

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС
WISTAR В УСЛОВИЯХ ОПОРНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2024 г. К. В. Гордиенко^{1,*}, Н. А. Лукичёва¹, А. И. Ахметзянова², А. К. Колупаев³,
О. А. Саченков², Т. В. Балтина², Е. Р. Садчикова³, Г. Ю. Васильева¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

*E-mail: k.vl.gordienko@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 18.07.2024 г.

Изучено влияние гравитационной разгрузки (антиортостатического вывешивания) и последующего восстановления на минеральную плотность и механические свойства бедренной и большеберцовой костей крыс Wistar при пероральном приеме биотехнологического аналога лактоферрина человека (200 мг/кг), выделенного из молока коз-производителей. Минеральную плотность костей определяли методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, прочность и жесткость – исследованиями костей на трехточечный изгиб. Показано, что гравитационная разгрузка в течение 21 суток приводила к снижению минеральной плотности большеберцовой и бедренной костей. Применение лактоферрина значимо не повлияло на минеральную плотность и проекционную площадь исследуемых костей. Статистически значимых различий между экспериментальными группами по значению механической жесткости обнаружено не было, но при этом у животных после реадaptации предел прочности был значимо выше в группах, получавших лактоферрин. Полученные результаты могут свидетельствовать о перспективности применения препаратов лактоферрина в качестве средств профилактики для поддержания прочностных свойств. В то же время сохранение минеральной плотности костной ткани в дефицит-стимулирующих условиях требует рассмотрения альтернативных дозировок и способов доставки препарата.

Ключевые слова: крыса, опорная разгрузка, лактоферрин, бедренная кость, большеберцовая кость, остеоденситометрия, трехточечный изгиб

DOI: 10.31857/S0869813924080035, EDN: BCOGVV

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент известно, что костная ткань адаптируется в ответ на изменение механической нагрузки. Частичное или полное отсутствие опорной нагрузки приводит к негативным изменениям структурных и прочностных свойств костей – преимущественно в отделах скелета, участвующих в поддержании позы (пояс нижних конечностей, поясничный отдел позвоночника), что наблюдается у пациентов, нахо-

дящихся длительное время в условиях постельного режима [1, 2], участников космических полетов разной продолжительности [3–6], а также в наземных экспериментах, моделирующих факторы космических полетов [7]. Аналогичные изменения отмечены у животных после космических полетов [8–10] и после экспериментов с опорной разгрузкой [11–13].

Механизм адаптации костной ткани к опорной разгрузке до конца не изучен, что затрудняет поиск средств профилактики. Но известно, что происходит дисбаланс между костеобразованием и резорбцией [3, 13, 14].

В настоящее время ведется активный поиск профилактических немедикаментозных методов и лекарственных средств, которые позволят приостановить изменения микроархитектоники кости и потерю минеральной плотности в отдельных участках скелета при действии факторов космических полетов. Также актуальным вопросом является разработка персонализированных схем восстановления костной ткани после завершения космических полетов и возвращения космонавтов на Землю [15].

В качестве одного из потенциальных средств профилактики рассматривается полифункциональный белок лактоферрин (ЛФ). ЛФ представляет собой железосвязывающий гликопротеин семейства трансферринов, обладающий выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [16–18]. Вероятно, ЛФ воздействует на кость через систему рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора каппа В (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG), повышая выработку OPG, препятствуя тем самым созреванию остеокластов и замедляя скорость резорбции костной ткани [19–21], одновременно с этим повышая скорость костеобразования посредством увеличения популяции преостеобластов и способствуя их выживанию и пролиферации [22–24]. Система RANK/RANKL/OPG – ключевое звено костного гомеостаза. В экспериментах с опорной разгрузкой отмечается локальное повышение секреции RANKL и снижается продукция OPG, что, вероятно, приводит к дисбалансу ремоделирования [13, 25, 26]. Аналогичные результаты показаны для условий космических полетов [27, 28].

Ранее было продемонстрировано, что ЛФ эффективен при эстроген-зависимой потере костной ткани у мышей и крыс после овариоэктомии [29, 30]. Также местное применение ЛФ способствует повышению скорости регенерации костной ткани после травм [31]. Однако в условиях опорной разгрузки действие ЛФ ранее не изучалось.

Целью данного исследования было определение способности ЛФ предотвращать снижение минеральной плотности костной ткани и ее механической прочности, вызванные 21-суточным антиортостатическим вывешиванием, а также оценка влияния его применения на восстановление кости после опорной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и условия содержания

Исследования были выполнены на 48 самцах крыс линии Wistar. Масса животных до начала эксперимента составляла 226.0 ± 20.5 г. Экспериментальные группы животных содержались при температуре 18–22 °С и относительной влажности воздуха 30–70%. Освещение соответствовало сезонной продолжительности светового дня. Ограничений доступа к еде и воде не было. Эвтаназия животных проходила посредством цервикальной дислокации под ингаляционным наркозом (Изофлуран «Laboratories Karizoo, S.A.», Испания).

Экспериментальные группы и действующее вещество

Моделирование опорной разгрузки задних конечностей проводили с помощью метода антиортостатического вывешивания (АОВ) по Новикову–Ильину в модификации

Морри–Холтон [32, 33]. Длительность АОВ составила 21 день. Реадаптация двух групп животных после АОВ составила также 21 день. Помимо групп с АОВ были группы виварийного контроля, содержащиеся в тех же лабораторных условиях.

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп путем простой рандомизации (по 8 крыс в каждой группе):

Группа 1. CP ($n = 8$, виварийный контроль, получавший плацебо),

Группа 2. CL ($n = 8$, виварийный контроль, получавший ЛФ),

Группа 3. HSP ($n = 8$, животные в условиях АОВ, получавшие плацебо),

Группа 4. HSL ($n = 8$, животные в условиях АОВ, получавшие ЛФ),

Группа 5. HSPR ($n = 8$, группа с реадaptацией после АОВ, которая получала плацебо во время и после АОВ),

Группа 6. HSLR ($n = 8$, группа с реадaptацией после АОВ, получавшая ЛФ во время и после АОВ).

Биотехнологический аналог лактоферрина человека (чистота 96%, насыщение железом 14%, далее ЛФ) был предоставлен Институтом биологии гена РАН [16]. Препарат применяли в дозе 200 мг/кг. Непосредственно перед введением сухой порошок ЛФ разводили в воде комнатной температуры (250 мг ЛФ на 5.0 мл раствора). Раствор стабилен в течение часа при температуре 15–45 °С. Для упрощения перорального введения препарата до его разведения в воду добавляли пюре (1.4 г на 5.0 мл раствора) из мяса индейки (производитель «ФрутоНяня»). Смесь вводили ежедневно в одно и то же время перорально с помощью одноразового трехкомпонентного шприца (объем шприца 1.0 мл) без иглы. Плацебо – пюре из мяса индейки, разведенное в объеме воды в том же соотношении.

Введение препарата/плацебо и АОВ продолжались в течение трех недель. Далее животные из групп CP, CL, HUP и HUL подвергались эвтаназии, а животных из групп HUPR и HULR переводили в стандартные клетки, где содержали еще три недели с использованием препарата/плацебо.

Вывешенные животные содержались индивидуально, другие группы – в одной клетке на группу.

Остеоденситометрия

Забор костного материала для дальнейшего исследования проводили сразу после эвтаназии. С помощью ножниц выделяли большеберцовые и бедренные кости. Ножницами и медицинской марлей кости очищали от фрагментов мышечной ткани, после чего помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина. Остеоденситометрию левых бедренных костей (L. femur) и правых большеберцовых (R. tibia) проводили на двухэнергетическом рентгеновском денситометре (Hologic, США) в режиме Small Animal (High Resolution).

Кость размещали поперек хода рентгеновской трубки: большеберцовую – задней поверхностью к столу денситометра, бедренную – шероховатой линией. С целью уменьшения случайной погрешности проведена серия повторных измерений без изменения положения кости. Определение границ кости происходило автоматически.

Оценивали площадь ортогонально-косоугольной проекции кости (ПП, см²) и ее проекционную минеральную плотность (МПК, г/см²).

Дополнительно изображения бедренной кости были разделены в продольном направлении на три равные области. Средняя треть, представленная исключительно кортикальной костной тканью, использовалась для определения тех же показателей. Этот же участок кости подвергался механическим испытаниям.

Проведение испытаний на трехточечный изгиб

Для оценки механических свойств кортикальной кости правая бедренная кость была испытана на трехточечный изгиб, согласно описанной методике [34, 35]. Кость располагалась горизонтально передней стороной вниз, эпифизы фиксировали сплавом Вуда в стаканах экспериментальной установки УТС 110М-100 (Россия, г. Иваново). Стаканы крепились к неподвижной траверсе прессы через переходник. Нагрузка прикладывалась перпендикулярно бедренной кости по середине диафиза. Экспериментальная установка работала в режиме управления ходом с постоянной скоростью 1 мм/мин, нагружение проводилось до перелома. На основе полученных данных были рассчитаны предел прочности (МПа) и модуль Юнга (МПа).

Статистическая обработка результатов

Данные представлены как среднее значение (M) со стандартным отклонением (SD). Для расчета статистических различий между группами использовался двухфакторный дисперсионный анализ (первый фактор – прием ЛФ, второй фактор – АОВ/реадаптация). Для множественных сравнений был проведен апостериорный тест Тьюки. Для выявления взаимосвязи между показателями остеоденситометрии и исследований на трехточечный изгиб оценивали коэффициент корреляции Пирсона. Значение $p < 0.05$ считалось значимым. Все статистические тесты проводились с использованием программного обеспечения GraphPAD Prism 9 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коэффициент вариации значений ПП и МПК, полученных в 10 измерениях каждой кости, составил $3.13 \pm 1.00\%$ и $1.03 \pm 0.26\%$ для большеберцовой, $2.43 \pm 0.74\%$ и $0.89 \pm 0.26\%$ для бедренной кости соответственно. Это указывает на относительно высокую изменчивость измерений для каждой отдельной кости, но допустимую для объединения измерений одним средним/медианой. Таким образом, влияние факторов (АОВ, прием препарата, восстановление) на показатели денситометрии определялось по средним значениям десяти измерений.

Значения МПК и ПП обеих костей в группах с вывешиванием без реадаптации достоверно ниже значений этих показателей для соответствующих групп контроля и реадаптации (табл. 1). Значимых отличий по факту приема ЛФ между группами обнаружено не было.

Таблица 1. Результаты остеоденситометрии бедренной и большеберцовой кости

Группы	Большеберцовая кость		Бедренная кость	
	МПК, г/см ²	ПП, см ²	МПК, г/см ²	ПП, см ²
CP	0.20 ± 0.01	1.08 ± 0.10	0.22 ± 0.01	1.32 ± 0.10
CL	0.20 ± 0.01 ^{ns}	1.09 ± 0.07 ^{ns}	0.22 ± 0.01 ^{ns}	1.36 ± 0.08 ^{ns}
CP	0.20 ± 0.01	1.08 ± 0.10	0.22 ± 0.01	1.32 ± 0.10
HSP	0.17 ± 0.01 ^{***}	0.94 ± 0.04 ^{**}	0.19 ± 0.01 ^{***}	1.15 ± 0.07 ^{***}
CL	0.20 ± 0.01	1.09 ± 0.07	0.22 ± 0.01	1.36 ± 0.08
HSL	0.17 ± 0.01 ^{***}	0.98 ± 0.04 [*]	0.19 ± 0.01 ^{***}	1.21 ± 0.03 ^{**}
HSP	0.17 ± 0.01	0.94 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.15 ± 0.07

Окончание таблицы 1.

Группы	Большеберцовая кость		Бедренная кость	
	МПК, г/см ²	ПП, см ²	МПК, г/см ²	ПП, см ²
HSL	0.17 ± 0.01 ^{ns}	0.98 ± 0.04 ^{ns}	0.19 ± 0.01 ^{ns}	1.21 ± 0.03 ^{ns}
HSP	0.17 ± 0.01	0.94 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.15 ± 0.07
HSPR	0.20 ± 0.01 ^{***}	1.28 ± 0.14 ^{***}	0.23 ± 0.01 ^{***}	1.44 ± 0.16 ^{***}
HSL	0.17 ± 0.01	0.98 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.21 ± 0.03
HSLR	0.21 ± 0.01 ^{***}	1.23 ± 0.13 ^{***}	0.23 ± 0.01 ^{***}	1.49 ± 0.15 ^{***}
HSPR	0.20 ± 0.01	1.28 ± 0.14	0.23 ± 0.01	1.44 ± 0.16
HSLR	0.21 ± 0.01 ^{ns}	1.23 ± 0.13 ^{ns}	0.23 ± 0.01 ^{ns}	1.49 ± 0.15 ^{ns}

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, ns – статистически не значимо.

Направление изменений МПК средней трети кости (кортикальная кость) соответствовало изменениям МПК всего органа: отношение первых ко вторым было постоянным для всех групп (0.97 ± 0.03).

Значения модуля Юнга, полученные при трехточечном изгибе бедренной кости, не отличались между сравниваемыми группами ($p > 0.05$, рис. 1).

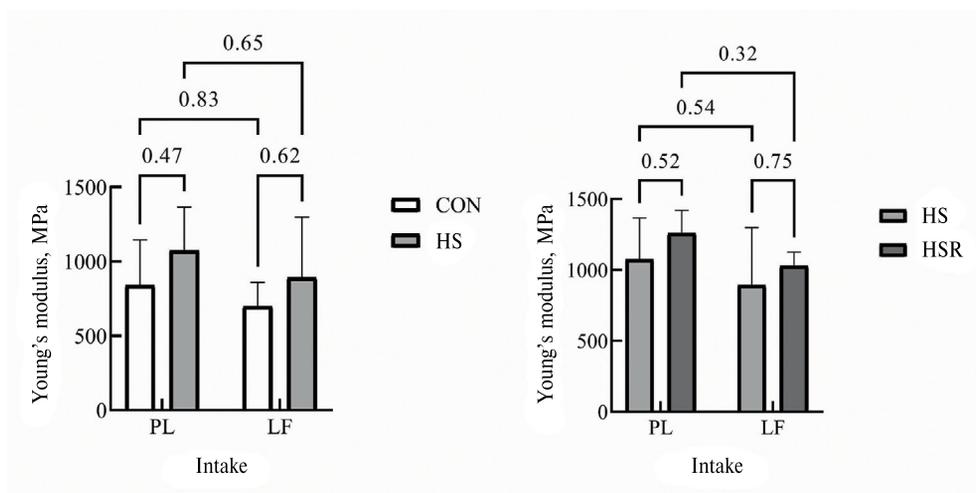


Рис. 1. Модуль Юнга. CON – контрольные группы, HS – вывешенные группы, HSR – вывешенные группы с последующей реадaptацией, PL – группы, принимающие плацебо, LF – группы, принимающие лактоферрин.

В то же время предел прочности был достоверно выше для групп CL и HSLR по отношению к группе HSL, а также для группы HSLR по отношению к HSPR (рис. 2). Различия между другими парами были незначимы.

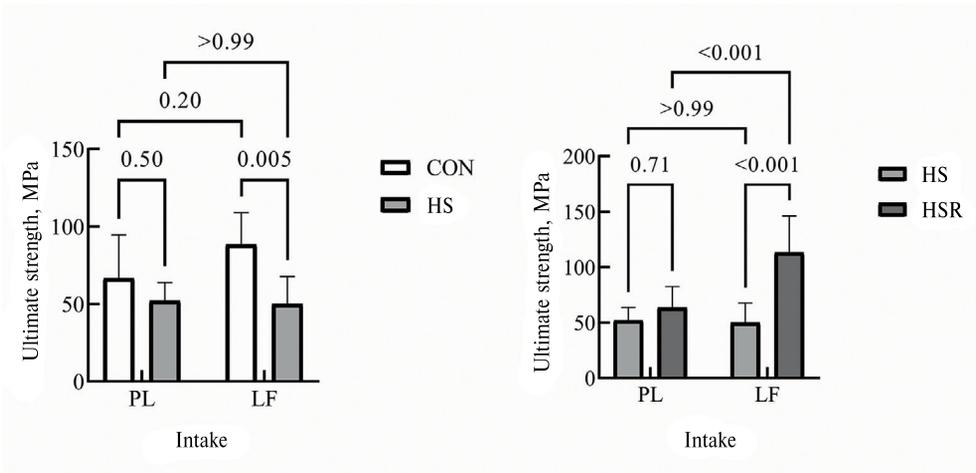


Рис. 2. Предел прочности. CON – контрольные группы, HS – вывешенные группы, HSR – вывешенные группы с последующей реадaptацией, PL – группы, принимающие плацебо, LF – группы, принимающие лактоферрин.

Статистическую связь между пределом прочности и параметрами остеоденситометрии центральной части кости можно охарактеризовать как умеренную: $r = 0.49$, 0.55 для ПП и МПК соответственно ($p < 0.001$) [36]. Связь с модулем Юнга не была обнаружена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы провели оценку ЛФ в качестве средства профилактики костных изменений в условиях опорной разгрузки. Будучи чувствительной к механическим нагрузкам, костная ткань реагирует выраженным зонспецифичным изменением минеральной составляющей. Предыдущие исследования влияния опорной разгрузки без применения профилактических средств показали, что снижение МПК происходит преимущественно в губчатом веществе кости. Это было продемонстрировано в исследованиях на грызунах в условиях АОВ разной продолжительности. Снижение трабекулярного объема костной ткани наблюдается уже на 14-е сутки воздействия [37]. За 3–4 недели АОВ потери МПК могут составлять 20–25% [11, 13]. Полученные нами результаты подтверждают, что 21-суточное АОВ приводит к значимому снижению МПК ($p < 0.05$) всей кости и кортикального вещества, в частности, что также было показано в других работах [38, 39].

Размер костей (выраженный ПП) вывешенных групп был меньше, чем у соответствующих контрольных групп ($p < 0.05$). Поскольку резорбция кортикальной кости наблюдается только со стороны эндоста, ПП с ростом организма способна только увеличиваться [40]. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают, что опорная разгрузка также способствует замедлению роста костей, что описывалось и в других исследованиях [11, 12]. В систематическом обзоре Globus, Morey–Holton, суммирующем результаты экспериментов с АОВ за 40 лет, предполагается, что у растущих животных изменение костной ткани связано в первую очередь с замедлением роста костей и костеобразования, а не с усилением резорбции [41].

В то же время ЛФ не оказал значимого профилактирующего эффекта на МПК и ПП, что, вероятно, обусловлено дозировкой и способом введения препарата.

Эффект перорального приема ЛФ может быть потенциально уменьшен желудочно-кишечным распадом его молекулы. Было показано, что более длительное время опорожнения желудка, а также низкий рН (1.5–2) приводят к более интенсивному перевариванию ЛФ в желудке [42]. Известно, что на опорожнение желудка оказывают влияние множество факторов: объем и плотность пищи, физическая нагрузка, температура, осмоляльность, висцеральный кровоток, положение тела и электролитный баланс. Эти факторы могут оказывать влияние на эффективность перорального приема препаратов в условиях измененного вектора гравитации и сниженной двигательной активности, характерных для опорной разгрузки [43]. Исследования на людях в условиях антиортостатической гипокинезии показывают, что длительная частичная опорная разгрузка приводит к повышенной секреции желудочного сока, утолщению стенок желудка и к замедлению его эвакуаторной функции [44]. Исходя из этого, можно предположить, что положение тела животного во время АОВ могло ограничивать моторно-эвакуаторную функцию желудка и приводить к повышенной кислотности.

Изменение минеральной составляющей кости сказывается и на ее прочности. Прочность кости поддерживается за счет изменений толщины ее кортикального слоя, площади поперечного сечения, качества минерализации и микроструктуры [45]. Исследования в космических полетах и АОВ показывают, что опорная разгрузка приводит к снижению прочности кости [10, 25, 45, 46].

Во время исследования на трехточечный изгиб был отмечен эффект взаимодействия между АОВ и приемом ЛФ: предел прочности для контрольной группы (CL) выше ($p < 0.05$), чем у вывешенной (HSL), но только на фоне приема препарата. Полученные нами при оценке прочностных свойств результаты не показали достоверных различий между группой контроля (CP) и группой АОВ, получавших плацебо (HSP), несмотря на различия при оценке МПК и ПП.

Помимо исследования эффективности ЛФ как средства профилактики для потери костной ткани, вызванной частичной разгрузкой, нами была предпринята попытка оценить, влияет ли он на скорость ее восстановления.

Ревадaptация вызвала анаболический эффект для МПК и ПП. Также при отсутствии значимого эффекта препарата на указанные параметры была установлена связь между показателями прочности кости (предел прочности) и приемом ЛФ: бедренная кость животных, получавших препарат, выдержала большую нагрузку, чем у животных, получавших плацебо ($p < 0.05$). Изменения жесткости костной ткани (модуль Юнга) не значимы ($p > 0.05$).

Таким образом, настоящее исследование подтверждает, что 21-суточная опорная разгрузка и ревадaptация после иммобилизации приводят к значительным изменениям показателей оценки состояния костной ткани. При этом отмечается перспективность применения ЛФ в качестве средства профилактики для поддержания прочностных свойств костей и, вероятно, скорости восстановления костной ткани. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что терапевтической дозировки ЛФ недостаточно для предотвращения снижения плотности и угнетения роста костей при данном экспериментальном воздействии, а способ доставки препарата неоптимален для условий антиортостатического вывешивания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят заведующего Лабораторией миологии Института медико-биологических проблем РАН д.б.н., профессора Бориса Стивовича Шенкмана и его сотрудников за помощь в организации эксперимента.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Р. С., Г. Ю. В., Н. А. Л., К. В. Г., А. К. К.), проведение эксперимента, сбор и подготовка биоматериала (Н. А. Л., К. В. Г.), выполнение денситометрии (К. В. Г.), проведение испытаний костей на трехточечный изгиб (А. И. А., О. А. С.), обработка экспериментальных данных и статистический анализ результатов (К. В. Г., А. И. А., Т. В. Б.), обсуждение результатов, написание и редактирование манускрипта – все авторы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнялась с использованием Уникальной научной установки «Трансген-банк» при финансировании за счет средств бюджета Минобрнауки России в рамках проекта (Соглашение № 075–15–2021–668 от 29.07.2021 г.). Проведение испытаний костей на трехточечный изгиб выполнялось при финансовой поддержке, выделенной Казанскому федеральному университету по государственному заданию в сфере научной деятельности, проект № FZSM–2023–0009. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН – Физиологической секцией Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО (Протокол № 603 от 25.10.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang S-D, Dai L-Y, Jiang L-S (2006) Osteoporosis after spinal cord injury. *Osteoporos Int* 17: 180–192.
<https://doi.org/10.1007/s00198-005-2028-8>
2. Aliprantis AO, Stolina M, Kostenuik PJ, Poliachik SL, Warner SE, Bain SD, Gross TS (2012) Transient muscle paralysis degrades bone via rapid osteoclastogenesis. *FASEB J* 26: 1110–1118.
<https://doi.org/10.1096/fj.11-196642>
3. Baran R, Wehland M, Schulz H, Heer M, Infanger M, Grimm D (2022) Microgravity-related changes in bone density and treatment options: a systematic review. *IJMS*23: 8650.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158650>
4. Genah S, Monici M, Morbidelli L (2021) The Effect of Space Travel on Bone Metabolism: Considerations on Today's Major Challenges and Advances in Pharmacology. *IJMS*22: 4585.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094585>
5. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, Voronin L (2000) Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J Musculoskelet Neuron Interact* 1: 157–160.
6. Оганов ВС, Бакулин АВ, Новиков ВЕ, Мурашко ЛМ, Кабицкая ОЕ, Моргунов ВВ, Воронин ЛИ, Шнайдер В, Шейклфорд Л, Лебланк А (2005) Реакции костной системы человека в космическом полете: Феноменология. *Авиакосм экол мед* 39: 3–9. [Oganov VS, Bakulin AV, Novikov VE, Murashko LM, Kabitskaya OE, Morgun VV, Voronin LI, Schneider V, Shackelford L, LeBlanc A (2005) Reactions of the human skeletal system in space flight: phenomenology. *Aviakosm Ekol Med* 39: 3–9. (In Russ)].
7. Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM (2009) Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res* 5: 843–850.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050807>
8. Kaplansky AS, Durnova GN, Burkovskaya TE, Vorotnikova EV (1991) The effect of microgravity on bone fracture healing in rats flown on Cosmos-2044. *Physiologist* 34: S196–S199.

9. *Капланский АС, Дурнова ГН, Сахарова ЗФ, Ильина-Какуева ЕИ* (1987) Гистоморфометрический анализ костей крыс, находившихся на борту биоспутника «Космос-1667». *Косм биол авиакосм мед* 21: 25–31. [*Kaplanskiy AS, Durnova GN, Sakharova ZF, Il'ina-Kakueva EI* (1987) Histomorphometric analysis of the bones of rats on board the Kosmos 1667 biosatellite. *Kosm Biol Aviakosm Med* 21: 25–31. (In Russ)].
10. *Hariom SK, Ravi A, Mohan GR, Pochiraju HD, Chattopadhyay S, Nelson EJR* (2021) Animal physiology across the gravity continuum. *Acta Astronautica* 178: 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.09.044>
11. *Дурнова ГН, Капланский АС, Логинов ВИ* (2006) Динамика восстановления структуры большеберцовых костей крыс после остеопении, вызванной вывешиванием. *Авиакосм экол мед* 40: 29–31. [*Durnova GN, Kaplanskiy AS, Loginov VI* (2006) [Dynamics of restoration of the structure of the tibia bones of rats after osteopenia caused by hindlimb suspension]. *Aviakosm Ekol Med* 40: 29–31. (In Russ)].
12. *Дурнова ГН, Капланский АС* (2003) Сравнительное гистоморфометрическое исследование большеберцовых костей у самцов и самок крыс при вывешивании за хвост в антиортогностическом положении. *Авиакосм экол мед* 37: 29–32. [*Durnova GN, Kaplanskiy AS* (2003) Comparative histomorphometric study of the tibia in male and female rats when suspended by the tail in an antiorthostatic position. *Aviakosm Ekol Med* 37: 29–32. (In Russ)].
13. *Metzger CE, Anand Narayanan S, Phan PH, Bloomfield SA* (2020) Hindlimb unloading causes regional loading-dependent changes in osteocyte inflammatory cytokines that are modulated by exogenous irisin treatment. *NPJ Microgravity* 6: 28. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00118-4>
14. *Grano M, Mori G, Minielli V, Barou O, Colucci S, Giannelli G, Alexandre C, Zallone AZ, Vico L* (2002) Rat hindlimb unloading by tail suspension reduces osteoblast differentiation, induces IL-6 secretion, and increases bone resorption in ex vivo cultures. *Calcified Tissue Int* 70: 176–185. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-2034-6>
15. *Lang TF, Leblanc AD, Evans HJ, Lu Y* (2006) Adaptation of the proximal femur to skeletal reloading after long-duration spaceflight. *J Bone Mineral Res* 21: 1224–1230. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060509>
16. *Goldman IL, Georgieva SG, Gurskiy YaG, Krasnov AN, Deykin AV, Popov AN, Ermolkevich TG, Budzevich AI, Chernousov AD, Sadchikova ER* (2012) Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem Cell Biol* 90: 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
17. *Chernousov AD, Nikonova MF, Sharova NI, Mitin AN, Litvina MM, Sadchikov PE, Goldman IL, Yarilin AA, Sadchikova ER* (2013) Neolactoferrin as a stimulator of innate and adaptive immunity. *Acta Naturae* 5: 71–76. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-71-76>
18. *Naot D, Palmano K, Cornish J* (2012) Lactoferrin – A Potential Anabolic Intervention in Osteoporosis. In: Dionyssiotis Y (ed) *Osteoporosis*. In Tech.
19. *Sachenkov O, Kharislamova L, Shamsutdinova N, Kirillova E, Konoplev Y* (2015) Evaluation of the bone tissue mechanical parameters after induced alimentary Cu-deficiency followed by supplementary injection of Cu nanoparticles in rats. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 98: 012015. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012015>
20. *Bastos AR, Da Silva LP, Maia FR, Pina S, Rodrigues T, Sousa F, Oliveira JM, Cornish J, Correló VM, Reis RL* (2019) Lactoferrin-hydroxyapatite containing spongy-like hydrogels for bone tissue engineering. *Materials* 12: 2074. <https://doi.org/10.3390/ma12132074>
21. *Trybek G, Jedliński M, Jaroń A, Preuss O, Mazur M, Grzywacz A* (2020) Impact of lactoferrin on bone regenerative processes and its possible implementation in oral surgery – a systematic review of novel studies with metanalysis and metaregression. *BMC Oral Health* 20: 232. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01211-6>
22. *Blais A, Malet A, Mikogami T, Martin-Rouas C, Tomé D* (2009) Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 296: E1281–E1288. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90938.2008>
23. *Grey A, Banovic T, Zhu Q, Watson M, Callon K, Palmano K, Ross J, Naot D, Reid IR, Cornish J* (2004) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 18: 2268–2278. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0456>
24. *Cornish J* (2004) Lactoferrin promotes bone growth. *Biometals* 17: 331–335. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027713.18694.91>
25. *Jia B, Xie L, Zheng Q, Yang P, Zhang W, Ding C, Qian A, Shang P* (2014) A hypomagnetic field aggravates bone loss induced by hindlimb unloading in rat femurs. *PLoS One* 9: e105604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105604>

26. *He J, Feng X, Wang J, Shi W, Li H, Danilchenko S, Kalinkevich A, Zhovner M* (2018) Icarin prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stabilizing bone biological apatite in a hindlimb suspension rodent model. *Acta Pharmacol Sin* 39: 1760–1767.
<https://doi.org/10.1038/s41401-018-0040-8>
27. *Smith JK* (2020) Osteoclasts and microgravity. *Life* 10: 207.
<https://doi.org/10.3390/life10090207>
28. *Lloyd SA, Morony SE, Ferguson VL, Simske SJ, Stodieck LS, Warmington KS, Livingston EW, Lacey DL, Kostenuik PJ, Bateman TA* (2015) Osteoprotegerin is an effective countermeasure for spaceflight-induced bone loss in mice. *Bone* 81: 562–572.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.08.021>
29. *Hou J, Xue Y, Lin Q* (2012) Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin* 33: 1277–1284.
<https://doi.org/10.1038/aps.2012.83>
30. *Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M, Ren FZ* (2009) Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutrition* 139: 958–964.
<https://doi.org/10.3945/jn.108.100586>
31. *Gao R, Watson M, Callon KE, Tuari D, Dray M, Naot D, Amirapu S, Munro JT, Cornish J, Musson DS* (2018) Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis: local lactoferrin promotes bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 12: e620–e626.
<https://doi.org/10.1002/term.2348>
32. *Ильин ЕА, Новиков ВЕ* (1980) Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами. *Косм биол авиакосм мед* 14: 79–80. [*In* *ЕА, Novikov VE* (1980) Workbench for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Kosm Biol Aviakosm Med* 14: 79–80. (In Russ)].
33. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
34. *Akhmetzyanova AI, Sharafudinova KR, Sabirova DE, Baltin ME, Gerasimov OV, Baltina TV, Sachenkov OA* (2022) Assessing the effect of spinal cord injury severity on the mechanical properties of the hind limb bones of experimental rats. *Russ J Biomech* 26: 38–46.
<https://doi.org/10.15593/RZhBiomeh/2022.4.04>
35. *Sadchikov PE, Goldman IL, Razin SV, Chernousov AD, Alekseeva LI, Sadchikova ER* (2016) The molecular mechanism of lactoferrin influence on bone formation. *Osteopor Bone Dis* 19: 12–22.
<https://doi.org/10.14341/osteo2016312-22>
36. *Evans JD* (1996) *Straightforward statistics for the behavioral sciences*. Brooks/Cole Pub. Co, Pacific Grove.
37. *Cunningham HC, West DWD, Baehr LM, Tarke FD, Baar K, Bodine SC, Christiansen BA* (2018) Age-dependent bone loss and recovery during hindlimb unloading and subsequent reloading in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 19: 223.
<https://doi.org/10.1186/s12891-018-2156-x>
38. *Krause AR, Speacht TA, Steiner JL, Lang CH, Donahue HJ* (2020) Mechanical loading recovers bone but not muscle lost during unloading. *NPJ Microgravity* 6: 36.
<https://doi.org/10.1038/s41526-020-00126-4>
39. *Lloyd SA, Bandstra ER, Willey JS, Riffle SE, Tirado-Lee L, Nelson GA, Pecaut MJ, Bateman TA* (2012) Effect of proton irradiation followed by hindlimb unloading on bone in mature mice: A model of long-duration spaceflight. *Bone* 51: 756–764.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.07.001>
40. *Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM, Augat P* (2016) Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury* 47: S11–S20.
[https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(16\)47003-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(16)47003-8)
41. *Globus RK, Morey-Holton E* (2016) Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol* 120: 1196–1206.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00997.2015>
42. *Wang B, Timilsena YP, Blanch E, Adhikari B* (2019) Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition* 59: 580–596.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1381583>
43. *Amidon GL, DeBrincat GA, Najib N* (1991) Effects of Gravity on Gastric Emptying, Intestinal Transit, and Drug Absorption. *J Clin Pharm* 31: 968–973.
<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1991.tb03658.x>

44. *Афонин БВ, Гончарова НП, Карамышев ЮА (2007) Функциональное состояние желудка человека в эксперименте с 4-месячной антиортостатической гипокinezией. Авиакосм экол мед 41: 37–43. [Afonin BV, Goncharova NP, Karamyshev YuA (2007) Functional state of the human stomach in an experiment with 4-month antiorthostatic hypokinesia. Aviakosm Ekol Med 41: 37–43. (In Russ)].*
45. *Shimano MM, Volpon JB (2009) Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. Braz J Med Biol Res 42: 330–338. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000400004>*
46. *Ильин ЕА (1984) Исследование на биоспутниках «Космос». Косм биол авиакосм мед 18: 57–66. [Il'in EA (1984) Research on the Kosmos biosatellites. Kosm Biol Aviakosm Med 18: 57–66. (In Russ)].*

Application of Lactoferrin for the Prevention and Restoration of Bone Tissue in Wistar Rats under Conditions of Hindlimb Unloading

**K. V. Gordienko^{a,*}, N. A. Lukicheva^a, A. I. Akhmetzyanova^b, A. K. Kolupaev^c,
O. A. Sachenkov^b, T. V. Baltina^b, E. R. Sadchikova^c, and G. Yu. Vassilieva^a**

^a*Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences (IBMP RAS), Moscow, Russia*

^b*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*

^c*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: k.vl.gordienko@gmail.com*

The influence of gravitational unloading (antiorthostatic suspension) and subsequent recovery on the mineral density and mechanical properties of the femoral and tibial bones of Wistar rats was studied with oral administration of a biotechnological analog of human lactoferrin (200 mg/kg) derived from the milk of producer goats. Bone mineral density was determined by dual-energy X-ray absorptiometry, and strength and stiffness were assessed through three-point bending tests.

It was shown that gravitational unloading for 21 days led to a decrease in the mineral density of the tibial and femoral bones. The administration of lactoferrin did not significantly affect the mineral density or projected area of the studied bones. No statistically significant differences in mechanical stiffness were found between the experimental groups, but after readaptation, the ultimate strength was significantly higher in the groups that received lactoferrin. Thus, the obtained results may indicate the potential of lactoferrin preparations as prophylactic agents for maintaining bone strength. At the same time, maintaining bone mineral density under deficit-stimulating conditions requires consideration of alternative dosages and delivery methods of the drug.

Keywords: rat, hindlimb unloading, lactoferrin, femur, tibia, DXA, three-point bending