

БИОЛОГИЯ

УДК 636.2:577.112.083+612.015.3

*В. С. ЛУКАШЕВИЧ¹, А. И. БУДЕВИЧ², И. В. СЕМАК³, В. Н. КУЗНЕЦОВА²,
Е. В. МАЛЮШКОВА³, А. Э. ПЫЖ¹, С. А. НОВАКОВСКАЯ¹, Ю. А. РУДНИЧЕНКО¹,
Н. А. ПОПКОВ², академик О. А. ИВАШКЕВИЧ³, член-корреспондент И. В. ЗАЛУЦКИЙ¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗ МОЛОКА КОЗ-ПРОДУЦЕНТОВ И ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
lukashvs@rambler.ru; viola_25@tut.by; novakovskaya@tut.by; link060619@list.ru; IZalutsky@gmail.com

²НПЦ НАН Беларуси по животноводству, Жодино, Беларусь
budevich7388100@mail.ru; genlab2009@gmail.com; popkov-n@tut.by

³Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
semak@bsu.by; malyushkova@gmail.com; nauka@bsu.by

В рамках белорусско-российских программ Союзного государства получены трансгенные по гену лактоферрина человека первичные козлы Лак-1 (генная конструкция hLF5) и Лак-2 (генная конструкция hLF3), создано стадо животных-продуцентов и банк спермы. Используя катионообменную хроматографию, выделены электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантного лактоферрина человека (rhLF) из молока трансгенных коз и природного лактоферрина человека (nhLf) из женского молока. Различными аналитическими методами, включая масс-спектрометрию и пептидное картирование, показана аналогия физико-химических характеристик между rhLF и nhLf. При системном употреблении крысами rhLF оказывал благоприятное действие на кишечную микрофлору, ультраструктуру печени и кишечника, активировал липидный метаболизм и стероидогенез.

Ключевые слова: трансгенные козы, рекомбинантный лактоферрин человека.

*V. S. LUKASHEVICH¹, A. I. BUDZEVICH², I. V. SEMAK³, V. N. KUZNETSOVA², E. V. MALYUSHKOVA³, A. E. PYZH¹,
S. A. NOVAKOVSKAYA¹, J. A. RUDNICHENKO¹, N. A. POPKOV², O. A. IVASHKEVICH³, I. V. ZALUTSKY¹*

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN FROM THE MILK OF GOAT-PRODUCERS AND ITS PHYSIOLOGICAL EFFECTS

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
lukashvs@rambler.ru; viola_25@tut.by; novakovskaya@tut.by; link060619@list.ru; IZalutsky@gmail.com

²Scientific and practical center of the National Academy of Sciences of Belarus on animal husbandry, Zhodino, Belarus
budevich7388100@mail.ru; genlab2009@gmail.com; popkov-n@tut.by

³Belarusian State University, Minsk, Belarus
semak@bsu.by; malyushkova@gmail.com; nauka@bsu.by

Primary male-goats Lac-1 (human lactoferrin gene construction hLF5) and Lac-2 (human lactoferrin gene construction hLF3) with a genome containing a human lactoferrin gene were bred and the sperm bank of primary male-goats was created within the framework of Belarus-Russia Union State programs. The herd of goats that produced recombinant human lactoferrin (rhLF) in their milk was obtained. Human lactoferrin (rhLF) from the milk of transgenic goats, natural human lactoferrin (nhLf) from the woman milk, and natural goat lactoferrin (gLf) from the milk of non-transgenic goats were purified using cation-exchange chromatography. Physicochemical characteristics of rhLF were similar to those of nhLf as revealed by different analytical methods including mass spectrometry and peptide mapping. Oral supplementation with rhLF activated lipid metabolism and steroidogenesis, promoted favorable changes in the gut microflora composition as well as the enhancement of the functional activity and the fine structure of the rat liver and gut.

Keywords: transgenic goats, recombinant human lactoferrin.

Введение. Диагностические и терапевтические потребности современной медицины диктуют необходимость получения широкого спектра высокоочищенных биологически активных соединений и, в первую очередь, регуляторных белков. К настоящему времени относительно до-

ступны в необходимых объемах несколько десятков таких веществ, тогда как перспективная потребность составляет несколько сотен. Этот дисбаланс инициировал интенсивное развитие фармацевтической трансгенной биотехнологии, научный потенциал которой в значительной степени определяет уровень инновационного развития фарминдустрии в целом [1].

Еще несколько десятилетий назад основным способом получения биофармацевтических продуктов было выделение их из обогащенных источников. Однако такой подход имеет ряд очевидных недостатков, начиная от сложностей с достижением высокой степени очистки и заканчивая структурными отличиями регуляторных белков человека от аналогов, получаемых из растительного и животного сырья.

Благодаря успехам молекулярной биологии и геной инженерии стало возможным получение и трансгенез ДНК-структур, содержащих человеческий ген и отвечающих за биосинтез регуляторных белков, в хорошо изученный и относительно простой геном микроорганизмов с последующей очисткой целевых белков из «телец включения», цитозоля либо культуральных сред. Такая стратегия позволила получать в достаточных количествах практически все так называемые рекомбинантные регуляторные белки. Однако и в этой технологии обозначился ряд недостатков, обусловленных, например, различием пострибосомального процессинга у человека и микроорганизмов и, как следствие, получением отличных по третичной структуре веществ с необходимостью их дальнейшей «доработки» до идентичности и биологически активного состояния. Более того, существует постоянная угроза наличия примесей мембранных липополисахаридов микроорганизмов, которые даже в ничтожно малых количествах способны инициировать сильнейшую воспалительную и иммунную реакции человеческого организма.

Вышеуказанных недостатков лишены подходы, основанные на использовании для производства рекомбинантных белков культур клеток животных. Более того, в случае культур клеток млекопитающих обеспечивается максимально близкий к человеческому профиль гликозилирования белков. Однако существующие в настоящее время технологии характеризуются достаточно низким выходом целевого продукта, требуют дорогостоящих реагентов и особых условий культивирования, в результате чего себестоимость препарата оказывается крайне высокой [2].

Совокупность подобных обстоятельств явилась побудительной основой к разработке методологии трансгенеза млекопитающих, априори лишенной выше указанных проблем.

Уже получены трансгенные по ряду регуляторных белков животные – мыши, коровы, кролики, козы и, несмотря на активное лоббирование интересов производителей белков на основе микробного трансгенеза и явно завышенную опасность возможных вирусных и прионных contaminаций, количество научных изысканий в области трансгенеза млекопитающих неуклонно возрастает [3]. Применение трансгенных животных для получения лекарственных соединений рассматривается как один из трендов в биотехнологии, бионанотехнологии и биомедицинских науках на период до 2020 года в соответствии с техническим отчетом фирмы RAND Corporation «The Global Technology Revolution 2020, In-Depth Analyses. Bio/Nano/Materials/Information Trends, Drivers, Barriers, and Social Implications» (http://www.rand.org/pubs/technical_reports/TR303.html). Вместе с тем на настоящий момент современной технологической платформой промышленного производства терапевтических белков с использованием трансгенных животных располагает лишь ограниченное количество стран. Ярким примером коммерческой реализации трансгенеза млекопитающих является производство биотехнологической компанией rEVO Biologics, Inc. (GTC Biotherapeutics, США) рекомбинантного антитромбина III человека (коммерческое название – АТгун®) из молока трансгенных коз. АТгун® после проведенных клинических испытаний разрешен к применению в США и Европейском Союзе, а лицензии на производство препарата приобретены Германией и Японией (<http://revobiologics.com>).

В соответствии с докладом аналитической компании «GBI Research» на сегодняшний день биопрепараты занимают 17–20 % глобального фармацевтического рынка с объемом продаж около 200 млрд долл. США. Ожидается, что в ближайшие 20 лет они заменят порядка 70 % химических лекарственных средств. Общий объем продаж воспроизведенных копий оригинальных препаратов (биосимиляров) на мировом фармацевтическом рынке к концу 2015 г. достиг 20 млрд долл. США и увеличится к 2020 г. до 55 млрд долл. США (пресс-релиз компании «GBI

Research» от 30.06.2015, <http://www.gbiresearch.com>). Создание отечественной технологической платформы производства биосимиляров с использованием трансгенных животных не только обеспечит импортозамещение, но и позволит в перспективе частично занять эту долю фармрынка. Значительным продвижением в этом направлении может стать организация производства высокоэффективных и биологически безопасных продуктов функционального питания, гигиенических и лекарственных средств нового поколения на основе уже созданных в Республике Беларусь рекомбинантных белков человека. В рамках выполнения программ Союзного государства «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген-2» в Беларуси впервые в мировой практике были получены козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека, разработана технология выделения данного белка и с помощью пептидного картирования, дегликозилирования, иммунохимического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии, спектрофотометрии, ЭПР-спектроскопии, масс-спектрометрии, хроматографического и электрофоретического анализов установлена идентичность основных физико-химических характеристик рекомбинантного лактоферрина человека и природного лактоферрина из женского молока [4; 5].

Лактоферрин (ЛФ), известный также как лактотрансферрин, представляет собой негемовый железосвязывающий гликопротеин млекопитающих, относящийся к семейству трансферринов. ЛФ является полифункциональным белком, помимо транспорта железа он модулирует иммунные реакции, обладает антиоксидантной активностью, противораковыми и противовоспалительными свойствами, участвует в регуляции роста и дифференцировки клеток [6]. Разнообразие функциональных свойств ЛФ объясняет повышенный спрос на него, как субстанцию для производства лекарственных форм, продуктов функционального питания и биологически активных добавок к пище разнонаправленного действия. Прогнозируемая мировая потребность в ЛФ к 2017 г. составит 262 тыс. кг (пресс-релиз компании Synlait Milk Ltd., Новая Зеландия от 8.05.2013, <http://www.synlait.com>).

Следует особо отметить, что на мировом рынке рекомбинантный ЛФ человека как товарный продукт отсутствует. В настоящее время его заменой является ЛФ крупного рогатого скота, который, как и другие белки животного происхождения, имеет определенные отличия от соответствующих белков человека, что ограничивает его терапевтическую эффективность в силу потенциальной аллергенности и низкой аффинности к рецепторам человека. Дополнительным негативным моментом является также низкое содержание ЛФ в молоке крупного рогатого скота (0,03–0,49 г/л) [3], в связи с чем для получения промышленных количеств высокоочищенного ЛФ необходимо перерабатывать значительное количество сырья.

В Российской Федерации успешно прошел клинические испытания разработанный в НИИ онкологии им. П. А. Герцена лекарственный препарат с ЛФ из женского молока – «Лапрот», предназначенный для профилактики и купирования интоксикаций. Природный ЛФ человека из женского молока по сравнению с ЛФ из молока крупного рогатого скота характеризуется более высокой биобезопасностью и терапевтической эффективностью, а его высокое содержание в молоке (2,0–5,8 г/л) [3] обеспечивает намного больший выход целевого продукта. Вместе с тем низкая доступность и дороговизна сырья существенно повышают стоимость препарата (цена «Лапрота» в аптечной сети – 4047,62 российских руб. на 19.09.2015 за флакон, содержащий 50 мг ЛФ человека), что ограничивает его применение в клинической практике и делает малодоступным для широких слоев населения. Проблемы этического плана, связанные с использованием грудного молока, а также потенциальная возможность передачи инфекций дополнительно осложняют продвижение на рынок препаратов с ЛФ из женского молока. Очевидно, что рекомбинантный ЛФ человека, содержащийся в молоке коз-продуцентов в высоких концентрациях (около 5,7 г/л, данные авторов) и являющийся полным аналогом белка человеческого происхождения, может рассматриваться в качестве его реальной альтернативы в связи с более высокой биобезопасностью и несоизмеримо более низкой стоимостью, сопоставимой при промышленном производстве с таковой ЛФ из молока крупного рогатого скота.

Настоящее сообщение является представлением методологии трансгенеза, получения высокоочищенного рекомбинантного ЛФ человека из молока трансгенных коз и результатов некоторых его функциональных эффектов.

Материалы и методы исследования. Проведение совместных с Институтом биологии гена РАН экспериментов по получению первичных трансгенных животных по гену ЛФ человека (производители Лак-1 и Лак-2) осуществлялось в Биотехнологическом центре с опытным производством НПЦ НАН Беларуси по животноводству. В зиготы коз на стадии двух пронуклеусов, визуализированных с использованием дифференциально-интерференционного контраста, микроинъекцировались следующие генные конструкторы, включающие ген лактоферрина человека [7]:

1. Конструкция rhLf5 длиной 35013 bp, содержащая копию геномной последовательности ЛФ человека под контролем бета-казеинового промотора коз, повтор из двух инсуляторов бета-глобинового гена кур, нетранслируемые области;

2. Конструкция rhLf3 размером 37253bp, содержащая геномную последовательность ЛФ человека и кДНК под контролем бета-казеинового промотора коз, повтор из двух инсуляторов бета-глобинового гена кур, нетранслируемые области.

Предварительно с целью индукции множественной овуляции у доноров применялись комплексные схемы с использованием прогестагенов, фолликулостимулирующих гормонов, ГСЖК и рилизинг-гормонов. Извлечение эмбриоматериала осуществлялось хирургически через 63–76 ч после удаления импланта.

Все микроманипуляции с зиготами проводились под микроскопом «Axiovert 200» (Zeiss, Швейцария) с помощью микроманипуляторов «Narishige» (Япония) и микроинъектора «Femto-Jet» (Германия). Культивирование эмбриоматериала вне организма осуществлялось в специальных средах при температуре 39 °С при наличии концентрации CO₂ (5 %).

Пересадка микроинъекцированного биоматериала (2–3 зиготы) проводилась реципиентам, синхронизированным с половым циклом доноров, под наркозом хирургически в яйцевод на стороне желтого(ых) тела(л) яичника.

Анализ на наличие встроенной конструкции у рожденного приплода, полученного после трансплантации микроинъекцированных зигот, проводился с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров 5'-ggaacggagctcagtgaggatgg, 5'-caggaagcaggtagggtggtc.

Для создания стада животных – продуцентов ЛФ человека использовалась сперма первичных трансгенных козлов-производителей Лак-1 и Лак-2 (средний показатель передачи гена лактоферрина человека потомству – 26,8 %), а также сперма производителей F₁, F₂, F₃, полученных от Лак-1 (средний показатель передачи трансгена потомству составил 50 %).

Выделение рекомбинантного ЛФ человека из сыворотки молока трансгенных коз осуществляли с помощью катионообменной хроматографии. Сыворотку получали из обезжиренного молока в результате кислотной коагуляции казеина и его последующего осаждения центрифугированием. Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе среднего давления АСТА FPLC system (Amersham-Pharmacia, Швеция). Сыворотку наносили на колонку HiPrep 16/10 SP HL (Amersham-Pharmacia, Швеция), предварительно промытую уравнивающим буфером (20 мМ фосфат Na, 0,4М NaCl, pH 6,5), со скоростью 1 мл/мин. Лактоферрин элюировали линейным градиентом 0,4М – 1М NaCl. Фракции, содержащие ЛФ, концентрировали и обессоливали с помощью кассет для ультрафильтрации Vivaflow 50 (Sartorius) с отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Полученный концентрат лиофилизировали на лиофильной сушке ALPHA 1–4 LD plus. Аналогичная технология использовалась для выделения ЛФ из сыворотки женского и козьего молока. Для получения высокоочищенных препаратов лактоферрина проводили двухстадийную катионообменную хроматографию на разных типах сорбентов.

Концентрацию рекомбинантного ЛФ человека в молоке определяли методом ИФА с помощью коммерческих наборов реагентов «ЛАКТОФЕРРИН–ИФА–БЕСТ» (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) и «Lactoferrin human ELISA kit» (Abcam, Великобритания).

На MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd), в линейном режиме с положительной ионизацией или с использованием рефлектрона были получены масс-спектры выделенных лактоферринов. Точность измеренных средних масс целых белков составляла около 100 Да; а точность измеренных моноизотопных масс пептидов – 0,005 % (50 ppm).

Идентификацию белков осуществляли по пептидному фингерпринту (пептидной карте триптических масс), при помощи программы Mascot www.matrixscience.com, для трипсинолиза

использовали модифицированный трипсин Promega. Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха.

Исследования физиологических эффектов полученного ЛФ выполнялись на 20 белых рандомбредных крысах-самцах одного возраста, содержащихся в стационарных условиях вивария. Все животные находились на одинаковом рационе, при свободном доступе к воде и пище, в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Согласно условию эксперимента, животные были разделены на две группы. Первая группа содержалась на стандартном рационе и служила контрольной. Крысам второй группы с помощью зонда *per os* вводили ЛФ в дозе 200 мг/кг в течение 2 месяцев. После снятия животных с опыта получали сыворотку крови и определяли уровни стероидных гормонов с использованием наборов УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси» в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Содержание глюкозы, холестерина, триглицеридов, липопротеидов высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП) определяли с помощью соответствующих наборов и по инструкциям производителя – НТПК «Анализ Х» (Минск).

Исследование состава микрофлоры толстой кишки экспериментальных животных проводили в соответствии с методическими рекомендациями [8]. Определяли удельное содержание бифидобактерий, стафилококков, дрожжей и плесневых грибов.

Для культивирования бифидобактерий использовали жидкую тиогликолевую среду (Himedia, Индия), определение функциональных свойств (антагонистической активности) популяций бифидобактерий проводили по степени их кислотообразующей активности в среде культивирования. Для идентификации золотистого стафилококка и плесневых грибов использовали подложки Rida Count (R-Biopharm AG, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию микроорганизмов в исходном материале менее 10^2 КОЕ/г не учитывали.

Результаты обработаны статистически с помощью программ Statistica 6.0, Origin 6.0. Данные представлены в виде средней N и ошибки средней n .

В работе использован электронно-микроскопический метод исследования. Изъятые участки печени, тонкой и толстой кишки фиксировали в растворе 3 %-ного глутарового альдегида и 1 %-ного параформа, после чего они измельчались и обрабатывались 2 %-ным раствором четырехокси осмия в 0,1M фосфатном буфере (pH 7,4), после промывания которым материал обезживали в растворах этанола возрастающей крепости и заключали в аралдит по общепринятой методике [9]. Образцы выдерживали в термостате при 56 °С до полной полимеризации аралдита, затем резали на ультратоме LKB (Швеция) и просматривали на электронном микроскопе JEM 100 CX (Япония).

Результаты и их обсуждение. В результате проведения генно-инженерных экспериментов были получены первичные трансгенные козлы Лак-1 и Лак-2. При осуществлении работ по созданию стада животных – продуцентов ЛФ человека использовалась сперма Лака-1 и его потомков. Средний показатель передачи трансгена потомству составил 50,0 %.

Содержание рекомбинантного ЛФ человека в молоке, рассчитанное для всего стада лактирующих животных, составило в среднем 5,7 г/л. Наличие трансгена в геноме коз и лактоферрина человека в молоке не повлияло негативно на здоровье животных.

В настоящее время стадо коз-продуцентов, являющееся «биореактором» получения высокоактивного ЛФ, содержащееся в Биотехнологическом центре с опытным производством РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», насчитывает 205 голов, из которых 188 голов – самки, 17 голов – самцы.

Рекомбинантный ЛФ выделяли из сыворотки молока трансгенных коз с помощью катионообменной хроматографии.

Чистоту полученного препарата лактоферрина оценивали с помощью денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (рис. 1). Согласно данным денситометрического анализа гелей, окрашенных Кумасси R-250, чистота полученного препарата ЛФ составляет более 98 %.

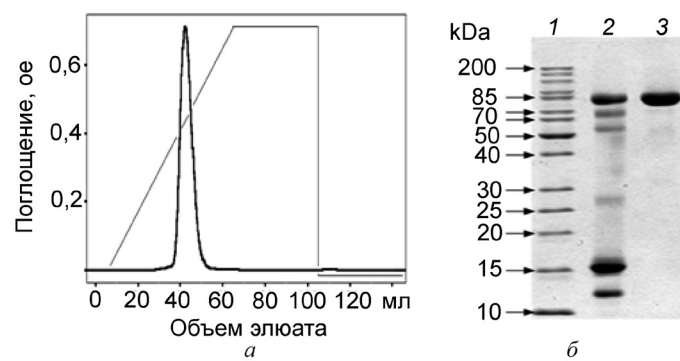


Рис. 1. Очистка рекомбинантного ЛФ с помощью катионообменной хроматографии на колонке HiPrep 16/10 SP XL. *a* – Профиль градиентной элюции ЛФ. Регистрация велась при длине волны 280 нм; *б* – Электрофореграмма (ДСН – электрофорез в 18 %-ном полиакриламидном геле) очищенного ЛФ и белков сыворотки молока трансгенной козы: 1 – стандарты молекулярных масс (Fermentas, кат. №SM0661); 2 – сыворотка молока; 3 – очищенный ЛФ

С помощью MALDI-времяпролетной масс-спектрометрии (НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН) были получены точные массы выделенных лактоферринов: рекомбинантного ЛФ человека из молока трансгенных коз, природных ЛФ из козьего и женского молока (рис. 2). Молекулярные массы рекомбинантного ЛФ и ЛФ из женского молока совпадают и отличаются от таковой ЛФ из козьего молока.

Идентификацию ЛФ осуществляли по пептидному фингерпринту (пептидной карте триптических масс) при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Согласно основным критериям достоверности идентификации в Mascot (количество «совпавших» пептидов, в предположении одного белка; паттерны протеолиза; отклонение массы белка от предполагаемой), рекомбинантный ЛФ идентифицирован как ЛФ человека.

Как показали результаты бактериологического исследования (табл. 1), при длительном скармливании лабораторным животным ЛФ наблюдается элиминация условно-патогенных микроорганизмов. Накопление дрожжей и плесеней в кишечнике снижалось в 3,8 раза – общий титр грибов составил $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^3$ КОЕ/г, контроль – $(4,6 \pm 0,8) \cdot 10^3$ КОЕ/г ($p < 0,05$). Полученные результаты соответствуют известным данным о том, что фунгицидная активность ЛФ опосредуется разрушением клеточной стенки и связыванием белка с плазмалеммой *C. albicans*, а изменение мембранного потенциала провоцирует гибель грибных клеток [10].

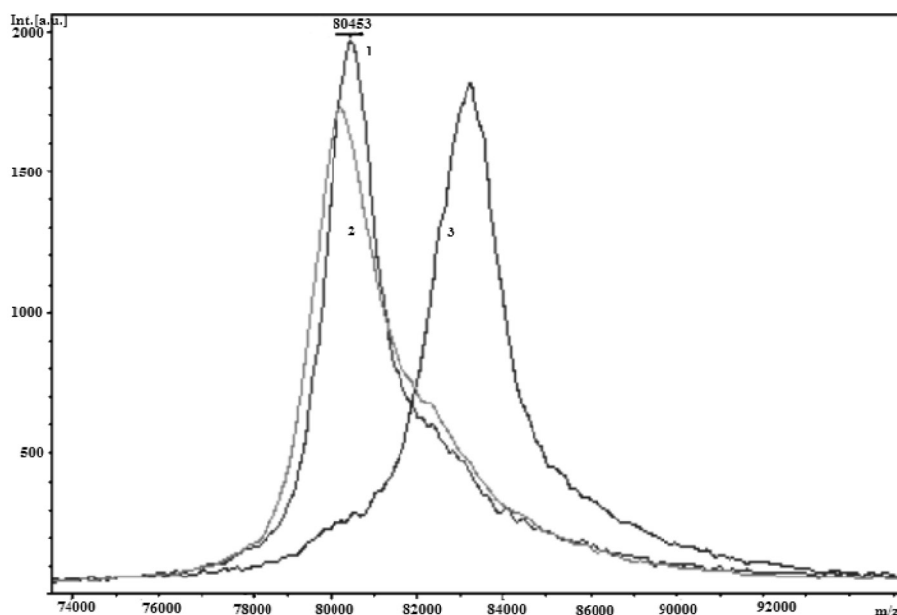


Рис. 2. Масс-спектры лактоферрина из козьего молока (3), женского молока (2) и из молока трансгенных коз (1)

Т а б л и ц а 1. Влияние лактоферрина на отдельных представителей микробиоценоза толстой кишки крыс после 2-месячного скормливания

Серия	Вид микроорганизма, КОЕ/г		
	<i>Bifodobacterium</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Fungi</i>
Контроль	$(10 \pm 2,1) \cdot 10^9$	$(10,6 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(4,6 \pm 0,8) \cdot 10^3$
ЛФ, 200 мкг/кг	$(11,6 \pm 2,2) \cdot 10^9$	$(1,8 \pm 0,13) \cdot 10^{3*}$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{3*}$

П р и м е ч а н и е: * – достоверные различия от контрольной группы ($p < 0,05$), $n = 10$.

ЛФ, введенный в пищевой рацион, оказывал наивысший бактерицидный эффект в отношении грамположительных кокков. Накопление золотистого стафилококка уменьшалось в 5,6 раза и составило $1,8 \pm 0,13$ КОЕ/г против $(10,6 \pm 4,6) \cdot 10^3$ КОЕ/г в контроле.

Физиологические процессы роста и развития бифидобактерий ЛФ существенно не затрагивал, общий титр *Bifodobacterium* spp. на фоне длительного воздействия ЛФ имел тенденцию к росту на 16,0 %.

Таким образом, системное потребление рекомбинантного ЛФ неблагоприятно отражается на процессах роста грамположительных стафилококков. ЛФ оказывает противогрибковый эффект и поддерживает развитие пробиотической микрофлоры.

Исследование основных показателей обмена в сыворотке крови при потреблении ЛФ показало, что содержание общего белка практически не изменялось, концентрация глюкозы имела тенденцию к снижению на 9,5 % (табл. 2). Установлено достоверное увеличение показателей липидного обмена – общего холестерина, ЛПНП и ЛПВП – на 12,42, 50,79 и 22,19 % соответственно по сравнению с контрольной группой.

Т а б л и ц а 2. Некоторые биохимические показатели в сыворотке крови крыс при пероральном введении лактоферрина в течение 2 месяцев

Показатель	Контроль	ЛФ
Глюкоза (ммоль/л)	$8,75 \pm 0,38$	$7,96 \pm 0,41$
Общий белок (г/л)	$82,29 \pm 1,108$	$84,32 \pm 1,29$
Холестерин (ммоль/л)	$1,704 \pm 0,057$	$1,915 \pm 0,085^*$
ЛПВП (ммоль/л)	$0,130 \pm 0,007$	$0,158 \pm 0,012^*$
ЛПНП (ммоль/л)	$0,722 \pm 0,078$	$1,088 \pm 0,109^*$
Тестостерон (нмоль/л)	$8,19 \pm 1,48$	$15,48 \pm 2,55^*$
Прогестерон (нмоль/л)	$3,95 \pm 0,34$	$6,18 \pm 0,93^*$
Эстрадиол (нмоль/л)	$0,22 \pm 0,015$	$0,18 \pm 0,009^*$

П р и м е ч а н и е: * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$), $n = 10$.

Под влиянием ЛФ уровни тестостерона и прогестерона в сыворотке крови крыс достоверно возрастали на 89,01 и 56,85 % соответственно. Напротив, содержание эстрадиола значимо снижалось на 20,38 %, что, возможно, связано с подавлением активности ароматазы, которая участвует в преобразовании тестостерона в эстрадиол.

Повышение уровней холестерина (как первичного звена синтеза половых гормонов), тестостерона и прогестерона указывает на активацию всей цепочки реакций стероидогенеза и может являться одним из механизмов реализации метаболических эффектов ЛФ.

Полученные результаты соответствуют и подтверждают известные данные [11; 12] и свидетельствуют о том, что ЛФ способствует ускорению основного метаболизма и проявляет выраженные анаболические свойства.

Электронно-микроскопические исследования печени, тонкой и толстой кишки экспериментальных крыс, получавших в течение 2 месяцев препарат лактоферрина, показали повышение функциональной активности изучаемых органов.

ЛФ активизирует метаболические процессы в клетках паренхимы печени и ее синусоидных капиллярах. Усиливается белоксинтезирующая функция гепатоцитов, на что указывает выявление

ние в перинуклеарной зоне гепатоцеллюлярных комплексов гранулярной эндоплазматической сети в виде расширенных канальцев, усеянных рибосомами. Агранулярная цитоплазматическая сеть и пластинчатый комплекс Гольджи характеризуются гиперплазией мембран и расширением канальцев за счет увеличения метаболической активности и накопления в них белков и липидов (рис. 3, а).

В области расположения синтетического аппарата клеток – гладкого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, отмечаются скопления гранул гликогена. Одновременно выявляются очаги секвестрированного гликогена, диффузно рассеянного в цитоплазме гепатоцита, свидетельствующие о повышении интенсивности углеводного обмена в печени – расщеплении гранул гликогена и высвобождения глюкозы.

Повышается функциональная активность и выявляемость клеток синусоидных капилляров – перисинусоидальных липоцитов и звездчатых макрофагов (клеток Купфера), в цитоплазме которых отмечаются отложения крупных липидных капель, заполняющих весь их цитоплазматический матрикс (рис. 3, б).

Дилатация синусоидных капилляров печени и переполнение их элементами крови указывает на повышение уровня гемопоза и интенсификацию обменных процессов между кровью и клетками печени.

Отмечается активация синтетических процессов в клетках эпителиального пласта слизистой оболочки тонкой и толстой кишки. Бокаловидные экзокриноциты переполнены слизистым секретом, который выделяется в просвет кишок и стимулирует процессы пристеночного пищеварения (рис. 3, в). Повышение выявляемости в стенке тонкой и толстой кишки иммунокомпетентных клеток – эозинофилов и тучных клеток – свидетельствует о стимулирующем влиянии ЛФ на иммунную систему желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных (рис. 3, г).

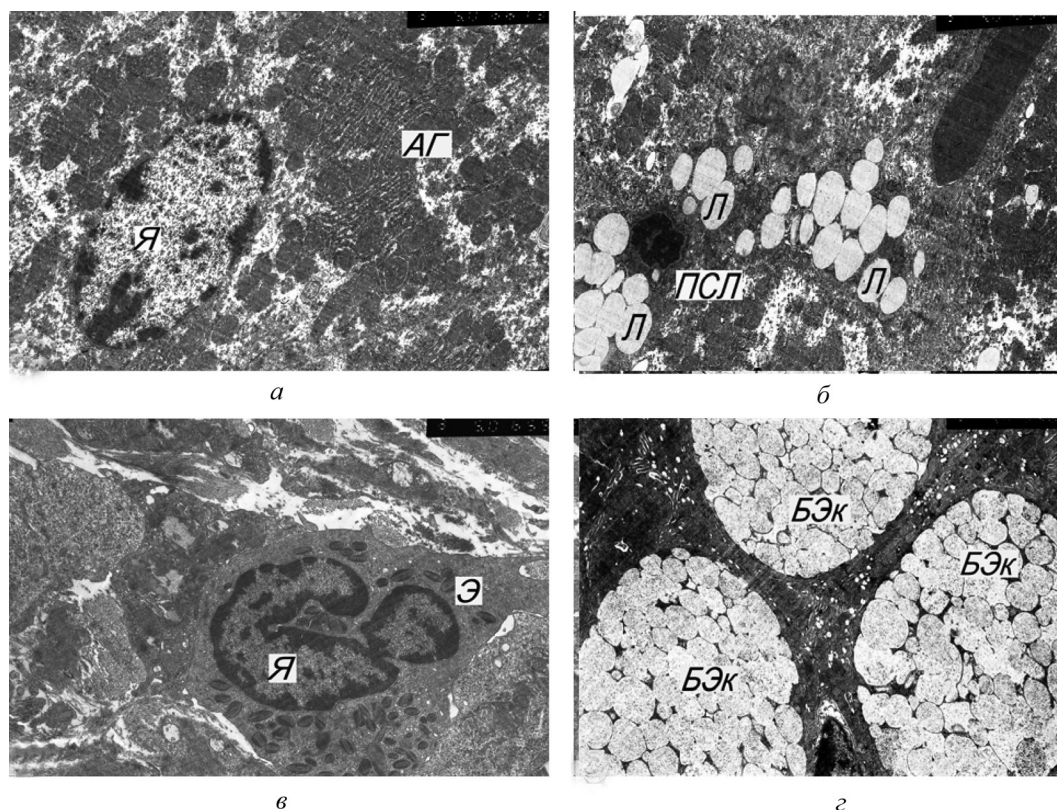


Рис. 3. Ультраструктурная организация гепатоцита (а), синусоидного капилляра печени (б), слизистой оболочки толстой кишки (в, г) экспериментальных крыс, получавших в течение 2 мес. очищенный ЛФ. Гиперплазия мембран пластинчатого комплекса Гольджи (а); скопления липидных капель в цитоплазме перисинусоидального липоцита (б); активированный эозинофил (в); бокаловидные экзокриноциты, переполненные слизистым секретом (г). Я – ядро, АГ – аппарат Гольджи, ПСП – перисинусоидальный липоцит, Л – липидные капли, Э – эозинофил, БЭК – бокаловидный экзокриноцит

Заключение. В результате проведения генно-инженерных экспериментов в рамках выполнения программ Союзного государства «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген-2» был осуществлен трансгенез ДНК-конструкций rhLf5 и rhLf3, предоставленных Институтом биологии гена РАН, в зиготы коз с последующей их трансплантацией животным-реципиентам. Получены первичные козлы, сперма которых была использована для создания стада. Среднее содержание рекомбинантного ЛФ человека в молоке лактирующих животных составило 5,7 г/л, а показатель передачи трансгена потомству равнялся 50,0 % и не изменялся за весь период формирования стада животных-продуцентов на протяжении 6 лет. Создан банк спермы трансгенных козлов-производителей.

Разработан метод очистки ЛФ из молока трансгенных коз. Чистота полученного препарата составила более 98 %. С помощью масс-спектрометрии показана идентичность между рекомбинантным ЛФ, выделенным из молока коз-продуцентов, и природным, полученным из женского молока.

Установлено, что системное потребление рекомбинантного ЛФ экспериментальными животными приводит к выраженному подавлению роста грамположительных стафилококков. ЛФ проявляет фунгицидный эффект и поддерживает развитие пробиотической микрофлоры.

Анализ биохимических показателей в сыворотке крови опытных животных свидетельствует об активации стероидогенеза и обмена липидов. ЛФ ускоряет основной обмен и проявляет выраженные анаболические свойства.

ЛФ стимулирует обменные и регенераторные процессы в печени и способствует пролиферации печеночных клеток. Возрастает функциональная активность иммунокомпетентных клеток желудочно-кишечного тракта – эозинофилов и тучных клеток, отмечается стимуляция секреторных процессов в клетках эпителиального пласта слизистой оболочки тонкой и толстой кишки.

В ходе выполнения программы «БелРосТрансген-2» коллективом авторов показано положительное действие рекомбинантного ЛФ человека в экспериментальных моделях антибиотик-ассоциированного дисбактериоза, химиотерапии и возрастного гипогонадизма [13–15]. Установлены протекторные эффекты рекомбинантного ЛФ человека в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки на культуру клеток HeLa [16], **проводятся исследования его опухолередуцирующего действия при раке молочной железы.**

Разработаны и внесены в реестр государственной регистрации технические условия (ТУ) на сырье, субстанцию и продукты на ее основе: ТУ ВУ 100235722.212–2012 «Молоко козье с лактоферрином человеческим рекомбинантным» (госрегистрация № 034516); ТУ ВУ 100235722.213–2013 «Лактоферрин человеческий рекомбинантный» (госрегистрация № 037647); ТУ ВУ 100235722.216–2013 «Добавка к пище биологически активная КАПЕЛЛАКТ-ИММУНО» (госрегистрация № 039261); ТУ ВУ 100235722.218–2013 «Добавка к пище биологически активная ФОРТЕЛАКТ-ИММУНО» (госрегистрация № 039263).

Таким образом, на настоящий момент в Республике Беларусь заложены научно-методические и технологические основы для организации производства рекомбинантного ЛФ человека и препаратов на его основе, а также проведения их до- и клинических испытаний. Проведенная работа является приоритетной и создает научно-технологическую базу для развития нового для Республики Беларусь направления фарминдустрии на основе использования трансгенных млекопитающих-продуцентов.

Выражаем благодарность за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа М. В. Серебряковой (НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН).

Список использованной литературы

1. Волков, Г. Л. Инновационные технологии в биофармацевтике: модерн и традиции / Г. Л. Волков, Е. С. Гаврилюк // Фармацевтическая отрасль. – 2011. – № 5 (28). – С. 94–98.
2. Lai, T. Advances in Mammalian Cell Line Development / T. Lai, Y. Yang, S. K. Ng // Technologies for Recombinant Protein Production Pharmaceuticals (Basel). – 2013. – Vol. 6, N 5. – P. 579–603.
3. Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems / O. G. Maksimenko [et al.] // Acta Naturae. – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. 33–46.
4. Recombinant human lactoferrin from transgenic goats: isolation and physicochemical properties / I. Semak [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. P-VI-6. – P. 74.

5. Recombinant human lactoferrin expressed in transgenic goats / A. Budzevich [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. O-VI-2. – P. 66.
6. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions / J. R. Kanwar [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, N 6. – P. 9703–9731.
7. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman [et al.] // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 90, N 3. – P. 513–519.
8. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза / Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – М., 2010. – 58 с.
9. *Боголепов, Н. Н.* Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголепов. – М., 1976. – 71 с.
10. *Viejo-Díaz, M.* Different anti-Candida activities of two human lactoferrin-derived Peptides, Lfpep and kaliocin-1 / M. Viejo-Díaz, M. T. Andrés, J. F. Fierro // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, N 7. – P. 2583–2588.
11. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells / Y. Kawasaki [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2000. – Vol. 64, N 2. – P. 348–354.
12. *Shimizu, H.* Development of an enteric-coated lactoferrin tablet and its application / H. Shimizu // *BioMetals*. – 2004. – Vol. 17. – P. 343–347.
13. Human lactoferrin from transgenic goats prevents antibiotic-associated structural and metabolic damages in the digestive system / U. Lukashevich [et al.] // The XIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, October 6–10, 2013. – Rome, Italy, 2013. – P. 41.
14. Recombinant human lactoferrin: biological activity / A. Budzevich [et al.] // The XIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, October 6–10, 2013. – Rome, Italy, 2013. – P. 32.
15. Средство повышения уровня эндогенного тестостерона в крови / И. В. Залуцкий, Ю. А. Рудниченко, В. С. Лукашевич; Положительное решение предварительной экспертизы по заявке на патент № а20130982 от 14.08.2013 г.
16. Протекторные эффекты рекомбинантного человеческого лактоферрина в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки на культуру клеток HeLa / М. О. Хотянович [и др.] // *Новости медико-биологических наук*. – 2011. – Т. 4, № 3. – С. 65–69.

Поступило в редакцию 12.10.2015