushkina K.A., Ulyanenko S.Ye., et al. Sensitivity of Melanoma B16 Side Population to Low- and High-LET Radiation. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2012;52;3:261–267 (In Russ.).
7. Shuvatova V.G., Semochkina Y.P., Strepetov A.N., Moskaleva E.Y. Sensitivity of MCF-7 Mammosphere CSCs to Neutron Radiation. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2022;8;5:23. DOI: 10.20517/2394-4722.2022.29.
8. Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., et al. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury. *Mol. Neurobiol*. 2017;54;2:1022–1032. DOI: 10.1007/s12035-015-9628-x.
9. Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8;3:494–509. DOI: 10.1007/s11481-013-9434-z.
10. Thompson K.K., Tsirka S.E. The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18;3:504. DOI: 10.3390/ijms18030504.
11. Kalm M., Andreasson U., Bjork-Eriksson T., Zetterberg H., Pekny M., Blennow K., et al. C3 Deficiency Ameliorates the Negative Effects of Irradiation of the Young Brain on Hippocampal Development and Learning. *Oncotarget*. 2016;7;15:19382–19394. DOI: 10.18632/oncotarget.8400.
12. Rodina A.V., Semochkina Y.P., Vysotskaya O.V., Romantsova A.N., Strepetov A.N., Moskaleva E.Y. Low Dose Gamma Irradiation Pre-treatment Modulates the Sensitivity of CNS to Subsequent Mixed Gamma and Neutron Irradiation of the Mouse Head. *Int. J. Radiat. Biol*. 2021;97;7:926–942. DOI: 10.1080/09553002.2021.1928787.
13. 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;16;4:3143–3148. DOI: 10.3892/etm.2018.6570.
14. Kopaeva M.Y., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Demorzhi M.S., Nesterenko M.V., Zarayskaya I.Y., et al. New Properties of a Well-Known Antioxidant: Pleiotropic Effects of Human Lactoferrin in Mice Exposed to Gamma Irradiation in a Sublethal Dose. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11;9:1833. DOI: 10.3390/antiox11091833.
15. Ivanov A.A., Ulanova A.M., Deshevoy Yu.B., Maltsev V.N. *Sredstvo Lecheniya Luchevoj Bolezni = Treatment for Radiation Sickness*. Pat. № RU2294755C1 Russia. 2007 (In Russ.).
16. Arzumov S.S., Safronov V.V., Strepetov A.N. Determination of a Dose Absorbed in a Biological Sample under Mixed Gamma–Neutron Irradiation. *Technical Physics*. 2018;63;10:1533–1536. DOI: 10.1134/S1063784218100031.
17. Zhirnik A.S., Sмирнова О.Д., Семочкина Ю.П., Шибаева К.Д., Родина А.В., Ратушняк М.Г., et al. Cognitive Impairment and Induction of Neuroinflammation in the Late Period after Single Whole Brain  $\gamma$ -Irradiation of Mice. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2021;61;1:32–43. DOI: 10.31857/S0869803121010112 (In Russ.).
18. Zhirnik A.S., Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Vysotskaya O.V., Sмирнова О.Д., Ратушняк М.Г., et al. Cognitive Disturbances and the State of Brain Glial Cells in Mice Exposed to Fractionated Whole-Brain Irradiation. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2022;67;5:10–17. DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-5-10-17 (In Russ.).
19. Posypanova G.A., Ratushnyak M.G., Semochkina Yu.P., Abisheva A.A., Moskaleva Ye.Yu. The Sensitivity of the Cultured Murine Neural Stem Cells to the Ionizing Radiation. *Tsitologiya*. 2019;61;10:806–816. DOI: 10.1134/S0041377119100067 (In Russ.).
20. Moskaleva Ye.Yu., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. Effects of  $\gamma$ -Radiation on Mesenchymal Stem Cells from Mouse Bone Marrow and Brain and Their Ability to Induce Tumors. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2017;57;3:245–256. DOI: 10.7868/S0869803117030018 (In Russ.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** НИЦ «Курчатовский институт».

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.11.2022. **Принята к публикации:** 25.01.2023.

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

**Financing.** National Research Center “Kurchatov Institute”.

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 20.11.2022. **Accepted for publication:** 25.01.2023.