

УДК 616-092

## Лактоферрин человека усиливает экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции

Копеева М.Ю.<sup>1</sup>, Азиева А.М.<sup>1</sup>, Черепов А.Б.<sup>1</sup>, Нестеренко М.В.<sup>2</sup>, Зарайская И.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

<sup>2</sup> ООО «Лактобио».

119331, Москва, просп. Вернадского, д. 29

**Целью** настоящей работы стало исследование влияния лактоферрина (Лф) человека на экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в первичных нейрональных культурах после физиологической стимуляции, определение точной локализации Лф человека и возможной колокализации экзогенного белка с индуцированной экспрессией c-Fos.

**Методы.** Первичные диссоциированные клеточные культуры получали из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6. Индукцию экспрессии белка c-Fos в клетках осуществляли путем трехкратного добавления 50 мМ KCl в культуральную среду на 8-й день культивирования *in vitro*. Анализ содержания c-Fos проводили иммунофлюоресцентным методом через 2 часа после стимуляции.

**Результаты.** Лф детектировался как в цитоплазме, так и в ядрах отдельных клеток культуры после стимуляции KCl. В ядрах некоторых клеток была выявлена колокализация включения Лф и экспрессии c-Fos. Было обнаружено, что предварительное введение Лф в культуральную среду увеличивало количество клеток, экспрессирующих c-Fos после добавления 50 мМ KCl.

**Ключевые слова:** лактоферрин человека; транскрипционный фактор c-Fos; нейрональные культуры; физиологическая стимуляция; цитоплазматическая и ядерная локализация.

**Для цитирования:** Копеева М.Ю., Азиева А.М., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Лактоферрин человека усиливает экспрессию транскрипционного фактора c-Fos в нейрональных культурах в условиях стимуляции. *Патогенез*. 2021; 19(1): 74-78.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2021.01.74-78

**Для корреспонденции:** Копеева Марина Юрьевна, e-mail: m.kopaeva@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

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

**Поступила:** 18.01.2021

## Human lactoferrin enhances the expression of transcription factor c-Fos in neuronal cultures under stimulated conditions

Копеева М.Ю.<sup>1</sup>, Азиева А.М.<sup>1</sup>, Черепов А.Б.<sup>1</sup>, Нестеренко М.В.<sup>2</sup>, Зарайская И.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Center «Kurchatov Institute»,

Ploshchad Akademika Kurchatova 1, Moscow 123182, Russian Federation

<sup>2</sup> Lactobio Ltd,

Prospekt Vernadskogo 29, Moscow 119331, Russian Federation

**The aims of this research were** 1) to study the effect of human lactoferrin (Lf) on the expression of the c-Fos transcription factor in primary neuronal cultures after physiological stimulation; 2) to determine the cellular localization of human Lf and possible colocalization of an exogenous protein with induced c-Fos expression.

**Methods.** Primary dissociated cell cultures were obtained from the hippocampus of newborn C57Bl/6 mice (P0-P1). The expression of c-Fos was induced by addition of 50 mM KCl to the culture medium at 8 day *in vitro*. c-Fos content was analyzed by immunofluorescence 2 hrs after stimulation.

**Results.** Lf was detected in cytoplasm and in nuclei after stimulation KCl. Lf inclusion and c-Fos expression were colocalized in the nuclei of some cells. Thus, results showed that pretreatment with Lf led to increase in the number of cells expressing c-Fos after exposure to 50 mM KCl.

**Key words:** human lactoferrin; transcription factor c-Fos; neuronal cultures; physiological stimulation; cytoplasmic and nuclear localization.

**For citation:** Копеева М.Ю., Азиева А.М., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. [Human lactoferrin enhances the expression of transcription factor c-Fos in neuronal cultures under stimulated conditions]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2021; 19(1): 74-78. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2021.01.74-78

**For correspondence:** Копеева Марина Юрьевна, e-mail: m.kopaeva@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received:** 18.01.2021

## Введение

Лактоферрин (Лф) — полифункциональный белок из семейства трансферринов. Он активно исследуется в экспериментальных патологических моделях заболеваний человека в качестве антиаллергического, иммуномодулирующего, радиопротекторного агента [1, 2], белка, способного ослабить прогрессирование нейродегенеративных заболеваний и стимулировать нейрорегенерацию [3]. Особый интерес вызывает способность Лф модулировать широкий спектр нейрональных процессов посредством изменения экспрессии генов, участвующих в долговременной нейропластичности (BDNF — Brain-Derived Neurotrophic Factor; CREB — cAMP Response Element-Binding protein, транскрипционный фактор; САМК — Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, и др.) [4, 5]. В качестве одного из маркеров долговременной пластичности нейронов широко используется экспрессия немедленного раннего гена *c-fos*, быстро активирующегося в ответ на внешние воздействия, в том числе стрессорные, и его продукта, транскрипционного фактора *c-Fos*. Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию специфических генов-мишеней в ответ на сигнальные события на клеточной мембране, опосредованные рецепторами. В культуре экспрессия немедленных ранних генов может быть индуцирована различными стимулами. Ранее было показано, что электрическая стимуляция вызывает значительное увеличение экспрессии *c-Fos* в нейрональной культуре [6], а аппликация КСI — появление белка *c-Fos* в культурах срезов гиппокампа [7]. В наших предыдущих исследованиях методами иммуногистохимии были выявлены высокоспецифичные места связывания лактоферрина человека (чЛф) в ядрах нейронов в мозге мыши [8]. В то же время возможная связь между Лф и индукцией *c-Fos* на уровне отдельных клеток еще не изучена.

Целью настоящей работы стало исследование влияния лактоферрина человека на экспрессию транскрипционного фактора *c-Fos* в первичных нейрональных культурах после физиологической стимуляции, определение клеточной локализации чЛф и возможной колокализации экзогенного белка с индуцированной экспрессией *c-Fos*.

## Материалы и методы исследования

Первичные диссоциированные клеточные культуры получали из гиппокампа головного мозга новорожденных мышей (P0-P1) линии C57Bl/6. Все манипуляции проводили в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ от 19.06.2013 г., а также требованиями Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 2 от 26.06.2019 г.). Клетки высаживали на стекла, предварительно обработанные 0,05% по-

лиэтиленимином, помещенные в 35-мм чашки Петри. Культуры клеток инкубировали при 37°C, 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub>, в среде Neurobasal (Gibco, 21103-049), содержащей биоактивную добавку B27 (Gibco, 17504-044) и глутамин (Gibco, 25030-024).

Нейрональные культуры были разделены на 6 групп: две экспериментальные («КСI», «КСI+Лф», *n* = 6 в каждой), две активного («АК», «АК+Лф», *n* = 6 в каждой) и две пассивного («ПК», «ПК+Лф», *n* = 5 в каждой) контроля. Индукцию экспрессии белка *c-Fos* в клетках осуществляли путем трехкратного добавления 50 мМ раствора КСI (3 × 2 мин, с интервалом 5 мин) в культуральную среду [7] на 8-й день культивирования *in vitro*. В качестве активного контроля использовали культуры с трёхкратной сменой среды. Группы пассивного контроля фиксировали одновременно с остальными без дополнительных манипуляций. За 24 часа до стимуляции, смены среды или фиксации в культуральную среду групп «КСI+Лф», «АК+Лф» и «ПК+Лф», соответственно, добавляли чЛф (1 мг/мл). В работе был использован человеческий Лф, выделенный из женского молозива методом препаративной ионообменной хроматографии [8].

Через 2 часа после стимуляции или смены среды культуры фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich) в PBS. Иммунофлюоресцентное окрашивание проводили с использованием козьих поликлональных антител к белку *c-Fos* (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-52-G) и кроличьих моноклональных антител (EPR4338) к лактоферрину (1:150; Abcam, ab109000), с последующей детекцией с помощью ослиных противокозьих антител, меченных флюорофором Alexa Fluor 488 (1:500; Abcam, ab150129) и ослиных противокроличьих антител, меченных флюорофором Alexa Fluor 568 (1:500; Abcam, ab175470). Кроме того, клеточные ядра докрашивали ДНК-специфическим маркером Hoechst 33258 (1:1000; Invitrogen, H-1398). Окрашенные культуры оцифровывали с помощью конфокального микроскопа FV10i (Olympus) и анализировали в программных пакетах Imaris 7.4.2 (Bitplane) и Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Количество *c-Fos*<sup>+</sup>-ядер было нормализовано на общее количество ядер, среднее арифметическое рассчитано по 10 полям зрения в каждой культуре.

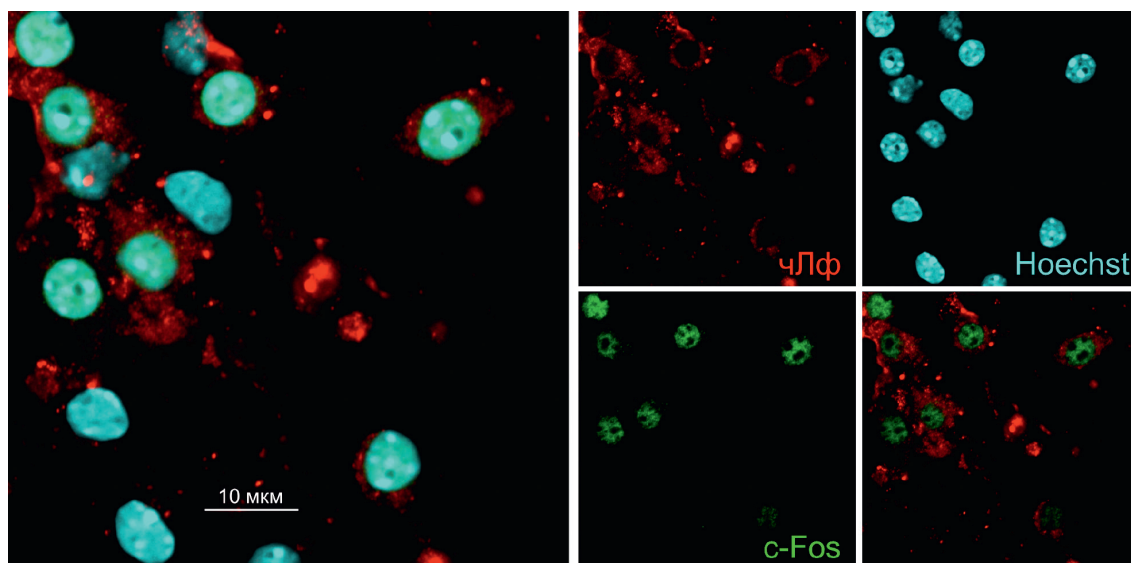
Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, California, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнительного анализа применяли непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса ANOVA с последующим *post hoc* анализом по критерию Данна для множественных сравнений. Для сравнения групп «КСI+Лф» и «КСI» использовали непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни. Данные представлены как медиана ± межквартильный размах. Различия считали достоверными при *p* < 0,05.

## Результаты исследования и обсуждение

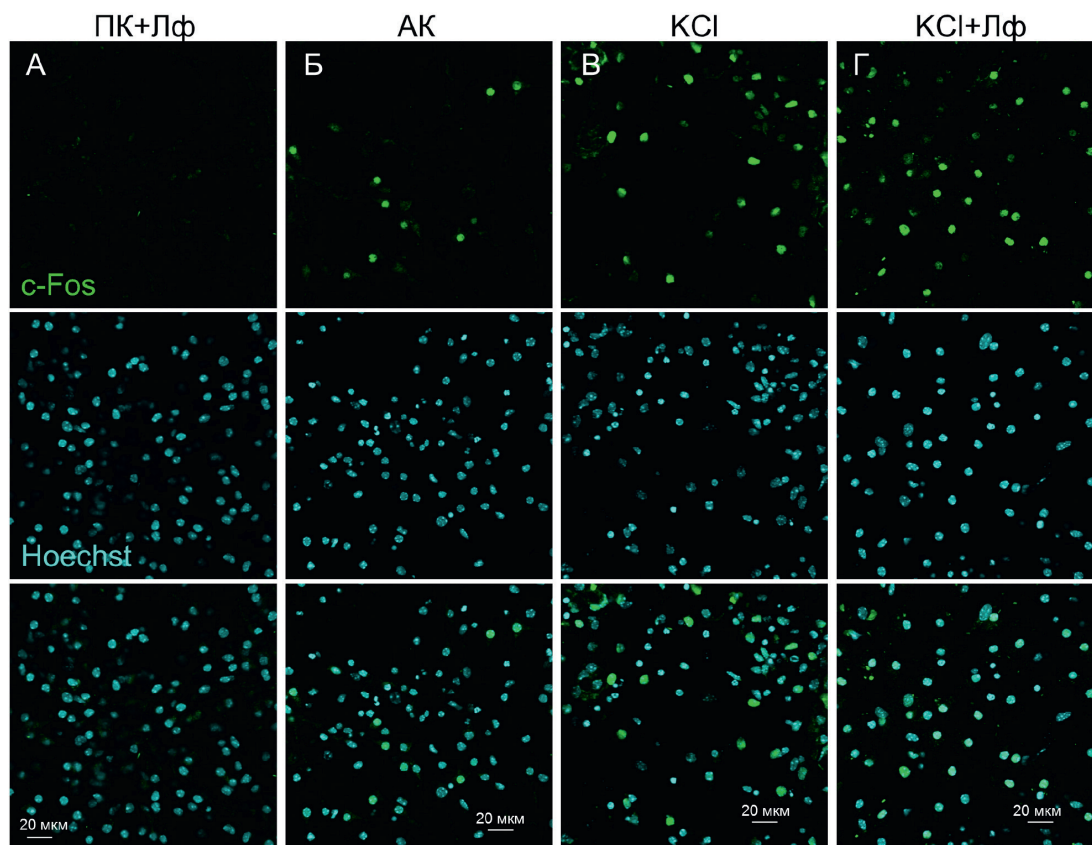
Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что Лф присутствовал как в цитоплазме, так и в ядрах отдельных клеток культуры после стимуляции. В ядрах некоторых клеток была выявлена колокализация вклю-

чения Лф и экспрессии c-Fos. Кроме того, Лф детектировался в цитоплазме всех c-Fos<sup>+</sup>-клеток (рис. 1).

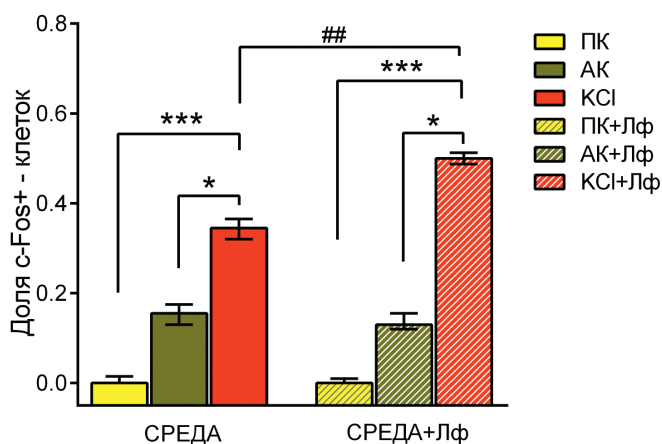
Исследование показало, что стимуляция вызывала индукцию экспрессии белка c-Fos в культурах клеток гиппокампа мышей, значительно отличающуюся от контроля (рис. 2).



**Рис. 1.** Иммунофлуоресцентная детекция белка c-Fos (зеленый) и лактоферрина (красный) в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 часа после стимуляции 50 мМ KCl. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой).



**Рис. 2.** Иммунофлуоресцентная детекция белка c-Fos (зеленый) в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 часа после стимуляции 50 мМ KCl. Ядра клеток докрашены Hoechst (голубой).



**Рис. 3.** Количественный анализ экспрессии белка с-Fos в культурах клеток гиппокампа на 8-е сутки культивирования *in vitro* через 2 часа после стимуляции 50 мМ KCl. Отличия от групп «AK» и «AK+Лф» обозначены – \* ( $p < 0,05$ ); отличия от групп «ПК» и «ПК+Лф» – \*\*\* ( $p < 0,001$ ); отличия от группы «KCl» – ## ( $p < 0,005$ ).

Гистологический анализ выявил увеличение количества с-Fos<sup>+</sup>-клеток как в группе «KCl» по сравнению с группами «ПК» ( $p = 0,0002$ ) и «AK» ( $p = 0,039$ ), так и в группе «KCl+Лф» по сравнению с группами «ПК+Лф» ( $p = 0,0002$ ) и «AK+Лф» ( $p = 0,038$ ). Результаты *post hoc* анализа представлены на рис. 3. Было обнаружено, что предварительное введение Лф увеличивало количество клеток, экспрессирующих с-Fos после добавления 50 мМ KCl («KCl+Лф» vs «KCl»,  $p = 0,0022$ ).

В совокупности наши данные свидетельствуют о том, что предварительное введение Лф в культуральную среду усиливало экспрессию транскрипционного фактора с-Fos в первичных нейрональных культурах в ответ на физиологическую стимуляцию 50 мМ KCl. Ранее было показано, что в большинстве случаев иммунореактивность Лф была локализована только в цитоплазме [9, 10]. В настоящей работе впервые показана ядерная локализация экзогенного чЛф и его колокализация с белком с-Fos после стимуляции 50 мМ KCl культур клеток гиппокампа мышей. Для дальнейшего изучения роли чЛф в клеточных процессах планируется исследовать влияние белка на развитие постстрессовой патологии нейронов мозга.

### Список литературы

- Garcia-Montoya I.A., Cendon T.S., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1820(3): 226-236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
- Копеева М.Ю., Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Карганов М.Ю. Лактоферрин положительно влияет на динамику восстановления физиологических и поведенческих показателей мышей при остром гамма-облучении. *Патогенез.* 2020; 18(1): 29-33. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33
- Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Pretreatment with human lactoferrin had a positive effect on the

- dynamics of mouse nigrostriatal system recovery after acute MPTP exposure. *Biology.* 2021; 10(1): 24. DOI: 10.3390/biology10010024
- Chen Y., Zheng Z., Zhu X., Shi Y., Tian D., Zhao F., Liu N., Hüppi P.S., Troy F.A., Wang B. Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 2015; 52: 256-269. DOI: 10.1007/s12035-014-8856-9
- Wang B. Molecular determinants of milk lactoferrin as a bioactive compound in early neurodevelopment and cognition. *J. Pediatr.* 2016; 173: S29-S36. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.02.073
- Суханова А.Л., Минеева О.А., Киселев И.И., Бурцев М.С., Анохин К.В. Выявление следовых процессов в системах нейронов, культивируемых на микроэлектродных матрицах. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012; 153(5): 538-541.
- Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8185. DOI: 10.1371/journal.pone.0008185
- Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. Transport of human lactoferrin into mouse brain: administration routes and distribution. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 167(4): 561-567. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3
- Tuccari G., Barresi G. Lactoferrin in human tumours: immunohistochemical investigations during more than 25 years. *Biometals.* 2011; 24: 775-784. DOI: 10.1007/s10534-011-9450-5
- Tammam S.N., Azzazy H.M.E., Lamprecht A. Nuclear and cytoplasmic delivery of lactoferrin in glioma using chitosan nanoparticles: Cellular location dependent-action of lactoferrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018; 129: 74-79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.05.027

### References

- Garcia-Montoya I.A., Cendon T.S., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1820(3): 226-236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
- Копеева М.Ю., Алчинова И.Б., Нестеренко М.В., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Карганов М.Ю. [Lactoferrin beneficially influences the recovery of physiological and behavioral indexes in mice exposed to acute gamma-irradiation]. *Patogenez. [Pathogenesis].* 2020; 18(1): 29-33. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.01.29-33 (in Russian)
- Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Нестеренко М.В., Зарайская И.Ю. Pretreatment with human lactoferrin had a positive effect on the dynamics of mouse nigrostriatal system recovery after acute MPTP exposure. *Biology.* 2021; 10(1): 24. DOI: 10.3390/biology10010024
- Chen Y., Zheng Z., Zhu X., Shi Y., Tian D., Zhao F., Liu N., Hüppi P.S., Troy F.A., Wang B. Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 2015; 52: 256-269. DOI: 10.1007/s12035-014-8856-9
- Wang B. Molecular determinants of milk lactoferrin as a bioactive compound in early neurodevelopment and cognition. *J. Pediatr.* 2016; 173: S29-S36. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.02.073
- Sukhanova AL, Mineyeva OA, Kiselev II, Burtsev MS, Anokhin KV. [Detection of trace processes in the networks of neurons cultured on microelectrode arrays]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine].* 2012; 153(5): 538-541. (in Russian)
- Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8185. DOI: 10.1371/journal.pone.0008185
- Копеева М.Ю., Черепов А.Б., Зарайская И.Ю., Нестеренко М.В. Transport of human lactoferrin into mouse brain: administration routes and distribution. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 167(4): 561-567. DOI: 10.1007/s10517-019-04572-3
- Tuccari G., Barresi G. Lactoferrin in human tumours: immunohistochemical investigations during more than 25 years. *Biometals.* 2011; 24: 775-784. DOI: 10.1007/s10534-011-9450-5
- Tammam S.N., Azzazy H.M.E., Lamprecht A. Nuclear and cytoplasmic delivery of lactoferrin in glioma using chitosan nanoparticles: Cellular location dependent-action of lactoferrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018; 129: 74-79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.05.027

---

### **Сведения об авторах**

*Копеева Марина Юрьевна* — научный сотрудник Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-6100-2830>

*Азиева Ася Магомедовна* — младший научный сотрудник Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0003-2222-6302>

*Черепов Антон Борисович* — ведущий инженер Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

*Нестеренко Михаил Владимирович* — доктор биологических наук, научный руководитель ООО «Лакто-био»; <https://orcid.org/0000-0002-0504-9853>

*Зарайская Ирина Юрьевна* — кандидат биологических наук, руководитель Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; <https://orcid.org/0000-0003-2371-0227>