

УДК [577.112.853+577.112.854]:57.083.3:616-092.9

Т. А. МИТЮКОВА¹, А. А. БАСАЛАЙ¹, Н. С. КОСТЮЧЕНКО¹, О. Е. ПОЛУЛЯХ¹,
Д. А. СЕМЕНОВ², О. В. СВИРИДОВ²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОЙ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОСТУПЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛАКТОФЕРРИНА В КРОВЯНОЕ РУСЛО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

² Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Проведение экспериментальных исследований на животных с пероральным введением рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ) требует контроля за поступлением препарата в кровь. Цель работы – изучить динамику поступления рчЛФ в кровь крыс после перорального введения в биологически активных дозах с использованием новой тест-системы ЛИФМА-рчЛФ. Проводилось введение рчЛФ *per os* крысам в дозах 100 и 200 мг препарата на 1 кг массы тела животного и определение белка в сыворотке крови через 1, 2 и 4 ч после введения. Показано дозозависимое увеличение концентрации иммунореактивной субстанции в сыворотке крови крыс через 1 ч после орального приема. Через 2 и 4 ч содержание определяемого вещества в сыворотке крови поступательно снижалось. Зарегистрирована зависимость определяемой концентрации ЛФ от используемой дозы препарата.

Ключевые слова: иммуноаналитическая система, рекомбинантный человеческий лактоферрин, крысы.

Введение. Лактоферрин (ЛФ) – это природный железосвязывающий гликопротеин, относящийся к семейству трансферринов, который содержится в молоке млекопитающих и других экзокринных выделениях, включая слезную жидкость, слюну и желчь. Исследования биологических свойств ЛФ продемонстрировали широкий спектр его эффектов, включая противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное, противоостеопоротическое, противогрибковое, антибактериальное, противовирусное, иммуномодулирующее, гепатопротекторное действие и другие полезные свойства [1]. Однако, изучение его предполагаемой лекарственной ценности, либо роли в питании требует дальнейших экспериментальных исследований. Следует подчеркнуть, что основной массив экспериментов по изучению ЛФ был выполнен с использованием коровьего ЛФ (кЛФ) [2]. Однако, не вызывает сомнений, что наиболее перспективным препаратом является человеческий ЛФ, это подтверждается литературными сведениями по изучению свойств ЛФ из грудного человеческого молока и рекомбинантного человеческого ЛФ (рчЛФ), полученного из молока трансгенных животных, а также из биологического материала других трансгенных продуцентов [3–5]. Интерес к медицинскому и диетологическому использованию рчЛФ нарастает во всем мире, о чем свидетельствует его производство в промышленных масштабах, которое осуществляется на базе различных биологических моделей растительного и животного происхождения. В этих целях используются грибы *Aspergillus awamori* (Agennix Inc., Houston, TX, USA), рис (Ventria Bioscience, Denver, CO, USA), трансгенные коровы (Pharming Group N.V., Leiden, The Netherlands), козы и др. Исследования показали, что рчЛФ отвечает критериям

структурного сходства с натуральным человеческим ЛФ [3–5]. В настоящее время в Республике Беларусь освоена технология производства химически чистого препарата рчЛФ из молока трансгенных коз и существует товарная продукция – препарат рчЛФ [4]. Изучение эффектов перорально введенного рчЛФ на крысах показало, что оптимальные дозы, оказывающие биологический эффект, составляют, примерно, 100 – 200 мг/кг [1, 2].

Важным вопросом, который возникает при введении ЛФ *per os*, является вопрос о его сохранности либо деградации при поступлении в пищеварительный тракт. Сведения, опубликованные в литературе, являются во многом противоречивыми. В одном из исследований было показано, что рчЛФ полностью разлагается в верхних отделах желудочно-кишечного тракта у людей, а в другом сообщалось, что более 60 % перорально введенного кЛФ проходит через желудок в структурно неповрежденной форме [6]. Скорость опорожнения желудка и рН желудочного содержимого, а также источник ЛФ играют важную роль в переваривании этого белка в естественных условиях. Информация об усвоении ЛФ у младенцев и новорожденных менее противоречива и демонстрирует значительную степень сохранности ЛФ, поступающего с молоком матери [6]. Однако на сегодняшний день нет данных, которые бы убедительно показывали степень и характер деградации молекулы ЛФ на разных стадиях переваривания, а также химическую структуру и функциональные свойства образующихся продуктов.

Для реализации возможности определения человеческого ЛФ из грудного молока и рчЛФ в разнообразных биологических жидкостях была разработана иммуноаналитическая система, основанная на принципе лантанидного иммунофлуориметрического анализа в микропланшетах (ЛИФМА-рчЛФ) [7]. Этот метод основан на уникальных физических свойствах редкоземельных металлов. В частности, органический комплекс иона европия, присоединенный к иммунореагенту, в диссоциативно-усиливающем растворе способен к долгоживущей флуоресценции с высоким квантовым выходом и большим стоксовым сдвигом. Это позволяет осуществить отсроченную во времени регистрацию флуоресцентного сигнала в длинноволновой области видимого спектра в условиях затухшей фоновой флуоресценции биологических объектов. Благодаря этому ЛИФМА объединил в себе очень хорошую чувствительность и широкий динамический диапазон определения аналита, в том числе и рчЛФ [8–10]. Исходя из вышеизложенного, представляло интерес использовать новую тест-систему ЛИФМА-рчЛФ для количественного определения рчЛФ в сыворотке крови крыс.

Цель работы – изучить динамику поступления рчЛФ в кровь крыс после перорального введения в биологически активных дозах с использованием тест-системы ЛИФМА-рчЛФ.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная работа была проведена на 28 половозрелых крысах-самцах Вистар с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Все манипуляции с животными были одобрены комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси. Масса тела крыс находилась в пределах 220 – 250 г. Животные были разделены на 7 подгрупп методом случайного распределения, таким образом, чтобы каждая подгруппа состояла из 4 крыс. Первая подгруппа животных служила контролем (№ 1 – 4). Животным этой группы *per os* вводили физиологический раствор в объеме 100 – 120 мкл на крысу. Крысам № 5 – 16 (n = 12) вводили перорально раствор рчЛФ в дозе 100 мг/кг (в объеме около 100 – 120 мкл). Крысы № 17 – 28 (n = 12) получали пероральную дозу рчЛФ 200 мг/кг в вышеприведенном объеме раствора. Животных выводили из эксперимента через 1, 2 и 4 ч после введения препарата. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования и хранили при -20 °С не более двух месяцев.

В работе был использован рчЛФ производства Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Концентрацию рчЛФ в сыворотке крови измеряли с использованием тест-системы ЛИФМА-рчЛФ. В ходе анализа рчЛФ из исследуемых разведенных сывороток или из калибровочных проб иммунохимически связывался в лунках микропланшета, поверхность которых была предварительно покрыта моноклональным антителом мыши против человеческого ЛФ (ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва). Затем другие антигенные детерминанты связанного рчЛФ взаимодействовали со специфическими кроличьими поликлональными антителами, содержащими 7 комплексированных ионов европия на макромолекулу как результат химической модификации N-сукцинимидным эфиром диэтилентриаминтетраацетата Eu^{3+} [10]. После каждого этапа избыток реагентов удалялся промывкой моющим раствором с оптимальным содержанием солей и детергента. В завершение ЛИФМА с помощью микропланшетного флуориметра DELFIA 1234 (Wallac Oy Финляндия) в диссоциативно-усиливающем растворе с pH 3,2, включавшем триоктилфосфиноксид, нафтоилтрифторацетон и тритон X-100, измерялась с временной задержкой 400 мкс долгоживущая флуоресценция (возбуждение – 320 нм, регистрация – 615 нм) высвободившихся из хелатного комплекса ионов европия. По калибровочной зависимости сигнала флуоресценции от концентрации рчЛФ производился расчет содержания рчЛФ в исследуемых пробах.

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе Statistica 7.0. Применялись непараметрические методы статистики, поскольку распределение величин отличалось от нормального. Срединная концентрация рчЛФ в сыворотке крови каждой группы крыс ($n = 4$) представлена в виде медианы и процентилей (Me [25; 75]) и выражена в мкг/л. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна-Уитни и подтверждали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Известно, что линейный диапазон измерений тест-системой ЛИФМА-рчЛФ охватывает интервал концентраций рчЛФ от 1,6 до 100,0 мкг/л [7]. Показатели линейности определения при разбавлении проб составляют 85 – 100 %. Точность анализа характеризуется коэффициентом вариации 6 %. Кроме того, в нашей работе для корректной оценки результатов определения концентрации рчЛФ в сыворотке животных было проведено предварительное испытание – определение низких, средних и высоких концентраций рчЛФ в сыворотке крови *in vitro* с использованием «метода добавок». В сыворотку крови были внесены рассчитанные концентрации рчЛФ – 2,1, 13,4 и 81,0 мкг/л. Далее эти концентрации определялись в пробах с использованием тест-системы ЛИФМА-рчЛФ (таблица). Как видно из данных, представленных в таблице 1, степень открытия низкой концентрации составила 110 %, средней – 93 % и высокой – 87 %.

Табл. Определение концентрации рчЛФ в сыворотке крови крыс *in vitro* («метод добавок»).

№ образца	Расчетная концентрация рчЛФ, мкг/л	Измеренная концентрация рчЛФ, мкг/л	Степень открытия, %
1	2,1	2,3 ± 0,2	110
2	13,4	12,5 ± 0,8	93
3	81,0	70,5 ± 2,1	87

Результаты определения концентрации рчЛФ в сыворотке крыс после перорального введения препарата представлены на рисунке 1. Следует отметить, что в сыворотке крови крыс контрольной группы, которым вводили *per os* физиологический раствор, рчЛФ не обнаруживался, так же как и эндогенный ЛФ крыс, который по литературным данным содержится в крови в диапазоне концентраций 100–2500 мкг/л [11]. Это подтверждает высокую специфичность тест-системы ЛИФМА-рчЛФ.

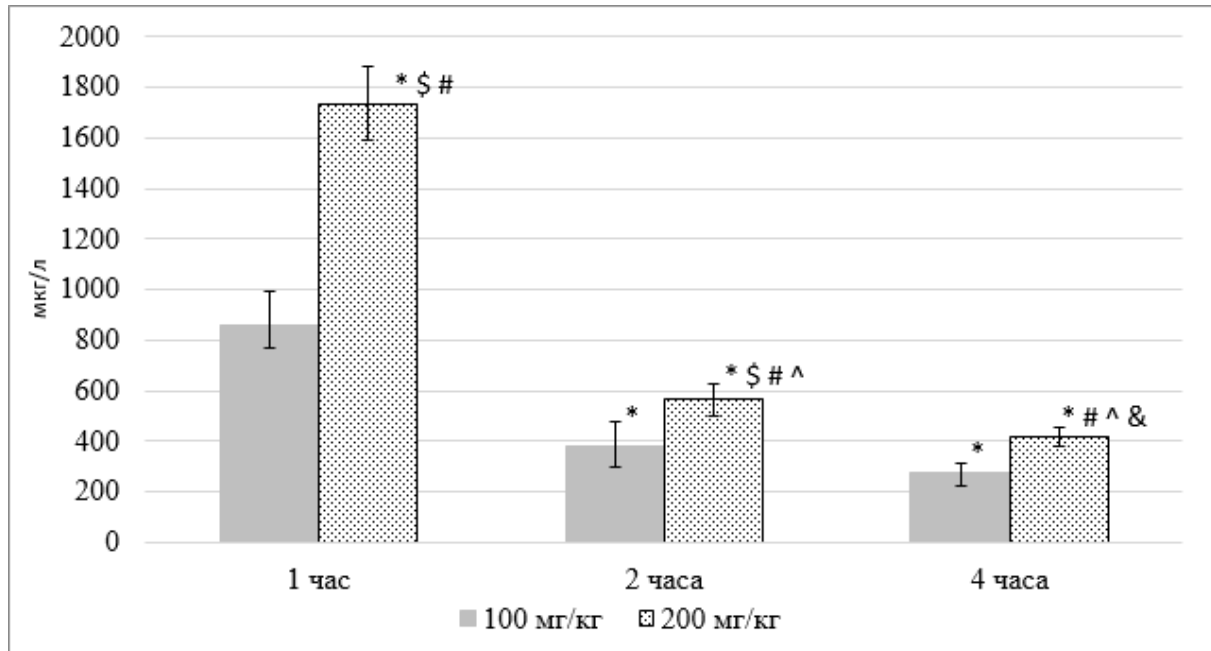


Рис. 1. Результаты определения концентрации рчЛФ в сыворотке крыс после перорального введения. Статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «100 мг/кг 1 ч», \$ – от группы «100 мг/кг 2 ч», # – от группы «100 мг/кг 4 ч», ^ – от группы «200 мг/кг 1 ч», & – от группы «200 мг/кг 2 ч».

При введении рчЛФ крысам в дозе 100 мг/кг максимальное содержание белка было зарегистрировано через 1 ч после введения – 856,00 [769,00; 995,00] мкг/л. Далее через 2 и 4 ч концентрация рчЛФ в сыворотке крови поступательно уменьшалась. Через 2 и 4 ч после введения содержание рчЛФ в сыворотке крови составляло соответственно 43,5 % и 30,5 % от максимального, снижаясь за эти интервалы времени, примерно в 2,3 и в 3,3 раза по отношению к максимальной зарегистрированной концентрации.

Результаты перорального введения крысам раствора рчЛФ в дозе 200 мг/кг также выявили максимальное содержание белка в сыворотке крови через 1 ч после введения – 1730,50 [1593,00; 1882,50] мкг/л, что практически в 2 раза выше, чем при дозе 100 мг/кг. Последнее характеризует четкую дозовую зависимость содержания белка в сыворотке крови по отношению к количеству перорально введенной субстанции. Через 2 и 4 ч после введения рчЛФ в дозе 200 мг/кг содержание рчЛФ в сыворотке крови составляло соответственно 32,5 % и 23,9 % от максимального, снижаясь за эти интервалы времени, примерно в 3 и в 4,2 раза по отношению к максимальной зарегистрированной концентрации.

Вопрос о поступлении ЛФ, введенного *per os*, в кровь и органы животных представляет большой интерес, причем, наиболее изученным в этом плане является кЛФ. Fischer et al. [12] показали временной ход поглощения и характер накопления в тканях кЛФ после внутрижелудочного введения однократной дозы мышам или у ежедневно получавших кЛФ мышей в течение 4-х недель. Уже через 10 – 20 мин после перорального введения белок кЛФ появлялся в определяемых концентрациях в крови и тканях мышей и

был зарегистрирован в содержимом желудка, тонкого и толстого кишечника в течение 1 ч после внутрижелудочного введения. Следует подчеркнуть, что на этих сроках белок обнаруживался в нативной форме с неизменной молекулярной массой (80 кДа). Авторы показали, что кЛФ достаточно устойчив к протеолитической деградации и легко всасывается в антигенной форме в кровь [12]. Takeuch et al. провели серию работ, посвященных изучению фармакокинетики введенного интрадуоденально кЛФ [13]. Эти исследования продемонстрировали, что введенный интрадуоденально кЛФ попадает в кровоток через лимфатическую жидкость грудного протока у взрослых крыс. Результаты иммуногистохимических исследований этих авторов подтвердили вышеуказанную систему транспортировки кЛФ [13]. Таким образом, поглощенный ЛФ не сразу метаболизируется в печени, что позволяет предположить, что он может распределяться по всему организму в эффективной дозе. Есть сведения об аналогичной системе транспортировки кЛФ у поросят [13]. В любом случае, эти данные указывают на то, что кЛФ, транспортируемый к эпителиальным клеткам из просвета кишечника, попадает в кровоток по лимфатическому пути, а не через портальное кровообращение. Что касается взрослых крыс, которым вводили кЛФ интрадуоденально, то результаты являются неоднозначными, поскольку воздействие пепсина может приводить к частичной деградации молекулы белка, что зависит от pH желудочного сока и времени нахождения белка в желудке [6]. В работе [14] установлено, что кЛФ в энтеросолюбильной форме менее чувствителен к желудочному пепсину и более эффективно всасывается из кишечника, чем кЛФ в не энтеросолюбильной форме. Наряду с этим существуют данные, что кЛФ может перевариваться желудочным пепсином с образованием биологически активного пептида лактоферрицина [15], причем лактоферрицин обладает многочисленными биологическими активностями, сходными с активностью ЛФ.

Полученные нами результаты согласуются с выводами работы [12], свидетельствующими о быстром поступлении ЛФ в кровь при пероральном приеме. Учитывая эти сведения, можно предположить, что определяемый сэндвич-системой белок представляет собой либо нативную молекулу рчЛФ, либо ее крупные иммунореактивные фрагменты. Вопрос о степени сохранности молекулы ЛФ, о количестве и свойствах образующихся биологически активных пептидов при пероральном введении ЛФ является предметом дискуссий и требует проведения дальнейших исследований.

Заключение. В результате проведенной работы получено подтверждение, что перорально введенный рчЛФ поступает в кровь животных в виде иммунореактивных молекул нативного белка, либо иммунореактивных пептидов и обнаруживается тест-системой ЛИФМА-рчЛФ. Зарегистрирована четкая зависимость определяемой максимальной концентрации ЛФ (через 1 ч после введения) от используемой дозы. Полученные результаты дают основание для проведения дальнейших исследований по изучению биологических эффектов рчЛФ в экспериментах на животных. Перспективным направлением является изучение биологических свойств пептидов, образующихся при переваривании ЛФ в желудочно-кишечном тракте и поступающих в кровь.

Литература:

- [1]. Ashraf M.F., Zubair D., Bashir M.N. et al. Nutraceutical and health-promoting potential of lactoferrin, an iron-binding protein in human and animal: current knowledge // Biol Trace Elem Res. 2024. Vol. 202. № 1. P. 56–72.
- [2]. Елизарова А.Ю., Костевич В.А., Войнова И.В. и др. Лактоферрин как перспективное средство в терапии метаболического синдрома: от молекулярных механизмов до клинических испытаний // Медицинский академический журнал. 2019. Т. 19. № 1. С. 45–64.

- [3]. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // *Биофармацевт. журн.* 2010. Т. 2. № 3. С. 3–19.
- [4]. Будевич А.И. Перспективы рекомбинантного лактоферрина человека, получаемого из молока коз-продуцентов // *Наука и инновации.* 2016. № 6. С. 29–32.
- [5]. Агиевич И.С., Костеневич А.А., Фальковская У.В. и др. Мировая практика получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (обзор) // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты.* 2017. Т. 9. С. 9–30.
- [6]. Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion // *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019. Vol. 59. № 4. P. 580–596.
- [7]. Семенов Д.А., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. Лабораторная иммунофлуоресцентная система для количественного определения лактоферрина человека в биологических жидкостях // *Новости медико-биологических наук.* 2022. Т. 22. № 3. С. 119–120.
- [8]. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V.M. et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays // *Anal Biochem.* 1984. Vol. 137. № 2. P. 335–343.
- [9]. Куприенко О.С., Дубовская Л.В., Шабуня П.С. и др. Функционализированные металлохелаты на основе диэтилентриаминтетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул // *Биоорганич. химия.* 2015. Т. 41. № 6. С. 675–685.
- [10]. Семенов Д.А., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. Новые иммуноаналитические системы на основе рекомбинантного лактоферрина человека // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* 2021. Т. 65. № 3. С. 290–302.
- [11]. Shimazaki K. Lactoferrin: A marvelous protein in milk? (review) // *Anim. Sci. J.* 2000. Vol. 71. № 4. P. 329–347.
- [12]. Fischer R., Debbabi H., Blais A. et al. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues // *Int Immunopharmacol.* 2007. Vol. 7. № 10. P. 1387–1393.
- [13]. Takeuchi T., Kitagawa H., Harada E. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats // *Exp Physiol.* 2004. Vol. 89. № 3. P. 263–270.
- [14]. Takeuchi T., Jyonotsuka T., Kamemori N. et al. Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats // *Exp Physiol.* 2006. Vol. 9. № 16. P. 1033–1040.
- [15]. Wakabayashi H., Takase M., Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin // *Curr Pharm Des.* 2003. Vol. 9. № 16. P. 1277–1287.

T. A. MITYUKOVA¹, A. A. BASALAI¹, M. S. KASTSIUCHENKA¹, O. Y. POLULIAKH¹, D. A. SEMENOV²,
O. V. SVIRIDOV²

USE OF A NEW IMMUNOASSAY SYSTEM TO STUDY THE ENTRY OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN INTO THE BLOODSTREAM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

¹*State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

²*State Scientific Institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

Conducting experimental studies on animals with oral administration of recombinant human lactoferrin (rLF) requires monitoring of the drug's entry into the bloodstream. The aim of the work is to study the dynamics of the intake of rLF into the blood of rats after oral administration in biologically active doses using the new LIFMA-rLF test system. rLF per os was administered to rats at doses of 100 and 200 mg per 1 kg of animal body weight and serum protein was determined 1, 2 and 4 hours after administration. A dose-dependent increase in the concentration of the immunoreactive substance in the blood serum of rats was shown 1 hour after oral administration. After 2 and 4 hours, the content of the detectable substance in the blood serum decreased progressively. The dependence of the determined concentration of LF on the dose of the drug administered has been recorded.

Keywords: immunoassay system, recombinant human lactoferrin, rats.