

На правах рукописи

КОСТЕВИЧ

Валерия Александровна

**ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ
АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТОФЕРРИНА**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, Соколов Алексей Викторович

Официальные оппоненты:

Гужова Ирина Владимировна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Лаборатория защитных механизмов клетки, заведующий

Наливаева Наталия Николаевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Лаборатория сравнительной физиологии и патологии ЦНС, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Защита состоится « » 2017 г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета Д001.022.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте http://iemspb.ru/wp-content/uploads/2016/10/Kostevich_textdiss.pdf

Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Основной белок грудного молока, лактоферрин (ЛФ), синтезируется различными типами клеток и проявляет чрезвычайную полифункциональность, в том числе за счёт участия в ряде белок-белковых взаимодействий. Помимо грудного молока, ЛФ выявлен практически во всех экзокринных секретах, а также секреторных гранулах нейтрофилов. Описано несколько изоформ ЛФ и несколько типов клеточных рецепторов для ЛФ. Сотни лабораторий по всему миру интенсивно исследуют разнообразные функции ЛФ, с 1991 года до настоящего времени каждые два года проводятся международные конференции, посвященные этому белку. В настоящее время доказаны функции ЛФ как антимикробного и противовирусного агента, ростового фактора желудочно-кишечного тракта и костной ткани, иммуномодулятора, эффективного липолитического, противоопухолевого и антианемического агента. Будучи одним из сильнейших белковых хелаторов ионов железа (III), ЛФ создает железодефицитную среду, препятствуя росту патогенных микроорганизмов. Учитывая тесную связь метаболизма железа с регуляцией адаптации к гипоксии, нами была предпринята попытка исследовать антигипоксические и антианемические свойства ЛФ и молекулярный механизм их реализации.

Регуляция адаптации к гипоксии тесно связана с развитием таких патологических процессов, как железодефицитная анемия, опухолевый рост, генерация активных форм кислорода (АФК), воспаление и апоптоз. Учитывая, что ЛФ является мажорным белком грудного молока, практически не подвергается деградации в желудочно-кишечном тракте младенца и преодолевает гематоэнцефалический барьер, прояснение молекулярных механизмов его участия в адаптационных процессах важно для понимания функций этого белка при грудном вскармливании. Последнее особенно важно при создании искусственных смесей для вскармливания новорожденных.

Степень разработанности темы исследования. Ранее в Отделе молекулярной генетики Института Экспериментальной Медицины при изучении медь-содержащего белка церулоплазмينا (ЦП) в молозиве и грудном молоке был обнаружен его комплекс с ЛФ [Zakharova et al., 2000], который также присутствует в норме в слезной жидкости, а при воспалении образуется в кровотоке. Биохимическая характеристика комплекса ЦП-ЛФ выявила усиление ферроксидазной активности ЦП при взаимодействии с ЛФ, что явилось предпосылкой для исследования антианемической активности ЛФ и её молекулярных механизмов. На момент начала этих исследований лишь в одной лаборатории в мире практически одновременно с нами был зафиксирован антианемический эффект ЛФ. Позже обнаруженный нами в 2012 году антигипоксический эффект лактоферрина был подтвержден в 2013 году на уровне организма (поросята) [Nguyen et al., 2014] и в 2014 году при исследовании клеточной культуры (нейробластома) [Park et al., 2014].

Цель исследования. Выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе антигипоксической активности лактоферрина, и их связь с его антианемическими свойствами.

Задачи. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние железо-насыщенной и апо-форм лактоферринов человека и коровы на устойчивость мышей к острой гипоксии с гиперкапнией.

2. Исследовать антианемическое действие железо-насыщенной и апо-форм лактоферрина при экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс.

3. Выявить наличие иммунореактивных гипоксия-индуцибельных факторов 1 и 2-альфа, эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышей и крыс, получавших различные дозы препаратов лактоферрина.

4. Изучить влияние экспериментального блокирования ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс на антианемические свойства лактоферрина.

5. Исследовать влияние введения лактоферрина беременным и лактирующим крысам на стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессию их генов-мишеней у потомства.

Научная новизна. В результате проведенных исследований впервые показана антигипоксическая активность апо-формы ЛФ при введении мышам. Впервые выявлена стабилизация гипоксия-индуцибельных факторов 1 и 2 альфа (HIF-1 α и HIF-2 α), а также индукция синтеза белковых продуктов их генов-мишеней ЦП и эритропоэтина (ЭПО) в органах животных, получавших апо-ЛФ. Впервые на модели выключения ферроксидазной активности ЦП показано, что защитные эффекты апо-формы ЛФ регулируются по принципу отрицательной обратной связи ферроксидазной активностью ЦП. Продемонстрировано, что апо-форма ЛФ способна вызывать индукцию HIF-сигнального пути при пероральном введении грызунам и при вскармливании потомства самками, получавшими ЛФ внутривентриально и перорально.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования проясняют молекулярные механизмы, лежащие в основе антигипоксической и антианемической активности апо-формы ЛФ. Стабилизация HIF-1 α и HIF-2 α под действием апо-формы ЛФ, а также индукция синтеза ключевых участников метаболизма железа и эритропоэза (ЦП и ЭПО) являются предпосылкой для изучения нейро- и кардиопротективных свойств ЛФ. Регуляция активности апо-формы ЛФ под действием ферроксидазной активности ЦП является основой для понимания функциональной взаимосвязи железо-связывающих свойств ЛФ и активируемой им ферроксидазы (ЦП). По результатам работы был оформлен патент РФ, посвященный применению ЛФ в качестве физиологического миметика гипоксии.

Методология и методы исследования. Исследование молекулярных механизмов реализации антигипоксической и антианемической активности ЛФ выполнено с использованием высокоочищенного препарата белка с привлечением методов биохимии и иммунохимии. Были разработаны модели острой гипоксии с гиперкапнией у мышей, постгеморрагической анемии у крыс, адаптирована модель гемолитической анемии для крыс, использована

разработанная в Отделе молекулярной генетики модель выключения ферроксидазной активности церулоплазмينا. Были охарактеризованы свойства ЦП, выделенного из крови крыс, получавших AgCl с пищей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антигипоксическая активность характерна для апо-формы лактоферрина человека и коровы, но не насыщенных железом препаратов белка.

2. При экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс антианемическая активность выявлена только у апо-формы лактоферрина.

3. Стабилизация гипоксия-индуцибельных факторов 1-альфа и 2-альфа, увеличение синтеза эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышечной и крыс выявлены при внутрибрюшинном, *per os* и интраназальном введении апо-формы лактоферрина.

4. Усиление антианемических свойств апо-формы лактоферрина связано с дефицитом ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс, получавших AgCl с пищей.

5. После введения лактирующим крысам апо-лактоферрина увеличивается стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессия их генов-мишеней у потомства.

Степень достоверности и апробации результатов. Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Xth, XIth International Conference on Lactoferrin «Structure, Function and Application» (Мексика, Масатлан, 2011; Италия, Рим, 2013), VII, VIII и IX крымских конференциях «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Украина, Судак, 2011–2013), Международных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Беларусь, Минск, 2012; 2014; 2016), X юбилейной и XI международных конференциях «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, Пицунда, 2014; Гагра, 2015), VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, 3 из которых – статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, представленные в “PubMed”; 6 тезисов конференций; получен 1 патент РФ.

Личный вклад соискателя. Личный вклад автора состоял в анализе литературы по проблеме исследования, планировании экспериментов и их выполнении, статистической обработке полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации, написании автореферата. Участие автора в анализе литературы – 95%, статистической обработке результатов – 90%, подготовке статей и тезисов докладов – 90%, написании диссертации и автореферата – 95-100%.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы»,

«Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 328 источников, из них 7 – отечественных. Диссертация изложена на 107 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 3 таблицах и иллюстрированы 22 рисунками.

Финансовая поддержка и благодарности. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: №№ 08-04-00905, 09-04-00742, 13-04-01191, грантов президента РФ: МК-1484.2012.4, МК-6062.2014.4, а также программы РАМН «Протеом человека».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовались следующие материалы: моноклональные антитела («Abcam», «BioRad», «Протеиновый контур»), хроматографические сорбенты («BioRad», «Pharmacia»), реактивы для электрофореза («Serva», «BioRad», «Лаборатория МЕДИГЕН»), неорганические основания, соли и кислоты («Merck», «РЕАХИМ»), органические реактивы и субстраты ферментов («Sigma», «Serva», «Лаборатория МЕДИГЕН»), полный и неполный адьюванты Фрейнда, гепарин («СПОФА», Польша). Для приготовления растворов использовали апиrogenную деионизированную воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм×см (Медиана-Фильтр, Россия).

Хроматографические методы. Все хроматографические процедуры проводили при 4°C в термостатируемом хроматографическом шкафу, в остальных случаях условия указаны дополнительно. Хроматографию при комнатной температуре осуществляли на хроматографе BioLogic DuoFlow («Bio-Rad», США).

Синтез сорбентов. Сефарозу 4В или агарозу активировали с помощью BrCN [Cuatrecasas *et al.*, 1968]. После активации к смоле добавляли равный объем PBS, содержащий лиганд. Реакцию проводили в течение 12 часов при перемешивании при 4°C. Полученные смолы хранили в PBS с добавлением азида натрия.

Спектрофотометрия. Спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой области измеряли с помощью спектрофотометра СФ-2000-02 («ОКБ-Спектр», Санкт-Петербург).

Пара-фенилендиамин-оксидазную активность церулоплазмينا оценивали, используя в качестве субстрата *p*-фенилендиамин (*p*-PD), который окисляется ЦП с образованием окрашенного продукта конденсации [Ravin, 1961].

Ферроксидазную активность ЦП определяли по убыли железа (II), определяя концентрацию образовавшегося комплекса железа (II) с феррозином [Пулина и соавт., 2010]. Активность выражали в мМ окисляемого железа за час для неразбавленной сыворотки.

Концентрацию гемоглобина определяли фотоколориметически, добавляя цельную кровь к водному раствору аммиака [Пулина и соавт., 2010]. Уровень гемоглобина выражали в относительных единицах, принимая значение в первый день эксперимента за 100%.

Концентрацию железа в сыворотке измеряли после восстановления аскорбиновой кислотой и образования цветного комплекса с феррозином.

Электрофоретические методы. Для определения молекулярной массы и степени чистоты белков использовали электрофорез в ПААГ в щелочной системе, рН 8,9 [Davis, 1964], в кислой системе, рН 4,3 [Маурер, 1971], в щелочной системе в присутствии SDS [Laemmli, 1970], в высокомолярной Tris-буферной системе в присутствии SDS [Fling and Gregerson, 1986]. Для окраски белковых зон использовали Кумасси бриллиантовый синий R-250, для выявления специфической оксидазной активности ЦП гели окрашивали раствором о-дианизидина [Owen and Smith, 1961].

Выделение церулоплазмينا из сыворотки крови крыс и мышей проводили, используя последовательно хроматографию на колонке с UNO-Sphere Q, затем на колонке с неомицин-агарозой [Соколов и соавт., 2012].

Использовали двухэтапный метод **получения ЛФ из грудного молока**, включающий хроматографию на колонке с CM-Сефадексом и затем гель-фильтрацию на колонке с Сефакрилом S-200 HR [Zakharova *et al.*, 2000].

Трансферрин (ТФ) из сыворотки крови человека выделяли, последовательно хроматографируя подготовленную сыворотку на DEAE-Toyopearl и UNO-Sphere S.

Подготовка образцов тканей для выявления иммунореактивных белков. Предварительно замороженные при -70°C образцы тканей гомогенизировали с трехкратным объемом (w/v) буфера, содержащего коктейль ингибиторов протеиназ («Roche»). Гомогенат центрифугировали и определяли в надосадочной жидкости концентрацию белка с помощью микро-варианта метода Брэдфорд [Bradford, 1976]. Пробы для ЭФ в ПААГ содержали 100 мкг общего белка.

Иммунизация кроликов и получение антител. Для увеличения иммунного ответа антигены перед иммунизацией подвергали электрофорезу в ПААГ, затем фрагменты геля, содержащие белок, вводили в виде суспензии совместно с адьювантом Фрейнда внутривенно в парапозвоночную область кроликов. Иммунизацию повторяли 3 раза с интервалом в 14 дней. Для выделения аффинных антител проводили хроматографию сыворотки кроликов на DEAE-Сефадексе А-50, а затем на колонке с белком-антигеном, иммобилизованным на BrCN-активированной Сефарозе.

Вестерн-блоттинг. Для выявления специфических зон в ПААГ после ЭФ применяли метод электрофоретического переноса на нитроцеллюлозный фильтр и детекцию специфических зон с помощью иммуноферментного анализа – Вестерн-блоттинг [Anderson *et al.*, 1982]. Для детекции зон исследуемых антигенов использовали раствор, содержащий 4-хлор-1-нафтол (либо о-дианизидин), нитроцеллюлозный фильтр с проявившимися фиолетовыми (либо оранжевыми) зонами хранили в темноте.

Твердофазный иммуноферментный анализ эритропоэтина проводили, используя наборы «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» («Вектор-бест», Россия).

Изучение антигипоксической активности. Антигипоксическую активность белковых препаратов изучали на мышцах–гибридах F1CBA×C57BL, вес 20 ± 2 г, в модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Предварительно мышцей сортировали по устойчивости к гипоксии, отбирая мышцей, сохранявших

естественную позу в герметичном сосуде объемом 200 мл в течение 18 минут (17-19 минут). После такого отбора животных оставляли на 1 месяц, вводили исследуемые препараты и вновь регистрировали время сохранения естественной позы в разные временные промежутки после введения апо-формы и насыщенной железом формы лактоферрина, трансферрина, альбумина сыворотки человека (75 мг/кг).

Изучение антианемической активности:

1. Модель постгеморрагической анемии. Эксперименты проводились на самцах крыс линии «Вистар», вес 210 ± 15 г. Животных поделили на 3 группы по 6 крыс в каждой. В течение четырех дней под эфирным наркозом у животных обеих групп отбирали по 3 мл крови, еще два забора проводили на 7-й и 8-й день эксперимента. Ежедневно анализировали концентрацию гемоглобина, уровень сывороточного железа. Начиная с 7-го дня животным экспериментальной группы вводили внутрибрюшинно 75 мг/кг ЛФ человека (в апо- и насыщенной железом формах) в 1 мл физиологического раствора в течение четырех дней. Контрольной группе вводили по 1 мл физиологического раствора.

2. Модель гемолитической анемии. Крысам линии «Вистар» однократно внутрибрюшинно вводили сублетальную дозу фенилгидразина 250 мг/кг в 2 мл PBS. На следующий день животным вводили апо-ЛФ или насыщенную железом форму ЛФ (75 мг/кг) либо PBS (контрольная группа) – по 15 животных в группе. В этот день, через 3 и 6 дней после индукции гемолитической анемии оценивали уровень гемоглобина и концентрацию железа в сыворотке крови.

3. Содержание крыс на диете с хлоридом серебра. Беременных самок крыс линии «Вистар» содержали в отдельных клетках и сразу после рождения потомства заменяли корм на аналогичный с добавлением хлорида серебра (2,5 г на 1 кг сухого корма). Крысы имели свободный доступ к корму, получая при этом около 50 мг AgCl ежедневно. Потомство этих крыс содержалось на такой же диете в течение трех месяцев. Эксперимент по постгеморрагической анемии модифицировали: у 80 крыс отбирали по 4 мл крови в течение четырех дней, на 5-й, 6-й и 7-й дни половине животных вводили 75 мг/кг апо-ЛФ, другой половине – физиологический раствор.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2002. Эксперименты повторяли три раза ($n=3$, если не указано иначе). Для проверки гипотезы, что анализируемая выборка имеет нормальное распределение, использовали критерий Колмогорова–Смирнова для $\alpha = 0,05$. В случае сравнения экспериментальных данных с расчетным значением использовали одновыборочный t-критерий, нулевую гипотезу принимали при $p > 0,05$.

В случае множественных сравнений использовали двухфакторный и трехфакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Тьюки, нулевую гипотезу принимали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование антигипоксической активности лактоферрина на модели острой гипоксии с гиперкапнией у мышей. При сравнении антигипоксической активности препаратов ЛФ использовали апо-форму и насыщенную железом форму белка (Fe_2 -ЛФ) (75 мг/кг). Препараты вводили внутривентриально за 1 час и 24 часа до гипоксии низкоустойчивым к гипоксии мышам. Результаты представлены на Рис. 1. Используемый в качестве отрицательного контроля альбумин сыворотки крови (ЧСА) не повлиял на время сохранения позы животными. Апо-форма ЛФ только при введении за 24 часа до тестирования увеличивала время сохранения позы низкоустойчивыми мышами на 30%, что позволяло отнести таких животных к группе высокоустойчивых к гипоксии. Fe_2 -ЛФ, а также эквивалентный объем PBS и трансферрин (75 мг/кг) не влияли на время сохранения позы животными.

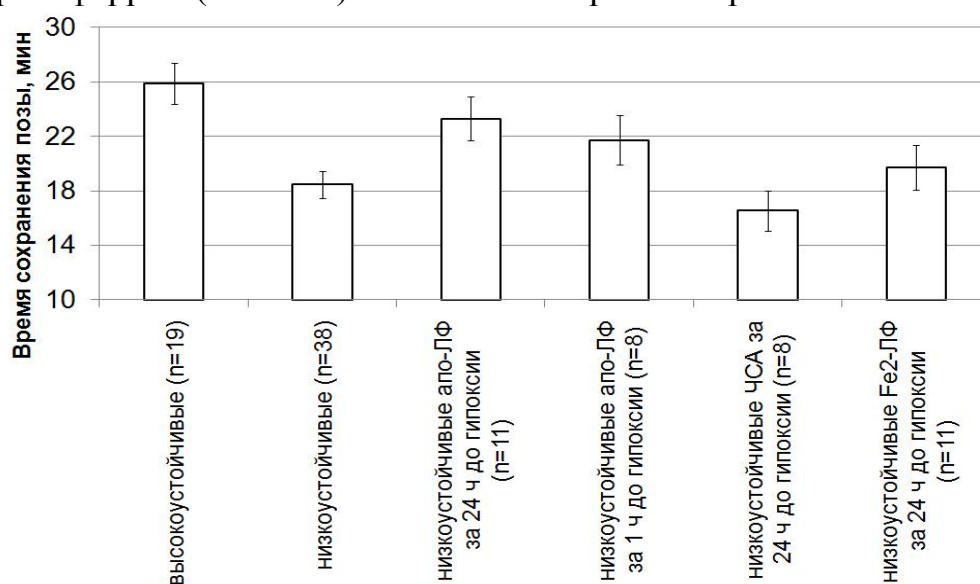


Рис. 1. Время сохранения позы в условиях острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией низкоустойчивых к гипоксии мышей после введения тестируемых препаратов (75 мг/кг). Для сравнения дан столбик для группы высокоустойчивых к гипоксии мышей. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

В независимых экспериментах нами было показано, что ЛФ, выделенный из молока коров, также продемонстрировал антигипоксическую активность, но только в апо-форме и при введении за 24 часа до тестирования.

В связи с отсроченным эффектом действия нами был сделан предварительный вывод, что антигипоксическая активность апо-формы ЛФ связана с активацией адаптационных сигнальных путей организма животных.

Исследование антианемической активности лактоферрина на моделях острой постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс. Для сравнения влияния апо- и Fe_2 -ЛФ мы использовали модель постгеморрагической анемии у крыс. Критерием развития анемии служило понижение уровня гемоглобина (Рис. 2).

Чтобы подтвердить, что недостаток гемоглобина вызван дефицитом железа, мы определяли количество этого элемента в сыворотке крови (Рис. 3). На 4-й день эксперимента уровень гемоглобина снизился до 59 % от первоначального. После следующей кровопотери (7-ой день) он существенно не изменился. К этому моменту концентрация железа в сыворотке снизилась до 20 мкМ.

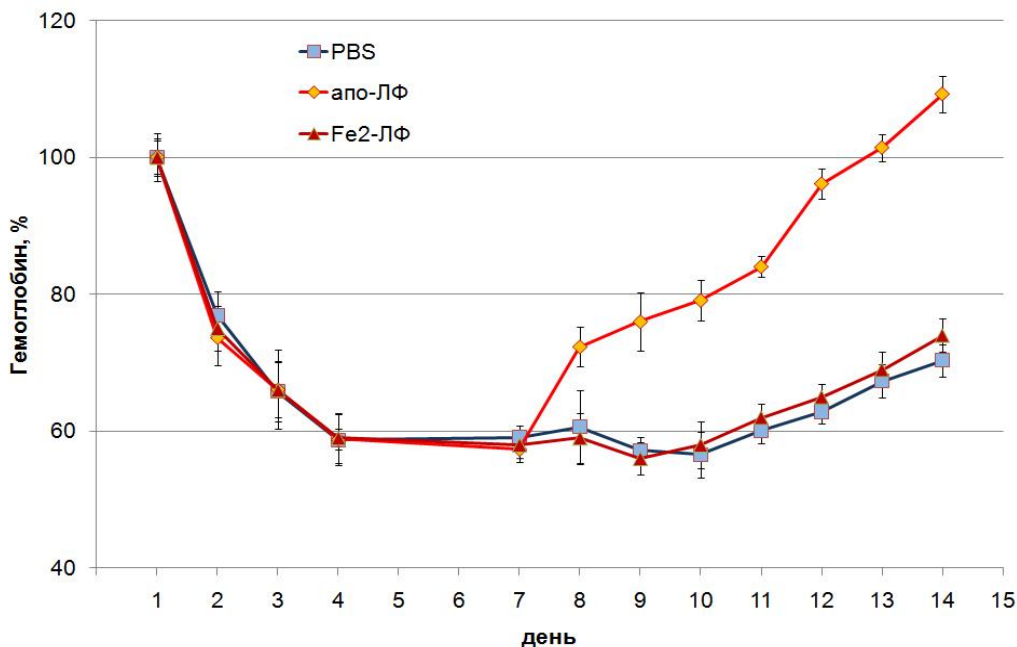


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ (7-й – 10-й дни) на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й, 7-й и 8-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

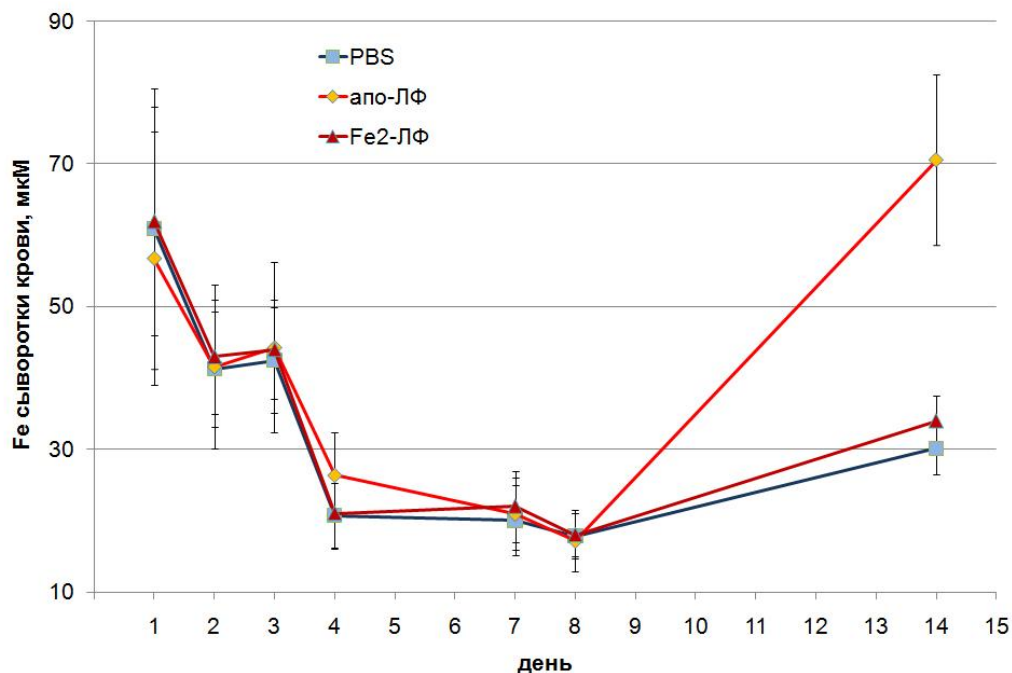


Рис. 3. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ (7-й – 10-й дни) на концентрацию Fe сыворотки крови у крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й, 7-й и 8-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

С 7-го дня двум группам крыс вводили ЛФ человека (апо- и Fe₂-ЛФ), контрольной группе – эквивалентный объем PBS. На следующий день уровень гемоглобина в группе с апо-ЛФ повысился до 72 %, а в контрольной группе и в группе с Fe₂-ЛФ – до 61 %. На 14-й день у животных, получавших апо-ЛФ, гемоглобин превысил исходный уровень (109 %), тогда как в контрольной группе и в группе с Fe₂-ЛФ он достиг только 70 %.

Уровень сывороточного железа к 14-му дню эксперимента у крыс, получавших апо-ЛФ, поднялся до 125 %, а у животных контрольной группы и группы с Fe₂-ЛФ он составил только 49 % от исходного. Таким образом, апо-форма ЛФ, в отличие от Fe₂-ЛФ, проявила выраженную антианемическую активность.

Модель гемолитической анемии с использованием фенилгидразина была ранее описана для мышей [Hodgson, 1973]. На следующий день после инъекции гемолитического агента крысам концентрация гемоглобина снижалась до 42% от первоначальной (Рис. 4). Исходный уровень гемоглобина восстанавливался только на 6-й день. Наблюдалось также снижение концентрации сывороточного железа, на 3-й день после индукции анемии концентрация составила 56% от исходного уровня (Рис. 5). Однократное внутрибрюшинное введение крысам апо-ЛФ в дозе 75 мг/кг на следующий день после индукции гемолитической анемии привело к восстановлению концентрации гемоглобина на 3-й и 6-й день эксперимента до 82% и 113% от исходного уровня (Рис. 4). У контрольных животных и крыс, получивших Fe₂-ЛФ, в эти дни уровень гемоглобина составлял 74% и 98%, соответственно. Концентрация сывороточного железа у крыс, получивших 75 мг/кг апо-ЛФ, на 3-й и 6-й день эксперимента составила 76 и 90% от исходного уровня (Рис. 5).

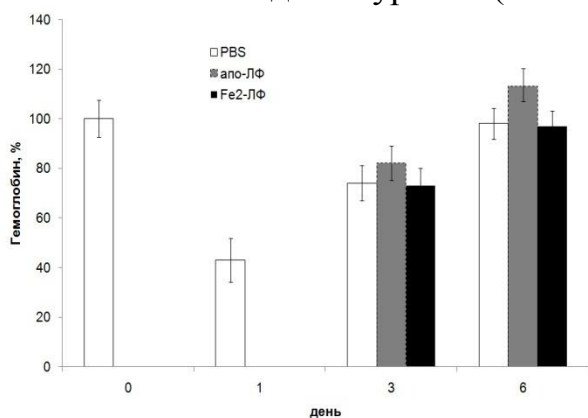


Рис. 4. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

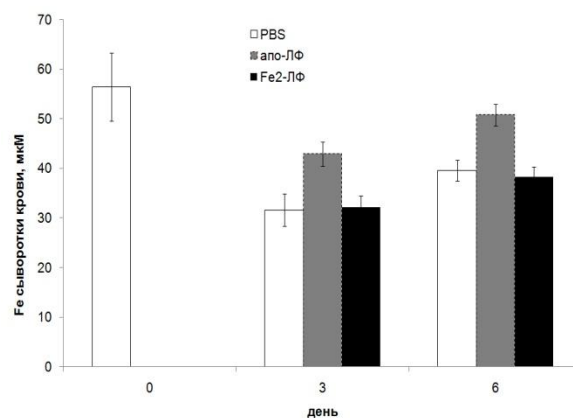


Рис. 5. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ на концентрацию железа в сыворотке крови крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Ферроксидазная активность ЦП повышалась в 1,5 раза после введения крысам любой из форм ЛФ. Проведенные опыты с использованием Fe₂-ЛФ позволяют предположить, что корректирующее действие ЛФ не связано с

прямым воздействием на ферроксидазную активность ЦП, поскольку Fe₂-ЛФ практически не восстановил параметров метаболизма железа в моделях постгеморрагической и гемолитической анемии. Этот неожиданный результат позволил выдвинуть рабочую гипотезу о том, что корректирующее действие ЛФ связано непосредственно с его хелаторными свойствами.

Учитывая, что для проявления защитных свойств в использованных нами моделях острой гипоксии и анемии необходимо увеличить количество эритроцитов, что было косвенно подтверждено по увеличению концентрации гемоглобина, мы изучили влияние введения различных форм ЛФ и ТФ на концентрацию индуктора эритропоэза, эритропоэтина (ЭПО), через сутки после внутрибрюшинного введения (Рис. 6). Концентрация ЭПО после введения апо-ЛФ увеличилась в 4,5 раза, в отличие от остальных групп крыс.

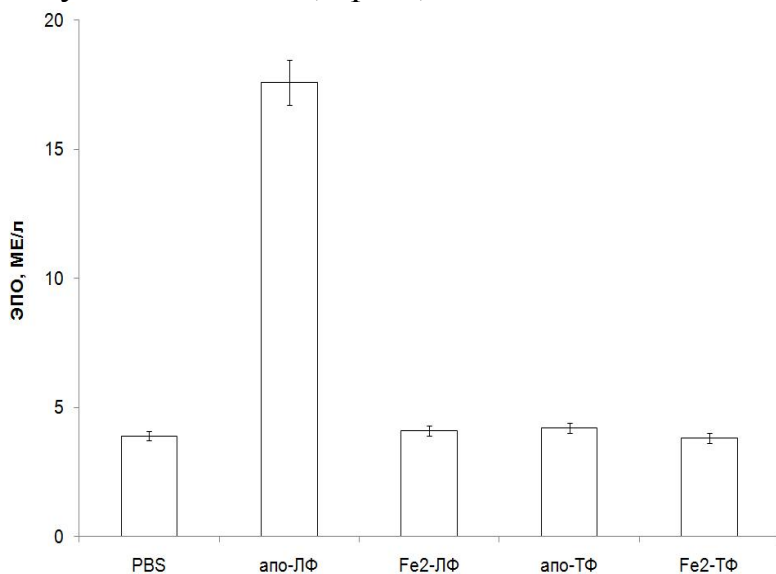


Рис. 6. Влияние PBS, апо-ЛФ, Fe₂-ЛФ, апо-ТФ и Fe₂-ТФ (250 мг/кг) на концентрацию ЭПО в сыворотке крови крыс через 24 часа после внутрибрюшинного введения. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Исследование влияния лактоферрина на иммунореактивные гипоксия-индуцибельные факторы 1-альфа и 2-альфа, эритропоэтин и церулоплазмин в образцах тканей мышей и крыс. Учитывая, что именно апо-форма ЛФ приводила к увеличению концентрации ЭПО, одной из мишеней HIF-сигнальной системы, было решено исследовать влияние введения апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ на присутствие в тканях животных иммунореактивных HIF-1 α и HIF 2 α и продуктов их генов-мишеней: ЦП и ЭПО. В качестве положительного контроля был использован синтетический хелатор железа (фармакологический миметик гипоксии) – десферал (DFO).

HIF-1 α был обнаружен на сроках 4-24 часа после внутрибрюшинного введения апо-ЛФ (75 мг/кг) мышам в мозге (рис. 7), печени, селезёнке, легких, сердце и почках. Практически не удалось выявить HIF-1 α в тканях контрольных животных, получивших PBS. Продукт активации HIF-1 α , ЦП, был также обнаружен в перечисленных выше органах после введения апо-ЛФ (рис. 8).



Рис. 7. Результат выявления HIF-1 α после Вестерн-блоттинга белков гомогенатов мозга мышей (n=3), получивших за сутки PBS (1-3), DFO (4-6; 5 мг/кг) и апо-ЛФ (7-9; 75 мг/кг), на дорожку нанесено 100 мкг общего белка, М – окрашенные маркеры молекулярной массы, стрелкой указано положение полосы 125 кДа.

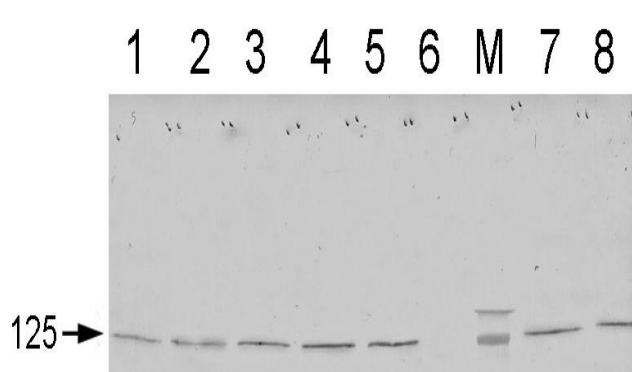


Рис. 8. Результат выявления ЦП после Вестерн-блоттинга белков гомогенатов мозга (1), легких (2), почек (3), печени (4), селезёнки (5), сердца (7) мышей (n=3), получивших за сутки апо-ЛФ (75 мг/кг), PBS (6, гомогенат мозга), DFO (8, 5 мг/кг, гомогенат мозга), на дорожку нанесено 100 мкг общего белка, М – окрашенные маркеры молекулярной массы, стрелкой указано положение полосы 125 кДа.

В тех же органах были выявлены HIF-2 α и продукт его активации ЭПО на сроках от 4 до 24 часов после внутрибрюшинной инъекции апо-ЛФ (75 мг/кг). Также был исследован интраназальный способ введения апо-ЛФ (15 мг/кг), при котором HIF-1 α , HIF-2 α , ЦП и ЭПО были обнаружены в гомогенатах головного мозга мышей и крыс. Были изучены последствия добавления апо-ЛФ человека и коровы (конечная концентрация 2 мг/мл) в PBS и молоко коровы, которые употребляли мыши и крысята сразу после отлучения от лактирующей самки. На 3-й и 6-й дни в тканях животных были обнаружены иммунореактивные HIF 1 α , HIF-2 α , ЦП и ЭПО. Результаты выявления данных антигенов с помощью Вестерн-блоттинга суммированы в таблице 1.

Таблица 1.

Обобщенные результаты выявления иммунореактивных HIF-1 α , HIF-2 α , ЦП и ЭПО (как минимум 3 животных в группе) у мышей и крыс.

	печень	мозг	сердце	селезёнка	легкие	почки
4-24 часа после в/б* инъекции PBS	-	-	-	-	-	-
4-24 часа после в/б инъекции апо-ЛФ, 75 мг/кг	+	+	+	+	+	+
4-24 часа после в/б инъекции Fe ₂ -ЛФ, 75 мг/кг	-	-	-	-	-	-
PBS с питьем (3 и 6 дней)	-	-	-	-	-	-
PBS, содержащий 2 мг/мл апо-ЛФ, с питьем (3 и 6 дней)	+	+	+	+	+	+
Молоко коровы с питьем (3 и 6 дней)	-	-	-	-	-	-
Молоко коровы, содержащее 2 мг/мл апо-ЛФ, с питьем (3 и 6 дней)	+	+	+	+	+	+
После и/н** введения PBS (4-24 часа)	-	-	-	-	-	-
После и/н введения апо-ЛФ (4-24 часа, 15 мг/кг)	-	+	-	-	-	-

* в/б – внутрибрюшинная, ** и/н – интраназальное.

Учитывая, что, в отличие от апо-ЛФ, Fe₂-ЛФ не вызывал стабилизации HIF и активации синтеза ЦП и ЭПО в тканях, на следующем этапе работы мы изучили, повлияет ли экспериментальное выключение ферроксидазной активности ЦП у крыс на защитные свойства апо-ЛФ.

Исследование влияния выключения ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс, получавших диету с AgCl, на защитные свойства лактоферрина. Удобной экспериментальной моделью выключения ферроксидазной активности ЦП является содержание крыс на диете с AgCl, однако, учитывая эмбриотоксический эффект AgCl [Shavlovski *et al.*, 1995], было решено вводить AgCl в пищу сразу после рождения интактными самками крысят. Измерение содержания Ag в молоке лактирующих крыс на 2-ой и 8-ой день лактации показало наличие 8 ± 2 и 10 ± 2 мкг Ag на 1 мл цельного молока, соответственно. В молоке контрольных самок не было выявлено серебра. После трех месяцев вскармливания крыс AgCl мы не выявили статистически достоверных отличий по весу (212 ± 12 г, $n=246$) от контрольных крыс того же возраста (214 ± 23 г, $n=238$). В опыте были использованы только самцы, а самки были подвергнуты эфирному наркозу, декапитации и из их сыворотки были выделены препараты ЦП. Определение содержания ионов меди и серебра в препаратах ЦП показало наличие $5,8 \pm 0,3$ атомов Cu на молекулу ЦП из сыворотки контрольных крыс и $3,9 \pm 0,2$ атомов Cu и $2,1 \pm 0,3$ атомов Ag на молекулу ЦП из сыворотки Ag-крыс. Таким образом, можно предположить, что ЦП из сыворотки Ag-крыс содержал вместо двух ионов меди I типа два иона серебра. Вероятно, именно поэтому препарат ЦП из сыворотки Ag-крыс не обладал ферроксидазной активностью. На полученной модели мы исследовали, насколько ферроксидазная функция ЦП важна для восстановления ключевых параметров метаболизма железа при постгеморрагической анемии. До начала опыта концентрация железа в сыворотке Ag-крыс была в 1,4 раза ниже, чем в контрольной группе (39 ± 4 и 56 ± 11 мкМ).

В течение четырех ежедневных заборов крови мы наблюдали монотонное снижение содержания гемоглобина и концентрации сывороточного железа у крыс в обеих группах (Рис. 9 и 10). После окончания массивных заборов крови уровень гемоглобина практически восстановился до исходного уровня у крыс в обеих группах к 14-му дню без статистически достоверных различий (Рис. 9). Напротив, концентрация железа в сыворотке у Ag-крыс к 14-му дню эксперимента была в 4,5 раза ниже, чем у контрольных крыс (Рис. 10). Таким образом, несмотря на фатальное снижение концентрации железа, Ag-крысы восстановили уровень гемоглобина с той же динамикой, что и крысы контрольной группы. Ежедневное введение апо-ЛФ (75 мг/кг) половине контрольных и Ag-крыс после последней кровопотери (на 5-й, 6-й и 7-й день) привело к восстановлению концентрации сывороточного железа в отличие от Ag-крыс, которым не вводили апо-ЛФ.

У Ag-крыс в течение всего эксперимента не наблюдалось проявления как ферроксидазной, так и аминоксидазной активности ЦП. Таким образом, восстановление концентрации железа до исходного уровня нельзя было

объяснить действием апо-ЛФ на ферроксидазную активность ЦП. Более того, апо-ЛФ быстрее купировал анемию у крыс с дефицитом ферроксидазной активности ЦП.

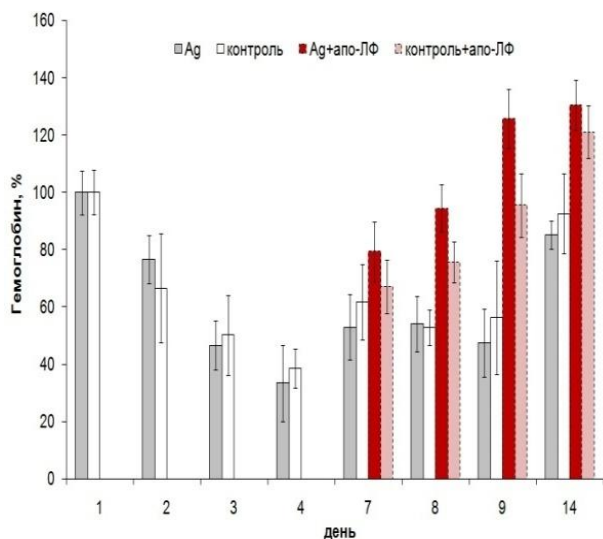


Рис. 9. Влияние внутрибрюшинного введения PBS либо апо-ЛФ (5-й –7-й дни) на концентрацию гемоглобина у контрольных и Ag-крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

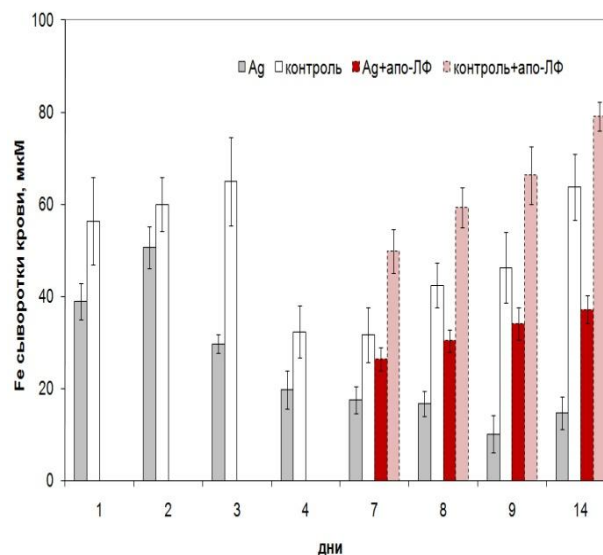


Рис. 10. Влияние внутрибрюшинного введения PBS либо апо-ЛФ (5-й –7-й дни) на концентрацию Fe в сыворотке крови контрольных и Ag-крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Сравнение защитного эффекта апо-ЛФ проводили и для гемолитической анемии: Ag-крысы после индукции гемолитической анемии, также как и контрольные, восстановили уровень гемоглобина до исходного на 6-й день, однако, концентрация железа на 6-й день продолжала составлять не более 54% от исходной (Рис. 11). Концентрация сывороточного железа у Ag-крыс, получивших 75 мг/кг апо-ЛФ, на 3-й и 6-й дни эксперимента составила 96% и 114% от исходного уровня (Рис. 11).

Однократное внутрибрюшинное введение Ag-крысам апо-ЛФ в дозе 75 мг/кг на следующий день после индукции гемолитической анемии привело к восстановлению концентрации гемоглобина на 3-й и 6-й дни эксперимента до 96% и 126 % от исходного уровня, что было выше, чем у контрольных крыс, получивших апо-ЛФ (Рис. 12). Дополнительные эксперименты, проведенные на Ag-крысах с использованием Fe₂-ЛФ, показали, что он практически не восстановил параметров метаболизма железа в моделях постгеморрагической и гемолитической анемии (данные не приведены).

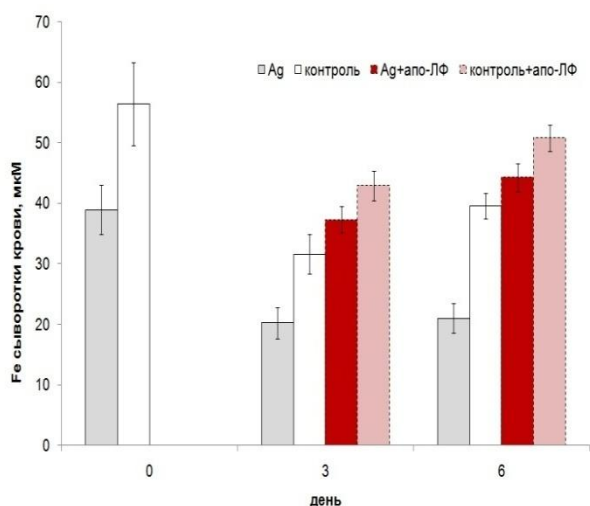


Рис. 11. Влияние внутрибрюшинного введения PBS и апо-ЛФ на концентрацию Fe в сыворотке крови крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

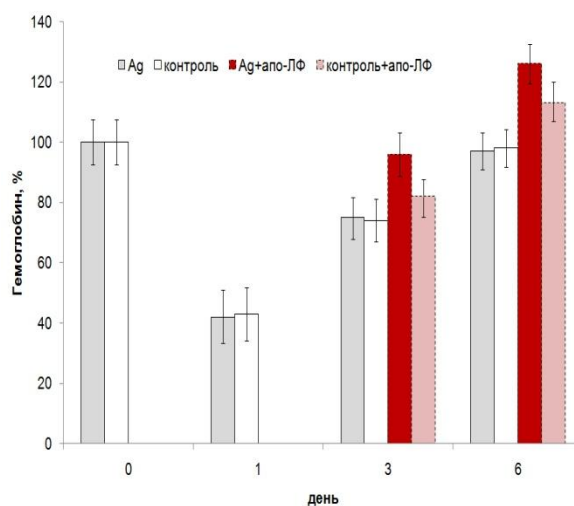


Рис. 12. Влияние внутрибрюшинного введения PBS и апо-ЛФ на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

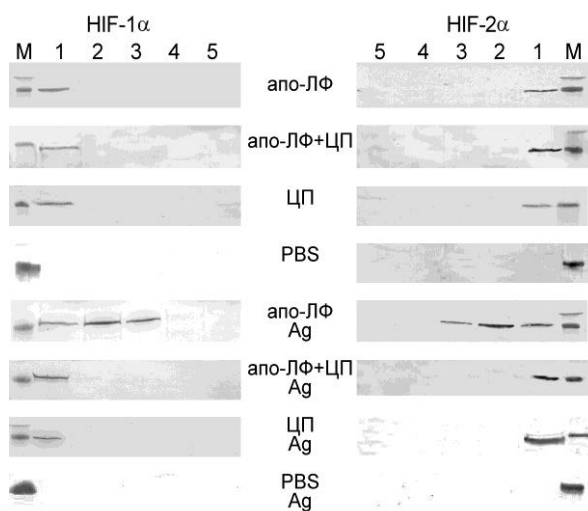


Рис. 13. Типичный пример выявления иммунореактивных HIF-1 α и HIF-2 α при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов мозга крыс через 1-5 дней после внутрибрюшинной инъекции 75 мг/кг апо-ЛФ, 100 мг/кг ЦП, двух белков либо PBS. 100 мкг белка на дорожку, M – окрашенный маркер молекулярной массы, номера 1, 2, 3, 4, 5 соответствуют дням после инъекции.

В независимых экспериментах при сравнении эффекта внутрибрюшинного введения 75 мг/кг апо-ЛФ контрольным и Ag-крысам мы показали, что Ag-крысы демонстрируют 3-х дневную стабилизацию HIF-1 α и HIF-2 α (Рис. 13). Введение Ag-крысам вместе с апо-ЛФ активного ЦП препятствовало пролонгированию защитных свойств апо-ЛФ, сокращая время стабилизации HIF до 1 дня, как и у крыс, получивших только активный ЦП, а также препятствовало выраженному увеличению концентрации ЭПО в их сыворотке крови. Так, концентрация ЭПО у Ag-крыс, получивших ЦП и апо-ЛФ, не возростала сильнее, чем у контрольных крыс, получивших ЦП (Рис. 14). Недавно появились данные о способности ЦП индуцировать HIF-сигнальный путь [Dai *et al.*, 2016].

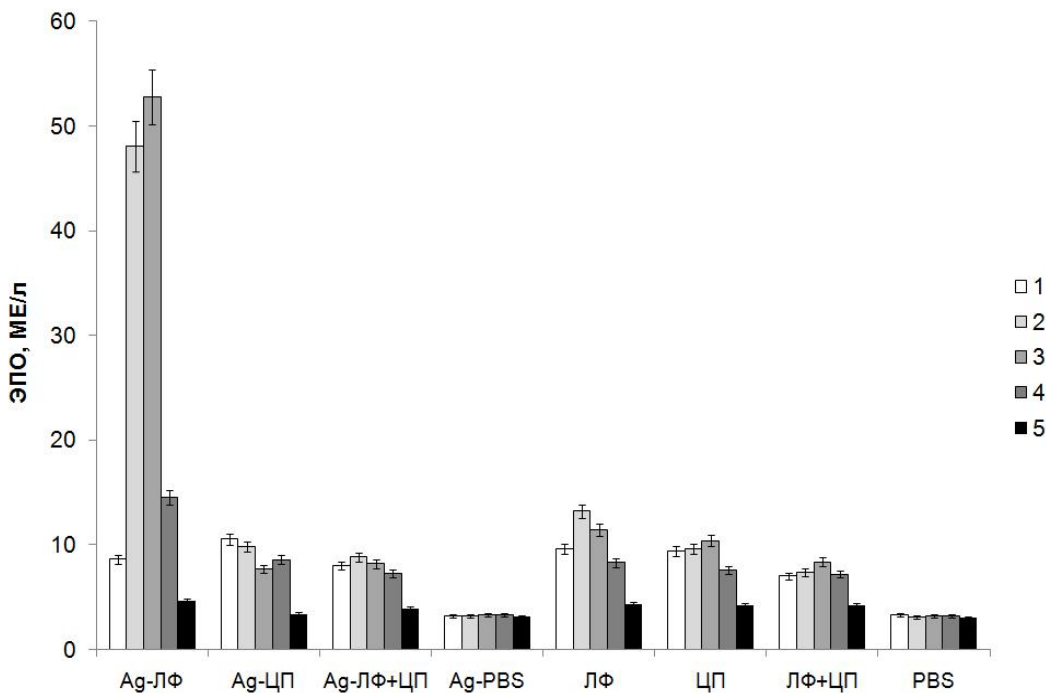


Рис. 14. Концентрация ЭПО в сыворотке Ag-крыс и контрольных крыс через 1-5 дней после внутрибрюшинной инъекции 75 мг/кг апо-ЛФ, 100 мг/кг ЦП, двух белков либо PBS. Номера 1, 2, 3, 4, 5 соответствуют дням после инъекции. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Исследование влияния введения апо-лактоферрина беременным и лактирующим крысам на стабильность гипоксия-индуцибельных факторов у их потомства. Внутрибрюшинное введение апо-ЛФ (75 и 250 мг/кг) беременным крысам показало наличие иммунореактивных HIF-1 α и HIF-2 α в мозге, печени, селезенке и плаценте самок, в то же время в тканях эмбрионов не наблюдалось наличия иммунореактивных HIF. Кроме того, в мозге самок и плаценте был обнаружен иммунореактивный ЭПО. Введение Fe₂-ЛФ беременным крысам не вызывало стабилизации HIF и индукции синтеза ЭПО (Рис. 15). При внутрибрюшинном введении лактирующим самкам крыс апо-ЛФ (250 мг/кг) через 3-24 часа было обнаружено наличие HIF-1 α и HIF-2 α , а также ЭПО в мозге, печени и селезенке крысят (Рис. 16). Такого эффекта у потомства не обнаруживалось в случае инъекции PBS либо Fe₂-ЛФ лактирующим крысам.

Стабилизация HIF-1 α и HIF-2 α и индукция ЭПО была обнаружена также в мозге, печени и селезенке тех детенышей, чьи матери получали с питьевой водой апо-ЛФ (5 мг/мл в течение 3 дней), но не Fe₂-ЛФ.

Таким образом, индукция HIF-сигнальной системы была обнаружена нами у потомства крыс, получавших апо-форму ЛФ внутрибрюшинно и *per os*.

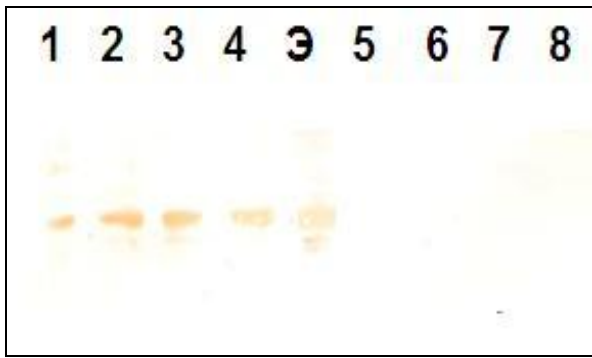


Рис. 15. Типичный пример выявления иммуореактивного ЭПО при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов плацент крыс после внутрибрюшинной инъекции 250 мг/кг апо-ЛФ (1-4), 250 мг/кг Fe₂-ЛФ (5,6) либо PBS (7,8). 100 мкг белка на дорожку, Э – 0,5 мкг ЭПО (положительный контроль).

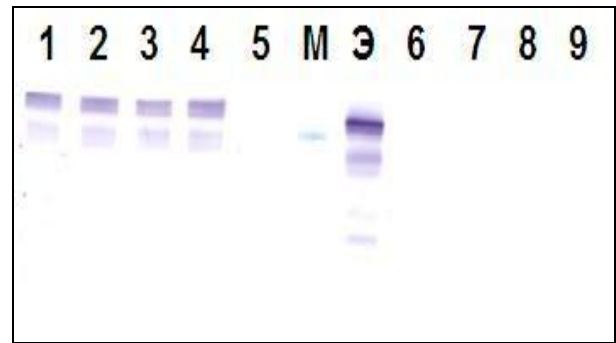


Рис. 16. Типичный пример выявления иммуореактивного ЭПО при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов мозга крысят, вскармливаемых самками, получившими внутрибрюшинно инъекции 250 мг/кг апо-ЛФ (1-4 – через 3, 4, 8 и 24 ч после инъекции), PBS (5), 250 мг/кг Fe₂-ЛФ (6-8 – через 3, 4, 8 и 24 ч после инъекции) 100 мкг белка на дорожку, Э – 0,5 мкг ЭПО (положительный контроль), М – полоса 40 кДа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты отсроченного (через 24 ч.) антигипоксического действия апо-ЛФ, но не насыщенной железом формы белка (Рис. 1), при острой гипоксии с гиперкапнией позволяют предположить активацию экспрессии адаптивных генов за счёт хелаторных свойств апо-ЛФ. Мы показали, что апо-ЛФ, как и DFO, вызывает стабилизацию HIF-1 α и увеличение экспрессии его гена-мишени, ЦП (Рис. 7 и 8). Таким образом, если DFO называют фармакологическим миметиком гипоксии, то апо-форму ЛФ можно назвать физиологическим миметиком гипоксии. Хотя миметики гипоксии вызывают стабилизацию HIF-1 α , который может способствовать росту опухолей [Semenza, 2010], многочисленные противоопухолевые эффекты ЛФ, а именно индукция апоптоза раковых клеток, ингибирование ангиогенеза, модулирование активности ферментов, метаболизирующих канцерогены, а также связывание железа [Parody, 2007; Tsuda *et al.*, 2010], говорят в пользу того, что апо-ЛФ едва ли способен потенцировать опухолевый рост за счет стабилизации HIF-1 α .

Известно, что гипоксия активирует целый ряд генов, ответственных за запасание железа и эритропоэз: трансферрин (ТФ) и его рецептор, ЭПО, ЦП, ферритин, а также GDF15 [Elvidge *et al.*, 2006]. Последний снижает продукцию гепсидина, способствующего развитию дефицита железа [Tanno *et al.* 2007], чем можно объяснить противоанемический эффект DFO, вызывающего экспрессию GDF15 *in vitro*, на культурах клеток [Saletta *et al.*, 2009] и *in vivo*, при введении DFO добровольцам [Lakhal *et al.*, 2009]. Возможно, что противоанемический эффект апо-формы ЛФ также связан с индукцией GDF15. Нами была показана эффективность апо-формы ЛФ при постгеморрагической и гемолитической анемии.

В настоящее время мы можем предложить гипотетические схемы, по крайней мере, двух возможных механизмов стабилизации HIF-1 α под действием ЛФ: Fe-зависимым (Рис. 17) и Fe-независимым путем (Рис. 18). Известно, что HIF-1 α конститутивно синтезируется во всех типах клеток: в случае нормоксии и нормальной концентрации внутриклеточного железа HIF-1 α гидроксилируется Fe-зависимыми гидроксилазами: PHD по остаткам P402 и P564 и FIH по остатку N803. В последнем случае HIF-1 α является транскрипционно неактивным и взаимодействует с pVHL, что способствует его убиквитинилированию и последующей протеосомной деградации. В условиях гипоксии или дефицита внутриклеточного железа процесс гидроксирования HIF-1 α блокируется, HIF-1 α транспортируется в ядро, где, связываясь с конститутивными факторами HIF-1 β и p300/CBP, запускает транскрипцию генов-мишеней, содержащих гипоксия-респонсивные элементы (HRE) [Lee *et al.*, 2004]. Недавно было показано, что DFO индуцирует лизосомальную деградацию ферритина и при этом понижает пул внутриклеточного железа, связывая железо, освобождаяемое из ферритина в лизосомах [De Domenico *et al.*, 2009]. Учитывая, что апо-ЛФ способен связывать по крайней мере 50% внутриклеточного железа ферритина [Birgens, 1994], можно предположить, что именно таким образом он уменьшает активность Fe-зависимых гидроксилаз (PHD и FIH) и способствует стабилизации HIF-1 α (Рис. 17).

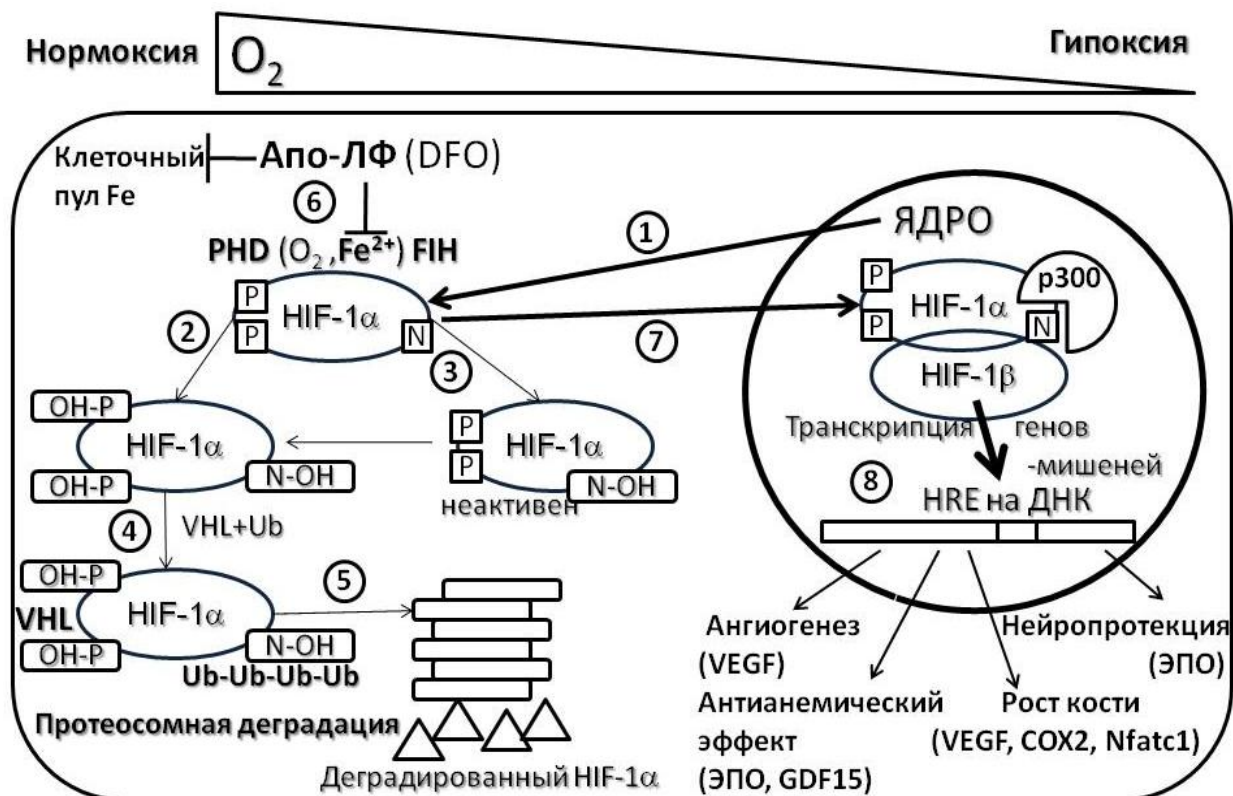


Рис. 17. Железо-зависимая схема регуляции HIF-сигнальной системы под действием ЛФ.

Известно, что ЛФ активирует транскрипцию таких факторов, как TGF- β 1 [Jiang 2011] и IL-1 β [Sonetal., 2002], которые активируют синтез HIF-1 α [Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2009] через MAPK-каскад [Richard *et al.*, 1999]. Более того, в ряде работ показано, что и сам по себе ЛФ активирует MAPK-каскад [Dhennin-Duthille *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2011], участие которого несомненно в Fe- и O₂-независимой индукции HIF-1 α рядом ростовых факторов и цитокинов [Lee *et al.*, 2004].

Также показано, что ЛФ ингибирует рост карциномы, в том числе за счет поддержания белка ретинобластомы pRb в гипофосфорилированной форме [Damiens *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2006]. Последний взаимодействует с HIF-1 α , и именно в гипофосфорилированной форме вызывает его трансактивацию [Budde *et al.*, 2005]. Учитывая, что в раковых клетках нейтрофильный ЛФ активирует p53 по NF- κ B-зависимому пути [Oh *et al.*, 2004], можно предположить, что именно эта особенность ЛФ будет препятствовать возможности роста опухолей за счет ЛФ-зависимой индукции HIF-1 α .

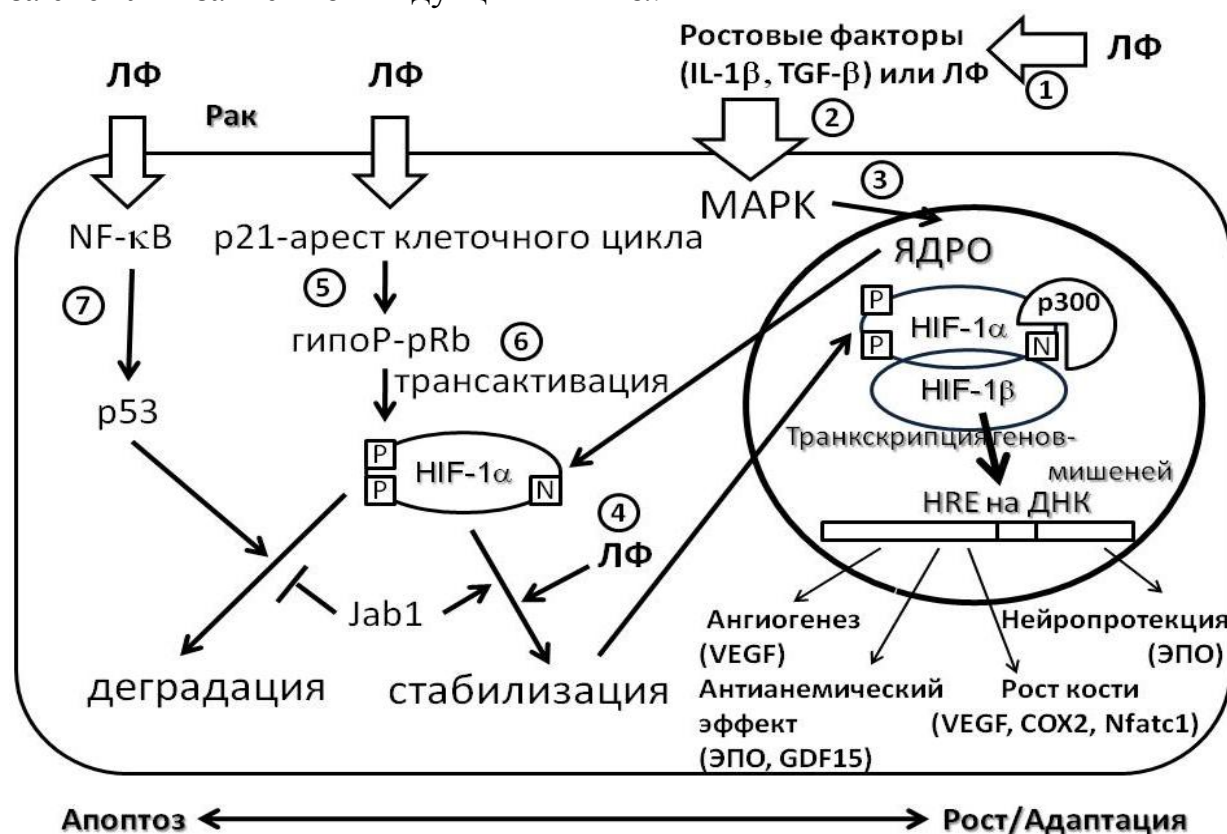


Рис. 18. Железо-независимая схема регуляции HIF-сигнальной системы под действием ЛФ.

Известно, что DFO и его аналоги обладают нейропротективными свойствами на животных моделях болезни Альцгеймера и Паркинсона [Ben-Shachar *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2007]. Особенностью ЛФ является способность проходить через гематоэнцефалический барьер [Fillebeen *et al.*, 1999; Kamemori *et al.*, 2008]. Известно, что в мозге старых 18- и 24-месячных крыс [Ndubizu *et al.*, 2009] из-за повышенной экспрессии пролил-гидроксилаз не работает механизм стабилизации HIF-1 α , обусловленный гипоксией. Но у этих же животных агенты, инактивирующие Fe-зависимые гидроксилазы, способны запустить

нечувствительный к кислороду механизм стабилизации HIF-1 α . Если этот феномен справедлив и для человека, то апо-ЛФ может явиться перспективным лекарством для профилактики нейродегенерации старения.

По сравнению с другими видами млекопитающих, именно в молоке человека находят максимальное количество ЛФ (1-5 мг/мл) [Teng, 2002]. Мы показали, что вскармливание крыс и мышей молоком с добавкой апо-ЛФ человека вызывает стабилизацию HIF-1 α во всех изученных нами органах (см. Таблицу 1). При введении ЛФ беременным и лактирующим самкам крыс мы обнаружили индукцию синтеза ЭПО в плацентах самок и в органах потомства (рис. 15, 16), находившихся на вскармливании у самок, получавших ЛФ внутрибрюшинного либо *per os*. Возможно, что и при грудном вскармливании апо-ЛФ вызывает стабилизацию HIF-1 α и такая симуляция «гипоксического» прекондиционирования обеспечивает часть ростовых и протективных свойств ЛФ для грудных детей.

Апо-ЛФ эффективнее купировал как постгеморрагическую (Рис. 9 и 10), так и гемолитическую (Рис. 11 и 12) анемию у Ag-крыс. Это согласуется с его способностью к пролонгированной стабилизации HIF-1 α , HIF-2 α у Ag-крыс (Рис. 13) и выраженному увеличению концентрации ЭПО в сыворотке Ag-крыс по сравнению с контрольными (Рис. 14). Учитывая, что активный ЦП, способствующий насыщению ЛФ железом [Соколов и соавт., 2005] и образующий с ним комплекс *in vivo* [Sokolov *et al.*, 2014], препятствовал пролонгированной стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α , можно предложить обобщенную схему взаимного влияния ЛФ и ЦП *in vivo* (Рис. 19). После внутрибрюшинного введения крысам апо-ЛФ взаимодействует с ЦП, который способствует насыщению апо-ЛФ ионами железа, насыщенный железом ЛФ быстро выводится из кровяного русла, снижает концентрацию железа в плазме крови, что приводит к снижению пула лабильного железа в клетках, снижению активности железо-зависимых гидроксилаз, стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α с последующей индукцией синтеза ЭПО и ЦП (Рис. 19, 1). В случае введения апо-ЛФ Ag-крысам из-за отсутствия ферроксидазной активности ЦП не происходит эффективного насыщения ЛФ ионами железа, он проникает в клетки преимущественно в апо-форме, что приводит к более выраженному снижению пула лабильного железа в клетках, снижению активности железо-зависимых гидроксилаз, пролонгированной стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α с последующей длительной индукцией синтеза ЭПО (Рис. 19, 2). Тот факт, что введение активного ЦП вместе с апо-ЛФ сокращает время стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α у Ag-крыс, свидетельствует в пользу регуляции ферроксидазной активностью ЦП защитных свойств апо-ЛФ по механизму отрицательной обратной связи.

Для DFO в настоящее время обнаружены кардио- и нейропротективные свойства [Dendorfer *et al.*, 2005, Salvador *et al.*, 2010]. Принимая во внимание большое сходство в свойствах апо-ЛФ и DFO, с учётом их способности стабилизировать HIF-1 α , следует ожидать в ближайшее время нового взгляда на терапию ЛФ кардио- и нейродегенеративных заболеваний.

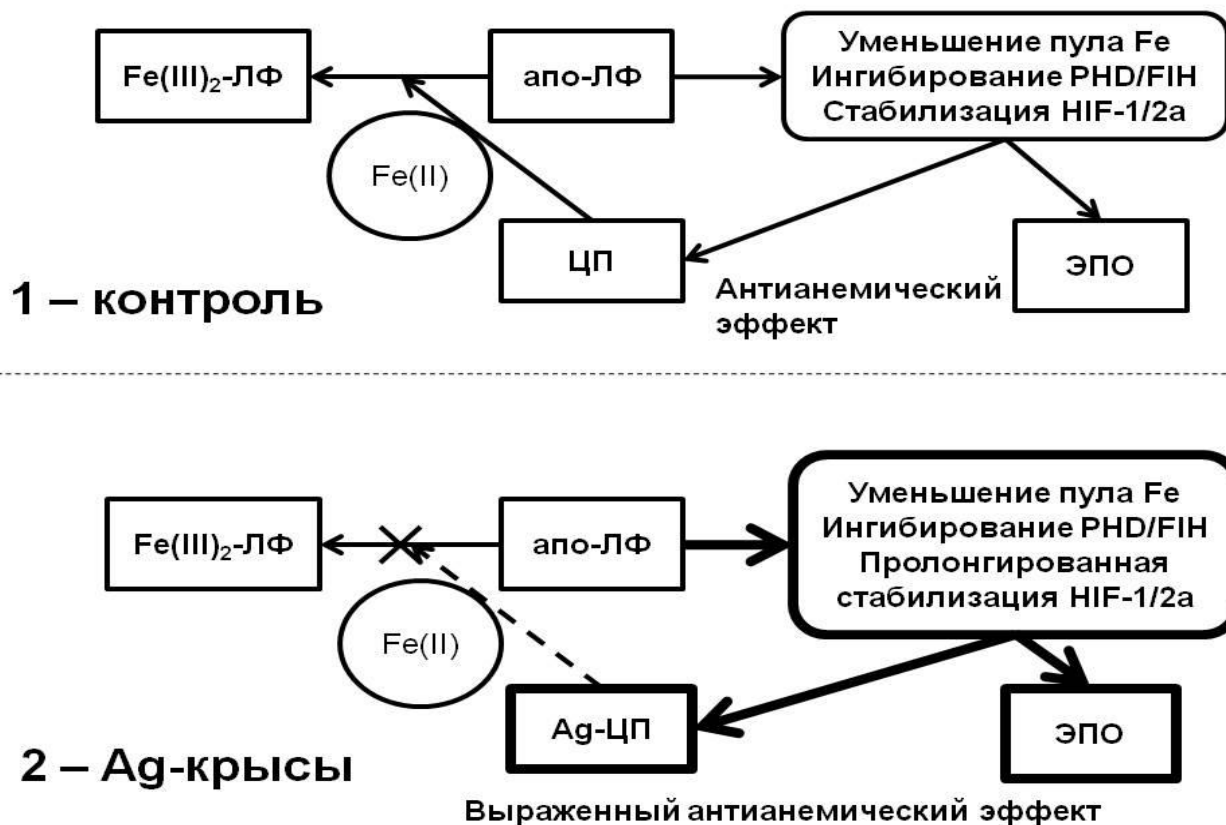


Рис. 19. Схема церулоплазмин(ЦП)-зависимой регуляции защитных свойств апо-ЛФ у контрольных (1) и Ag-крыс (2).

ВЫВОДЫ

1. Апо-форма лактоферрина человека и коровы, но не насыщенный железом лактоферрин, проявляет антигипоксическую активность при введении низкоустойчивым к гипоксии мышам за сутки до тестирования в модели острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

2. При экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс апо-форма лактоферрина, но не насыщенный железом лактоферрин, оказывает антианемическое действие.

3. Апо-форма лактоферрина вызывает стабилизацию гипоксия-индуцибельных факторов 1-альфа и 2-альфа, увеличение синтеза эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышей и крыс при внутрибрюшинном, *per os* и интраназальном введении.

4. Дефицит ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс усиливает антианемическую активность апо-лактоферрина.

5. Введение апо-лактоферрина лактирующим крысам увеличивает стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессию их генов-мишеней у потомства, однако у беременных грызунов HIF-сигнальная система после введения апо-ЛФ активируется в плаценте, но не у эмбрионов.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Влияние лактоферрина на последствия острой геморрагической анемии у крыс / М.О. Пулина, А.В. Соколов, **В.А. Костевич** и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 148. – С. 180–184.

2. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha / Е.Т. Zakharova, **V.A. Kostevich**, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev // *Biometals*. – 2012. – Vol. 25, № 6. – P. 1247–1259.

3. Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet / **V.A. Kostevich**, A.V. Sokolov, S.O. Kozlov et al. // *Biometals*. – 2016. – Vol. 29, № 4. – P. 691–704.

Статьи в рецензируемых журналах:

4. **Костевич, В.А.** Регуляция церулоплазмином антигипоксической активности апо-лактоферрина на модели крыс, получавших диету с хлоридом серебра / **В.А. Костевич**, А.В. Соколов // *Медицинский Академический Журнал*. – 2012. – Т. 12, вып. 3. – С. 72–73.

5. Анализ содержания и насыщенности железом и медью лактоферрина в молоке у женщин с первого дня и до 5 лет лактации / **В.А. Костевич**, А.В. Соколов, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // *Медицинский Академический Журнал*. – 2014. – Т. 14. – С. 80–86.

Патент:

6. Применение апо-формы лактоферрина человека в качестве антигипоксанта и стабилизатора гипоксия-индуцибельного фактора-1 альфа: пат. 2465004 Рос. Федерация: МПК А 61 К 38/40, А 61 Р 39/00 / Захарова Е.Т., **Костевич В.А.**, Соколов А.В., Васильев В.Б.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НИИЭМ" СЗО РАМН. – N 2011109165/15, заявл. 11.03.11; опубл. 27.10.12, Бюл. N 30.

Тезисы конференций:

7. Apo-lactoferrin-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1 alpha in realization of anti-hypoxic and anti-anemic effects in rats and mice / A. Sokolov, **V. Kostevich**, E. Zakharova, V. Vasilyev // Xth International Conference on Lactoferrin Structure, Function and Application (May 8–12, 2011, Mazatlan, Mexico). – P. 82.

8. Two iron chelators, desferal and human apo-lactoferrin – insight into neuroprotective properties / V. Vasilyev, V. Kostevich, E. Zakharova et al. // XIth International Conference on Lactoferrin Structure, Function and Applications (6-10 October 2013, Rome, Italy). – 2013. – P. 84.

9. Prolongation of protective features of apo-lactoferrin in rodents kept on a diet containig silver chloride / **V.A. Kostevich**, E.T. Zakharova, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev // XIth International Conference on Lactoferrin Structure, Function and Applications (6-10 October 2013, Rome, Italy). – 2013. – P. 86.

10. Роль взаимодействия церулоплазмينا и лактоферрина в регуляции стабилизации гипоксия-индуцибельных факторов-1/2-альфа / **В.А. Костевич**, А.В. Соколов, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // X юбилейная международная конференция «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (1-10 октября 2014 г., Пицунда, Абхазия). – 2014. – С. 28.

11. Взаимодействие лактоферрина и церулоплазмينا регулирует индукцию гипоксия-индуцибельных факторов-1/2 альфа / **В.А. Костевич**, А.В. Соколов, А.Ю. Власенко и др. // VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные направления биохимии человека» (3-5 декабря 2015 г., Санкт-Петербург). – 2015. – С. 19–20.

12. Апо-форма лактоферрина вызывает стабилизацию гипоксия-индуцибельных факторов-1/2 альфа и Nrf2 / **В.А. Костевич**, А.В. Соколов, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // Международная научная конференция. Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем (28-30 июня 2016 г., Минск, Беларусь). – 2016. – С.309–310.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ag-крысы – крысы, содержащиеся на диете с хлоридом серебра	pVHL – белок фонХиппель–Линдау
COX2 – циклооксигеназа 2	SDS – додецилсульфат натрия
DEAE – диэтиламиноэтил	TGF- β 1 – трансформирующий ростовой фактор β 1
DFO – дефероксамин, десферал	TBS –150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl буфер, pH 7,4
Fe ₂ -ЛФ – насыщенный ионами железа лактоферрин	Tris – трис-(оксиметил)-аминометан
Fe ₂ -ТФ – насыщенный ионами железа трансферрин	VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
FIN-1 (factor inhibiting HIF-1 α) – аспарагин-гидроксилаза HIF-1 α	Ub - убиквитин
HIF – гипоксия-индуцибельный фактор	апо-ЛФ – апо-форма лактоферрина
HRE – гипоксия-респонсивный элемент	апо-ТФ – апо-форма трансферрина
IL-1 β – интерлейкин-1 β	АФК – активные формы кислорода
Ka – константа связывания	гипоР-pRb – гипофосфорилированный белок ретинобластомы
МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы	ЛФ – лактоферрин
NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би»	ПААГ – полиакриламидный гель
o-DA – орто-дианизидин	ТФ – трансферрин
p300 – активатор транскрипции (300 кДа)	ЦП – церулоплазмин
p53 – опухолевый супрессор (53 кДа)	ЧСА – альбумин сыворотки крови человека
PBS – 150 мМ NaCl, 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4	ЭПО – эритропоэтин
PHD1-3 (prolyl hydroxylase domain proteins) – пролил-гидроксилазы 1-3	ЭФ – электрофорез
p-PD–пара-фенилендиамина дигидрохлорид	
pRb – белок ретинобластомы	