

*На правах рукописи*

**ЕЛИЗАРОВА**  
**Анна Юрьевна**

**КОМПЛЕКС ЛАКТОФЕРРИНА С ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ: ПЛАТФОРМА  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.4. – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины», Отделе молекулярной генетики.

**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 лабораторией.

**Самойлович Марина Платоновна** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория гибридной технологии, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.158.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ») по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 73/75.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте <https://iemspsb.ru/external/elizarova-aj/>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

**Мухин Валерий Николаевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Во всем мире онкологические заболевания остаются одной из наиболее частых причин смерти, несмотря на открытие и разработку эффективных методов лечения и стратегий диагностики рака. Ежегодно в мире злокачественные новообразования (ЗНО) диагностируются более чем у 14 миллионов человек, и продолжается тенденция к росту заболеваемости и смертности, вызванной раком (Ferlay et al., 2015). По данным International Agency for Research on Cancer, в 2020 году зарегистрировано около 19,3 миллионов новых случаев заболевания раком, из которых больше половины (почти 10 миллионов) закончились летальным исходом (Ferlay et al., 2020). Эти цифры растут с каждым годом и во многом обусловлены как проблемами профилактики, отсутствия единой системы ранней диагностики и скрининга рака, так и несовершенством существующих методов противоопухолевой терапии. В Российской Федерации в последние годы смертность населения от ЗНО занимает второе место после смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Современная терапия онкологических заболеваний основана на трех основных методах лечения: хирургии, лучевой терапии и лекарственном лечении, которое включает химиотерапию и ряд новых подходов. Однако перечисленные методы далеко не всегда дают положительные эффекты, приводящие к излечению; кроме того, данные способы лечения имеют серьезные побочные эффекты, а некоторые из них эффективны только на ранних стадиях заболевания и обладают лишь локальным воздействием на опухоль. Лечение рака методом химиотерапии широко применяется, но имеет серьезные ограничения вследствие применения токсичных компонентов, которые зачастую разрушают большинство метаболически активных нормальных клеток и подавляют иммунитет, подвергая онкологических больных риску вторичных инфекций.

Важнейшая причина, по которой раковые клетки очень сложно уничтожить – высокая скорость их роста, к тому же даже небольшая опухоль на определенной стадии развития способна давать метастазы в отдаленные органы и ткани. Именно поэтому обнаружение новых экспериментальных соединений, которые специфически убивают раковые клетки, но при этом не оказывают весомого влияния на нормальные клетки, является актуальной задачей. В связи с этим в настоящее время во всем мире остро стоят задачи по разработке новых адресных, высокоэффективных и низкотоксичных методов терапии онкологических заболеваний, которые к тому же не приводят к развитию множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Одним из наиболее перспективных направлений является поиск природных молекул, способных при контакте с клетками опухоли вызвать их гибель или, по крайней мере, остановку роста. При этом по-настоящему эффективными считаются комбинации двух и более молекул, в норме встречающихся в организме человека. В настоящее время известен целый ряд белков природного происхождения, обладающих селективной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам.

Известно, что лактоферрин (LF) – белок молока и других секретов, а также нейтрофильных лейкоцитов, в экспериментах на культурах клеток и на животных способен подавлять рост опухолевых клеток (Tsuda et al., 2010; Zhang et al., 2014; Iglesias-Figueroa et al., 2019). Среди механизмов этого явления называют стимулирующее действие LF на иммунную систему и увеличение числа апоптозных клеток, вероятно, из-за способности LF останавливать клеточное деление в фазах G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. Природные продукты и биоактивные

молекулы, в их числе LF,  $\alpha$ -лактальбумин,  $\beta$ -лактоглобулин, имеют серьёзные преимущества как потенциальные лекарства в силу их относительной доступности и высокого содержания в молоке, отсутствии иммунного конфликта и возможности перорального применения. Изучение противоопухолевых свойств LF и его производных – весьма своевременная задача, особенно в свете сведений о способности неэстерифицированной олеиновой кислоты (ОА), образовав комплекс с LF коровы, вызывать гибель раковых клеток (Fang et al., 2014). Было известно, что LF может мобилизовать жирные кислоты (ЖК) из депо и, вероятно, усиливать распад триглицеридов *in vivo* (Morishita et al., 2013). Среди многих жирных кислот ОА проявляет весьма высокую цитотоксичность. К настоящему моменту практически ничего не известно о механизме или механизмах её токсического действия в комплексе с LF.

**Степень разработанности темы исследования.** Одним из перспективных направлений исследований в области онкологии является поиск малотоксичных и высокоэффективных веществ биологического происхождения – белков, которые способны избирательно убивать опухолевые клетки, не оказывая нежелательных побочных эффектов (Teixeira et al., 2019). Различные комплексы «белок/жирная кислота» на протяжении последних лет рассматривают как мощное оружие, способное как предотвращать, так и лечить рак, а также потенцировать действие традиционной клинической терапии. К наиболее изученным комплексам относят HAMLET и BAMLET, многочисленное исследование которых демонстрирует ярко выраженный противоопухолевый эффект в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также в клинических исследованиях (Rath et al., 2015). Противоопухолевый потенциал комплекса «лактоферрин/олеиновая кислота» (LF/OA) изучен недостаточно, и работ по его исследованию в качестве потенциального лекарственного средства в отечественной и зарубежной литературе практически нет. Что касается собственно LF, то его фармакологические эффекты достаточно широки. К тому же LF демонстрирует высокую биодоступность, высокую селективность по отношению к раковым клеткам и отсутствие значимых побочных эффектов, а его действие нацелено на широкий спектр молекулярных мишеней, контролирующих пролиферацию опухолевых клеток, выживание, миграцию, инвазию и метастазирование (Cutone et al., 2020). LF рассматривается также в качестве потенциальной системы доставки лекарств к опухоли и является перспективным носителем для химиопрепаратов, что представляется эффективным инструментом для химиотерапии (Kondapi, 2020; Elzoghby et al., 2020; Sabra and Agwa, 2020; Agwa and Sabra, 2021). Среди многих жирных кислот ОА проявляет весьма высокую цитотоксичность. Исследования на животных и клеточных линиях доказывают, что ОА обладает антиканцерогенной активностью и ее можно рассматривать в роли противоопухолевого агента (Carrillo et al., 2012). Все это послужило основанием для проведения исследования по созданию комплекса LF/OA и изучению его возможных противоопухолевых и антибактериальных активностей.

**Цель исследования.** Исследовать формирование комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой и его цитотоксические свойства *in vitro* и *in vivo*.

**Задачи.** Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить эффективность взаимодействия лактоферрина человека с различными жирными кислотами и проанализировать изменение физико-химических свойств лактоферрина в комплексе с олеиновой кислотой.

2. В опытах *in vitro* сравнить цитотоксичность лактоферрина человека и его комплекса с олеиновой кислотой на культуре опухолевых клеток.
3. Изучить влияние комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой на нетрансформированные клетки крови.
4. В опытах на лабораторных животных сравнить цитотоксичность лактоферрина человека и его комплекса с олеиновой кислотой.
5. Сравнить антибактериальную активность лактоферрина человека и его комплекса с олеиновой кислотой.
6. Оценить влияние парентерального (подкожного) введения комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой на выживаемость мышей с гепатомой 22a и на рост опухоли.

**Научная новизна.** В рамках данного исследования был использован новый подход к получению комплекса LF с ОА, реализованный путем простого смешивания белка с этанольным раствором ЖК в присутствии 2 % этанола при комнатной температуре. Впервые было показано образование комплекса между насыщенной железом формой LF и ОА, а также проанализирована зависимость противоопухолевого эффекта от степени насыщения белка железом. Впервые было проведено прямое сравнение противоопухолевых свойств комплексов с ОА рекомбинантного лактоферрина человека и лактоферрина, выделенного из молока коровы. В результате проведенных исследований впервые показано образование комплекса между LF/8ОА и белком церулоплазмином (СР), а также установлено, что присутствие СР в среде защищает нормальные клетки от цитотоксического эффекта LF/8ОА. Продемонстрировано, что комплекс апо-формы LF с ОА обладает значимым противоопухолевым эффектом при парентеральном введении мышам с подкожно перевитыми опухолями.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания новых малотоксичных противоопухолевых комплексов. Полученные данные расширяют представление о противоопухолевой активности комплексов «белок/жирная кислота» и являются предпосылкой для более детального изучения свойств и механизмов комплексов на основе лактоферрина. Предлагаемый в работе метод получения комплекса между белком и жирной кислотой в этанольном растворе облегчает процесс комплексообразования, может быть легко модифицирован и масштабирован в соответствии с поставленными задачами (использование других белков или ЖК, изменение коэффициентов стехиометрии). Данный задел можно использовать для обоснования дальнейшей разработки подобных онкотоксических комплексов.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой данного исследования явились работы отечественных и зарубежных ученых, посвященные получению комплексов белков молока с ЖК и изучению их действия на опухолевые и нормальные клетки. В работе были использованы различные современные биохимические и иммунохимические методы, выбор которых определялся поставленными задачами (метод проточной цитометрии, поверхностный плазмонный резонанс, спектроскопия кругового

дихроизма, флуоресцентная спектроскопия). Объектом изучения являлся комплекс рекомбинантного лактоферрина человека с олеиновой кислотой. Исследование проводилось на различных модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Апоптоз клеток выявляли методом горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле и методом проточной цитометрии. Противоопухолевого действия *in vivo* была изучена на мышах линии СЗНА с перевитой гепатомой 22а (Н22а). Влияние комплекса LF/OA на клеточное дыхание *E. coli* оценивалось с помощью резазурин-теста. Для очистки и иммунохимической детекции белков, анализа образования комплекса между белком и олеиновой кислотой, изучения его свойств и цитотоксической активности было использовано более 20 методов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Биологические свойства лактоферрина человека в отношении клеток изменяются при добавлении к белку олеиновой кислоты в соотношении 8 моль на 1 моль белка.
2. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой *in vitro* обладает цитотоксичностью в отношении клеток мышинной гепатомы 22а, HL-60 и Jurkat, индуцируя апоптоз, и проявляет антибактериальную активность в отношении *E. coli*.
3. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой при концентрации выше 8 мкМ LF инициирует гемолиз. Однако присутствие церулоплазмينا в среде предотвращает лизис эритроцитов.
4. При системном (парентеральном) введении мышам в дозе 250 мг на кг комплекс лактоферрина с олеиновой кислотой тормозит рост опухолей. Длительное ежедневное применение не оказывает токсического воздействия на организм лабораторных мышей.
5. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой существенно отдалял наступление гибели мышей, вызванной ростом гепатомы, в сравнении с группами контроля и лактоферрина *per se*.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Результаты получены с помощью современных методов исследования. Достоверность данных подтверждена их воспроизводимостью при проведении нескольких (как минимум трех) повторений, а также корректной статистической обработкой. Результаты работы были представлены на 11 симпозиумах и конференциях в виде устных и постерных докладов: V Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2015); Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, Беларусь, 2015); Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА (Москва, 2016), Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Беларусь, 2016); International Biometals Symposium «BioMetals» (Дрезден, Германия, 2016); III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016); XX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017); VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича

Овчинникова» (Москва, 2017); International Conference «Lactoferrin: Structure, Functions & Applications» (Рим, Италия, 2017); Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019); International Conference «Lactoferrin: Structure, Functions & Applications» (Лима, Перу, 2019).

**Публикации.** По теме диссертационной работы было опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, 2 из которых — статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 — в журналах, входящих в международные базы Scopus и Web of Science, 13 тезисов в сборниках научных трудов по материалам конференций.

**Личный вклад соискателя.** Автор непосредственно участвовал в проведении всех основных этапов диссертационного исследования: планировании экспериментов, проведении экспериментальной части работы, статистической обработке полученных данных и их интерпретации, обосновании выводов. Автором проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Отдельные этапы исследований проводились при непосредственном участии диссертанта в соавторстве с сотрудниками Отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ» д.б.н. Киселевой Е.П., к.б.н. Кудрявцевым И.В., к.б.н. Стариковой Э.А., Зеленским Е.А., Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» Грудининой Н.А и Егоровым В.В. Спектроскопия кругового дихроизма и флуоресцентная спектроскопия были проведены под руководством проф. Винченцо Де Филипписа, Падуанский университет, г. Падуа (Италия). Подготовка основных публикаций по теме диссертационной работы проводилась совместно с научным руководителем д.б.н. Соколовым А.В. и соавторами работ.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 216 страницах, содержит 16 таблиц и 51 рисунок и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы, включающий 362 источника, из них 28 — отечественных.

**Финансовая поддержка и благодарности.** Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук: МК-5074.2016.4, МД-5133.2018.4 и МД-1901.2020.4.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использовались следующие материалы: хроматографические сорбенты («BioRad», «Pharmacia», «Serva»), реактивы для электрофореза («BioRad», «Serva», «Sigma», «Panreac-AppliChem», «Лаборатория МЕДИГЕН»), неорганические основания, соли и кислоты («Ampresco», «Merck», «Panreac-AppliChem», «ВЕКТОН», «РЕАХИМ», «ХЕЛИКОН»), органические реактивы и ферменты («Biomedical», «Sigma», «Serva», «Лаборатория МЕДИГЕН»). Для приготовления растворов использовали апирогенную

деионизированную воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм×см (Медиана-Фильтр, Россия).

**Экспериментальные животные.** В работе использовали 64 мышей-самцов линии СЗНА весом 16–28 г (питомник «Рапполово», РАМН, Санкт-Петербург). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

**Клеточные культуры.** В качестве объектов исследований *in vitro* были использованы клетки промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60), мышинной гепатомы 22а (H22a) и клетки линии Jurkat клон Е6-1 (Т лимфоциты человека), полученные из коллекции клеточных культур ФГБНУ Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

**Лактоферрин коровы** выделяли из биологически-активной добавки («Jarrow formulas», США) с помощью фракционирования сульфатом аммония (насыщение до 80 %) и последующей ионообменной хроматографии на UNOsphere S.

**Лактоферрин из грудного молока** был получен с помощью ионообменной хроматографии на CM-Sephadex C-50 и гель-фильтрации на Sephacryl S-200 HR.

**Насыщенный железом лактоферрин** получали добавлением 200 мкМ FeCl<sub>3</sub> к 50 мкМ апо-формы LF в 100 мМ Na-цитрат-гидрокарбонатном буфере, pH 8,0. Избыток железа удаляли с помощью диализа.

**Мономерный препарат церулоплазмينا (CP)** был получен из плазмы крови человека с помощью ионообменной хроматографии на UNOsphere Q и аффинной хроматографии на неомицин-агарозе.

**Комплекс лактоферрина с олеиновой кислотой (ОА)** получали методом простого смешивания (Elizarova et al., 2019). LF растворяли в PBS и добавляли к белку ОА, растворенную в этаноле (8 мольных избытков). После каждой добавки ОА раствор тщательно перемешивали в течение 30 секунд на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (2400 об/мин; «BioSan», Латвия). Процедуру перемешивания для каждой добавки повторяли трижды с интервалом в 1 минуту при комнатной температуре. Избыток спирта удалялся при диализе в течение ночи при +4 °С против раствора PBS и последующей фильтрацией через фильтрующие насадки Syringe Filter с диаметрами пор 0,45 мкм. Для длительного хранения комплексы замораживали и хранили при температуре -20 °С. Для получения комплексов других белков с ОА и комплексов LF с различными жирными кислотами (ЖК) использовали данный протокол.

**Анализ стехиометрии комплексов лактоферрина с олеиновой кислотой** осуществляли колориметрическим ферментативным методом с использованием коммерческого набора реагентов: NEFA («Randox», Великобритания). Измерения были проведены согласно инструкции производителя.

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



**Спектры кругового дихроизма** в ближней (250–360 нм) и дальней (190–250 нм) УФ-областях снимали на КД-спектрометре Jasco J-810 («Jasco», Япония) при 20 °С в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм (дальний-УФ) и 10 мм (ближний-УФ).

**Спектры флуоресценции** регистрировали на спектрофлуориметре Jasco FP-6500 («Jasco», Япония) с термостатом при 25 °С в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**Размеры частиц определяли** при помощи метода динамического светорассеяния на лазерном анализаторе Zetasizer Nano S (Malvern, Великобритания) в одноразовых прозрачных кюветах из полистирола с длиной оптического пути 10 мм.

**Изучение белок-белковых взаимодействий осуществляли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР)** на приборе Biacore X100 («GE-Healthcare», UK) с использованием стандартного чипа CM5 (карбоксиметил-декстрановый чип) с иммобилизованным СР человека. Для оценки аффинности возрастающие концентрации ананта – LF (LF/80A) инъецировали над покрытым СР чипом.

**Электрофоретические методы.** Для определения молекулярной массы и степени чистоты белков использовали электрофорез в ПААГ в щелочной системе (375 мМ Tris-HCl буфер, pH 8,9 (Davis, 1964)), в высокомолярной Tris-буферной системе в присутствии SDS – 750 мМ Tris-HCl буфер, pH 8,9 (Fling and Gregerson, 1986). Окрашивание гелей проводили с помощью красителя Кумасси бриллиантовый синий R-250. Для выявления специфической оксидазной активности СР гели окрашивали раствором о-дианизидина (Owen and Smith, 1961). Электрофорез ДНК проводили в геле 1 % агарозы в Tris-боратном буфере (44,5 мМ Tris, 44,5 мМ борная кислота, pH 8.0; 1 мМ ЭДТА) (Маниатис и соавт., 1984).

**Эритроциты выделяли** из цитратной крови здоровых доноров после трёх циклов отмывки клеток от плазмы раствором PBS и последующим центрифугированием (1000 g, 10 мин).

**Выделение нейтрофилов.** Нейтрофилы (НФ) выделяли из свежесобранной донорской крови путем центрифугирования с использованием декстрана Т-70 и гистобака-1077. Полученный осадок НФ отмывали PBS, содержащим 2 мг/мл D-глюкозы, и хранили при 4 °С в течение нескольких часов. Все эксперименты с НФ проводили непосредственно в день отбора крови и проведения эксперимента.

**Гемолиз эритроцитов** оценивали после часовой инкубации эритроцитов с тестируемыми белковыми агентами (37 °С) с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) по  $A_{412}$  в надосадочной жидкости.

**Анализ влияния исследуемых препаратов на нейтрофилы** определяли по выходу миелопероксидазы (МПО) из клеток. К суспензии нейтрофилов ( $3 \times 10^5$  клеток/лунка) в PBS, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы, добавляли различные концентрации исследуемых белковых препаратов и инкубировали в течение часа при 300 об/мин и 37 °С с использованием термошейкера PST-60HL-4 («Biosan», Латвия). После планшет центрифугировали 5 мин при 1500 g и в надосадочной жидкости определяли концентрацию МПО твердофазным иммуноферментным анализом, методом «сэндвича» с использованием моноклональных антител против МПО (клон МРО18) и моноклональных антител, меченных пероксидазой хрена (клон 2F7).

**Оценку жизнеспособности клеток H22a** проводили с помощью витального окрашивания метиленовым синим.

**Апоптоз и некроз** клеток Jurkat и HL-60 после инкубации с тестируемыми агентами оценивали с помощью окрашивания ДНК-связывающими красителями: YO-PRO (100 нМ) и пропилий йодидом (3 нМ) с подсчетом клеток с помощью проточного цитофлуориметра Navios («Beckman Coulter», США).

**Геномную ДНК получали** методом хлороформ-изоамиловой экстракции (24:1 v/v). Концентрацию и качество ДНК определяли спектрофотометрически с помощью прибора Nanodrop 2000c («Thermo Scientific», США).

**Антимикробное действие** тестируемых препаратов в отношении штамма *E.coli* DH5α оценивали по их эффекту на метаболическую активность бактерий с помощью флуоресцентного маркера резазурина спектрофотометрическим методом.

**Изучение острой и отсроченной токсичности.** Острую и отсроченную токсичность определяли на 34 мышах-самцах СЗНА весом 18–28 г по 17 особей в группе. Исследуемый комплекс вводили мышам опытной группы однократно внутрибрюшинно с помощью стерильных шприцев и игл (0,45×12 мм) в дозе 2000 мг/кг. В качестве контрольного агента использовали физиологический раствор, который вводили в равном белковому раствору объеме. Общая продолжительность наблюдения составляла 14 суток с момента введения препаратов для изучения отсроченных проявлений токсических эффектов.

**Изучение противоопухолевой активности.** Противоопухолевую активность белковых препаратов изучали на 30 мышах-самцах линии СЗНА весом 16–26 г. Для солидного роста опухоли клетки гепатомы 22a прививали мышам под кожу в область спины в количестве  $2 \times 10^5$  клеток на мышь в объеме 0,25 мл питательной среды. Все животные в количестве 30 особей были разделены на три опытные группы: первой (контрольной) группе животных вводили PBS, второй – рекомбинантный лактоферрин человека в дозе 5 мг на мышь (250 мг/кг) и третья группа получала аналогичную дозу комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой. Все препараты вводились мышам подкожно в область спины спустя 48 часов после инокуляции опухоли. Инъекции препаратов проводили ежедневно на протяжении 24 дней. Время появления опухолей и их размер регистрировали каждые два дня. С 10 дня после перевивки опухоли у всех мышей измеряли размеры опухоли с последующим определением ее объема. Противоопухолевую активность комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой оценивали по проценту торможения роста опухоли (ТРО) и индексу роста опухоли (ИРО) (Стуков и соавт., 2000; Стуков и соавт., 2001), а также по увеличению продолжительности жизни животных (УПЖ).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку полученных результатов производили при помощи программ MS Excel 2008. Эксперименты повторяли три раза (n=3), если не указано иначе. Для выявления различий между экспериментальными группами и контролем использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для оценки выживаемости использовали метод множественных оценок Каплана–Мейера, медиану выживания и среднюю продолжительность жизни. Для выявления различий между кривыми выживаемости в группах был проведен двухвыборочный анализ с

использованием критерия Гехана-Вилкоксона. Построение графиков выполняли в программе MS Excel 2008.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Взаимодействие лактоферрина с различными жирными кислотами

В ходе настоящего исследования был разработан метод получения комплекса лактоферрина с жирными кислотами (ЖК), в частности, с олеиновой кислотой. Разработанный подход основан на процессах постепенного смешивания раствора ЖК в этаноле с белком, диализа следов этанола и фильтрации. При добавлении растворов ненасыщенных ЖК в этаноле к белку мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания ЖК с водной фазой. Чтобы выяснить, является ли образование комплекса лактоферрина специфичным для олеиновой кислоты, было проведено скрининговое исследование ряда ненасыщенных и насыщенных ЖК, различающихся по длине цепи, насыщенности и конфигурации двойной связи (ей). Показано, что ненасыщенные ЖК легко образуют комплексы с LF с различной стехиометрией, в то время как насыщенные ЖК не взаимодействуют с LF. В нашем случае титрование белка показало, что один моль LF способен связать до 8 моль ОА, до 6 моль линолевой кислоты и до 5 моль линоленовой и арахидоновой кислот в PBS при температуре 25 °С (Таблица 1).

Таблица 1 – Стехиометрия взаимодействия лактоферрина с ненасыщенными жирными кислотами

Название жирной кислоты	ЖК/LF, моль/моль
Линоленовая (18:3 $\Delta$ 9, 12, 15)	4,7
Арахидоновая (20:4 $\Delta$ 5, 8, 11, 14)	5,5
Линолевая (18:2 $\Delta$ 9, 12)	5,8
Олеиновая (18:1 $\Delta$ 9)	8,4

Учитывая, что LF проявил максимальную связывающую способность именно в отношении наиболее изученной и доступной олеиновой кислоты, то в дальнейшем именно комплекс лактоферрина с олеиновой кислотой был подробно охарактеризован. Оказалось, что комплекс LF/8ОА по данным динамического рассеяния света представляет собой систему мелких частиц со средним размером около 18 нм. Близкие значения (16 нм) были получены также методом малоуглового рассеяния нейтронов. Учитывая, что ранее в двух независимых исследованиях с помощью метода рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами размер молекулы LF был определен в пределах от 6,4–6,8 нм до 10,0–11,5 нм, то размер комплекса LF с олеиновой кислотой около 18 нм свидетельствует в пользу взаимодействия 8 молекул жирной кислоты с глобулой белка, не исключая возможности димеризации LF, но не формирования более крупного комплекса по типу белковой оболочки вокруг мицеллы из олеиновой кислоты.

### Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на лизис эритроцитов

Оценку токсичности препаратов LF и LF/8ОА в отношении зрелых неопухолевых клеток оценивали при помощи гемолитического теста по лизису эритроцитов крови

человека. На рисунке 1 можно видеть, что интактный LF в диапазоне исследуемых концентраций (2–128 мкМ) не обладает гемолитической активностью и не приводит к разрушению эритроцитов. После часовой инкубации с эритроцитами LF/80A уже в концентрации 8,5 мкМ обладал высокой гемолитической активностью и вызывал лизис 50 % эритроцитов в данных экспериментальных условиях.

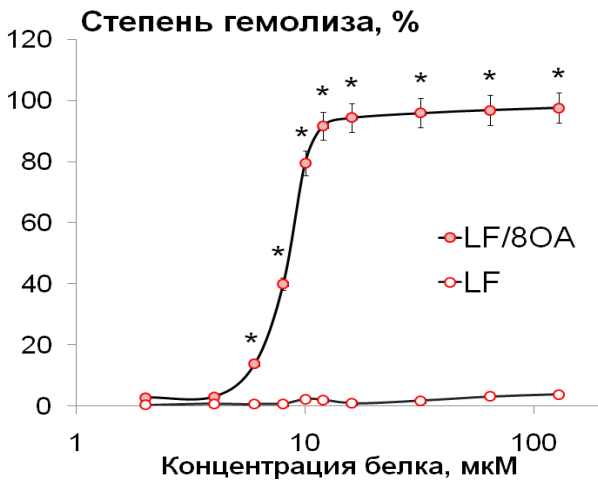


Рисунок 1 – Сравнение гемолитического эффекта комплекса LF/80A с LF. Степень гемолиза оценивали после инкубации эритроцитов человека с LF (белый маркер) и LF/80A (красный маркер) в течение 1 часа при 37 °С. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буфер, который для получения полного лизиса был заменен апиrogenной деионизированной водой. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке, \* – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольным LF.

При сравнении гемолитической активности комплексов LF с олеиновой кислотой был проведен сравнительный анализ апо-формы и холо-формы белка. Показано, что, наряду с апо-формой LF, насыщенная железом форма белка не оказывала влияния на мембрану эритроцитов. Комплекс холо-LF/80A аналогично комплексу с апо-формой белка обладал гемолитической активностью, которая возрастала с увеличением концентрации комплекса.

Клеточные культуры в экспериментах *in vitro* изолированы, и отсутствует возможность воспроизвести всю совокупность защитно-приспособительных механизмов, запускающихся в организме. Нами было показано, что церулоплазмин (СР) – белок острой фазы воспаления, являющийся антиоксидантом, нейтрализует токсический эффект апо-LF/80A. На рисунке 2 представлены данные по влиянию СР на гемолиз, индуцированный комплексом LF/80A.

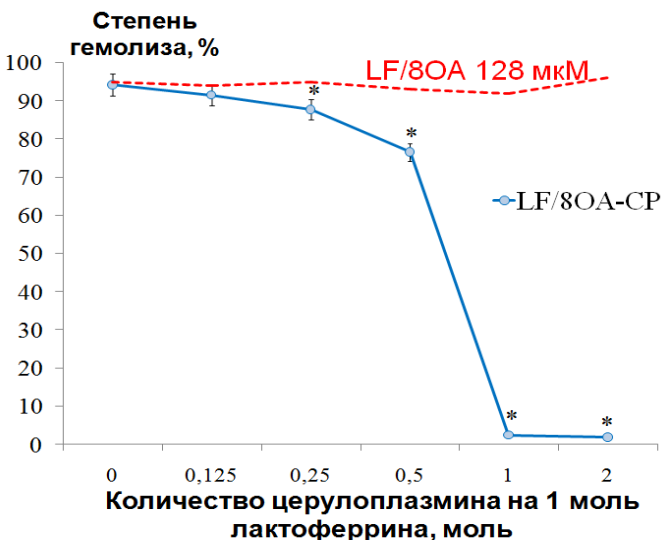


Рисунок 2 – Влияние СР на гемолитический эффект комплекса LF/80A. Концентрация LF/80A в эксперименте фиксирована и составляет 128 мкМ. Степень гемолиза оценивали после инкубации эритроцитов человека с LF/80A в присутствии различных концентраций СР в течение 1 часа при 37 °С. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке, \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по сравнению с LF/80A.

Показано, что добавление СР к комплексу LF/80A способствовало снижению гемолитического эффекта, а в соотношении 1 СР:1 LF/80A полностью ингибировало гемолиз.

### Исследование активации нейтрофилов в присутствии лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой

Комплекс LF/80A обладал провоспалительной активностью в отношении нейтрофилов человека (НФ), приводя к их активации, что выражалось в дегрануляции, которую оценивали по высвобождению из клеток миелопероксидазы (МПО). Показано, что комплекс LF/80A, начиная с концентрации 1 мкМ, способен вызывать дегрануляцию НФ в суспензии, которая увеличивается с повышением концентрации комплекса (Рисунок 3).

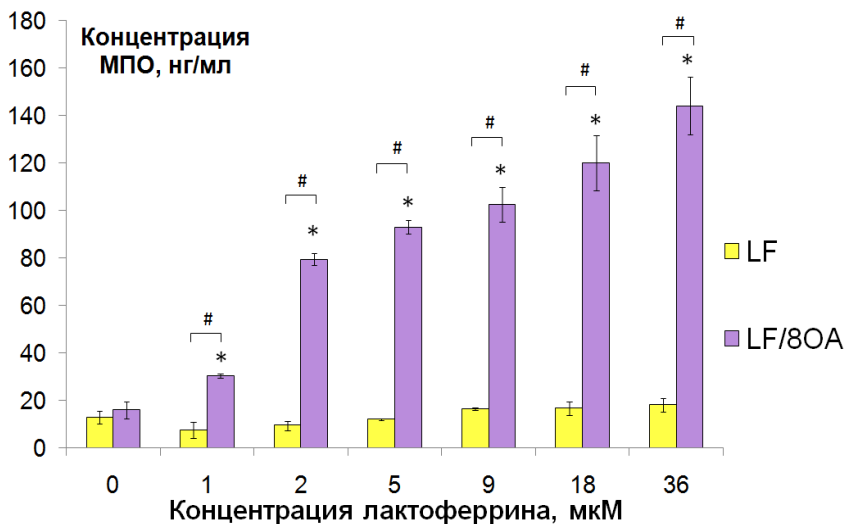


Рисунок 3 – Концентрация МПО после часовой инкубации нейтрофилов человека с LF (желтый маркер) и LF/80A (фиолетовый маркер) в различных концентрациях. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке.

\* – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению LF; # – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению со спонтанной активацией нейтрофилов.

Аналогичный защитный эффект СР мы обнаружили и в отношении нейтрофилов человека. Показано, что инкубация НФ с LF/80A в присутствии СР приводила к уменьшению высвобождения МПО из нейтрофилов в сравнении с клетками, которые инкубировались с комплексом без добавления СР. Добавление в среду СР даже в соотношении меньше 0,5 моль СР на 1 моль LF/80A приводило к ослаблению выхода МПО, что свидетельствовало о защитном эффекте СР (Рисунок 4).

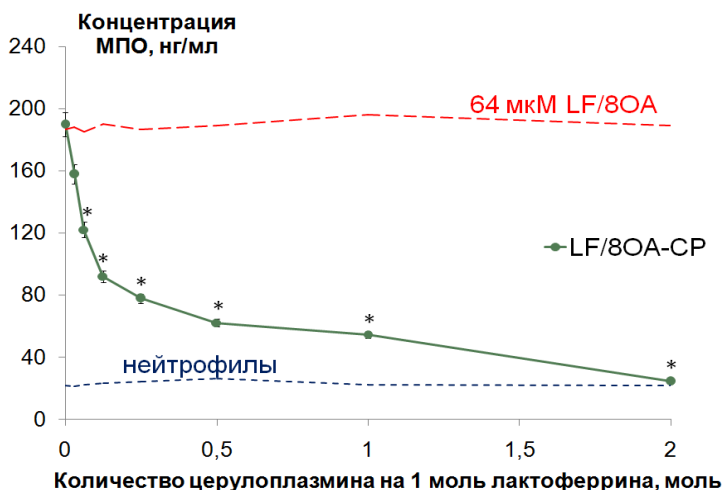


Рисунок 4 – Концентрация МПО после часовой инкубации нейтрофилов человека с 64 мкМ LF/80A в присутствии различных концентраций СР (зеленый маркер). Данные представлены в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке.

\* – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с LF/80A.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что СР защищает эритроциты от гемолитического действия LF/80А, а также препятствует дегрануляции нейтрофилов опосредованной комплексом белок-ЖК.

### **Анализ жизнеспособности клеток линии Jurkat и HL-60 методом проточной цитофлуориметрии**

Методом проточной цитофлуориметрии была проведена оценка сценария клеточной гибели (апоптоз/некроз) после культивирования клеток Jurkat и HL-60 с тестируемыми препаратами. Спустя 18 часов культивации клеток линии Jurkat с LF/80А количество опухолевых клеток на стадии раннего апоптоза достоверно возросло в сравнении с контролем. Комплексы апо-LF с меньшим содержанием ОА не демонстрировали цитотоксический эффект в условиях данного эксперимента (Рисунок 5). Основным механизмом клеточной гибели под действием LF/80А на данную культуру опухолевых клеток являлся апоптоз.

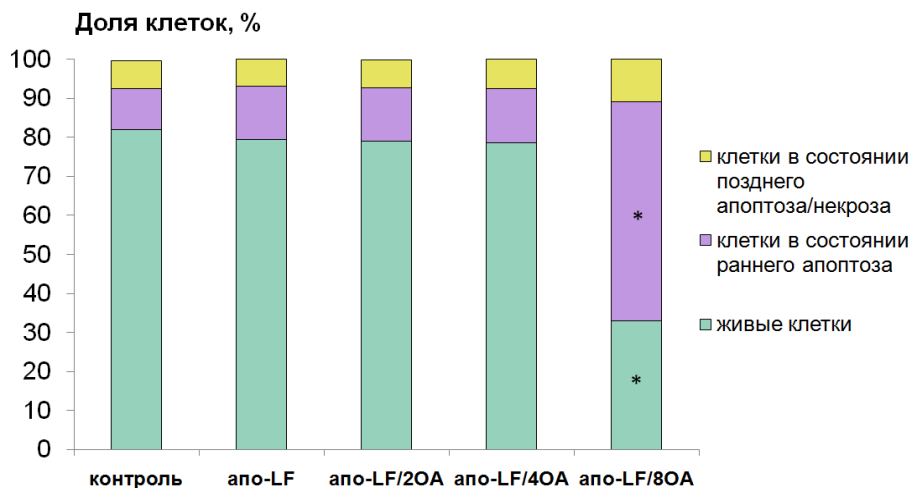


Рисунок 5 – Исследование уровня апоптоза и некроза клеток линии Jurkat после 18 часов инкубации с апо-LF и его комплексами с ОА по данным проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в % от общего числа клеток каждой группы в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке. \* – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

По результатам проточной цитофлуориметрии комплекс LF/80А, как и в случае с клетками Jurkat, вызывал апоптоз клеток линии HL-60. При сравнении влияния различных видов LF, а также его комплексов с ОА, на жизнеспособность клеток линии HL-60 не было выявлено достоверно значимых отличий. Все комплексы обладали цитотоксической активностью, в равной степени запуская процессы апоптоза и некроза в клетках HL-60.

### **Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на гибель гепатомы 22а**

С помощью окрашивания метиленовым синим, была проведена оценка жизнеспособности клеток гепатомы 22а. После 24-часовой инкубации H22a с LF, 80А и LF/80А было обнаружено, что LF/80А проявлял дозозависимую противоопухолевую активность уже при концентрации 5 мкМ, чего не наблюдалось в случае с контрольным LF и 80А в тех же концентрациях. Жизнеспособность клеток в случае инкубации с 80А и LF/80А в максимальной концентрации 25 мкМ составила 87 % и 66 %, соответственно. На рисунке 6

показано, что комплекс LF/8OA оказывал более выраженное антиканцерогенное действие на клетки гепатомы 22a в сравнении с OA и LF в условиях проведения эксперимента.

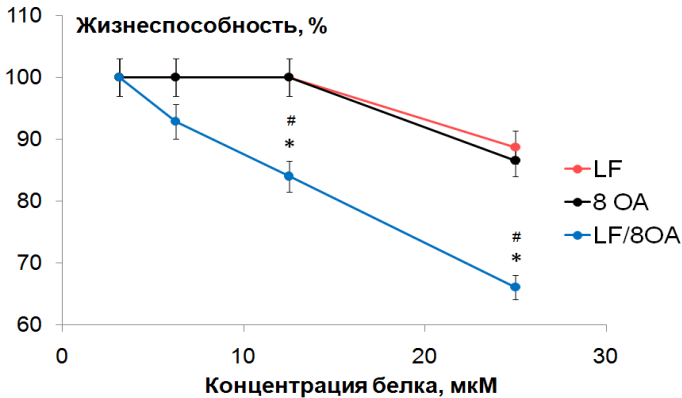


Рисунок 6 – Жизнеспособность клеток H22a после 24 часов инкубации с 3.125, 6.25, 12.5 и 25 мкМ LF (красный маркер), 8 OA (черный маркер) и LF/8OA (синий маркер). OA была растворена в ДМСО. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ ,  $n=3$  по каждой точке, \* – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с LF. # – отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 8OA.

### Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на рост гепатомы 22a у мышей

Для проведения исследования по изучению противоопухолевой эффективности комбинации LF с OA, на примере мышинной гепатомы 22a, суспензию клеток H22a подкожно инокулировали сингенным мышам линии СЗНА. В течение всего срока исследования осуществляли наблюдение за животными, включающее ежедневный осмотр и измерение линейных размеров подкожных узлов. Противоопухолевую эффективность LF и LF/8OA *in vivo* оценивали по нескольким параметрам: увеличению продолжительности жизни животных (УПЖ), проценту торможения роста опухоли (ТРО) и индексу роста опухоли (ИРО).

В течение нескольких дней после инокуляции мышам опухоли и введения препаратов не наблюдалось никаких видимых изменений ни в одной из групп. К 8-му дню после подкожного введения мышам суспензии клеток H22a в области инъекции формировались видимые, хорошо пальпируемые опухолевые узлы объемом 60–120мм<sup>3</sup>. Время появления первых опухолевых узлов во всех трех группах достоверно не различалось (8-й день). Однако следует отметить, что в группе мышей, получавших лечение LF/8OA, наблюдалась некоторая тенденция к задержке появления первых узлов по сравнению с другими группами (10-ый день). У большинства животных постепенно развивалась обнаруживаемая подкожная солидная опухоль. Измерение объема опухолей у мышей в опыте регистрировали до момента гибели животных.

Для оценки динамики роста H22a использовали кинетические кривые роста опухолей (Рисунок 7). Как видно из графика, начиная с 10-го дня, объемы опухоли у мышей, получавших физиологический раствор и 5 мг LF (250 мг/кг), быстро увеличивались. Однократное ежедневное введение комплекса LF/8OA в дозе 5 мг на мыш (250 мг/кг) приводило к торможению роста на всех сроках наблюдения, а в некоторых случаях к полному рассасыванию опухолевых узлов. При введении мышам LF без добавления OA в дозе 5 мг на мыш (250 мг/кг) аналогичного ингибирующего эффекта не наблюдалось: наоборот, было показано, что подкожное введение LF в таких дозах приводит к быстрому росту опухолей.

К 24-м суткам, на момент завершения лечения мышей тестируемыми препаратами, средний объем опухоли у мышей, получавших LF/8OA, медленно увеличился и составлял 860 мм<sup>3</sup>, в то время как среднее значение объемов опухоли у мышей, получавших PBS,

быстро увеличивалось и достигало 5400 мм<sup>3</sup>. В группе мышей, получавших LF, активность препарата была сходной с группой контроля: средний объем опухоли в группе составил 4500 мм<sup>3</sup>. Оценка динамики роста опухолевых узлов показала, что объемы подкожных опухолей в группе с воздействием LF/8OA были достоверно меньше в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,01$ ), а также с LF группой ( $p < 0,01$ ) на протяжении всего срока эксперимента, начиная с 12-го дня. Статистически значимых различий между группой LF и контролем обнаружено не было.

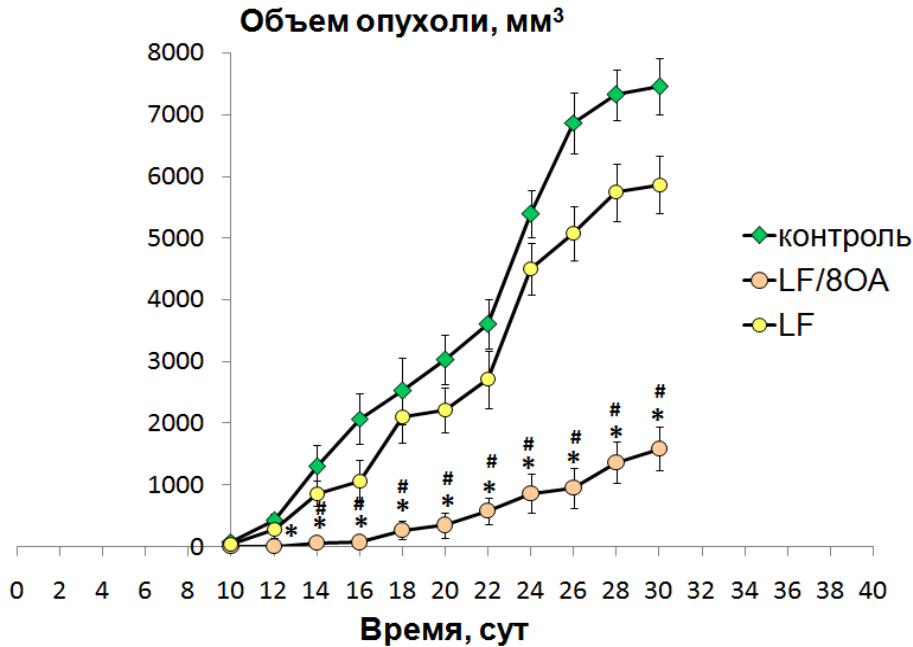


Рисунок 7 – Динамика роста опухолей у мышей линии СЗНА, после трансплантации  $2 \times 10^5$  H22a и введения исследуемых препаратов. Графики представляют собой средние объемы опухолей у мышей из контрольной (зеленый маркер), обработанной LF (желтый маркер) и LF/8 OA (оранжевый маркер) групп. Инъекции препаратов (250 мг/кг) проводили ежедневно на протяжении 24 дней. Контрольная группа мышей получала PBS. С 10-го дня после перевивки опухоли у всех мышей измеряли размеры опухоли с определением объема. Статистический анализ объемов опухолей между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. \* ( $p < 0,01$ ) – достоверные различия между экспериментальной группой и контрольной группой.

# ( $p < 0,01$ ) – достоверные различия между группами LF/8OA и LF.

По результатам измерения объема опухолей было установлено, что комплекс LF/8OA обладает ярко выраженным противоопухолевым эффектом и вызывает торможение роста опухоли на всех сроках наблюдения. О противоопухолевом действии исследуемых препаратов судили также по результатам сопоставления среднего объема опухолей в группе контрольных и подопытных животных. Сравнение объемов показало, что к 10-м суткам наблюдалось достоверное торможение роста опухолей у мышей группы LF/8OA по сравнению с контролем (98 %). На 30-е сутки после перевивки клеток процент торможения роста опухоли в группе LF/8OA составлял примерно 79 % по отношению к контролю, в то время как у группы мышей, которым вводили LF, этот показатель составил 21 % (Рисунок 8).

Был рассчитан индекс роста опухоли – показатель эффективности противоопухолевой терапии, который представляет собой отношение площади под кинетической кривой роста



опухоли у животных в экспериментальной группе к площади под кинетической кривой роста опухоли в контрольной группе. Показано, что при введении животным по 5 мг LF/80А и LF ежедневно (24-дневный курс) ИРО составлял 0,14 и 0,63 соответственно.

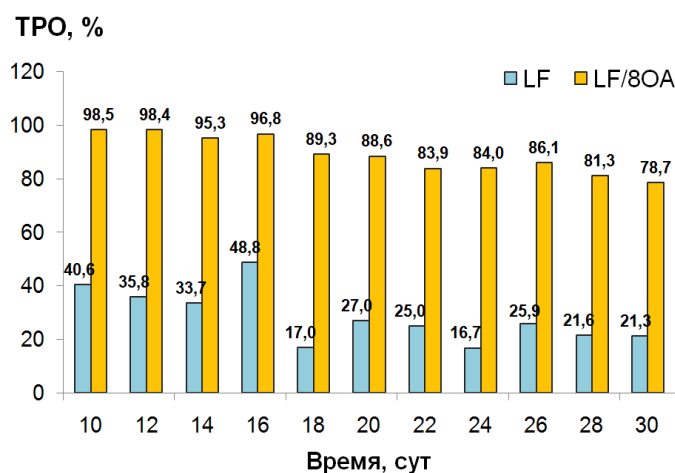


Рисунок 8 – Динамика торможения роста Н22а у мышей линии СЗНА после введения тестируемых препаратов. Голубым цветом на гистограмме обозначены столбцы, отражающие процесс торможения роста гепатомы в LF группе, оранжевые столбцы – в группе LF/80А. Показатели ТРО для экспериментальных групп рассчитаны относительно контроля. Между группами LF/80А и LF зарегистрированы статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ).

### Исследование влияния LF и LF/80А на выживаемость мышей с гепатомой 22а

Одной из важнейших характеристик при изучении новых эффективных фармакологических веществ является выживаемость. На основании продолжительности жизни животных во всех группах были построены кривые кумулятивной выживаемости Каплана-Мейера (Kaplan and Meier, 1958). Начало гибели мышей в контрольной группе и в группе, которая получала LF, было зарегистрировано на 30-е и 14-е сутки, соответственно, в то время как выживаемость опытной группы LF/80А составляла 100 %. На момент полной гибели мышей в контрольной и LF группе на 48-е сутки после трансплантации гепатомы 22а в группе с LF/80А выживаемость составляла 70 %. На 73-и и 106-е сутки этот показатель составлял 50 % и 20 %, соответственно. У 20 % животных наблюдалось полное рассасывание опухолевых узлов. На рисунке 9 представлен график кривых выживаемости по Каплану-Мейеру для всех групп животных в зависимости от вида лечения.

Для выявления существенных различий между кривыми выживаемости был проведен двухвыборочный анализ с использованием критерия Гехана-Вилкоксона по всем 30 животным (Philonenko et al., 2013). Нецензурированных исследований из них 28 (93,33 %), цензурированных – 2 (6,67 %). При сравнении группы LF/80А с группой LF ( $p < 0,01$ ) и с группой контроля ( $p < 0,01$ ) показаны статистически значимые различия. Между группами контроля и LF статистически значимых различий отмечено не было ( $p > 0,05$ ).

Была проведена оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни животных после терапии. Введение мышам комплекса LF/80А вызвало увеличение продолжительности жизни в сравнении с контролем на 173 % и увеличение значения Т/С на 273 %. Для асцитных или солидных опухолей минимальные значения этих параметров должны составлять: Т/С  $\geq 150$  % и УПЖ  $\geq 50$  % (Хабриев, 2005).

Спустя 60 дней, после окончания 24-дневного курса инъекций препаратов, осуществляли подсчет числа полных ремиссий, а спустя 90 дней проводили подсчет полностью излеченных животных. В группе LF/80А у 20 % животных наблюдалось полное рассасывание опухолевого узла. В таблице 2 представлены основные показатели продолжительности жизни животных в зависимости от группы лечения.

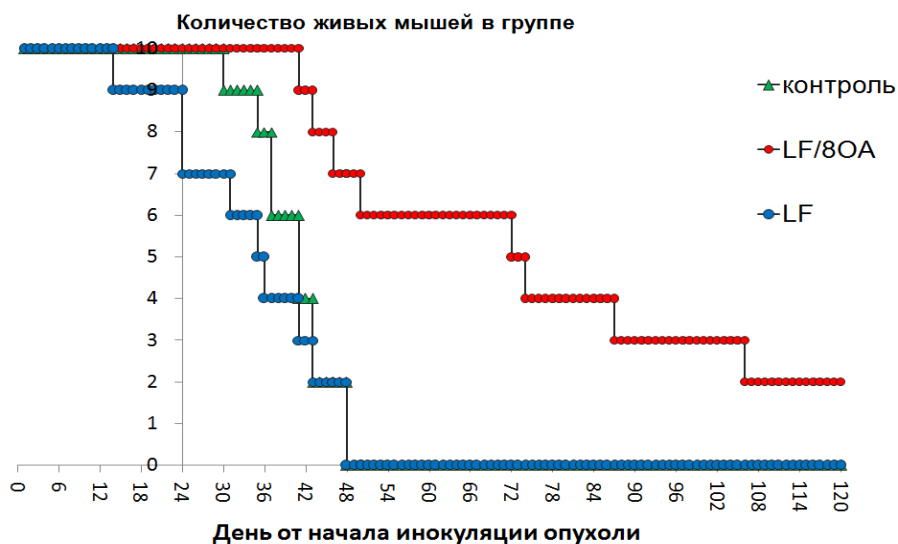


Рисунок 9 – Кривые кумулятивной выживаемости Каплана-Мейера на модели H22a у мышей самцов линии СЗНА после подкожной инокуляции и последующего лечения LF (синий маркер, n=10), LF/80A (красный маркер, n=10). Контрольной группе мышей вводили 0,25 мл PBS (зеленый маркер, n=10). Каждая точка представляет собой количество мышей, которые оставались живы, в день наблюдения. Для сравнения между группами использовали двухвыборочный статистический анализ с использованием критерия Гехана-Вилкоксона.

Таблица 2. Показатели продолжительности жизни мышей СЗНА после лечения

	LF/80A	LF	Контрольная группа
Число животных в группе	10	10	10
Минимальное значение продолжительности жизни, сутки	41	14	31
Максимальное значение продолжительности жизни, сутки	131	48	48
Средняя продолжительность жизни $\pm$ стандартная ошибка среднего, сутки	77,0 $\pm$ 33,14	34,4 $\pm$ 11,23	40,5 $\pm$ 5,38
Медианная продолжительность жизни, сутки	73	36	41
УПЖ, %	173	0	—
Т/С, %	273	0	—
ИРО	0,14	0,63	—
Число полных ремиссий	2	0	0
Число излеченных животных	2	0	0
Тест Гехана-Вилкоксона	p < 0,01	p > 0,05	—

Примечание: указана статистическая значимость при сравнении кривой выживания опытной группы с кривой выживания контрольной группы, p < 0,01 – статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, p > 0,05 – статистически значимых различий по отношению к группе контроля отмечено не было.

Таким образом, при изучении противоопухолевой активности в отношении клеток мышинной гепатомы 22a *in vivo*, было установлено, что ежедневное действие комплекса

LF/80A в дозе 5 мг на мышь (250 мг/кг) приводит к торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни животных по сравнению с контролем и группой, которая получала аналогичную дозу LF. После отмены введения препаратов (на 24-й день) эта тенденция сохранялась. Ежедневное подкожное введение в область опухолевого узла 5 мг LF на протяжении 24 дней приводило к стимулирующему эффекту, который наблюдался и после завершения терапии.

### Антибактериальная активность лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой

Нами была изучена антимикробная активность LF и LF/80A в системе *in vitro* с использованием суспензии *E. coli* в жидкой питательной среде. Исследование цитотоксического действия LF и LF/80A выявило, что оба исследуемых агента обладают высокой антибактериальной активностью в отношении *E. coli*. Однако LF проявлял большую бактериостатическую активность, по сравнению с комплексом. Минимальная ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % бактерий, для LF и его комплекса с ОА составила 82 мкМ и 142 мкМ, соответственно (Рисунок 10).

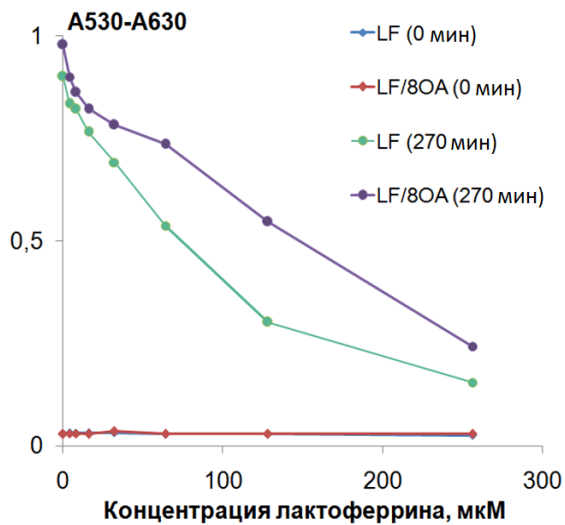


Рисунок 10 – Зависимость показателя  $A_{530}-A_{630}$  от концентрации белка. Синим и красным маркером на графике отмечены зависимости для LF и LF/80A в начальный момент времени. Зеленым и сиреневым маркером на графике отмечены зависимости для LF и LF/80A спустя 4,5 часа инкубации с *E. Coli* DH5 $\alpha$  ( $4 \times 10^4$  КОЕ/мл) в присутствии 60 мкМ резазурина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапия онкологических заболеваний представляет собой огромную проблему: слишком тонка грань между терапевтическим эффектом и ущербом для организма. В последние годы были достигнуты значительные успехи в терапии рака, однако, отсутствие специфичности опухоли, адресной доставки при труднодоступной локализации опухоли, а также развитие множественной лекарственной устойчивости остаются серьезными проблемами. Многие соединения, используемые в настоящее время для лечения онкологических заболеваний, являются токсичными не только для раковых клеток, но и для быстро делящихся здоровых клеток (Hanahan and Weinberg, 2011; Scott et al., 2012).

Селективность к опухолевым клеткам становится обязательной особенностью новых соединений для уменьшения побочных эффектов онколитической терапии, поэтому в настоящее время пристальное внимание исследователи уделяют поиску наиболее эффективного способа векторной доставки лекарственных веществ к клеткам опухоли. Обширные исследования на моделях *in vivo* и клинические исследования определили

белково-липидные комплексы как перспективный класс молекул со значительным терапевтическим потенциалом (Gustafsson et al., 2004).

Белковый компонент подобных комплексов способствует доставке цитотоксичных жирных кислот внутрь опухолевых клеток через плазматическую мембрану (Nakamura et al., 2013). Лактоферрин является идеальным носителем и может рассматриваться в качестве потенциальной системы доставки лекарств к опухоли (Agwa and Sabra, 2021). Существенным его преимуществом является возможность перорального применения: через 10–20 минут он обнаруживается в печени, почках, селезенке и головном мозге, что свидетельствует о сохранении белковой структуры (Зорина, 2019). К тому же разработка лекарств с противораковой активностью на основе LF снижает вероятность аллергических реакций и выработки аутоантител.

По итогам исследования можно заключить, что результаты, полученные в настоящей работе, расширяют представление о противоопухолевой активности комплексов «белок/жирная кислота» и являются предпосылкой для более детального изучения свойств и механизмов комплексов, созданных на основе лактоферрина (Таблица 3). Теоретический анализ публикаций, представленных в литературном обзоре, позволяет утверждать о несомненной актуальности изучения подобных противоопухолевых комплексов в качестве потенциального инструмента биотерапии злокачественных новообразований.

Таблица 3. Изменение свойств LF при образовании комплекса с ОА по данным литературы и результатам диссертационного исследования

Исследование	Особенности комплекса LF с ОА	Свойства комплекса сходные с LF
Fang et al., 2014	Увеличение отношения Вах/Bcl-2 и активация каспазы-3 в культуре HepG2	Активация каспазы-8 и каспазы-9 в культуре HepG2
Zhang et al., 2015	Цитотоксичность против HepG2, HT29 и MCF-7 (IC <sub>50</sub> ~ 5 мкМ)	-
Li et al., 2020	-	Подавление миграции и пролиферации культуры рака пищевода (KYSE450)
Yao et al., 2021	-	Увеличение доли клеток HT29 на стадии апоптоза и уменьшение миграции
Диссертационное исследование	Вызывает гемолиз и дегрануляцию нейтрофилов, эффективно подавляет рост гепатомы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Взаимодействует с церулоплазмином, ингибирует рост <i>E. coli</i> , при введении 2000 мг/кг острая токсичность не обнаружена

Уникальные свойства лактоферрина, а также тот факт, что в Отделе молекулярной генетики свойства этого белка изучаются много лет, послужили основанием для проведения исследования по созданию комплекса LF/OA и изучению его потенциала, как

противоопухолевого и антибактериального агента. К моменту начала в 2015 году настоящей диссертационной работы в литературе было только одно исследование, описывающее способность LF коровы образовывать комплекс с ОА, однако его цитотоксическая активность в отношении нетрансформированных клеток была не изучена (Fang et al., 2014). Комплекс на основе лактоферрина человека к началу нашего исследования не изучался вовсе. Наша работа посвящена созданию простого метода получения комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой и анализу его цитотоксических свойств в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

## ВЫВОДЫ

1. Титрование лактоферрина этанольным раствором олеиновой кислоты позволяет получить растворимый в физиологическом растворе комплекс, содержащий 8 моль олеиновой кислоты на 1 моль лактоферрина. Размер частиц комплекса составил около 16 нм.
2. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой проявляет цитотоксичность в отношении клеток мышинной гепатомы 22а, HL-60 и Jurkat *in vitro*, главным образом индуцируя апоптоз.
3. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой при концентрации выше 8 мкМ LF инициирует лизис эритроцитов. Однако присутствие церулоплазмينا в среде предотвращает цитотоксические эффекты.
4. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой при концентрации выше 1 мкМ LF способен вызывать дегрануляцию нейтрофилов в суспензии. Церулоплазмин нейтрализует эффект комплекса на клетки.
5. В комплексе с олеиновой кислотой в 2 раза снижается антибактериальная активность лактоферрина.
6. При системном (парентеральном) введении мышам в дозе 250 мг на кг комплекс лактоферрина с олеиновой кислотой тормозил рост опухолей. Длительное ежедневное применение не оказывало токсического воздействия на организм лабораторных мышей.
7. Комплекс лактоферрина человека с олеиновой кислотой препятствовал гибели мышей, вызванной ростом гепатомы, по сравнению с введением лактоферрина и физиологического раствора.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Соколов, А.В. Взаимодействие церулоплазмينا с комплексом лактоферрина и олеиновой кислоты / А.В. Соколов, А.Ю. Власенко, В.А. Костевич, Э.А. Старикова, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // Медицинский Академический Журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. С 233-234.

2. Елизарова А.Ю. Лактоферрин как перспективное средство в терапии метаболического синдрома: от молекулярных механизмов до клинических испытаний / А. Ю. Елизарова, В. А.

Костевич, И. В. Войнова, А. В. Соколов // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 1. – С. 45-64.

#### **Статьи в журналах, входящих в международные базы Scopus и Web of Science:**

3. Lebedev, D.V. Effect of alpha-lactalbumin and lactoferrin oleic acid complexes on chromatin structural organization / D.V. Lebedev, Y.A. Zabrodskaya, V. Pipich, A.I. Kuklin, E. Ramsay, A.V. Sokolov, **A.Yu. Elizarova**, A. Shaldzhyan, N.A. Grudinina, R.A. Pantina, B. Wu, T.A. Shtam, A.V. Volnitskiy, A.E. Schmidt, A.V. Shvetsov, V.B. Vasilyev, V.V. Isaev-Ivanov, V.V. Egorov // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2019. – Vol. 29, № 4. – P. 691-704.

4. **Elizarova, A.** Interaction of Lactoferrin with Unsaturated Fatty Acids: In Vitro and In Vivo Study of Human Lactoferrin/Oleic Acid Complex Cytotoxicity / A. Elizarova, A. Sokolov, V. Kostevich, E. Kisseleva, E. Zelenskiy, E. Zakharova, O. Panasenko, A. Budevich, I. Semak, V. Egorov, G. Pontarollo, V. De Filippis, V.Vasilyev // Materials (Basel). – 2021. – Vol. 14, № 7. – P. 1602-1619.

#### **Тезисы конференций:**

5. **Власенко, А.Ю.** Получение комплексов лактоферрина с олеиновой кислотой и анализ их цитотоксической активности / **А.Ю. Власенко**, А.В. Соколов, Э.А. Старикова, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // V Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (23-26 июня 2015 г., Санкт-Петербург). – 2015. – С. 86.

6. Григорьева, Д.В. Лактоферрин с олеиновой кислотой индуцирует гемолиз эритроцитов человека / Д.В. Григорьева, В.Е. Луценко, **А.Ю. Власенко**, И.В. Горудко, С.Н. Черенкевич, А.В. Соколов // Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни» (25-26 июня 2015 г., Минск) – 2015. – С. 83-84.

7. Соколов, А.В. Взаимодействие комплекса лактоферрина и олеиновой кислоты с церулоплазмином / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, В.Е. Луценко, Э.А. Старикова, В.Б. Васильев // Международная научная конференция. Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем (28-30 июня 2016 г., Минск). – 2016. – С. 363-365.

8. **Власенко, А.Ю.** Взаимодействие церулоплазмينا с комплексом лактоферрина и олеиновой кислоты / **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, А.В. Соколов // Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА (19-20 апреля 2016 г., Москва). – 2016. – С. 41.

9. Соколов, А.В. Взаимодействие церулоплазмينا с комплексом лактоферрина и олеиновой кислоты / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, Э.А. Старикова, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев // III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (12-14 сентября 2016 г., Санкт-Петербург). – 2016.

10. Sokolov, A.V. Interaction of ceruloplasmin with complex of lactoferrin and oleic acid / A.V. Sokolov, **A.Yu. Vlasenko**, V.A. Kostevich, E.T. Zakharova, V.B. Vasilyev // 10th International BioMetals Symposium (10-15 July 2016, Dresden). – 2016. – P. 144.

11. Соколов, А.В. Цитотоксические свойства комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой модулируются церулоплазмином / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич // XX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (22 апреля 2017 г., Санкт-Петербург). – 2017. – С. 524-525.

12. Соколов, А.В. Цитотоксические свойства комплексов лактоферрина с ненасыщенными жирными кислотами / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, В.В. Егоров, Э.А. Старикова, Е.П. Киселева, Е.Т. Захарова, О.М. Панасенко, В.Б. Васильев // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, № 5. – С. 47.

13. Соколов, А.В. Изучение противораковых свойств комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, Э.А. Старикова, Е.П. Киселева, В.Б. Васильев // Медицинская Иммунология. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 85.

14. Соколов, А.В. Цитотоксические свойства комплексов лактоферрина с ненасыщенными жирными кислотами / А.В. Соколов, **А.Ю. Власенко**, В.А. Костевич, В.В. Егоров, Э.А. Старикова, Е.П. Киселева, Е.Т. Захарова, О.М. Панасенко, В.Б. Васильев // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (18-22 сентября 2017 г., Москва). – 2017. – С. 47.

15. Sokolov, A. Complexes of lactoferrin with unsaturated fatty acids; a pilot study of the effect of “LF/oleic acid” complex on tumour growth in mice / A. Sokolov, **A. Vlasenko**, V. Kostevich, E. Starikova, E. Kisseleva, E. Zakharova, O. Panasenko, V. Vasilyev // XIII International Conference on Lactoferrin: Structure, Function & Applications (November 5-10, 2017, Rome). – 2017. – P. 59.

16. **Елизарова, А. Ю.** Исследование противоопухолевой активности комплекса лактоферрина человека с олеиновой кислотой *in vivo* / А. Ю. Елизарова, В. А. Костевич, Е. А. Зеленский, А. В. Соколов // Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (20 апреля 2019 г., Санкт-Петербург). – 2019. – С. 182-183.

17. Sokolov A., **Elizarova A.**, Kostevich V., Kisseleva E., Zelenskiy E., Panasenko O., Vasilyev V. Study of the effect of lactoferrin and lactoferrin-oleic acid complex on tumour growth in mice. 14th International Conference on Lactoferrin Structure, Function and Application, Lima, Peru, November 4-8, 2019, P. 24.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖК – жирная кислота

ЗНО – злокачественные новообразования

ИРО – индекс роста опухоли

ИФА – иммуноферментный анализ

КД – круговой дихроизм

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МПО – миелопероксидаза

НФ – нейтрофилы человека

ПААГ – полиакриламидный гель

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ТРО – торможение роста опухоли

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

BAMLET – **B**ovine **A**lpha-lactalbumin **M**ade **L**ethal to **T**umor cells

CP – церулоплазмин

H22a – мышьяная гепатома 22a

HAMLET – **H**uman **A**lpha-lactalbumin **M**ade **L**ethal to **T**umor cells

LF – лактоферрин

LF/8OA – комплекс лактоферрина с 8 молекулами олеиновой кислоты

NEFA (non-esterified fatty acids) – ненасыщенные жирные кислоты

OA – олеиновая кислота

PBS – 150 mM NaCl, 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4