

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Московская школа на Юго-Западе №1543

Влияние человеческого лактоферрина на нейрональную культуру в условиях стресса

Отчёт о научно-исследовательской работе

Смирнова Анна

Шафранов Марк

Научные руководители:

руководитель Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований

НИЦ «Курчатовский институт» к.б.н. Ирина Юрьевна Зарайская

н.с. Марина Юрьевна Копаева

м.н.с Ася Магомедовна Азиева

Москва

2019

Оглавление

| | |
|-------------------------|-------|
| Введение..... | 2 |
| Цель и задачи..... | 2 |
| Литературный обзор..... | 2-5 |
| Материалы и методы..... | 5-8 |
| Результаты..... | 8-13 |
| Благодарности..... | 13 |
| Приложение..... | 13 |
| Список литературы..... | 13-14 |

Введение

Лактоферрин (далее Лф) – это многофункциональный белок млекопитающих с молекулярной массой около 80 кДа. Одна из его функций – иммунная[1]. Множество исследований подтверждает то, что Лф накапливается в ЦНС при множестве патологий, затрагивающих головной мозг (болезни Паркинсона, Альцгеймера, инсульте и проч.)[2]. На данный момент доказано, что Лф может проникать в нервную ткань из кровяного русла, преодолевая ГЭБ[3], и накапливаться в органах ЦНС[2]. Есть сведения о том, что этот белок запускает в клетках-мишенях транскрипцию примерно 10 генов[4]. Мы решили проверить на модели нейрональной культуры, действительно ли Лф накапливается внутри стрессированных нервных клеток и способствует ли он транскрипции *c-Fos* гена, так как *c-Fos* белок (многофункциональный маркер пластичности нервных клеток[5]) может выступать в качестве сигнала клетки о стрессе.

Цель и задачи:

Цель:

- Определить влияние Лф на нейрональную культуру в условиях стресса.

Задачи:

- Выращивание нейрональных культур из клеток разных участков мозга новорожденных мышей (коры и гиппокампа);
- Определение локализации Лф и локализации *c-Fos* белка, а также связи между ними в норме и в условиях стресса.

Литературный обзор

➤ Лактоферрин в ЦНС

Лактоферрин (далее Лф) – это белок млекопитающих из семейства трансферринов. Этот белок выполняет в организме множество функций. Он совмещает в себе свойства, характерные для представителей и неспецифического, и специфического иммунитета[1]. Доказано, что при целом ряде патологий – от инфекционных болезней до онкологии[1] – количество Лф в организме млекопитающих заметно возрастает. Помимо высокого сродства к ионам двухвалентного железа и некоторых других металлов, он обладает антибактериальными, противовирусными, антипаразитарными, антиаллергическими, противораковыми и в целом иммуномодулирующими свойствами. Об иммуномодулирующих свойствах лактоферрина говорит то, что при целом ряде патологий – от инфекционных болезней до онкологии[1] – количество Лф в организме млекопитающих заметно возрастает.

Белок присутствует практически во всех известных биологических жидкостях млекопитающих, он разносится по организму нейтрофилами через кровяное русло и аккумулируется в ряде органов, включая органы ЦНС [цитируется по 2]. Так, например, Лф был обнаружен в спинномозговой жидкости крысы через 30 минут после внутривенного введения дозы с массовой долей активного вещества 0,003% [цитируется по 2]. Долгое время считалось, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает Лф в ЦНС [цитируется по 2], но группа учёных, утверждающих, что Лф попадает в спинномозговую жидкость путём рецептор-опосредованного эндоцитоза, подробно исследовала проникновение Лф в мозг в воссозданной *in vitro* системе с ГЭБ[3]. Перемещение Лф отслеживалось на конфокальном микроскопе с помощью ИГХ-метода. Оказалось, что Лф прочно связывается с гепарансульфат-протеогликанами, важным компонентом межклеточного вещества мозга [цитируется по 2]. По-видимому, в мозге конечная цель данного белка – нейроны, астроциты и клетки микроглии, в которых он аккумулируется[6].

Повышенная концентрация Лф в мозге наблюдается у пациентов с болезнью Альцгеймера [цитируется по 2]. У пациентов с болезнью Паркинсона повышенная концентрация Лф найдена в областях с пониженной концентрацией дофаминовых рецепторов. При этом концентрация Лф в разных повреждённых участках обратно пропорциональна концентрации дофаминовых рецепторов в чёрной субстанции [цитируется по 2]. Концентрация Лф у пациентов также напрямую коррелировала с тяжестью заболевания [цитируется по 2]. В наиболее сильно повреждённых участках мозга пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается максимальная концентрация связанного железа, что также свидетельствует о присутствии больших количеств Лф [цитируется по 2]. Другие авторы отмечают, что пик концентрации лактоферрина приходится на периоды как вирусных, так и бактериальных заболеваний мозга, объясняя это повышенной концентрацией гранулоцитов, регулирующих синтез Лф, в местах воспаления нервной ткани [цитируется по 2]. Также концентрация Лф резко повышалась у пациентов, переживших инсульт, в течение первых двух-трёх дней после начала проявления симптомов [цитируется по 2]. Повышенные концентрации Лф обнаруживаются при самых разных вариантах повреждения ЦНС. Таким образом, Лф, предположительно, противодействует стрессу ЦНС при её тяжёлых повреждениях.

➤ *Нейрональные культуры*

Нейрональные культуры становятся всё более популярным объектом исследований. Например, на культурах изучается электрическая активность нейронов, исследуются экспрессия белков, проводятся испытания токсических и физиологических эффектов различных химических соединений [цитируется по 5]. В отличие от живого мозга, монослой клеток нейрональной культуры в прямом смысле более доступен для исследователя и позволяет изучать множество процессов с помощью флюоресцентного микроскопа.

На данный момент нейрональные культуры активно используются для исследования пластичности нервных клеток[7]. Пластичность – совокупность процессов изменения физиологического состояния, экспрессии генов и фенотипа нервной клетки[7]. Пластичность может быть реакцией на изменения внешней среды (стресс). Особое внимание уделим экспрессии ранних генов (далее IEG) – именно они отвечают за изменение фенотипа и состояния нервной клетки, меняя её структуру на продолжительный отрезок времени; в ЦНС именно они играют ключевую роль в формировании долговременной памяти[9]. Одним из представителей IEG является ген *c-fos*. Ген *c-fos* выделяется в нервных клетках при действии широкого круга факторов стресса – изменения состава среды (добавление раствора хлористого калия или глутамата), солнечного света, электростимуляций низких и высоких частот и проч.[7]. Например, после добавления 10 мкМ раствора глутамата доля нервных клеток, секретирующих белок *c-Fos*, повысилась с 10-20% до 80% через 2 часа после добавления [цитируется по 5]. Также значительное содержание этого белка в культуре было выявлено через 2 часа после трёхкратной аппликации 50мМ раствора хлористого калия [цитируется по 5]. Поэтому белок *c-Fos* считается маркёром пластичности в целом и стресса в частности[5]. Его локализацию легко отследить на нейрональной культуре с помощью флуоресцентного микроскопа.

Ранее транскрипция гена *c-fos* в качестве ответа нейрональной культуры на стресс (а именно электрическую стимуляцию) уже было исследовано ИГХ-методом под флуоресцентным конфокальным микроскопом. Для детекции и определения локализации белка *c-Fos* использовали козы поликлональные антитела IgG (antic-Fos(4)-Gsc-52-G, "SantaCruzBiochem") и ослиные противокозьи антитела, меченые флуорофором AlexaFluor 488 (AlexaFluordonkeyanti-goat 488, "Invitrogen"). В ИГХ-исследовании козы антитела выполняли роль первичных, ослиные – вторичных[5]. Клеточные ядра окрашивали ДНК-специфическим маркером Hoechst[5]. Мы сочли это удобным и наглядным способом детекции и локализации белка *c-Fos* и решили использовать метод нейрональных культур с последующим ИГХ-исследованием для своего эксперимента.

➤ *Механизмы действия лактоферрина*

Лф, как было сказано ранее, противодействует широкому спектру патологий в организме. В последнее время становится очевидно, что Лф выполняет широкий спектр функций в организме, в частности – в нервных клетках. Известно, что Лф обладает NLS-последовательностью[8] – высокоспецифичным «пропуском» в клеточное ядро, и недавнее исследование[6] подтвердило, что Лф аккумулируется именно в ядрах клеток

ЦНС. Показано, что действие Лф на нейроны способно увеличивать количество BDNF, способствуя не только лечению болезней Альцгеймера и Паркинсона, но и раннему развитию мозга и памяти[11]. На основе свежих данных известно, что этот белок способен связываться с определёнными участками ДНК[10]. При этом он запускает в нервных клетках транскрипцию примерно 10 генов, соответствующие белки которых участвуют в каскадах, связанных с BDNF[11].

Поскольку Лф определённо оказывает положительное влияние на нервные клетки при стрессовых ситуациях, это значит, что он помогает нейронам благополучно выдерживать стресс, адаптируясь под него; возможно, даже противодействовать причине стресса. Адаптацией под стресс, несомненно, является пластичность нервных клеток. Уже известно, что косвенно Лф запускает синтез полисиаловой кислоты – маркера пластичности, миграции и дифференциации нервных клеток, направления и процесса роста аксонов[11]. Но сами процессы пластичности запускаются продуктами транскрипции ранее упомянутых IEG. Значит ли это, что Лф запускает или, по крайней мере, положительно влияет на транскрипцию IEG? Мы проверили это на примере гена *c-fos*, яркого представителя ранних генов. Ответ на этот вопрос поможет подтвердить предположения о конкретной роли Лф в изменении состояния клеток.

Материалы и методы

Общий план нашего эксперимента был таким: В работе использовалось 14 первичных нейрональных культур, и через 7 дней после посадки они были разделены на 4 группы. К трём культурам первой группы мы добавляли чЛф, инкубировали 24 часа, затем стрессировали одномолярным раствором хлористого калия 3 раза с перерывами по 2 минуты. Во вторую группу культур мы не добавляли чЛф, инкубировали 24 часа и стрессировали таким же методом. В третью группу вошли две культуры – это были контрольные культуры, которые инкубировались без чЛф и не стрессировались. Четвёртую группу из шести культур мы инкубировали с чЛф 2, 24 или 72 часа и не стрессировали. Таким образом, первая и вторая группы были опытными, а третья и четвёртая – контрольными. После инкубации с чЛф или без чЛф все группы фиксировались, к ним добавлялись антитела и они анализировались ИГХ-методом на конфокальном флуоресцентном микроскопе. На полученных снимках нами проверялась концентрация и локализация продуктов транскрипции гена *c-fos* в каждой группе на 10 случайным образом выбранных полях с каждой культуры.

➤ Получение и культивирование первичной диссоциированной культуры нервных клеток

На обработанной 70% этанолом поверхности была произведена декапитация новорожденной мыши (в возрасте не больше суток) с помощью ножниц. Кожные покровы головы были сразу обработаны салфеткой, смоченной 70% этанолом. Все дальнейшие операции производились в стерильных условиях (под ламинаром). Ножницами с острыми кончиками был сделан продольный разрез кожи до носа и были раздвинуты кожные покровы. Этими же ножницами был произведён продольный разрез черепа от большого затылочного отверстия во фронтальном направлении. Затем пинцетом оголялась поверхность голов-

ного мозга, после чего он доставался ложечкой и немедленно помещался в охлажденный на хладагенте диссекционный буфер.

Под микроскопом при помощи пинцета и скальпеля последовательно из двух полушарий извлекался гиппокамп, после чего он освобождался от сосудистых сплетений и помещался в новую чашку с охлажденным на хладагенте диссекционным буфером. Мозг разделялся на кору и мозжечок, извлекая обе части мозга в отдельные чашки с охлажденным на хладагенте диссекционным буфером.

Перечисленные пункты повторялись для каждого последующего животного. Когда гиппокампы из всех мышей были выделены, они пинцетом переносились в новую чашку и в капле буфера измельчались скальпелем. Эта и все дальнейшие операции проводились и с гиппокампами, и с образцами коры, и с мозжечками. Измельченная ткань переносилась в пробирку с 2 мл 0,25% трипсина (Invitrogen 25200-056), предварительно согретого до 37°C, и помещалась на 20 минут в термостат на 37°C. В пробирку с трипсинизированной тканью нами добавлялась культуральная среда (нейробазальная среда Neurobasal (Invitrogen 21103-049) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044) и глутамином (Invitrogen 25030-024)), предварительно согретая до 37°C, смесь тщательно ресуспендировалась, и затем клетки осаждались при помощи центрифуги при 1800 об./мин. в течение 5 мин. Затем удалялся супернатант, и клетки ресуспендировались в 9 мл полной культуральной среды, затем осаждались при помощи центрифуги при 1800 об./мин. в течение 5 мин. Супернатант снова удалялся, и клетки ресуспендировались в полной культуральной среде.

Нами производился подсчет клеток с помощью камеры Горяева; в конце их концентрация составляла примерно 300-400 тыс. на одно стекло. Клетки в объеме 50 мл наносились на матрицы или стекла, предварительно обработанные полиэтиленгликолем. Плотность клеточной культуры должна была при этом составлять не менее 1200 клеток/мм². Затем МЭМ помещались на 30 минут в CO₂-инкубатор на 37°C. После инкубации в культуры по каплям добавлялось по 1 мл предварительно согретой до 37°C среды и клетки помещались в CO₂-инкубатор.

Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C и газовой смеси 95% воздуха и 5% CO₂. Смена культуральной жидкости на новую среду (половина объема менялась на равный объем новой среды) осуществлялась через сутки после посадки на стекла и далее 1 раз в 3 дня. До начала эксперимента культуры инкубировались 7 суток.

➤ *Добавление человеческого лактоферрина к нейрональным культурам*

В работе был использован чЛф, 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% [цитируется по 6].

В культуральную среду добавлялся чЛф в концентрации 1 мг/мл следующим образом: сначала сухой чЛф растворялся в готовой согретой до 37°C культуральной среде, затем убиралась половина объема среды из чашек с культурами, и добавлялся такой же объем среды с чЛф в каждую культуру. При этом количество чЛф рассчитывалось таким образом, чтобы его конечная концентрация была 1 мг/мл. Культуры, к которым добавлялся чЛф (культуры первой и четвертой групп), инкубировались с ним разное время. Так, три культуры первой группы инкубировались с чЛф 24 часа, тогда как три культуры четвертой группы инкубировались с ним 2, 24 и 72 часа.

➤ *Стрессирование нейрональных культур*

Был приготовлен и подогрет до 37°C рабочий 3М раствор KCl в среде. До этой же температуры была согрета обычная среда. После этого были зафиксированы культуры пассивного контроля. В каждую культуру, предназначенную для стимуляции, было по каплям добавлено 10% объема рабочего раствора KCl той же концентрации, после чего среду слегка покачали и отнесли в инкубатор на 2 мин. (т.е. если объем культуральной жидкости 1 мл, следует добавить 110 мкл KCl).

Затем от клеток осторожно отобрали всю среду с KCl (пипеткой, не отсосом) и налили свежей обычной среды без KCl, после чего оставили в инкубаторе на 5 минут. Все действия, начиная с добавления 10% объема раствора KCl, были повторно произведены с теми же культурами еще дважды, после чего остановились на этапе чистой среды без KCl и оставили культуры на 90 минут в инкубаторе. Затем они были зафиксированы.

➤ *Приготовление параформальдегида и фиксация клеток в нём*

4% раствор параформальдегида (далее ПФА) был приготовлен на натрий-фосфатном буфере (далее PBS), в термоустойчивой посуде под тягой. Была сделана навеска, налит PBS, в сосуд была помещена мешалка, после чего сосуд был закрыт фольгой (не герметично) и помещён в тёплую водяную баню. Вся установка была помещена на магнитную плитку-мешалку, на которой была установлена температура 95°C. После закипания воды раствор ПФА варился до того момента, пока он не стал абсолютно прозрачным. Затем раствор был профильтрован с помощью воронки и обыкновенной фильтровальной бумаги, перелит в ёмкость с герметичной крышкой и охлаждён до 4°C в холодильнике.

Для фиксации клеток нейрональных культур понадобились замороженный хладагент, ледяной PBS, ледяной свежеприготовленный 4% ПФА (допускается использовать его до 3 дней после приготовления) и вакуумный отсос. Культуру достали из инкубатора, и среда была отсосана. Культура была установлена на хладагент, и было по каплям прилито 3 мл PBS. Затем он был отсосан насосом, и был по каплям прилит ледяной ПФА, после чего культура была оставлена на хладагенте на 7-10 мин.

После инкубации ПФА был отсосан и был осторожно прилит PBS. Затем он снова был отсосан и снова был прилит PBS. Наконец, мы приступили к окрашиванию фиксированных культур антителами.

➤ *Окрашивание культур антителами*

Сначала удалялся PBS, добавлялся 0.03% Triton по 250 мкл на культуру и инкубировался 10 минут при комнатной температуре. Затем удалялся Triton, добавлялось 1 мл PBS, и культура оставлялась на две минуты. Снова удалялся PBS, добавлялся 3% BSA по 250 мкл на культуру, и культура оставлялась на 40 мин при RT. Затем удалялся BSA и добавлялось по 200 мкл предварительно разведенных на BSA первичных антител к чЛф и к белку c-Fos (таблица 1). После внесения антител раствор тщательно размешивался. На ночь ставились культуры в их же чашках Петри на +4°C.

Затем удалялся BSA, культуры промывали 3 раза по 1 мл PBS и добавляли по 200 мкл предварительно разведенных на BSA (1:500 в 3% BSA) растворов вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 568 и Alexa Fluor 488 (табл. 1). После внесения антител раствор тщательно размешивался и оставлялся на 2 часа в темноте.

После этого культуры промывались 3 раза по 1 мл PBS, и к ним добавлялось по 250 мкл разведенного на PBS 1:1000 Hoechst. Культуры оставались в темноте на 10 минут. Наконец, был отмыт 1 мл PBS, удалён PBS, и на культуры была нанесена капля Fluoromount (Sigma-Aldrich), после чего культуры были заключены на их покровных стеклах.

➤ *Иммунофлуоресценция и анализ*

Флуоресцентные срезы оцифровывались помощью конфокального микроскопа FluoView 10i (Olympus). Для обработки полученных изображений нейрональных культур использовался программный пакет Imaris 7.4.2 (Bitplane). Фотографии (10 полей зрения размером 210x210 мкм с каждой культуры) были проанализированы в программном пакете “Image-Pro Plus 6.0” (Media Cybernetics), с использованием функции автоматизированного подсчета с учетом интенсивности специфического сигнала и размеров ядер. Статистический анализ был проведен в программе GraphPad Prism 6 с использованием непараметрического теста Манна-Уитни.

Результаты

Мы провели стимуляцию двух групп семидневных гиппокампальных культур, одна из которых предварительно инкубировалась с чЛф на протяжении суток. Во время стрессирования клетки подвергались химической стимуляции раствором KCl (три раза по две минуты с промежуточным инкубированием по 5 минут).

Количественное сравнение экспрессии белка c-Fos в стимулированных культурах с контролем проводилось двумя способами: путём нормализации интенсивности флуоресценции по зелёному каналу (c-Fos) на суммарную интенсивность по синему каналу (Hoechst, ядра) и нахождением среднего арифметического по всем полям зрения; а так же с помощью программного пакета «Image-Pro Plus 6.0» (с использованием функции автоматизированного подсчета с учётом интенсивности специфического сигнала и размеров ядер).

Оба теста выявили достоверное отличие по степени экспрессии белка c-Fos от группы «Контроль» ($p < 0,005$).

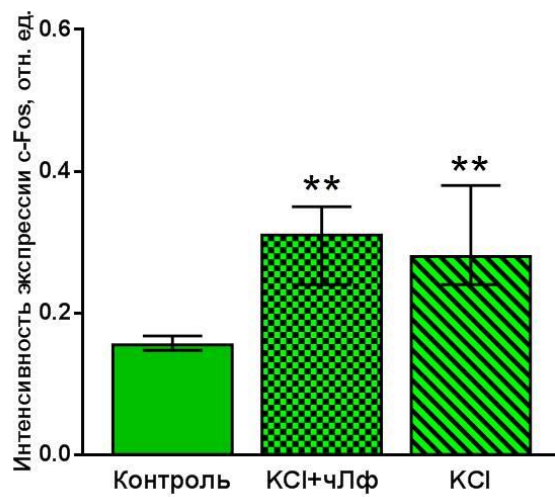


Рис. 1 (сравнение экспрессии белка c-Fos в культурах со стимуляцией и группе «Контроль» путём нахождения среднего арифметического; $p < 0,005$ (тест Манна-Уитни))

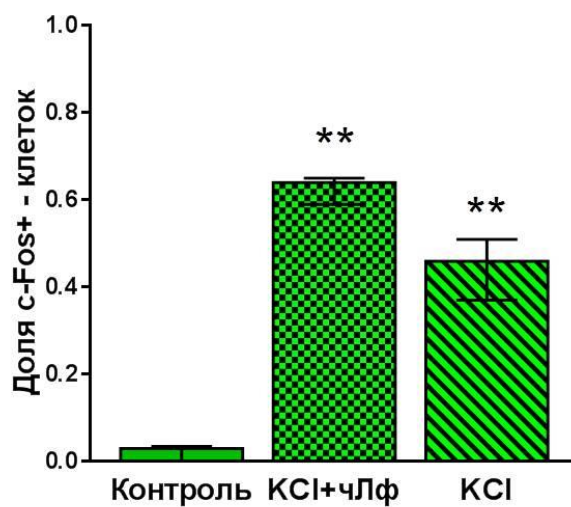


Рис. 2 (сравнение экспрессии белка c-Fos в культурах со стимуляцией и группе «Контроль» с помощью программного пакета «Image-Pro Plus 6.0»; $p < 0,005$ (тест Манна-Уитни))

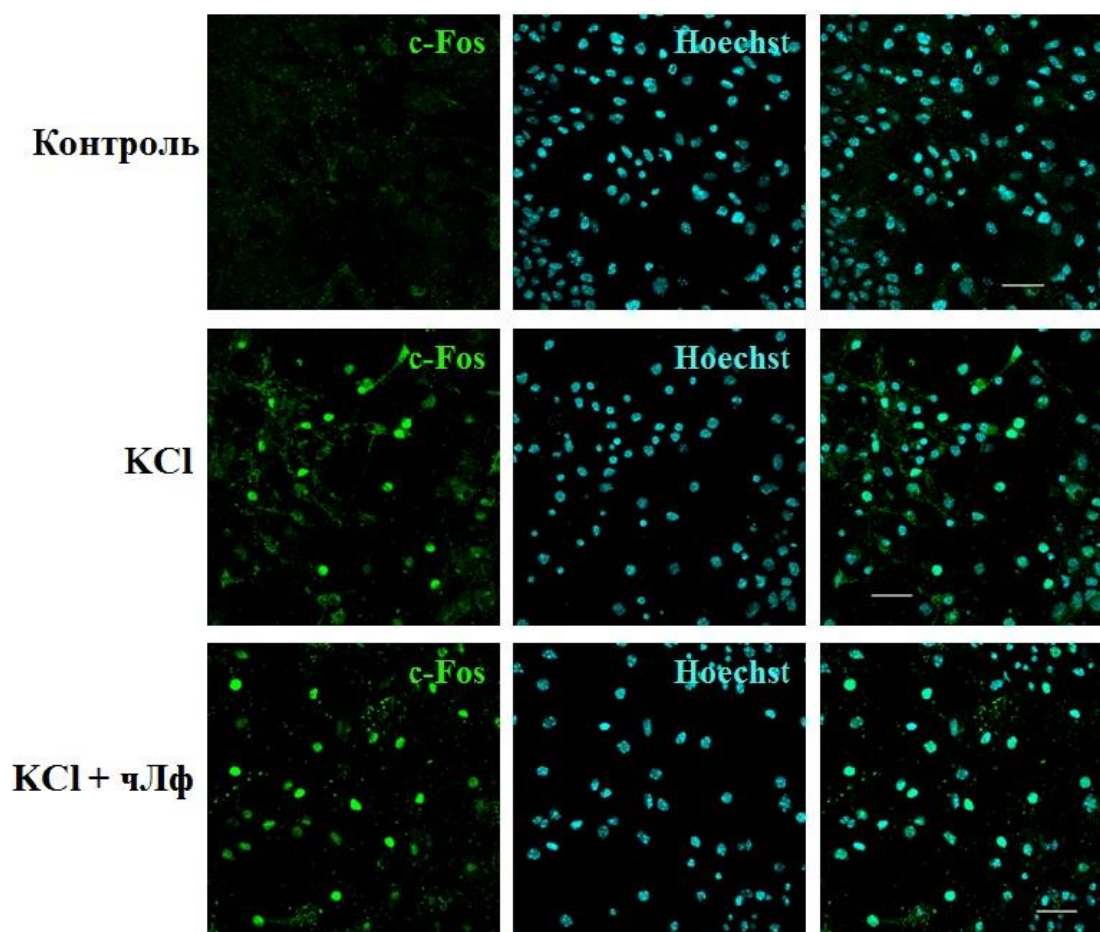


Рис. 3 (интенсивность флуоресценции по зелёному (c-Fos) и синему (Hoechst, ядра) каналам в культурах, подвергшихся стимуляции KCl, и группе «Контроль»)

Затем было проведено сравнение экспрессии белка c-Fos в стрессированных культурах с чЛф и без него. Было подсчитано среднее арифметическое количества c-Fos+-клеток, нормализованного на общее количество ядер, по всем полям зрения.

Мы решили немного изменить алгоритм сравнения результатов. Наш прежний алгоритм сравнения был таким – мы получали значения с каждого из десяти случайным образом выбранных участков каждой культуры, брали из десяти результатов отдельной культуры среднее арифметическое значение и полученные значения (по одному на культуру) сравнивали между собой. Теперь же мы брали не автоматически посчитанное среднее арифметическое от десяти участков, а реальный результат с самого среднего по доле ядер с c-Fos белком участка. Таким образом, от каждой культуры выбирался реальный, а не искусственно вычисленный "представитель", и с полученными данными проводился тот же тест по той же методике. Интересно, что при таком подходе у нас действительно были получены статистически значимые различия – Лф положительно влиял на экспрессию *c-fos*. Из этого следует, что положительное влияние Лф на экспрессию гена *c-fos*, скорее всего, присутствует, но точно мы не можем этого сказать из-за малой выборки.

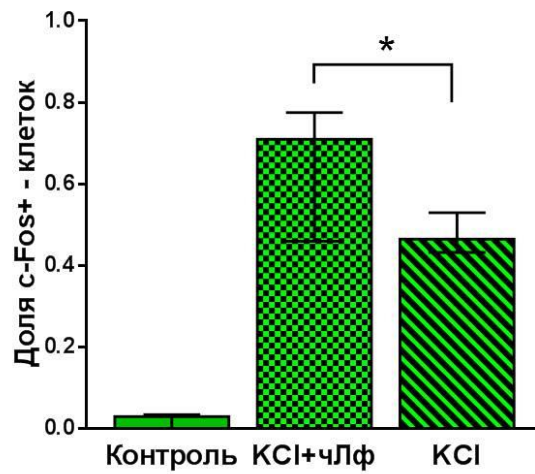


Рис. 4 (сравнение экспрессии c-Fos в стрессированных культурах с чЛф и без него; $p < 0,05$ (тест Манна-Уитни); каждая группа – 10 полей зрения с одной культуры)

Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание выявило цитоплазматическую локализацию чЛф в клетках не стимулированных культур через 2, 24 и 72 часа после добавления белка в культуральную среду.

Мы также провели контрольное окрашивание антителами против чЛф культур, в которые Лф не добавляли, – там флуоресценция по красному каналу (ярче фонового загрязнения) не была выявлена.

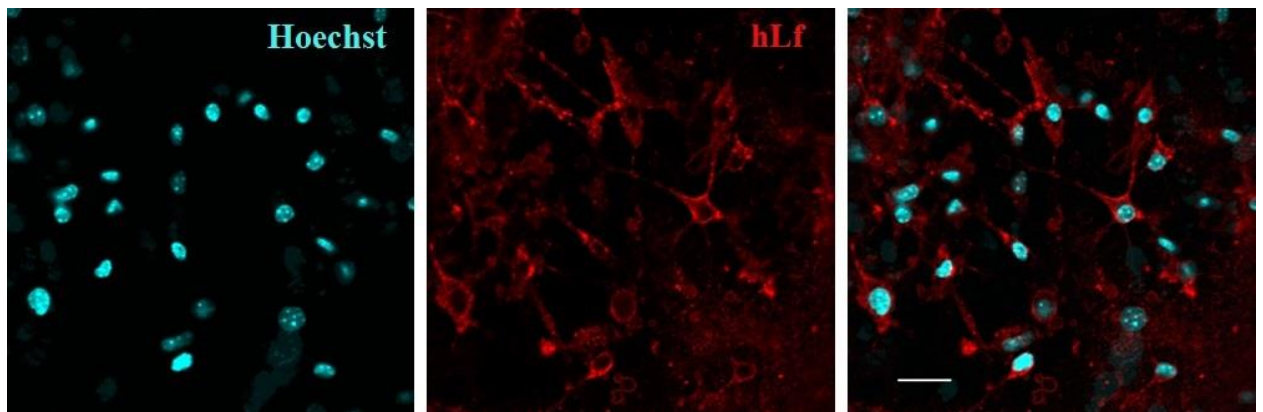


Рис. 5 (2ч+чЛф)

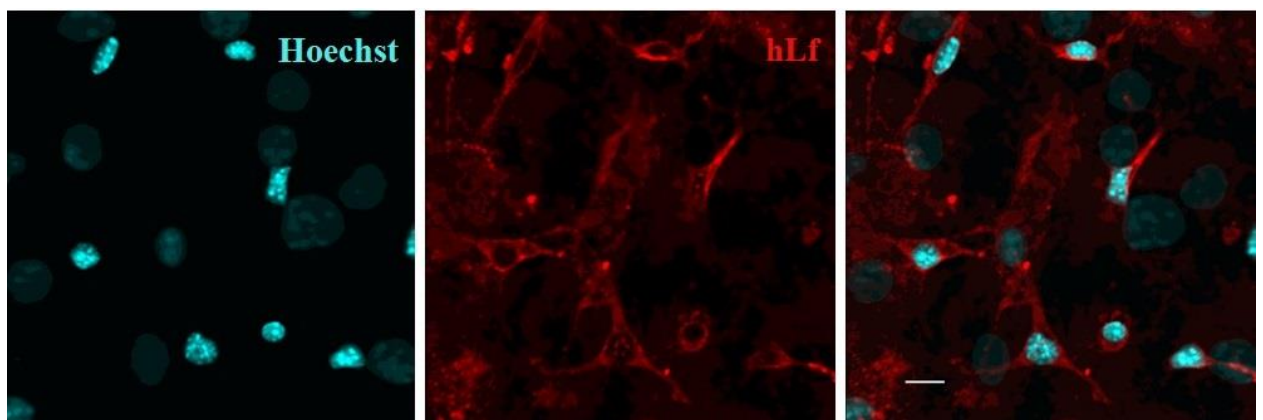


Рис. 6 (24ч+чЛф)

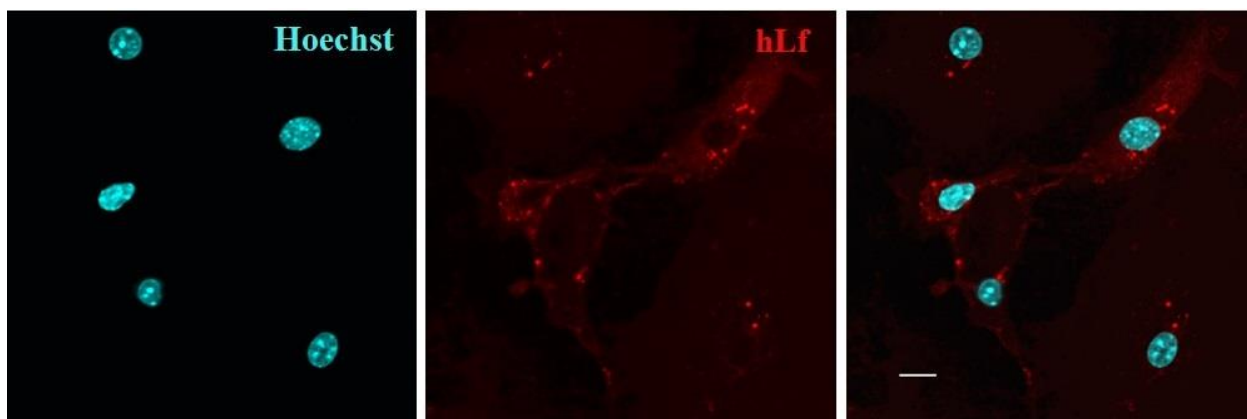
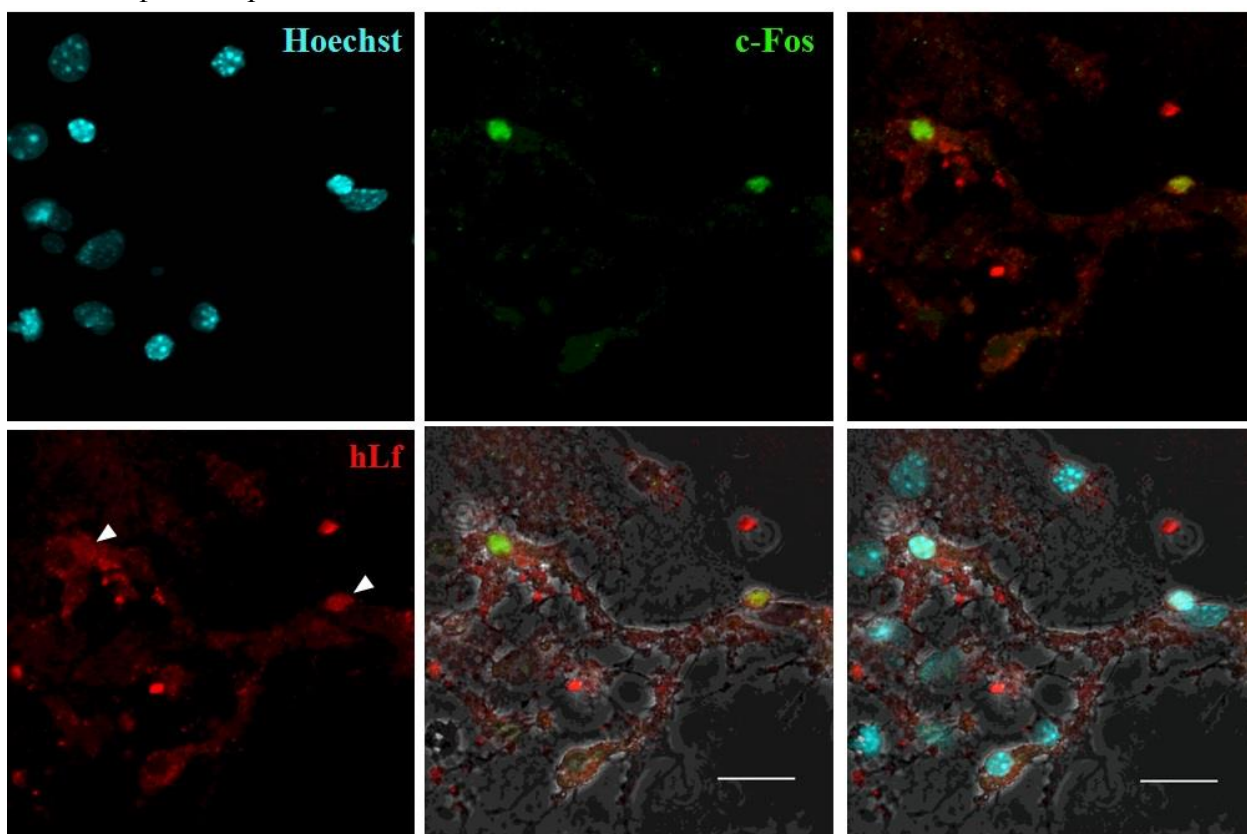


Рис. 7 (72ч+чЛф)

После стимуляции 50 мМ КСl чЛф детектировался как в цитоплазме, так и в ядрах отдельных клеток культуры. В ядрах некоторых клеток была выявлена колокализация включения чЛф и экспрессии c-Fos.



Шкала – 20 мкм.

Рис. 8 (24ч+чЛф, стрессированная культура; стрелочками указаны места колокализации включения чЛф и экспрессии белка c-Fos)

В настоящей работе с помощью флюоресцентного ИГХ-окрашивания впервые показана ядерная локализация экзогенного чЛф и его колокализация с белком c-Fos после стимуляции 50 мМ КСl культур клеток гиппокампа мышей.

Ядерная локализация чЛф в культуре была показана ранее, однако, лишь после пермеаблизации клеточных и ядерных мембран[8]. Предполагается, что стресс может влиять на локализацию и скорость проникновения чЛф в клетки. Предполагается также, что чЛф

влияет на степень экспрессии гена *c-fos*, влияя, таким образом, на выживаемость клеток, что в дальнейшем может быть использовано в клинической практике.

Для дальнейшего изучения роли чЛФ в клеточных нейрональных процессах планируется исследовать индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках культуры при постоянном присутствии экзогенного белка в культуральной среде, а также определить фенотип клеток с различной клеточной локализацией чЛФ.

Благодарности

Мы благодарим наших научных руководителей: Ирину Юрьевну Зарайскую за чуткое руководство, Марину Юрьевну Копаеву и Асю Магомедовну Азиеву за постоянную поддержку, помощь в проведении экспериментов, ценные указания и доброжелательное отношение.

Мы также благодарим Сергея Менделевича Глаголева за организацию практики.

Приложения

| Наименование | Роль в методе ИГХ | Хозяин | Разведение | Производитель |
|--|--------------------|--------|------------|-----------------------------------|
| Anti-Lactoferrin antibody | Первичное антитело | Кролик | 1:150 | Abcam, ab15811 |
| Anti-c-Fos antibody(4)-G | Первичное антитело | Коза | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology, sc-52-G |
| Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 conjugated | Вторичное антитело | Осёл | 1:500 | Abcam, ab175470 |
| Anti-goat IgG (H+L) Alexa Fluor 488 conjugated | Вторичное антитело | Осёл | 1:500 | Abcam, ab150129 |
| Hoecchst 33258 | Краситель | - | 1:1000 | Invitrogen, H-1398 |

Таблица 1. Список антител и красителей, использованных в ИГХ-исследовании.

Список литературы

- [1] – IsuiAbrilGarcía-Montoya, TaniaSiqueirosCendón, SigifredoArévalo-Gallegos, QuintínRascón-Cruz. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820 (2012), 226-236
- [2] – H.I. Marrif, Naser. A. Alwabel, H.M. Mousa. Brain Lactoferrin: An Endogenous Peptide or Merely an Intruder. *American Journal of Scientific Research* ISSN 1450-223X Issue 6 (2009), 79-85
- [3] – Fillebeen C, Dehouck B, Benaïssa M, Dhennin-Duthille I, Cecchelli R, Pierce A. 1999. Tumor necrosis factor-alpha increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 73, 2491-500
- [4] – Shuang-Feng Xu, Yan-Hui Zhang, Shan Wang, Zhong-Qiu Pang, Yong-Gang Fan, Jia-Yi Li, Zhan-You Wang and Chuang Guo. 2018. Lactoferrin ameliorates dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in MPTP-treated mice. *Redox Biology*, Volume 21, February 2019, 101090
- [5] – А.Л.Суханова, О.А.Минеева, И.И.Киселев, М.С.Бурцев, К.В.Анохин. 2012. Выявление следовых процессов в системах нейронов, культивируемых на микроэлектродных матрицах. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, том 153, № 5

- [6] – М.Ю.Копаева, А.Б.Черепов, И.Ю.Зарайская, М.В.Нестеренко. Проникновение лактоферрина человека в мозг мыши: пути введения и распределение. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2019, № 2, 106-114
- [7] – О.А.Минеева, М.С.Бурцев, К.В.Анохин. 2012. Подходы к изучению механизмов геномной и синаптической пластичности в сетях нервных клеток, культивируемых на мультиэлектродных матрицах. Журнал высшей нервной деятельности, том 62, № 3, 261–269
- [8] – SalmaN. Tammam, HassanM.E. Azzazy, AlfLamprecht. Nuclear and cytoplasmic delivery of lactoferrin in glioma using chitosan nanoparticles: Cellular location dependent-action of lactoferrin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 129 (2018), 74-79
- [9] – Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. 2016. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. Front. Mol. Neurosci.
- [10] – Gifford J.L., Ishida H., Vogel H.J. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin. PLoS One. 2012. Vol. 7. № 12. e51026.
- [11] – Chen Y., Zheng Z., Zhu X. et al.. Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation. 2015. Mol Neurobiol, 52, 256-269.