

УДК 577.112.7+547.458

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. Н. М. Местечкина*, О. А. Безбородова**, А. В. Ильина***, А. Н. Левов***,
С. Ю. Клейменов****, Е. Р. Немцова**, Р. И. Якубовская**, В. Д. Щербухин*, В. П. Варламов***

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071

**Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена МЗиСР РФ, Москва 125284

***Центр “Биоинженерия” РАН, Москва 117312

****Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334

e-mail: mestnm@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Исследовано влияние нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную (АОА) и детоксицирующую активности лактоферрина (ЛФ), длительность его циркуляции в организме. Помимо природных полимеров, были синтезированы производные хитозана с различными функциональными группами. На основании теста АОА из них отобрано 5 полисахаридов. При изучении детоксицирующего действия ЛФ на двух моделях индуцированного токсикоза выявлены полисахариды, которые сохраняли или усиливали эту активность ЛФ. Установлено, что образование комплекса лактоферрина с двумя галактоманнанами и сукциноилхитозаном приводило к положительным изменениям свойств ЛФ: детоксицирующая активность белка оставалась неизменной или увеличивалась на фоне замедления его выведения из организма.

Полисахариды, обладающие биологической активностью, такие, как инулин, декстраны, альгинаты, глюко- и галактоманнаны, хитозаны, широко используются в пищевой, косметической, фармацевтической и других отраслях промышленности и медицине. Известно, что, помимо собственной биологической активности, некоторые полисахариды изменяют активность других химических соединений. Так, полисахариды способны обеспечивать адресную доставку лекарственных средств в организме [1, 2], а также пролонгировать их действие [3]. Например, конъюгат галактоманнана с антибиотиком адриамицином используется для доставки последнего к рецепторам гепатоцитов, специфичным к α -галактозе [4].

Сульфатированный по N и 6-O хитозан значительно увеличивал активность *in vitro* и *in vivo* фактора роста костной ткани [5]. Выявлено, что хитозаны в составе вакцин способны усиливать иммунный ответ животных [6, 7].

Известны нанопрепараты пролонгированного действия на основе полисахаридов [8, 9]. Наноструктуры комплекса хитозан–альгинат с нифедипином [8] обеспечивают снижение артериального давления в течение длительного времени. Хитозан-гиалуроновые наночастицы, содержащие гепарин, используются при антиастматической терапии [9]. Подобные результаты вызывают интерес к изучению влияния нетоксичных и широко распространенных полисахаридов на функциональную активность белков.

В качестве модельного белка был выбран используемый в практической медицине лактоферрин (ЛФ) человека – полифункциональный железосодержащий гликопротеин из семейства трансферринов. Макромолекула белка состоит из одной полипептидной цепи (~700 аминокислотных остатков), которая образует 2 глобулярные N- и C-доли, каждая из которых содержит железосвязывающий домен. Лактоферрин способен связывать ионы железа и других металлов переменной валентности, что придает ему свойства активного антиоксиданта. Белок в высокой степени гликозилирован, его молекулярная масса (ММ) составляет около 80 кДа [10]. Он содержится в секреторных жидкостях, нейтрофилах и плазме крови.

ЛФ обладает антиоксидантной (АОА), антимикробной и иммуномодулирующей активностью, благодаря чему осуществляет детоксицирующее и противовоспалительное действие при патологических состояниях организма различного генеза [11–14]. Распространенность ЛФ косвенно свидетельствует о его защитной роли в организме, а недостаточный уровень ЛФ коррелирует с продолжительным и тяжелым течением воспалительных заболеваний. На основе природного ЛФ, выделенного из женского молока, разработан и зарегистрирован препарат “Лапрот” (№ ЛС-002374 от 15.12.2006 г.). Результаты испытаний препарата показали его высокую терапевтическую эффективность при лечении токсических состояний, обусловленных различными забо-

леванями, в частности гнойно-воспалительными, септическими и др. [14–16].

Однако при введении экзогенного ЛФ в кровоток он быстро элиминируется из организма и для поддержания эффективной концентрации требуется его систематическое введение. Увеличение продолжительности нахождения ЛФ в кровотоке гипотетически возможно с помощью создания высокомолекулярных комплексов ЛФ с полисахаридами. Такие препараты отсутствуют в настоящее время как в России, так и за рубежом. Имеется лишь сообщение о начале разработки препарата длительного действия на основе микрочастиц хитозана, содержащих ЛФ [17].

Для выбора полисахаридов, способных образовывать комплексы с ЛФ и пролонгировать его действие, было необходимо провести скрининг полисахаридов. Для этой цели нами был выбран ряд малотоксичных, растворимых в воде полисахаридов различного состава, структуры и происхождения — растительные глюко- и галактоманнаны, арабиногалактан; хитозан ракообразных и его синтетические производные, декстран. Наличие реакционноспособных функциональных групп в молекулах отобранных полисахаридов имеет принципиальное значение для дальнейших химических модификаций, которые могли бы обеспечить либо усиление присущих этим полисахаридам свойств, либо появление новых.

Важными характеристиками функциональной активности ЛФ являются антиоксидантная активность, детоксицирующая способность и скорость выведения из организма.

Цель работы — изучение влияния полисахаридов на функциональную активность ЛФ человека и выявление гликополимеров, обладающих способностью пролонгировать его действие.

МЕТОДИКА

Полисахариды. Использовали хитозан, галактоманнан, глюкоманнан, арабиногалактан и декстран.

Галактоманнан (ГМ) семян *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub сем. бобовых выделен и очищен из коммерческого источника (Gum Guar, “Sigma”, США) по методике, описанной ранее [18]. Частичной кислотной деполимеризацией получены 4 фракции полисахарида с различными ММ 89, 110, 147 и 226 кДа, которые определяли вискозиметрическим методом [18].

Глюкоманнан (ГЛМ) получен и очищен из корневой растения *Eremurus comosus* O. Fedtsch. сем. лилейных по методике, описанной в [19].

Арабиногалактан (АРГ) получен в НПФ “Флавит” (Пушино, Россия).

Декстран с ММ 60 кДа выпускается ОАО “Биохимик” (Саранск, Россия).

Исходный хитозан с ММ 700 кДа и степенью дезацетилирования (СД) $85 \pm 3\%$ получен в ЗАО “Биопрогресс” (Щелково, Россия).

Для синтеза производных хитозана использовали реагенты: янтарный и малеиновый ангидриды, 2-гидрокси-3-метоксибензальдегид, йодистый метил и пиросульфит натрия (“Fluka”, Швейцария).

Степень замещения (СЗ) и СД производных определяли аналитическими и спектральными методами [20, 21].

Молекулярную массу низкомолекулярных хитозанов и арабиногалактана определяли методом высокоэффективной гельпроникающей хроматографии [22]. Средневязкостную ММ исходного и гидролизованного хитозана (700 и 387 кДа) измеряли в вискозиметре Уббелодде при 25°C в Na-ацетатном буфере [23]. Для глюко- и галактоманнанов использовали вискозиметр Оствальда.

Моносахаридный состав арабиногалактана, глюко- и галактоманнанов устанавливали в их гидролизатах в виде ацетатов полиолов на хроматографе “Shimadzu GC 2010” (Япония).

Лактоферрин. В работе использовали лактоферрин человека, выделенный из женского молока (“МНИОИ им. П.А. Герцена”, Россия) [24], поликлональные антитела кролика к ЛФ человека (“ICN Biomedicals”, США), конъюгат антител к ЛФ человека с пероксидазой хрена (“МНИОИ им. П.А. Герцена”, Россия), цисплатин (“Эбеве”, Австрия).

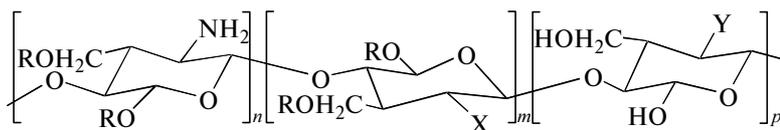
Молекулярную массу ЛФ человека определяли методом электрофореза в ПААГ [25], используя набор белков-маркеров (“Sigma”, США).

Аналитический электрофорез по методу Лемли [26] проводили в 7.5%-ном ПААГ в денатурирующих и неденатурирующих условиях. Гели окрашивали по стандартной методике раствором Кумасси R-250 бриллиантового голубого в уксусной кислоте.

Антигенную аутентичность белковых комплексов подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга-анализа. В качестве хромогена использовали 3,3-диаминобензидинтетрахлорид (“Sigma”, США) с 0.03% H₂O₂.

Антиоксидантная активность. АОА ЛФ (индивидуального и в составе комплекса) определяли *in vitro* в гомогенате печени мышей (линия BDF1, самки). Метод основан на способности исследуемого вещества ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенате печени мышей [27]. Антиоксидантную активность рассчитывали, как обратную величину от концентрации исследуемого образца, необходимой для 50% ингибирования ПОЛ, и выражали в условных единицах (усл. ед.).

Детоксицирующее действие. Активность изучали на моделях токсикоза, индуцированного введением токсической дозы (LD₅₀) цитостатического препарата цисплатина — цис-дихлордиаминплатины —



- I – $n = 5$; $m = 15$; $p = 80$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; $R = \text{H}$
 II – $n = 60$; $m = 2$; $p = 38$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NHCOCH}_2\text{CH}(\text{SO}_3\text{H})\text{COOH}$; $R = \text{H}$
 III – $n = 85$; $m = 15$; $p = 0$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NH}_2$; $R = \text{SO}_3\text{H}$
 IV – $n = 78$; $m = 2$; $p = 20$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = 2\text{-гидрокси-3-метоксибензиламин}$; $R = \text{H}$
 V – $n = 83$; $m = 2$; $p = 15$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$; $R = \text{H}$

Рис. 1. Структура производных хитозана: I – сукциноилхитозан; II – сульфат сукциноилхитозана; III – сульфат хитозана; IV – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан; V – метилированное производное хитозана.

ДДП или введением гепатотропного яда – четыреххлористого углерода (CCl_4).

Определение содержания ЛФ. Концентрацию ЛФ в биологических образцах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в “сэндвич” варианте [28].

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Термодинамические характеристики связывания лактоферрина с галактоманнаном исследовали с помощью калориметра изотермического титрования $i\text{T}_{200}$ (“MicroCal”, США), как описано ранее [29]. Эксперименты проводили при 25°C в изотоническом растворе. Аликвоты лиганда (2.5 мкл) добавляли в калориметрическую ячейку объемом 200 мкл до получения полной изотермы связывания. Концентрацию белка в калориметрической ячейке варьировали в пределах 10–20 мкМ, а концентрацию галактоманнана в титрующем шприце – 100–400 мкМ. Теплоу разбавления определяли титрованием буфера раствором лиганда, после чего изотерму разбавления вычитали из изотермы связывания, а полученную кривую обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета MicroCal Origin 7.0.

Измерение параметров денатурации белка производили при помощи микрокалориметра DASM-4M (СКБ Научного приборостроения РАН, Пушкино, Россия) с капиллярными ячейками объемом 467 мкл. Скорость нагрева $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, давление 2.2 бар.

Системы. Растворы ЛФ–полисахарид готовили следующим образом: лиофильно высушенный образец полисахарида растворяли в 0.15 М хлориде натрия (3 мг/мл), затем добавляли раствор лактоферрина (2.5 мг/мл) до конечной концентрации по ЛФ и полисахариду 1 мг/мл. Раствор тщательно перемешивали в течение 20 мин, получая системы ЛФ–полисахарид с соотношением компонентов 1 : 1 по массе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали широкий спектр полисахаридов: полусинтетические производные хитозана, галакто-

маннаны с различной степенью полимеризации, глюкоманнан, арабиногалактан и декстран.

Для синтеза производных хитозана (рис. 1) использовали образцы низкомолекулярного полисахарида (ММ 387, 60 и 7 кДа), полученные в результате ферментативного и кислотного гидролиза [30, 31] высокомолекулярного препарата (ММ 700 кДа, СД 85%). В результате дальнейшей химической модификации хитозана в состав полисахарида были введены 3 вида заместителей: несущие кислотные и основные функции и группы, придающие соединениям антиоксидантные свойства.

Для синтеза первой группы производных хитозана были осуществлены реакции: сукцинирование полисахарида янтарным ангидридом методом, описанным в работе [32]; сульфосукцинирование с помощью малеинового ангидрида и метабисульфита натрия по [33]; сульфатирование сульфотриоксидом пиридина в диметилформамиде по [34]. Получены 3 вида производных: сукциноилхитозан с СЗ 0.80 (рис. 1, I, исходный хитозан ММ 387 кДа, СД 85%); сульфат сукциноилхитозана с СЗ 0.40 (рис. 1, II, исходный хитозан ММ 7 кДа, СД 98%); и сульфат хитозана с СЗ 1.5 (рис. 1, III, исходный хитозан ММ 60 кДа, СД 85%).

Для получения второй группы производных использовали хитозан с ММ 7 кДа, СД 98%. Метилированное производное – кватернизированный хитозан (рис. 1, V) был синтезирован действием йодистого метила на полисахарид в щелочной среде N-метилпирролидона [35].

Третья группа производных представлена соединением – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозаном (рис. 1, IV), полученным взаимодействием полисахарида (ММ 7кДа, СД 98%) с 3-метокси-2-гидроксибензальдегидом и последующим восстановлением имина боргидридом натрия [36].

Галактоманнаны представляют собой линейный 1-4- β -D-маннан, часть моносахаридных остатков которых замещена по С-6 единичными остатками α -галактозы. Частичной кислотной деполимеризацией были получены фракции полисахарида с ММ

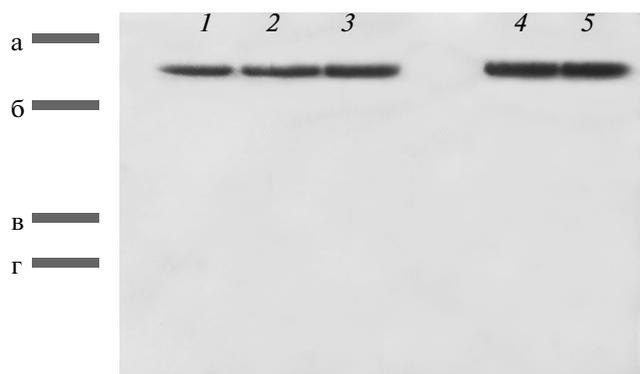


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях: 1 – ЛФ человека; 2 – ЛФ–ГМ (ММ 89); 3 – ЛФ–ГМ (ММ 110); 4 – ЛФ–АРГ; 5 – ЛФ–сукциноилхитозан. Белки метчики (кДа): а – фосфоорилаза (94), б – бычий сывороточный альбумин (67), в – яичный альбумин (43), г – карбоангидраза (30).

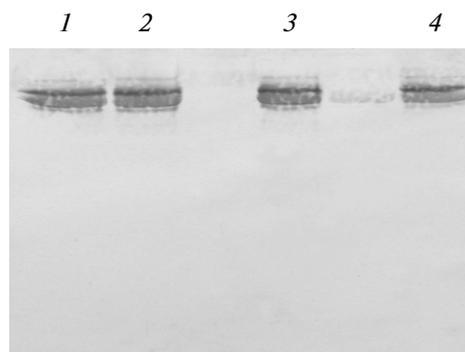


Рис. 3. Иммуноблоттинг ЛФ человека, входящего в состав комплексов с полисахаридами, с использованием поликлональных антител кролика к ЛФ человека: 1 – ЛФ; 2 – ЛФ–ГМ (ММ 89); 3 – ЛФ–АРГ; 4 – ЛФ–сукциноилхитозан.

89, 110, 147 и 226 кДа. Соотношение Ман : Гал во всех фракциях составило 1.66 ± 0.03 .

Глюкоманнаны – полисахариды, линейная цепь которых содержит 1,4-β-манно- и глюкопиранозные остатки и 2.4% ацетильных групп, локализованных при С-2 и/или С-3 остатках маннозы. Соотношение Ман : Глю полисахарида составило 1.60 ± 0.04 , ММ – 87.8 кДа.

Арабиногалактан – полисахарид, главная цепь которого состоит из 1,3-β-галактопираноз; к части звеньев по С-6 присоединены ответвления из арабинозы в фуранозной и пиранозной форме, β-галактопиранозы. Остатки в боковых цепях связаны между собой 1,3- и 1,6-гликозидными связями. Соотношение Гал : Ара = 8.6 ± 0.2 , ММ – 16.5 кДа.

Растворы систем ЛФ–полисахарид готовили, как описано в разделе “Методика”.

Для подтверждения идентичности индивидуального ЛФ и в комплексе с полисахаридами был использован следующий подход. Комплексы ЛФ с полисахаридами анализировали методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Образцы индивидуального ЛФ и в комплексе с полисахаридами образуют узкую, хорошо очерченную полосу (рис. 2), которая соответствует компоненту с молекулярной массой 75.5 ± 0.5 кДа, что хорошо совпадает со значением для коммерческого ЛФ человека.

Антигенную аутентичность подтверждали с помощью Вестерн-блоттинг-анализа. Для этого после окончания электрофореза в неденатурирующих условиях гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану. В результате было показано специфическое взаимодействие ЛФ, входящего в состав комплексов с полисахаридами и контрольного образца ЛФ человека, с поликлональными антителами к ЛФ человека (рис. 3).

Для установления влияния присутствия полисахаридов на антиоксидантную активность ЛФ, образ-

цы анализировали в биологической тест-системе *in vitro*, основанной на способности исследуемого вещества ингибировать ПОЛ в гомогенате печени контрольных животных. Данные по изучению АОА представлены в таблице. В качестве контроля использовали ЛФ человека. При его концентрации в пробе 118 ± 8 мкг/мл достигалось 50%-ное ингибирование ПОЛ. Ни один из исследованных полисахаридов не обладал собственной АОА, однако они значительно различались по своему влиянию на антиоксидантную активность лактоферрина.

Производные хитозана, имеющие в структуре кислые группировки (рис. 1, I, II, III; таблица, комплексы 1, 2 и 3), приводят к уменьшению АОА ЛФ, что, по-видимому, связано с ионными взаимодействиями между разноименно заряженными группами полисахарида и белка, влияющими на активный центр лактоферрина.

В случае производного IV (рис. 1), увеличение АОА ЛФ на 10% (таблица, 4) до 934 усл. ед. (контроль ЛФ – 847 усл. ед.), по-видимому, связано с наличием в полисахариде метоксигидроксibenзильной группировки, способной к окислению, а также и к координации с ионами железа.

Квартенизированное производное хитозана (рис. 1, V) увеличивало общий положительный заряд, что, вероятно, и приводило к увеличению активности ЛФ (таблица, 5) на 8% (917 усл. ед.). Таким образом, производные хитозана с заместителями, способными к окислению, или с группами, несущими положительный заряд, могут рассматриваться, как перспективные полисахариды для повышения АОА ЛФ при образовании комплексов с гликопротеином.

Как видно из таблицы, системы 6 и 7 высокомолекулярных галактоманнанов и система 10 глюкоманнана понижают АОА лактоферрина. Большая молекулярная масса двух фракций галактоманнана

Антиоксидантная активность лактоферрина в присутствии полисахарида

№	Система	Ингибирование (50%), мкг/мл	Активность, ед.
Производные хитозана			
1	ЛФ–сукциноилхитозан	140	714
2	ЛФ–сульфосукциноилхитозан	160	625
3	ЛФ–сульфат хитозана	152	657
4	ЛФ–N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан	107	934
5	ЛФ–метилированное производное хитозана	109	917
Галактоманнаны (ГМ)			
6	ЛФ–ГМ, ММ 226 кДа	239	418
7	ЛФ–ГМ, ММ 147 кДа	181	552
8	ЛФ–ГМ, ММ 110 кДа	119	840
9	ЛФ–ГМ, ММ 89 кДа	121	826
10	ЛФ–ГЛМ	157	637
11	ЛФ–декстран	180	556
12	ЛФ–декстран + ГМ (ММ 110 кДа)	161	621
13	ЛФ–арабиногалактан	125	800
	Контроль ЛФ	118 ± 8	847
	Контроль (полисахариды): сукциноилхитозан, сульфосукциноилхитозан, сульфат хитозана, N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, метилированное производное хитозана; ГМ – ММ 226 кДа, 147 кДа, 110 кДа, 89 кДа; ГЛМ; декстран; арабиногалактан	не ингибируют	

(ММ 226 и 147 кДа), по-видимому, создает стерические затруднения для ЛФ, что и приводит к уменьшению его АОА. Вероятно, аналогичный эффект наблюдается и для линейной, более жесткой структуры макромолекулы глюкоманнана.

Комплекс ЛФ с декстраном и тройная система (таблица, 11, 12) ЛФ–декстран–ГМ (ММ 110 кДа) также обладали меньшей активностью (556 и 621 усл. ед.) – 65 и 73% от активности нативного ЛФ – 847 усл. ед. Подобный результат может объясняться глобулярной структурой декстрана.

Анализ полученных данных в группе галактоманнанов (ГМ) показал, что в условиях используемой нами тест-системы, комплексы 8 (ГМ с ММ 110 кДа) и 9 (ГМ с ММ 89 кДа) практически не изменяли величину АОА ЛФ – 840 и 826 усл. ед. соответственно. Незначительно изменял активность ЛФ также и арабиногалактан (система 13) – 800 усл. ед. (на 5.5%).

Таким образом, в результате исследования влияния нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную активность лактоферрина выявлено 5 физиологически активных полисахаридов, а именно: производные хитозана – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан и метилированный хитозан, а также галактозосодержащие полисахариды – ГМ (110 кДа), ГМ (89 кДа) и АРГ.

Влияние гликополимеров на детоксицирующее действие ЛФ оценивали на двух моделях токсикоза у животных: индуцированного противоопухолевым препаратом – цисплатином, широко используемым в схемах полихимиотерапии и гепатотропным ядом – четыреххлористым углеродом.

Цисплатин вызывает целый комплекс токсических реакций. Применение этого препарата в высоких дозах вызывает гибель животных от острой токсичности. Из результатов, представленных на рис. 4, следует, что однократное введение ДДП в дозе 16 мг/кг приводило к 60 ± 10%-ной гибели животных от острого токсикоза.

В контрольной группе животных, получавших ЛФ человека (Лапрот), гибель от токсического действия ДДП составила 20 ± 10%. Для индивидуальных полисахаридов аналогичная величина составила 60 ± 10%, т.е. полисахариды не проявляли детоксицирующей активности. В группах животных, которым вводили системы из группы производных хитозана – ЛФ–N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, ЛФ–метилированное производное, ЛФ–сукциноилхитозан и ЛФ–АРГ наблюдалось снижение гибели животных до 30 ± 10%, а в группах животных, которые получали комплексы из группы галактоманнанов – ЛФ–ГМ (ММ 89 кДа) и ЛФ–ГМ (ММ 110 кДа) летальность составила только 20 ± 10% (рис. 4).

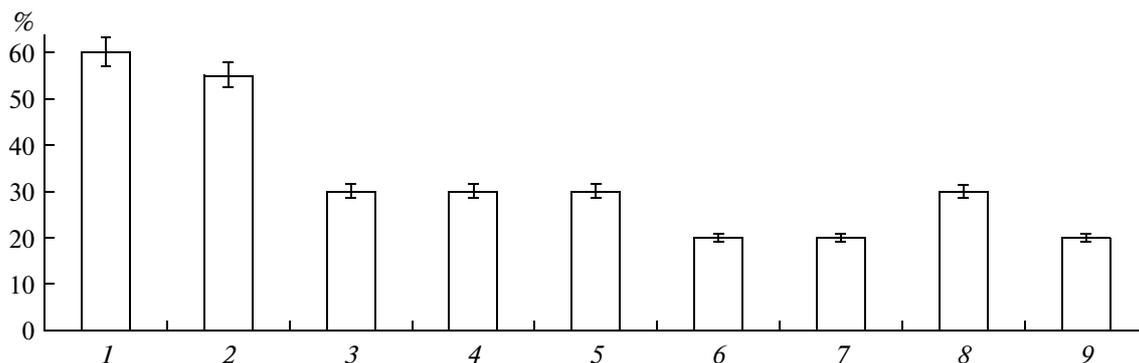


Рис. 4. Влияние систем ЛФ—полисахарид на токсическое действие ДДП: 1 — контроль ДДП, 2 — контроль полисахарида, 3 — ЛФ—N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, 4 — ЛФ—метилованное производное хитозана, 5 — ЛФ—сукциноилхитозан, 6 — ЛФ—ГМ (ММ 89), 7 — ЛФ—ГМ (ММ 110), 8 — ЛФ—АРГ, 9 — контроль ЛФ. Образцы вводили в разовой дозе 10 мг/кг в течение 3 сут (курсовая доза 30 мг/кг).

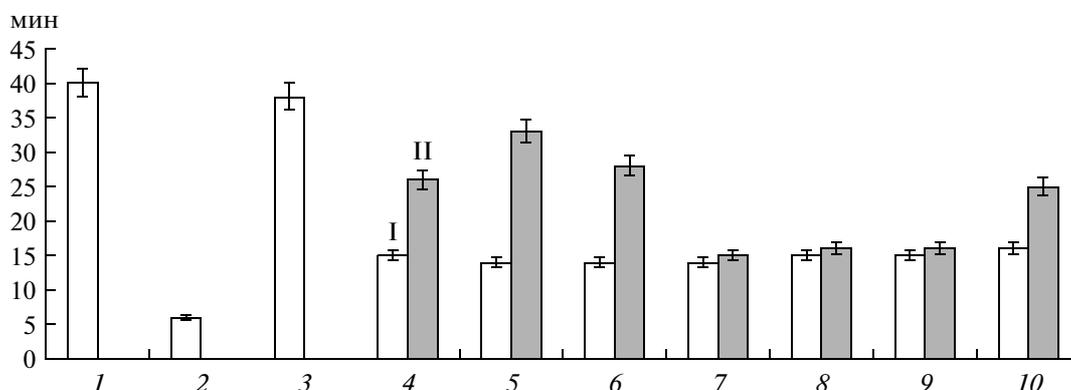


Рис. 5. Продолжительность тиопенталового сна животных, получавших CCl_4 : 1 — контроль CCl_4 , 2 — контроль изотонический раствор, 3 — контроль полисахарида, 4 — контроль ЛФ, 5 — ЛФ—N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, 6 — ЛФ—метилованное производное хитозана, 7 — ЛФ—сукциноилхитозан, 8 — ЛФ—ГМ (ММ 89), 9 — ЛФ—ГМ (ММ 110), 10 — ЛФ—АРГ. Образцы вводили в разовой дозе 10 мг/кг в течение 3 сут (курсовая доза 30 мг/кг).

I — тест за 1 ч, II — тест за 24 ч до введения CCl_4 .

Таким образом, в эксперименте в этой модели индуцированного токсикоза установлено, что полисахариды, не обладая собственным детоксицирующим эффектом, практически не влияют на соответствующую активность лактоферрина.

Токсикоз, вызываемый введением CCl_4 , проявляется в нарушении функций печени, что может быть оценено, например, по продолжительности наркотического (тиопенталового) сна. Влияние полисахаридов на детоксицирующую активность ЛФ в составе комплексов оценивали по уменьшению продолжительности этого сна, при этом исследуемые системы вводили за 1 и за 24 ч до тиопентала.

Из результатов, представленных на рис. 5, следует, что введение CCl_4 вызывало значительное увеличение продолжительности сна животных. Применение ЛФ человека и его комплексов с полисахаридами за 1 ч до инъекции CCl_4 приводило к биологически значимому уменьшению продолжительности сна животных.

При модификации теста, т.е. при введении ЛФ за 24 ч до инъекции CCl_4 , картина изменялась. Время сна в контроле (чистый ЛФ) увеличивалось на 86% по сравнению с предыдущим тестом. Для трех систем (рис. 5) продолжительность сна также увеличивалась. В то же время у трех систем — ЛФ—сукциноилхитозана и ЛФ—галактомананов с ММ 89 и 110 кДа, продолжительность наркотического сна совпала с таковой при введении за 1 ч до CCl_4 . Таким образом, показано, что эти системы увеличивали или пролонгировали детоксицирующую активность ЛФ.

Приведенные выше результаты побудили нас исследовать влияние полисахаридов на время функционирования ЛФ в печени и в кровяном русле модельных животных — мышей. Через 3 ч после введения ЛФ в организм его содержание в печени животных контрольной группы составляло всего 5%. В то же время в системах ЛФ—ГМ (89 кДа) и ЛФ—сукцино-

илхитозан (через 3 ч) и ЛФ—АРГ (через 2 ч) наблюдался высокий уровень ЛФ, который составил $90 \pm 3\%$, $74 \pm 9\%$ и $89 \pm 4\%$ от введенной дозы. Даже через 1 сут после инъекций содержание ЛФ не падало ниже 20% от введенной дозы.

Исследование сыворотки крови показало следующее. Через 3 ч после инъекции содержание ЛФ составляло 4%. Введение его в составе системы ЛФ—сукциноилхитозан повышало уровень белка до $55 \pm 13\%$ от введенной дозы, который постепенно снижался, достигая через 7 ч $25 \pm 7\%$. При введении систем с галактоманнаном и арабиногалактаном наблюдали аналогичный эффект: уровень ЛФ через 3 ч также был выше ($35 \pm 5\%$ и $25 \pm 6\%$ соответственно) и через 7 ч составлял $7 \pm 1\%$ и $3 \pm 0.8\%$. Следует отметить, что белок в составе всех комплексов, введенных животным, мог быть выявлен через 24 ч, в то время как у животных контрольной группы ЛФ человека через такой же срок наблюдения полностью отсутствовал.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что присутствие полисахаридов в исследованных системах способствует увеличению времени циркуляции ЛФ в кровотоке и повышению его концентрации в печени. Следовательно, полисахариды препятствовали элиминации ЛФ из организма.

Полученные результаты побудили нас проверить предположение о взаимодействии белка и полисахарида (на примере галактоманнана с ММ 89 кДа) с помощью ДСК. Было использовано два подхода: изотермическая калориметрия титрования и тепловая денатурация белка.

Исходя из формы калориметрической кривой и расчетов термодинамических параметров, можно предположить, что лактоферрин имеет два типа центров связывания с галактоманнаном: один с константой 5–10 нМ, второй с константой около 0.5 мМ, исходя из средней молекулярной массы полисахарида 89 кДа. Причем с каждым типом сайтов белка связывается не более 2 молекул полисахарида.

Для оценки возможных изменений стабильности структуры молекулы ЛФ в результате взаимодействия с полисахаридом также была исследована тепловая денатурация белка методом сканирующей калориметрии.

ДСК лактоферрина в изотоническом растворе, 150 мМ NaCl, не обнаружила явных различий термодинамических параметров необратимой тепловой денатурации индивидуального ЛФ и в присутствии галактоманнана. Небольшие различия в энтальпии и температуре максимума скорости денатурации оказались меньше предела разрешения метода для соответствующих величин, что не исключает возможности взаимодействия белка с галактоманнаном (данные изотермической калориметрии титрования), оказывающего стабилизирующее влияние на структуру молекулы ЛФ.

Таким образом, проведенные исследования показали взаимодействие лактоферрина с галактоманнаном *in vitro* в изотоническом растворе при 37°C, которое, однако, не влияет на стабильность вторичной и третичной структуры собственно макромолекулы белка. Увеличение времени нахождения лактоферрина в организме в присутствии галактоманнана позволяет предположить, что молекулы полисахарида экранируют белок от действия протеаз или затрудняют его участие в других биохимических процессах, замедляя его выведение.

* * *

Приведенные результаты демонстрируют воздействие нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную и детоксицирующую активности лактоферрина, а также на длительность циркуляции его в организме. Использование теста АОА позволило отобрать группу из 5 полисахаридов, активность которых в составе системы с ЛФ, была выше или на уровне активности индивидуального белка.

На двух моделях индуцированного токсикоза *in vivo* показано, что ЛФ в составе отобранных систем оказывал детоксицирующее действие в отношении острых токсических реакций, вызванных введением цитостатика — ДДП и гепатотропного яда — СС₁₄, что позволило говорить о сохранении биологической активности белка в комплексе с полисахаридами.

Определение ЛФ в составе комплексов в крови и печени показало, что белок детектируется вплоть до 24 ч после введения, в то время как индивидуальный ЛФ к этому сроку не детектируется вовсе.

При совокупной оценке полученных результатов выявлено, что образование комплексов лактоферрина с галактоманнанами (ММ 89 и 110 кДа) и сукциноилхитозаном приводит к наиболее выраженным положительным изменениям физиологических свойств ЛФ: детоксицирующая активность белка остается неизменной или увеличивается на фоне замедления его выведения из организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: грант 09-04-13714-офи-ц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang L., Chu J.S., Fix J.A. // Int. J. Pharm. 2002. V. 235. № 1–2. P. 1–15.
2. Kim H.J., Choi S.J., Shin W.S., Moon T.W. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 4. P. 1049–1056.
3. Misra A.N., Baweja J.M. // Indian Drugs. 1997. V. 34. № 4. P. 216–223.
4. Ouchi T., Matsumoto M., Ihara K., Ohya Y. // J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem. 1997. V. 34(A). № 6. P. 975–989.
5. Zhou H., Qian J., Wang J., Yao W., Liu Ch., Chen J., Cao X. // Biomaterials. 2009. V. 30. № 9. P. 1715–1724.

6. Ghendon Y., Markushin S., Vasiliev Y., Akopova I., Koptiaeva I., Krivtsov G., Borisova O., Ahmatova N., Kurbatova E., Mazurina S., Gervazieva V. // *J. Med. Virol.* 2009. V. 81. № 3. P. 494–506.
7. Jiang H., Park I., Shim N. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. V. 58. № 3. P. 471–476.
8. Li P., Dai Y.N., Zhang J.P., Wang A.Q., Wei Q. // *Int. J. Biomed. Sci.* 2008. V. 4. № 3. P. 221–228.
9. Oyarzun-Ampuero F.A., Brea J., Loza M.I., Torres D., Alonso M.J. // *Int. J. Pharm.* 2009. V. 381. P. 122–129.
10. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. // *Биофарм. журнал.* 2010. Т. 2. № 3. С. 3–19.
11. Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Сергеева Т.В. // *Анестезиология и реаниматология.* 1997. № 3. С. 36–41.
12. Ward P.P., Uribe-Luna S., Conneely O. // *Biochem. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 95–102.
13. Valenti P., Antonini G. // *Cell Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. № 22. P. 2576–2587.
14. Немцова Е.Р., Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Демидова Л.В., Чиссов В.И. // *Рос. онкол. журн.* 2006. № 4. С. 29–33.
15. Эделева Н.В., Сергеева Т.В., Немцова Е.Р., Щербицкая И.Я., Якубовская Р.И., Осипова Н.А. // *Анестезиология и реаниматология.* 2001. № 5. С. 61–64.
16. Немцова Е.Р., Сергеева Т.В., Безбородова О.А., Якубовская Р.И. // *Рос. онкол. журн.* 2003. № 5. С. 48–53.
17. Onishi H., Machida Y., Kovata K. // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2007. V. 33. № 6. P. 641–647.
18. Егоров А.В., Местечкина Н.М., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 4. С. 452–456.
19. Смирнова Н.И., Местечкина Н.М., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2002. Т. 38. № 5. С. 548–551.
20. Hirai A., Odani H., Nakajima A. // *Polym. Bull.* 1991. V. 26. № 1. P. 87–94.
21. Ильина А.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 3. С. 273–277.
22. Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н., Варламов В.П., Шпицун О.А. // *Журн. аналит. химии.* 2009. Т. 64. № 6. С. 666–670.
23. Gamzazade A.I., Slimak V.M., Skljjar A.M., Stikova E., Pavlova S., Rogozhin S. // *Acta Polym.* 1985. V. 36. № 8. P. 421–424.
24. Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Коханова И.Д., Дума В.Н., Александер С.К. // *Вопросы мед. химии.* 1986. № 6. С. 75–79.
25. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
26. Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. *Электрофорез в разделении биологических макромолекул.* М.: Мир, 1982. 446 с.
27. Tutykhina I.L., Bezborodova O.A., Shmarov M.M. // *Protein Expression and Purification.* 2009. V. 65. № 1. P. 100–107.
28. Немцова Е.Р., Иванова Л.М., Якубовская Р.И. // *Вопросы. мед. химии.* 1995. № 3. С. 58–61.
29. Mitkevich V.A., Kononenko A.V., Petrushanko I.Y., Yanvarev D.V., Makarov A.A., Kisselev L.L. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 14. P. 3947–3954.
30. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2002. Т. 38. № 2. С. 132–135.
31. Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G., Yamskov I.A., Palma-Guerrero J., Jansson H.B., Lopez-Llorca L.V., Salinas J., Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Varlamov V.P. // *Carbohydrate Polym.* 2006. V. 64. P. 66–72.
32. Yamaguchi R., Arai Y., Itoh T. // *Carbohydrate Res.* 1981. V. 88. № 2. P. 172–175.
33. Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun O. // *Chromatographia.* 2004. V. 59. № 11/12. P. 709–713.
34. Местечкина Н.М., Егоров А.В., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 3. С. 368–373.
35. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P. // *Carbohydrate Polym.* 2008. V. 71. P. 694–697.
36. Lin Y., Chen Q., Luo H. // *Carbohydrate Res.* 2007. V. 342. № 1. P. 87–95.

Effect of Polysaccharides on Biological Activity of Human Lactoferrin

N. M. Mestechkina^a, O. A. Bezborodova^b, A. V. Il'ina^c, A. N. Levov^c, S. Yu. Kleimenov^d,
E. R. Nemtsova^b, R. I. Yakubovskaya^b, V. D. Shcherbukhin^a, and V. P. Varlamov^c

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: mestnm@inbi.ras.ru

^b *Herzen Cancer Research Institute, Vtoroi Botkinskii proezd, Moscow, 125284 Russia*

^c *Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia*

^d *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

Received February 14, 2011

Abstract—The influence of neutral and ionic polysaccharides on the antioxidant (AOA) and detoxifying activities of lactoferrin (LF) and the duration of its circulation in the body was studied. In addition to natural polymers, we studied artificial chitosan derivatives with different functional groups. On the basis of AOA test, five polysaccharides were selected. The study of the detoxifying effect of LF in two models of induced toxicity revealed polysaccharides that maintained or increased the detoxifying activity of LF. We established that the formation of a complex of lactoferrin with two galactomannans and succinyl chitosan caused positive changes in LF properties: the detoxifying activity of the protein remained unchanged or increased, whereas its elimination from the body was decelerated.