

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ЕЛИЗАРОВА
Анна Юрьевна

**«Комплекс лактоферрина с олеиновой кислотой: платформа для
создания противоопухолевых препаратов»**

1.5.4 — Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Соколов Алексей Викторович

Санкт-Петербург, 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Онкология: краткая история	18
1.2. Основные события канцерогенеза	21
1.3. Основные биологические особенности опухолевых клеток, как мишени терапевтического воздействия.....	23
1.4. Этапы исследования лактоферрина.....	28
1.5. Нахождение LF в организме	30
1.6. Структура лактоферрина.....	32
1.7. Связывание ионов металлов	36
1.8. Цитотоксический эффект лактоферрина.....	36
1.8.1. Антибактериальная активность	37
1.8.2. Антипаразитарная активность	40
1.8.3. Противовирусная активность.....	41
1.8.4. Антигрибковая активность	43
1.8.5. Противоопухолевая активность.....	45
1.9. Комплексы LF с противоопухолевыми веществами	51
1.9.1. Комплекс лактоферрина с куркумином	51
1.9.2. Комплекс лактоферрина с темозоломидом	53
1.9.3. Комплекс лактоферрина с 5-фторурацилом.....	56
1.10. Олеиновая кислота	57
1.11. Комплексы белков молока с жирными кислотами	58
1.11.1. HAMLET	61
1.11.2. BAMLET	67
1.11.3. CAMLET	68
1.11.4. Комплекс LF с ОА	69
1.11.5. ELOA.....	70
1.11.6. β -лактоглобулин	71
1.12. LIMLET	71

1.13. Сyt-c-OA.....	72
1.14. Цитотоксический эффект олеиновой кислоты.....	73
Заключение по обзору литературы.....	78
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	81
2.1. Реактивы, использованные в работе.....	81
2.2. Экспериментальные животные.....	82
2.3. Клеточные культуры	83
2.4. Получение белковых препаратов.....	83
2.4.1. Выделение лактоферрина грудного молока.....	83
2.4.2. Выделение лактоферрина молока коров из БАД («Jarrow formulas»)	84
2.4.3. Выделение церулоплазмينا плазмы крови человека	85
2.5. Получение лактоферрина, насыщенного железом	86
2.6. Получение комплексов лактоферрина с жирными кислотами	86
2.7. Анализ стехиометрии комплексов лактоферрина с жирными кислотами	88
2.8. Хроматография комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой	89
2.9. Спектральные методы исследования	89
2.9.1. Спектрофотометрия.....	89
2.9.2. Спектрометрия кругового дихроизма.....	90
2.9.3. Флуоресцентная спектроскопия	91
2.9.4. Определение размеров частиц методом динамического светорассеяния.....	92
2.10. Изучение белок-белкового взаимодействия с помощью биосенсоров на эффекте поверхностного плазмонного резонанса	92
2.11. Клеточные методы.....	95
2.11.1. Культивирование клеток линии HL-60.....	95
2.11.2. Культивирование клеток линии Jurkat	95
2.11.3. Культивирование клеток мышинной гепатомы 22a	95
2.12. Исследование токсического действия веществ на опухолевые и нормальные клетки <i>in vitro</i>	96

2.12.1. Изучение жизнеспособности клеток линии HL-60 и Jurkat методом проточной цитометрии.....	96
2.12.2 Изучение жизнеспособности клеток гепатомы 22а методом окрашивания метиленовым синим	97
2.12.3. Анализ гемолитической активности.....	97
2.13. Исследования токсического действия веществ на опухолевые клетки <i>in vivo</i>	99
2.13.1. Изучение острой и отсроченной токсичности	99
2.13.2. Исследование влияния LF и LF/80A на гибель мышей с гепатомой 22а	100
2.14. Анализ концентрации неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крыс.....	102
2.15. Получение клеток <i>E. coli</i>	103
2.16. Оценка антимикробного действия LF и LF/80A в отношении штамма <i>E. coli</i> DH5α	103
2.17. Электрофоретические методы	104
2.17.1. Диск-электрофорез в щелочной системе.....	104
2.17.2. Выявление о-дианизидин-оксидазной активности после диск-электрофореза.....	105
2.17.3. Электрофорез в присутствии SDS в высокомолярной Tris-буферной системе.....	106
2.17.4. Электрофорез в агарозном геле	106
2.18. Выделение геномной ДНК.....	107
2.19. Выделение нейтрофилов	108
2.20. Анализ влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на нейтрофилы.....	109
2.21. Твердофазный иммуноферментный анализ миелопероксидазы.....	109
2.22. Статистическая обработка результатов.....	111
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	112
3.1. Специфичность взаимодействия лактоферрина с жирными кислотами	112

3.2. Определение образования комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой методом гель-фильтрации	114
3.3. Определение размеров частиц методом динамического светорассеяния	115
3.4. Спектры флуоресценции триптофанов	116
3.5. Спектроскопия кругового дихроизма.....	119
3.6. Анализ взаимодействия с церулоплазмином комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой методом диск-электрофореза.....	121
3.7. Изучение взаимодействия методом поверхностного плазмонного резонанса.....	122
3.8. Антибактериальная активность лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой	125
3.9. Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на лизис эритроцитов.....	126
3.10. Исследование активации нейтрофилов в присутствии комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой	130
3.11. Влияние исследуемых препаратов на апоптоз клеток <i>in vitro</i>	133
3.11.1. Анализ фрагментации ДНК в агарозном геле.....	133
3.11.2. Анализ жизнеспособности клеток линии HL-60 методом проточной цитофлуориметрии	134
3.11.3. Анализ жизнеспособности клеток линии Jurkat методом проточной цитофлуориметрии	137
3.11.4. Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на гибель гепатомы 22a.....	140
3.12. Исследование влияния LF/80A на острую и отсроченную токсичность <i>in vivo</i>	143
3.13. Исследование влияния LF и LF/80A на гибель мышей с гепатомой 22a	143
3.14. Влияние лактоферрина человека на концентрацию неэстерифицированных жирных кислот <i>in vivo</i>	149
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	151

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	161
ВЫВОДЫ.....	164
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	165
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	171

ВВЕДЕНИЕ

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 апоптотных клеток, вероятно, из-за способности LF останавливать клеточное деление в фазах G_0 - G_1 . Природные продукты и биоактивные молекулы, в их числе LF, α -лактальбумин, β -лактоглобулин, имеют серьёзные преимущества как потенциальные лекарства в силу их относительной доступности и высокого содержания в молоке, отсутствия

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 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 (Elzoghby et al., 2020; Kondapi, 2020; Sabra and Agwa, 2020; Agwa and Sabra, 2021). Среди многих жирных кислот олеиновая кислота 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/OА и изучению его возможных противоопухолевых и антибактериальных активностей.

Цель и задачи исследования

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

Задачи

1. Сравнить эффективность взаимодействия лактоферрина человека с различными жирными кислотами и проанализовать 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 22а 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 жирной кислоты 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 парентальном 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 жирных кислот, 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 жирными кислотами 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 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. Противоопухолевая активность *in vivo* была изучена на мышах линии СЗНА с перевитой гепатомой 22а (H22а). Влияние комплекса LF/OA на клеточное дыхание *E. coli* оценивалось с помощью резаурин-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 апробация 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 результатов исследований

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 молекулярной генетики ФГБНУ "ИЭМ" Грудиной Н.А и Егоровым В.В., 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 биохимии ФГБНУ "ИЭМ" д.м.н. Танянским Д.А. Спектроскопия кругового дихроизма и флуоресцентная спектроскопия были проведены под руководством проф. Винченцо Де Филипписа, Падуанский университет, г. Падуя (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

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Соколову Алексею Викторовичу за предоставленную интересную тему для исследований, за поддержку, неоценимую помощь и многократные обсуждения работы на всех её этапах, от планирования эксперимента до интерпретации полученных результатов.

Автор отдельно выражает благодарность к.б.н. Валерии Александровне Костевич за первые методические уроки, терпение, ценные рекомендации и замечания.

Автор выражает признательность коллегам, в тесном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа, а именно: к.б.н. Игорю Викторовичу Семаку и к.с.-х.н. Александру Ивановичу Будевичу за любезно предоставленный препарат рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансенных коз, к.б.н. Игорю Владимировичу Кудрявцеву за помощь при проведении исследований методом проточной цитометрии, д.б.н. Екатерине Прохоровне Киселевой и Евгению Александровичу Зеленскому за помощь в работе с мышинными моделями опухолей, д.м.н. Таянскому Дмитрию Андреевичу за помощь в работе с моделью липолиза на крысах, к.б.н. Наталье Андреевне Грудининой за ценные консультации и обучение работе с бактериальными культурами, Николаю Петровичу Горбунову за предоставление необходимых в работе моноклональных антител, к.б.н. Элеоноре Александровне Стариковой за помощь при работе с линиями опухолевых клеток человека, д.б.н. Владимиру Валерьевичу Егорову за неоценимую помощь в исследованиях методом малоуглового рассеяния нейтронов, Марине Николаевне Карпенко за помощь в статистической обработке данных, к.б.н. Елене Тихоновне Захаровой, к.б.н. Ирине Олеговне Сучковой, Наталье Игоревне Дергачевой и Ольге Игоревне Антимоновой за моральную поддержку, внимание и ценные дискуссии.

Автор также выражает глубокую признательность своим итальянским коллегам из Падуанского университета (Италия), в частности, профессору Винченцо Де Филиппису за предоставленную возможность освоить новые методы, доктору Джулии Понтаролло за помощь в проведении спектроскопии кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии.

Автор выражает благодарность всем сотрудникам Отдела молекулярной генетики за дружественную атмосферу, полученные знания и опыт практической работы, за ценные дискуссии и полезные замечания.

Автор выражает безмерную благодарность заведующему Отделом молекулярной генетики д.м.н., проф. Вадиму Борисовичу Васильеву за внимательное руководство, всестороннюю помощь, внимание и интерес к работе, за ценные замечания и советы.

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Онкология: краткая история

Вероятно, онкологические заболевания были известны людям и в доисторический период. Ученые неоднократно обнаруживали у египетских мумий следы неопластических заболеваний разной локализации. Это подтверждается рядом работ, описывающих наличие рака молочной железы, простаты, головного мозга и миеломы в человеческих останках, захороненных между 3000 и 230 годами до н.э. (Strouhal and Kritscher, 1990; Karpozilos and Pavlidis, 2004; Binder et al., 2014).

Термин «рак» в медицинской литературе появился около 400 г. до н.э., во времена древнегреческого целителя Гиппократ. Одна из его пациенток страдала от рака молочной железы. Заболевание находилось в серьезной стадии — новообразование в груди женщины было внешне похоже на «распухшее животное», а сосуды, которые питали опухоль, «сильно набухли и были похожи на расставленные клешни». Опухоль, оплетенная клубком распухших кровеносных сосудов, напомнила Гиппократу зарывшегося в песок краба, раскинувшего ноги по кругу, и по причине внешнего сходства с членистоногим Гиппократ назвал болезнь «karkinos» (др.-греч. Καρκίνος — «рак») (Mukherjee, 2012).

Долгое время изучение рака не приносило значимых успехов: более 1300 лет врачи и ученые придерживались гуморальной теории (доктрины, которая объясняла болезни нарушением баланса жидкостей), к тому же изучение опухолей ограничивалось запретом церкви на аутопсию. Сам Гиппократ утверждал, что «рак лучше вообще не лечить, потому что так больной живет дольше». В XVI веке французский военный хирург Амбруаз Парэ описал методы выжигания опухолей раскаленным на углях железом или мазью на основе серной кислоты. Зачастую подобное лечение приводило к сепсису и летальному исходу, хотя иногда небольшую раковую опухоль все

же удавалось удалить хирургическим путем. Возможность хирургического удаления опухоли на тот момент рассматривалась только в крайних случаях.

В XVII веке большинство пациентов прибегало к использованию мазей, притираний и отваров. В состав мазей стали входить необычные ингредиенты: козий помет, лягушки, вороньи лапки, а самым большим спросом пользовалась мазь из крабьих глаз. В 1760-е годы исследования шотландского хирурга Джона Хантера, проведенные на животных и трупах в домашней лаборатории, позволили выявить интересный факт. Врач обнаружил, что ему удастся удачно добраться и извлечь опухоль, не потревожив близлежащие ткани, если она является «подвижной». Так Хантер, сам того не подозревая, положил начало классификации опухолей по «стадиям». Подвижные опухоли были типичны на ранней стадии болезни, а «неподвижные» представляли собой более тяжелую стадию (инвазивную). Хирург пришел к выводу, что хирургическим путем удалять следует только подвижные опухоли. Таким образом, начиная уже с XVI века, в медицине начали закладываться основы методов лечения рака, используемых до сих пор: хирургии и лекарственной терапии (Mukherjee, 2012).

Первое документированное исследование, определяющее причину рака, было сделано в 1775 году, когда английский хирург Р. Pott описал случай профессионального рака: им был описан рак кожи мошонки у трубочистов. Это наблюдение положило начало исследованиям канцерогенеза и внесло большой вклад в изучение злокачественных новообразований (Pott, 1775).

В 1915 году японские ученые К. Yamagiwa и К. Ichikawa впервые получили химически индуцированную опухоль: в течение года они наносили на уши кроликов каменноугольную смолу (Fujiki, 2014). Первый чистый канцероген (дибензантрацен), был синтезирован в 1929 году, а в 1930-х годах Е. Kennaway и J. Cook выделили канцерогенные полициклические ароматические углеводороды, включая бензпирен, из каменноугольной смолы (Phillips, 1983).

В начале 1900-х годов Вoveri предложил мутационную теорию канцерогенеза: высказал предположение о том, что нарушения в хромосомах могут привести к возникновению рака. Именно Вoveri предвосхитил раннюю гипотезу генов-супрессоров опухолей, геномной нестабильности и других факторов, которые в совокупности вносят свой вклад в широко распространенное сегодня понимание природы рака (Hansford and Huntsman, 2014).

В 1932 г. А. Lacassagne доказал, что некоторые опухоли могут быть экспериментально вызваны большими количествами эстрогенных гормонов, а в 1944 г. С. Huggins предложил лечить этими веществами рак предстательной железы у человека: так появилась гормональная терапия, которая до сих пор лежит в основе лечения рака предстательной и молочных желез (Lacassagne, 1937; Huggins and Hodges, 1972).

Американский ученый Francis Rous описал вирусную природу рака: в 1911 году он заразил кур птичьей саркомой, полученной из опухолей больных птиц. Эти работы легли в основу вирусной теории рака, а многочисленные опыты на животных показали, что канцерогенное действие могут оказывать также рентгеновские и ультрафиолетовые лучи, радий и радиоактивные вещества (Moore and Chang, 2010). Основателем русской школы вирусной онкологии был Лев Александрович Зильбер, который начал разработку вирусологических аспектов рака в 1944 г. В своей книге «Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей», опубликованной в 1946 г., Зильбер высказал мысль о том, что некоторые вирусы могут выступать в качестве основной причины возникновения рака не только у животных, но и у человека (Зильбер, 1946; Костецкая с соавт., 2020). С тех пор было установлено, что семь вирусов вызывают 10–15 % случаев рака у человека (Chen et al., 2021).

Основополагающим для дальнейшего развития онкологической науки в России стало издание российским хирургом Николаем Николаевичем Петровым первого руководства «Общее учение об опухолях» (Петров, 1910).

Научный путь к пониманию рака вымощен множеством теорий и научных открытий, начиная со времен Гиппократов и заканчивая современными идеями и, несомненно, на этом пути было множество достижений, которые оказали большое влияние на прогресс в области онкологии. Открытие структуры ДНК, радиоактивного излучения, расшифровка генома человека, получение культуры эмбриональных стволовых клеток, способных развиваться в зрелые клетки различных типов, массовое производство моноклональных антител — благодаря этим и многим другим достижениям в конце XX и первые десятилетия XXI века лечение рака продвинулось очень далеко.

1.2. Основные события канцерогенеза

Основным стимулом для превращения нормальной клетки в опухолевую является повреждение ее генетического материала. К повреждающим факторам относятся: ионизирующее излучение, воздействие ультрафиолетовых лучей, влияние химических веществ, повреждающих ДНК (наркотические вещества, лекарственные препараты), некоторые вирусные и бактериальные инфекции (Lewandowska, 2019). Не каждое повреждение ДНК приводит к появлению раковой клетки, а только то, которое влияет на определенные гены. Основную роль в канцерогенезе играют протоонкогены и гены-супрессоры (Татосян, 2004).

Нормальные гены (протоонкогены) кодируют белки, необходимые для роста и участвующие в процессах жизненного цикла клетки. Превращение протоонкогена в онкоген является одним из механизмов возникновения опухолевых клеток. "Молчащие" протоонкогены могут быть активированы в результате следующих процессов: точечных мутаций, хромосомных транслокаций, амплификаций. Эти изменения в протоонкогенах запускают процесс малигнизации клеток. В некоторых случаях этот процесс может запускаться вирусами (Kontomanolis et al., 2020).

В отличие от таких заболеваний, как муковисцидоз или мышечная дистрофия, при которых мутация в одном гене способна стать причиной заболевания, активация одного онкогена почти всегда компенсируется: в организме имеется множество механизмов защиты от злокачественной трансформации (Kretzschmar, 1990; Vogelstein and Kinzler, 2004).

Механизмы образования опухолей не ограничиваются только действием онкогенов. Существует особый класс аутосомно-доминантных генов-супрессоров опухолей (антионкогенов), функция которых заключается в выработке белков, регулирующих клеточный цикл, "запускающих" процесс апоптоза и подавляющих пролиферацию клеток (Копнин, 2004). Наиболее изученным антионкогеном является p53, его мутации обнаруживаются в 50–60 % всех новообразований и являются плохим прогностическим признаком (Hollstein et al., 1991).

Превращение нормальной клетки в опухолевую представляет собой многостадийный процесс, который можно разделить на три основных последовательных стадии: инициация, промоция и прогрессия (Рис. 1.1) (Oliveira et al, 2007).

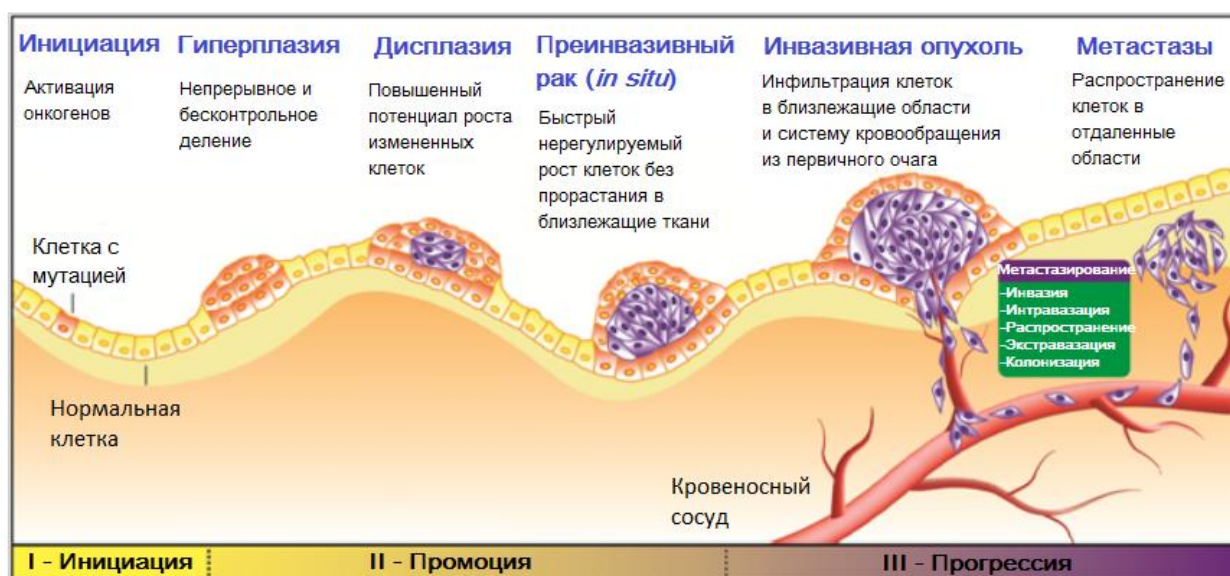


Рисунок 1.1 — Стадии развития злокачественных опухолей [Li et al., 2020]

На стадии инициации опухолевого процесса чаще всего происходят мутации в генах-супрессорах и протоонкогенах. На стадии промоции

трансформированная раковая клетка приобретает новые свойства: способность к автономному росту, накоплению мутаций, инвазии и метастазированию. В ней активируется синтез нуклеиновых кислот и процесс аэробного гликолиза, значительно подавлен процесс апоптоза. Далее клетки переходят на стадию опухолевой прогрессии: начинают проникать через стенки эндотелия в полость кровеносных и лимфатических сосудов и распространяются по всему организму; появляются вторичные очаги активно пролиферирующих клеток — метастазы. Патогенез опухолевого роста не ограничивается механизмами опухолевой трансформации клетки. Появление опухолевой клетки — это только начальная стадия онкогенеза. Дальнейшая судьба такой клетки во многом зависит от регуляторных систем организма (нервной, эндокринной, иммунной), состояние которых во многом определяет как саму возможность возникновения опухоли, так и характер течения опухолевой болезни (Кривчик, 2002).

1.3. Основные биологические особенности опухолевых клеток, как мишени терапевтического воздействия

Рак может развиваться практически в любой ткани организма, и каждый тип рака имеет свои уникальные особенности, однако при всем типовом разнообразии раковые клетки обладают общими биологическими признаками (Рис. 1.2).

Один из основных признаков раковых клеток — неограниченное деление. Нормальные клетки постоянно подвергаются воздействию сигналов, которые «диктуют», должна ли клетка делиться, дифференцироваться в другую клетку или погибнуть. Раковые клетки развивают определенную степень независимости от этих сигналов, что приводит к неконтролируемому росту и пролиферации. В значительной степени этот неконтролируемый рост связан с теломерами: опухолевые клетки могут восстанавливать защитные концы хромосом (Shay and Wright, 2011). При делении нормальных клеток

теломеры укорачиваются, и деление клеток останавливается, как только эти структуры становятся слишком короткими, в то время как опухолевые клетки продолжают делиться (Masutomi et al., 2003). В опухолевых клетках длину теломер восстанавливает фермент теломераза, усиление синтеза которого поддерживает способность к непрерывному делению. Это является критическим этапом в развитии около 85–90 % случаев рака у человека (Shay et al., 2005).

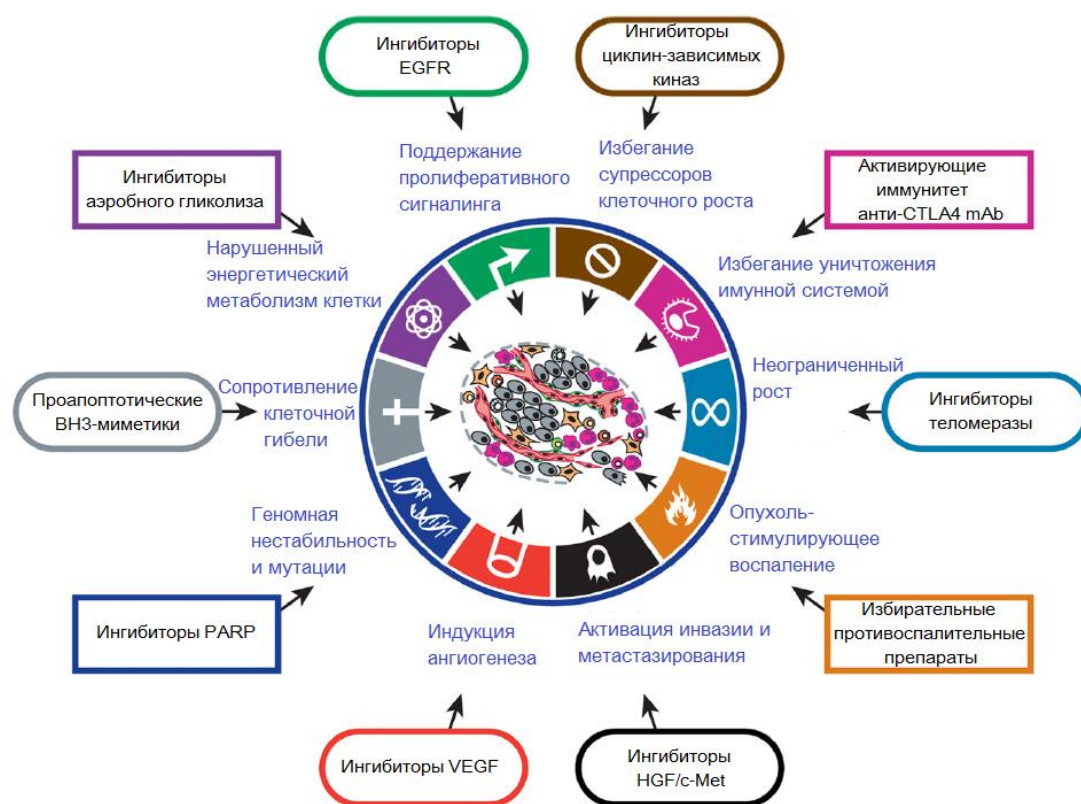


Рисунок 1.2 — Основные признаки опухолевых клеток и воздействующие на них препараты [Адаптировано из статьи Hanahan and Weinberg, 2011]

Разработка препаратов, нацеленных на подавление активности теломеразы в раковых клетках, является приоритетной задачей в противоопухолевой терапии (Chen et al., 2020). Второй путь, используемый оставшимися 10–15 % раковых клеток — альтернативное удлинение теломер (Alternative Lengthening of Telomeres, ALT) (Cesare and Reddel, 2010). Исследования на мышах показали, что при подавлении активности теломеразы клетки могут запускать программу альтернативного удлинения теломер. Эти результаты указали на необходимость разработки способов

блокировки ALT. Разработка ингибиторов ALT поможет фармакологам в создании и оценке эффективности противораковых веществ (O'Sullivan et al., 2014).

Одним из важнейших факторов роста и прогрессирования опухолей является неоангиогенез, т.е. формирование сосудов *de novo*. При достижении определенного размера (1–2 мм в диаметре) опухоль не может расти без дополнительного поступления питательных веществ. В результате образования новых сосудов она превращается из небольшого неопасного для организма кластера мутантных клеток в опухоль, способную к злокачественному росту, инвазии и метастазированию (Хвастунов и соавт., 2014).

В физиологических условиях ангиогенез находится в относительном динамическом равновесии, строго контролируемом стимулирующими и ингибирующими факторами. При раке баланс между этими факторами смещается в сторону стимуляции ангиогенеза (Ribatti et al., 2007). Ангиогенез опухоли представляет собой сложный механизм, регулируемый множеством сигнальных путей. К некоторым хорошо известным проангиогенным факторам относят: сосудистый фактор роста (VEGF), ангиопэтин (ANGPT), фактор роста фибробластов (bFGF) и фактор роста тромбоцитов (PDGF) (Qin et al., 2019). Разработка ангиогенных средств для противоопухолевой терапии привлекает большое внимание. Наибольшую известность среди антиангиогенных препаратов получил Бевацизумаб — гуманизированное моноклональное антитело, способное связывать VEGF, тем самым ингибируя ангиогенез (Кисличко и соавт., 2012). Однако, этот препарат демонстрирует терапевтический эффект преимущественно в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами, за исключением лечения глиобластом (Giuliano and Pages., 2013; Имянитов, 2010). Монотерапия в большинстве случаев оказывается неэффективной в связи с тем, что ангиогенез опухоли регулируется множеством путей. Терапевтическим преимуществом обладают ингибиторы тирозинкиназы (TKIs), поскольку они могут блокировать

одновременно несколько ангиогенных сигнальных путей. Так, например, к апрелю 2017 года в терапии рака использовались уже 31 ТКІ (Berndt et al., 2017).

Процессы, обеспечивающие распространение раковых клеток от первичного очага к дистальным органам, являются основной причиной летального исхода. Одним из основных является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — процесс изменения клетками эпителиального фенотипа на мезенхимальный. ЭМП представляет собой механизм инвазии и метастазирования опухолей. Кроме того, он является одним из механизмов развития устойчивости к цитотоксическому действию противоопухолевых препаратов — главной проблемы современной онкологии (Zhang et al., 2018; Гапонова и соавт., 2020). Предполагают, что ключевую роль в метастазировании некоторых видов рака играет HGF/c-Met сигнальный путь, который находится в состоянии покоя в нормальной ткани и активен в различных опухолях (Yap et al., 2011). Угнетение HGF/c-Met сигнализации является эффективной терапевтической стратегией в подавлении некоторых видов рака, таких как немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, яичников, мочевого пузыря, головы и шеи, шейки матки и некоторых других видов рака (Zhang et al., 2018). В доклинических и клинических испытаниях было продемонстрировано, что ингибиторы тирозинкиназы c-Met обладают противоопухолевой активностью и могут рассматриваться как перспективный вариант лечения злокачественных образований (He et al., 2014; Balan et al., 2017; Hsieh et al., 2017).

Понимание процесса ЭМП и изучение факторов, участвующих в нем, поможет создать теоретическую основу для разработки новых подходов к терапии рака, в частности предотвращения опухолевой инвазии и метастазирования — главных специфических особенностей злокачественного роста.

В процессе образования опухолевых клеток происходит потеря баланса между делением клеток и их гибелью из-за ослабления индукции апоптоза

(Evan and Vousden., 2001). Существует много способов, посредством которых злокачественная клетка может уклониться от апоптоза: нарушение баланса между проапоптотическими и антиапоптотическими белками, снижение активности каспазы, снижение содержания белка p53; увеличение экспрессии антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-xL); подавление регуляции или мутации в генах, кодирующих проапоптотические белки (Bax, Bim, Puma). Уход от апоптоза резко повышает жизнеспособность опухолевой клетки и делает опухоль менее чувствительной к терапевтическим воздействиям (Wong, 2011).

Каждый дефект или аномалия на пути апоптоза может стать интересной и актуальной мишенью в борьбе с раком. Лекарства или стратегии лечения, которые могут восстановить нормальное состояние апоптотических сигнальных путей, обладают высоким потенциалом. Некоторые исследования показали, что путем нарушения транскрипции генов, кодирующих семейство антиапоптотических белков Bcl-2, может быть достигнуто усиление апоптоза в клетках опухолей (Ocker et al., 2005). Одним из классов лекарств, инициирующих апоптоз, являются ВНЗ-миметики (миметики гомологичного домена 3 (ВНЗ) В-клеточной лимфомы 2 (BCL2)) (Delbridge and Strasser, 2015). В последние годы большой интерес вызывает концепция, направленная на использование ингибиторов белков апоптоза (IAPs) в качестве потенциальных мишеней для лечения рака. IAPs представляют собой группу антиапоптотических белков, синтез которых чрезмерно повышен во многих злокачественных опухолях человека. IAPs ингибируют апоптоз и препятствуют активации каспаз — белков, которые необходимы для инициации апоптоза (Nachmias et al., 2004).

Значительную роль в развитии рака также играет микроокружение опухоли (Tumor Microenvironment, TME) — микросреда, которая образуется в результате взаимодействия между подвергшимися мутационным изменениям высокопролиферативными опухолевыми клетками и разными типами окружающих клеток (фибробласты, эндотелиальные и стромальные

клетки, перициты, адипоциты, иммунные клетки). Опухоль в процессе трансформации собственных клеток перепрограммирует свое микроокружение так, что ТМЕ способствует развитию первичных опухолей, процессам инвазии и метастазирования. Все больше доказательств свидетельствует о том, что целенаправленное изменение ТМЕ может стать новой терапевтической тактикой для уничтожения раковой опухоли (Whiteside, 2008). Например, в качестве терапевтических мишеней были предложены интегрины (Meads et al., 2009). Другой мишенью в микроокружении опухоли может стать гипоксия, которая встречается редко в нормальных тканях, но характерна для очагов злокачественного роста. В частности, важной молекулярной мишенью в микроокружении опухоли является гипоксия-индуцибельный фактор — HIF-1 α (Venito et al., 2013).

Таким образом, более глубокое понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе трансформации нормальной клетки в опухолевую, открывает двери для разработки и применения нового поколения лекарств, которые будут специфически уничтожать опухолевую клетку.

1.4. Этапы исследования лактоферрина

В 1925 году Fontes и Thivolle обнаружили существование железа, которое было специфически связано с компонентом сыворотки крови. Авторы показали, что зола, полученная после сжигания плазмы крови лошади, содержит железо, но образуется это железо не из гемоглобина. Связывающий железо компонент во фракции сывороточных глобулинов был открыт группой ученых под руководством Starkenstein в 1933 году при фракционировании сульфатом аммония и впоследствии получил название трансферрин (TF) (Fox, 2003).

В молоке подобный компонент был обнаружен в 1939 году Sorensen и Sorensen в результате фракционирования молока коров сульфатом аммония. Благодаря своему красному цвету он получил название «*red protein from*

milk» (Sorensen et al., 1939). В 1951 году «красный» белок был также обнаружен в молоке человека, однако только в 60-х годах ученые начали его подробно изучать.

В 1960 году Groves показал, что фракция красного белка в молоке коров содержит компонент, который гомологичен сывороточному ТФ. Этот компонент получил несколько названий: «красный белок» молока, лактотрансферрин, лактосидерофилин, экриносидерофилин и лактоферрин. Последнее название в настоящее время считается общепринятым. Таким образом, в 1960 году тремя независимыми лабораториями было установлено, что LF является основным железосвязывающим белком в молоке человека (Groves et al., 1960; Johanson et al., 1960; Montreuil et al., 1960). В 1969 году LF был иммунологически идентифицирован в секреторных гранулах нейтрофильных лейкоцитов человека и морской свинки (Masson et al., 1969; Baggiolini et al., 1970).

В 1984 году Metz-Boutigue с соавторами расшифровали первичную структуру LF, выделенного из грудного молока (Metz-Boutigue et al., 1984), а спустя 6 лет в 1990 году Rey с соавторами определили нуклеотидную последовательность его гена (Rey et al., 1990). В 1991 году была установлена аминокислотная последовательность LF молока коров, а в 1987 и 1997 годах была определена трехмерная структура LF человека и коровы, соответственно (Anderson et.al., 1987; Moore et.al., 1997).

Начиная с 1991 года, проходят международные симпозиумы, посвященные изучению функций этого уникального белка. Сегодня LF вызывает повышенный интерес у биологов и медиков, которые изучают возможности его использования для лечения и профилактики различных заболеваний.

1.5. Нахождение LF в организме

Наиболее распространенным источником LF является грудное молоко (1–4 мг/мл) и молозиво (7 мг/мл) (Рис. 1.3), в котором уровень LF снижается до значений, характерных для нормального молока, за 15–30 дней (Masson et al., 1971). Содержание LF в молоке варьирует в зависимости от вида млекопитающих и стадии лактации (Hirai et al., 1990; Baker et al., 2002). Было показано, что чем больше содержание LF в молозиве, тем выше степень защиты грудных детей от различных бактериальных инфекций и воспаления (Artym et al., 2005). В меньшей концентрации LF может быть обнаружен в различных секретах экзокринных желез, таких, как слезная жидкость (1–2 мг/мл) (Kijlstra et al., 1983; Janssen et al., 1983; Jensen et al., 1986; Rapacz et al., 1988; Velasco Cabrera et al., 1997; Comerie-Smith et al., 1994), слюнная жидкость (10–32 мкг/мл, достигая при паротите 14 мг/мл) (Tabak et al., 1978), семенная жидкость (1 мг/мл) (Buckett et al., 1997), носовой (0,1 мг/мл) и бронхиальный секрет (< 1 мг/мл), желчь (10–40 мкг/мл), панкреатический сок (0,5 мг/мл) (Masson et al., 1966), содержание LF в котором варьирует в зависимости от состояния поджелудочной железы. Отмечен постепенный рост концентрации LF в чистом секрете при хроническом калькулезном панкреатите на стадии образования белковых пробок, а затем камней в протоках. Пониженный уровень LF зарегистрирован при раке поджелудочной железы (Ильина, 2009).

LF обнаружен во вторичных гранулах нейтрофилов (15 мкг/10⁶ нейтрофилов) (Bennett et al., 1987). Такие органы, как плацента и костный мозг, были также отнесены к источникам LF в организме (Levay et al., 1995).

В плазме крови LF присутствует в относительно низких концентрациях от 400 до 1000 нг/мл, повышаясь в разы при гнойно-септических процессах. Содержание LF в плазме крови изменяется также и во время беременности, повышаясь до 2600 нг/мл (Gutteberg et al., 1984; LaForce et al., 1987). Было

показано, что нейтрофилы после дегрануляции являются основным источником LF в плазме крови (Lonnerdal et al., 1995) (Рис. 1.3).

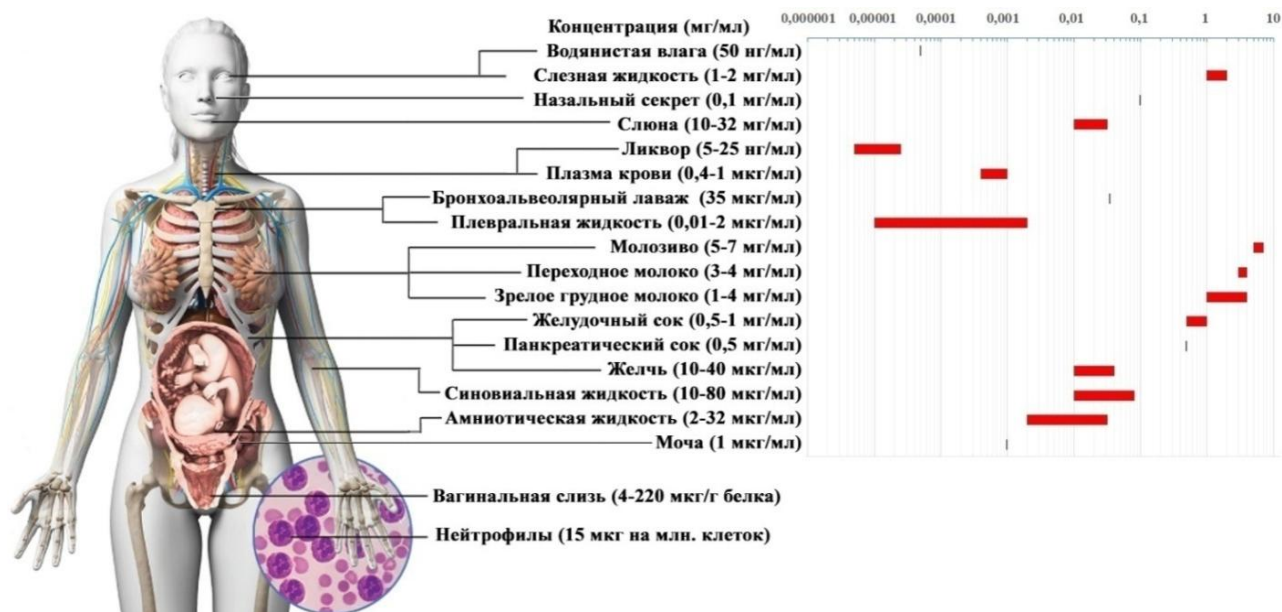


Рисунок 1.3 — Концентрация LF в различных биологических жидкостях [Naidu et al., 2020]

В связи с увеличением концентрации LF во время большинства воспалительных реакций и некоторых вирусных инфекций некоторые авторы относят его к белкам острой фазы (Kanyshkova et al., 2001). К примеру, в норме LF не детектируется в спинномозговой жидкости, однако, при инфекционном или асептическом менингите он обнаруживается в концентрации до 10–12 мкг/мл (Weinberg et al., 2001). При патологических процессах, включающих воспаление, самые высокие значения LF обнаруживаются в воспалительном очаге, хотя его концентрация увеличивается во всех биологических жидкостях (Birgens et al., 1985).

LF вырабатывается эпителиальными клетками слизистых оболочек у различных видов млекопитающих, включая человека, коров, лошадей, коз, свиней, собак, а также обнаружен у рыб (Bezault et al., 1994; Николаев и соавт., 2015).

1.6. Структура лактоферрина

LF представляет собой негемовый железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой 76–80 кДа. Благодаря гомологии первичной структуры со структурой сывороточного трансферрина и способности обратимо связывать ионы железа LF был классифицирован как член семейства трансферринов, наряду с сывороточным трансферрином, меланотрансферрином и овотрансферрином (Groves et al., 1960; Metz-Boutigue et al., 1984; Baker et al., 2002; Lambert et al., 2005).

LF человека, как и другие представители семейства трансферринов, состоит из одной полипептидной цепи, которая содержит 691 а.о. (696 а.о. в случае LF крупного рогатого скота). LF различных видов млекопитающих имеет сходную аминокислотную последовательность. Например, LF человека и крупного рогатого скота имеют примерную 70%-ную гомологию, тогда как LF человека и шимпанзе имеют почти 97%-ное совпадение первичной структуры. Выраженное сходство в первичной структуре LF разных видов указывает на то, что он выполняет одинаковые биологические функции (Moore et al., 1997; Baker et al., 2000).

Молекула LF имеет упорядоченную вторичную структуру, включающую 33–34 % α -спиралей и 17–18 % β -складок (Таблица 1.1). Трехмерная структура, определенная при помощи кристаллографического анализа (Рис. 1.4), показала наличие двух гомологичных шаровидных долей (Anderson et al., 1989; Baker et al., 2005; Baker et al., 2009).

В молекуле LF выделяют N-долю (amino, 1–333) и C-долю (carboxy, 345–691), каждая из которых имеет молекулярную массу около 40 кДа. Доли связаны друг с другом коротким подвижным α -спиральным участком из 11 аминокислот (334–344 а.о.), повернуты относительно друг друга примерно на 180° и сдвинуты на 25 Å, что делает молекулу LF несимметричной (Anderson et al., 1987). Каждая из долей представляет собой эллипсоид с приблизительными размерами $55 \times 35 \times 35 \text{ \AA}$ и разделена на два домена

одинакового размера, которые обозначаются как N1, N2 домены в N-доле и C1, C2 домены в C-доле, соответственно. Между C и N долями отмечается заметная гомология: их последовательности совпадают на 37 % (Metz-Boutigue et al., 1984)

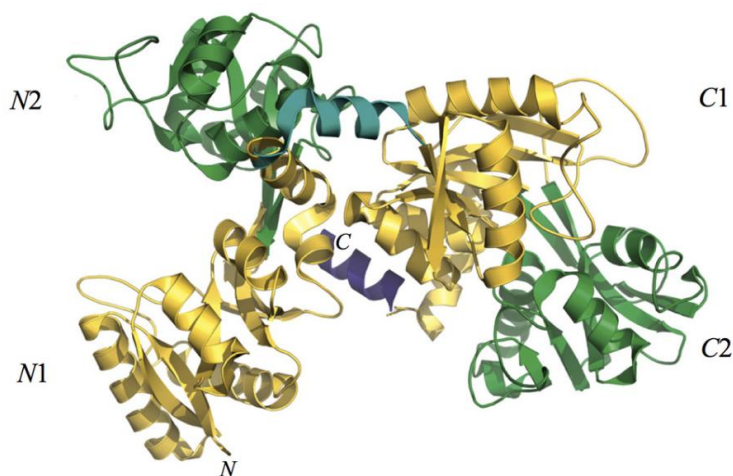


Рисунок 1.4 — Трехмерная структура апо-формы LF (железонасыщенной формы LF). N-доля (слева) и C-доля (справа) разделены на 4 домена: N1, N2 и C1, C2. C — α -спиральный участок, соединяющий доли между собой [Rosa et al., 2017]

Внутри каждой доли, в междоменном кармане, расположено по одному металл-связывающему центру (Рис. 1.5 А), который приспособлен для связывания Fe^{3+} и HCO_3^- . В координации ионов железа принимают участие D60, H253, Y92 и Y192 в N-доле и D395, H595, Y433 и Y526 в C-доле (Рис. 1.5 Б). Каждая доля может связывать атом металла в присутствии иона бикарбоната, который компенсирует положительный ($3+$) заряд иона железа (González-Chávez et al., 2009). Было показано, что замена любого из четырех а.о. в металл-связывающем центре приводит к резкому ухудшению связывания лактоферрином железа (Baker et al., 2009).

Трехмерные структуры железонасыщенной и железонасыщенной формы LF различаются: апо-форма LF имеет «открытую» конформацию N-доли и «закрытую» конформацию C-доли, у холо-формы LF обе конформации «закрыты» (Рис.1.6). Показано, что апо-форма LF является менее стабильной, чем насыщенная железом форма LF (Grossmann et al., 1992).

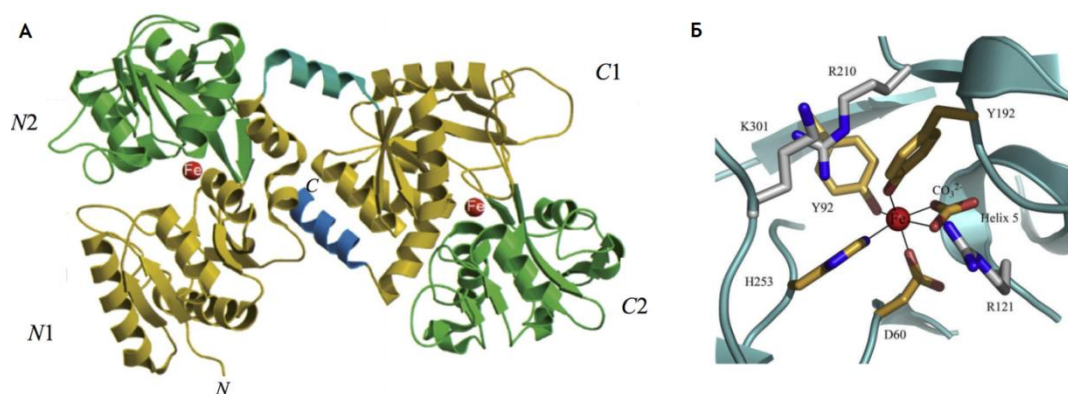


Рисунок 1.5 — (А) Трехмерная структура холо-формы LF. N-доля (слева) и С-доля (справа) разделены на 4 домена: N1, N2 и C1, C2. Красные круги между доменами — 2 иона железа. С — α -спиральный участок, соединяющий доли между собой [Rosa et al., 2017]. (Б) Железосвязывающий сайт LF в N-доле: 2 тирозина (Y92 и Y192), одна аспарагиновая кислота (D60), один гистидин (H253) и один карбонатный анион (CO_3^{2-}). Два основных остатка за участком железа (R210 и K301) помогают модулировать высвобождение железа [Baker and Baker., 2005]

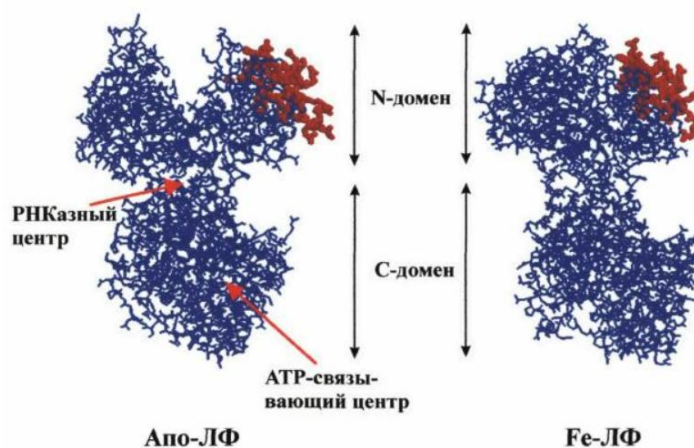


Рисунок 1.6 — Структура апо-формы LF и холо-формы LF. Красным цветом в N-доле изображен сайт связывания полианионов — гепарина, липополисахаридов, хондриотинсульфатов (совпадает или частично перекрывается с ДНК-связывающим сайтом)

Молекула LF имеет три потенциальных сайта N-гликозилирования, два из которых расположены в С-доле (N479, N624) и один в N-доле (N138) (Zlatina et al., 2021).

Многие важные функции LF определяются свойствами его поверхности. Заряд на поверхности молекулы LF распределен неравномерно, и выделяют три области с положительным зарядом: на N-конце (1–7 а.о.),

вдоль внешней стороны на первой α -спирали (13–30 а.о.) и в области между N и C-долями (Рис. 1.7) (Baker et al., 2009).

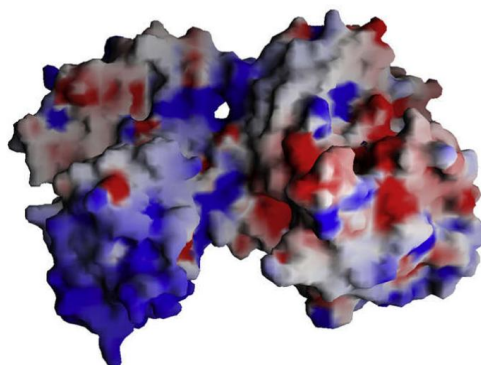


Рисунок 1.7 — Распределение заряда на поверхности LF человека. Положительно заряженные области выделены синим цветом, а отрицательно заряженные — красным [Baker and Baker., 2009]

LF устойчив к действию трипсина, трипсино-подобных протеаз и других ферментов, что обеспечивает целостность белка в желудке (Levay et al., 1995).

LF относится к катионным белкам, значение его изоэлектрической точки составляет 8,7 (Majka et al., 2013).

Таблица 1.1. Аминокислотный состав и вторичные структурные особенности лактоферрина человека (hLF) и крупного рогатого скота (bLF) [Адаптирована из статьи Baker et al., 2000]

Аминокислотный состав	Аминокислотный состав		Вторичная структура (%)					
	bLF	hLF		bLF	hLF		bLF	hLF
Ala (A)	67	63	Lys (K)	54	45	α-спираль	30,6	29,4
Arg (R)	37	45	Met (M)	4	5	3_{10} спираль	2,6	4,6
Asn (N)	29	33	Phe (F)	27	30	β-складки	17,4	18,1
Asp (D)	36	38	Pro (P)	30	35	Другое	49,3	47,9
Cys (C)	34	32	Ser (S)	45	50			
Glu (E)	40	41	Thr (T)	36	31			
Gln (Q)	29	28	Trp (W)	13	10			
Gly (G)	49	54	Tyr (Y)	21	21			
His (H)	10	9	Val (V)	46	48			
Ile (I)	16	16						
Leu (L)	66	58		689 а.о.	691 а.о.			

1.7. Связывание ионов металлов

Железосвязывающая способность LF обуславливает его участие в обмене железа. LF имеет очень высокое сродство к железу и связывается с ним прочно ($K_d \sim 10^{-20}$ М), но обратимо (Baker et al., 2004).

Каждая молекула апо-формы LF может связывать два иона трехвалентного железа (Fe^{3+}) в присутствии двух карбонатных ионов (CO_3^{2-}). По степени насыщения железом LF может находиться в трех различных формах: железоненасыщенная форма («апо-форма LF»; С и N доли свободны от железа), насыщенная железом форма («холо-форма LF», один атом железа присоединен к С-доле и один к N-доле) и частично насыщенная железом форма («моно-форма LF»; 1 атом железа присоединен либо к С, либо к N-доле). На практике, если доля насыщения LF железом находится в пределах от 6 до 8 %, он рассматривается как апо-форма, в то время как холо-формой считается белок со степенью насыщения железом от 76 до 100 % (Bokkhim et al., 2013). В грудном молоке лишь небольшая часть LF насыщена железом (6–8 %), а более 90 % белка находится в апо-форме (Fransson et al., 1980).

LF способен связывать ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} , а также ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Cd^{3+} , Ni^{3+} с высоким сродством, причем сродство LF к железу в 300 раз выше, чем сродство трансферрина плазмы. LF может удерживать железо даже в присутствии конкурирующего лиганда (например, цитрата) (Baker et al., 2004).

1.8. Цитотоксический эффект лактоферрина

В данном разделе будут освещены лишь некоторые из многочисленных функций лактоферрина, который был отнесен к группе «*moonlight protein*» в обзоре Brock (Brock et al., 1980). Поскольку конкретные физиологические эффекты LF достигаются посредством нескольких молекулярных

механизмов, то логичнее будет раскрыть ряд интереснейших свойств LF, обеспечивающих сочетание уникальных функций в данной молекуле.

1.8.1. Антибактериальная активность

Антибактериальной активности LF на протяжении длительного времени уделялось большое внимание. Было показано, что LF обладает бактериостатическим и бактерицидным действием как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении различных грамположительных (Francesca et al., 2004) и грамотрицательных бактерий (Beeckman et al., 2007), а также некоторых кислотоустойчивых бактерий (Schaible et al., 2002).

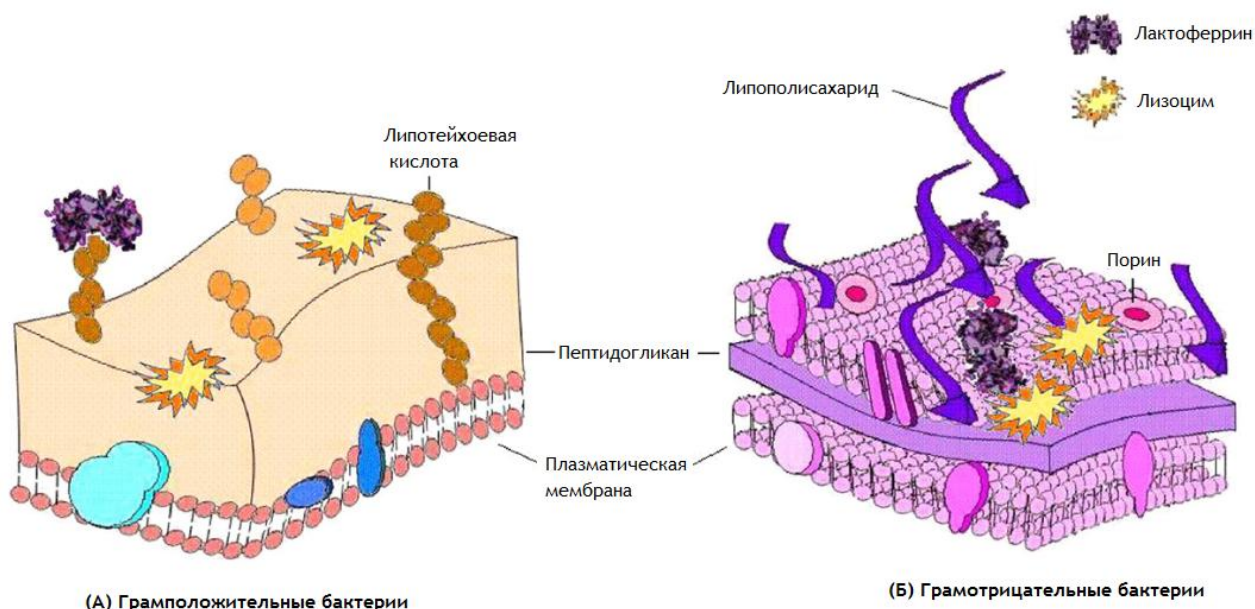
Исследования показали, что бактериостатическая функция LF обусловлена его способностью связывать железо и тем самым лишать бактерии микроэлемента, необходимого для их роста, метаболизма и жизнедеятельности, а также ингибировать экспрессию факторов вирулентности (Weinberg et al., 1995).

Было показано, что антибактериальная активность LF зависит от степени насыщения его железом: чем ниже степень насыщения LF железом, тем сильнее антибактериальное действие, которое он оказывает (Arnold et al., 1981). Бактериостатическое действие в отношении *Escherichia coli* (Brock et al., 1980), *S. salivarius*, *S. mutior*, *S. Pneumonial* (Arnold et al., 1980) присуще только апо-форме LF. Однако было показано, что холо-форма LF также способна ингибировать рост широкого спектра бактерий (Ellison 3rd et al., 1991; Ochoa et al., 2009; Ostan et al., 2017).

Некоторые микроорганизмы способны противостоять бактериостатическому действию LF за счет своей способности выделять белки сидерофоры (низкомолекулярные и высокоаффинные хелаторы ионов железа), которые конкурируют с LF за железо (Ellison 3rd et al., 1988), в то время как другие микроорганизмы, включая род *Neisseriaceae*, связывают LF

с помощью специфических мембранных белков-рецепторов, получая железо, связанное с LF (Schryvers et al., 1998; Yu et al., 2002).

В дальнейшем были описаны другие механизмы антибактериального действия LF, не связанные напрямую с его способностью лимитировать содержание железа в среде. В частности, было показано, что LF способен взаимодействовать непосредственно с наружной бактериальной мембраной (Orsi et al., 2004; Jenssen et al., 2009; Ostan et al., 2017) (Рис. 1.8).



(А) Грамположительные бактерии

(Б) Грамотрицательные бактерии

Рисунок 1.8 — Механизмы антибактериального действия LF.

(А) Грамположительные бактерии: LF связывается с отрицательно заряженными молекулами клеточных мембран, такими как липотейхоевая кислота, нейтрализуя заряд стенки и позволяя действовать другим антибактериальным соединениям, таким как лизоцим.

(Б) Грамотрицательные бактерии: LF может связываться с липидом А липополисахарида, вызывая высвобождение этого липида с последующим повреждением клеточной мембраны [Gonzalez-Chavez et al., 2009]

Исследования показали, что LF повреждает наружную мембрану грамотрицательных бактерий путем взаимодействия с липополисахаридами (ЛПС) бактериальных стенок. Положительно заряженная N-доля LF предотвращает взаимодействие между ЛПС и катионами бактерий (Ca^{2+} и Mg^{2+}), вызывая высвобождение ЛПС из клеточной стенки, увеличение мембранной проницаемости и лизис клеток (Coughlin et al., 2007; González-Chávez et al., 2009). Взаимодействие LF и ЛПС также потенцирует действие

природных антибактериальных препаратов, таких, как лизоцим (Ellison 3rd et al., 1991).

Природный лиганд лактоферрина — церулоплазмин — также оказывает влияние на его антибактериальную активность. Известно, что ЛФ образует комплекс с церулоплазмином (СР), белком плазмы крови (Mr 132 кДа), относящимся к белкам острой фазы воспаления (Zakharova et al., 2000). Комплекс LF с СР способствует увеличению ферроксидазной активности СР и ускорению встраивания железа в апо-форму LF (Соколов и соавт., 2005; Sokolov et al., 2009). Помимо взаимодействия белков *in vitro*, показано формирование комплекса СР–LF в грудном молоке (Соколов и соавт., 2005; Соколов и соавт., 2006) и слезной жидкости (Соколов и соавт., 2013).

Механизм действия LF в отношении грамположительных бактерий основан на его связывании с анионными молекулами на поверхности бактерий (например, такими, как липотейхоевая кислота), что приводит к уменьшению общего отрицательного заряда на клеточной стенке и таким образом повышает эффективность антибактериальных соединений, таких, как лизоцим и антибиотики (Leitch et al., 1999; González-Chávez et al., 2009; Barbiroli et al., 2012;).

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что LF обладает способностью предотвращать прикрепление определенных бактерий к клетке-хозяину (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens*, *S. mutans*, энтеротоксигенные штаммы *E. coli*) (Бухарин и соавт., 2011).

Бактерицидные свойства LF могут быть также обусловлены его способностью связываться с поринами (*Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Shigella flexneri*) и ограничивать поток питательных веществ в клетку, что в дальнейшем приводит к лизису бактерий (Baveye et al., 1999).

Многие штаммы бактерий способны инфицировать клетки человека, используя системы секреции III типа и факторы вирулентности. LF способен

расщеплять некоторые из этих белков и препятствовать прохождению бактерий в клетку (Gomez et al., 2003).

Свойства LF в отношении некоторых видов микроорганизмов объясняют отщеплением коротких основных (катионных) N-концевых пептидов путем ограниченного протеолиза. Пептид LF крупного рогатого скота с аминокислотной последовательностью 1–54 и более короткий (1–41), так называемый лактоферрицин В, обладают еще большим, чем LF, микробоцидным действием, которое объясняется выраженной основностью аминокислотной последовательности на концах молекул этих пептидов (Bellamy et al., 1992).

1.8.2. Антипаразитарная активность

Большое количество исследований посвящено роли LF и его пептидов в воздействии на заболевания, вызываемые паразитами, однако, механизмы, лежащие в основе противопаразитарного действия LF, изучены недостаточно. Противопаразитарная активность LF была описана против таких опасных паразитов, как *Giardia lamblia* или *Pneumocystis carinii* (вызывает пневмоцитоз, являющийся смертельным для 65–85 % людей, больных СПИДом) (Turchany et al., 1995; Baker et al., 2009).

В 2001 году Omata с соавторами показали, что инвазивные свойства спорозоитов *Toxoplasma gondii* и *Eimeria stiedai sporozoites* значительно снижались после инкубации их с пептидом LF коровы (лактоферрицином В) (Omata et al., 2001). Полагают, что лактоферрицин нарушает целостность мембраны паразита, приводя к последующим изменениям во взаимодействии между хозяином и паразитом. Другие исследования *in vitro* показывают, что LF человека не может предотвратить проникновение внутриклеточного паразита *Toxoplasma gondii* в хозяина, но приводит к ингибированию роста *T. gondii* в клетках (González-Chávez et al., 2009).

В случае гемопаразитов *Babesia caballi* и *Babesia equi* эффект LF зависел от насыщения его Fe^{3+} . Было обнаружено, что рост *Babesia caballi*

значительно подавляется апо-формой LF, но не ингибируется холо-формой LF; для *Babesia equi* ни один из типов LF не показал ингибирующего эффекта (González-Chávez et al., 2009).

Конкуренция за железо между паразитом и LF лежит в основе его противопаразитарной активности против *Pneumocystis carinii*. LF подавлял рост *Pneumocystis carinii* на 50 %, а в сочетании с антибиотиками на 90 % (Cirioni et al., 2000).

Апо-форма LF обладает сильным антипаразитарным действием *in vitro* в отношении *Entamoeba histolytica* за счет своей способности связывать липиды на мембране трофозоида, вызывая разрушение мембраны и повреждение паразита (González-Chávez et al., 2009).

Напротив, некоторые паразиты, такие как *Trichomonas*, способны извлекать пользу из связывания лактоферрином железа и использовать его в качестве донора ионов железа, что увеличивает жизнеспособность и инфекционность данного паразита (Tachezy et al., 1996). LF также демонстрирует аддитивную или синергическую активность с клинически используемыми противопаразитарными соединениями (Cirioni et al., 2000).

1.8.3. Противовирусная активность

Показано, что LF обладает противовирусной активностью против широкого спектра РНК- и ДНК-содержащих вирусов (Van der Strate et al., 2001). Связывание лактоферрином различных антигенов вирусной природы было показано преимущественно *in vitro*. Его противовирусная активность направлена как против оболочечных, так и против безоболочечных вирусов (Berlutti et al., 2011).

Известно несколько механизмов противовирусной активности LF. Одним из механизмов, описанном в 2000 году Ikeda с соавторами (Ikeda et al., 2000), является связывание LF непосредственно с самим вирусом, а не с клеткой хозяина. Такой механизм характерен для вируса простого герпеса,

цитомегаловирусов человека, вируса гепатита С (Adlerova et al., 2008). Таким образом, LF препятствует взаимодействию вируса с клеткой, попаданию его внутрь клетки и предотвращает развитие инфекции на ранней стадии (Ward et al., 2005; González-Chávez et al., 2009).

Локализация LF в ядре различных эпителиальных клеток человека позволяет предположить, что он оказывает свое действие не только на ранней стадии поверхностного взаимодействия между вирусом и клеткой, но и внутриклеточно (Berlutti et al., 2011).

Наиболее широко распространенная гипотеза о противовирусной активности LF заключается в том, что он способен связываться с анионными вирусными рецепторами гликозаминогликанов (в особенности с гепаран сульфатом) и блокировать их (Рис. 1.9). Связывание LF с вирусными рецепторами предотвращает первый контакт между вирусом и клеткой-хозяином, тем самым предотвращая инфекцию. LF способен ингибировать процесс репликации вирусов в зараженных клетках (вирус гепатита С, ВИЧ) (González-Chávez et al., 2009).

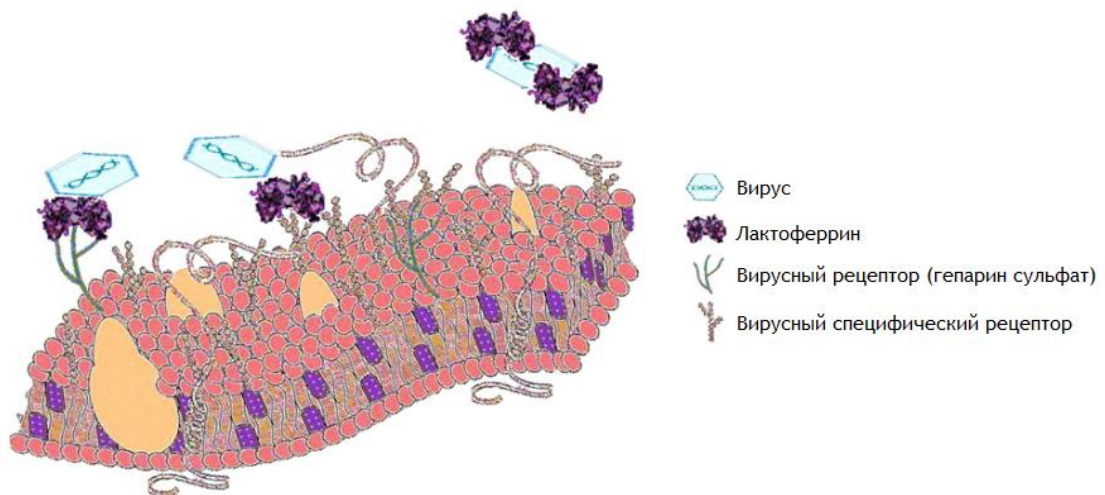


Рисунок 1.9 — Механизм противовирусного действия LF
[Gonzalez-Chavez et al., 2009]

Установлено, что LF регулирует иммунную систему за счет регуляции синтеза НК-клеток, гранулоцитов и макрофагов, которые играют решающую роль на ранних стадиях инфицирования (Farnaud et al., 2009).

Сообщалось, что насыщение LF металлами (железом, цинком или марганцем) предотвращает прикрепление ряда вирусов, таких как полиовирус, вирус простого герпеса (ВПГ) и ВИЧ, к клеткам хозяина. Кроме того, было показано, что LF, конъюгированный с цинком, ингибирует репликацию вируса даже при введении в организм после заражения (Van der Strate et al., 2001). Однако другие исследования показали, что апо-форма LF была более эффективна в ингибировании репликации ротавируса, чем насыщенная металлами форма (Florjan et al., 2009).

LF оказывает лечебное действие при респираторных заболеваниях, гриппе, вирусном гастроэнтерите. Было показано, что LF проявляет ингибирующую активность в отношении SAR-CoV-1, предотвращая прикрепление вируса, блокируя связывание шипового белка с клетками хозяина, тем самым формируя механизм защиты. LF также повышал врожденный иммунитет за счет усиления активности естественных клеток-киллеров, агрегации и адгезии нейтрофилов (Lang et al., 2011).

В последнее время особое внимание уделяется возможному терапевтическому эффекту LF в качестве лекарства от COVID-19 (Naidu et al., 2020).

1.8.4. Антигрибковая активность

Грибковые инфекции часто сопровождают развитие различных вирусных инфекций, злокачественных опухолей и других заболеваний, которые сопровождаются ослаблением иммунной системы. LF обладает антигрибковой активностью в отношении целого ряда грибковых патогенов человека и растений, включая грибы и плесень. Наиболее широко изучена его активность на представителях вида *Candida*, причем у *Candida tropicalis*, *Candida krusei* и *Candida albicans* самый высокий уровень восприимчивости к LF, а у *Candida glabratah* — самый низкий (Wang et al., 2019).

Установлено, что LF и лактоферрицин *in vitro* ингибируют рост *Trichophyton mentagrophytes* — грибка, который вызывает ряд кожных

заболеваний, к примеру, стригущий лишай. Лечение морских свинок, инфицированных *Trichophyton mentagrophytes*, лактоферрином из молока коровы приводило к снижению грибкового поражения на коже спины и конечностей (Wakabayashi et al., 2000).

В 2003 году Takakura с соавторами показали, что введение LF с питьевой водой мышам с ослабленным иммунитетом и симптомами стоматита приводит к снижению численности *Candida albicans* в полости рта и уменьшает область повреждений на языке (Takakura et al., 2003).

Ранние исследования объясняли противогрибковый эффект LF его способностью связывать железо (Kirkpatrick et al., 1971; Zarembek et al., 2007). Сообщалось, что связывание железа с апо-формой LF было необходимо для защиты хозяина от *Aspergillus fumigatus* (Zarembek et al., 2007). Опираясь на результаты более поздних исследований, сегодня предполагают, что противогрибковое действие LF не зависит от железа и опосредовано прямым взаимодействием LF с поверхностью грибковых клеток, повреждающим клеточные мембраны и повышающим их проницаемость, вызывая клеточную гибель (Fernandes et al., 2017).

Сообщалось, что противогрибковая активность LF в значительной степени ниже, чем активность коммерческих противогрибковых препаратов. Однако, комбинированное использование LF и некоторых коммерческих препаратов, таких как флюконазол, клотримазол, амфотерицин В и 5-фторцитозин, демонстрирует синергический эффект (Jenssen et al., 2009). Было показано, что LF в сочетании с флюконазолом обладает противогрибковой активностью в отношении устойчивых к флюконазолу штаммов *Candida albicans*, являющегося основным грибковым патогеном у пациентов с иммунодефицитом. В частности, ВИЧ-инфицированным пациентам с *Candida albicans*, устойчивым к противогрибковым препаратам, удалось полностью излечиться от грибковой инфекции после введения смеси LF, лизоцима и интраконазола (Masci et al., 2000).

Также было показано, что LF может опосредовать свою противогрибковую активность через стимуляцию иммунных механизмов клеток-хозяина как *in vitro*, так и *in vivo*. Предполагается, что важную роль в противогрибковой активности LF играют его иммуномодулирующие свойства: активация природных киллеров, цитокинов, Т-клеток и фагоцитарной активности нейтрофилов (Yamaguchi et al., 2004).

1.8.5. Противоопухолевая активность

В 1970–80-х годах LF приписывали множество различных функций, включая антибактериальные, антимикробные и иммуномодулирующие, однако, только в 1994 году J. Bezault с коллегами публикуют убедительные данные о противораковой активности LF человека на мышинной модели фибросаркомы и меланомы (Bezault et al., 1994). В частности, было показано, что внутрибрюшинное введение LF человека ингибирует как рост солидной опухоли, так и метастазирование в легкие, независимо от уровня насыщения белка железом. В 1995 году было установлено, что LF может значительно ингибировать развитие опухолей толстой кишки у крыс, получавших диметилгидразин (DMH) (McIntosh et al., 1995). Таким образом, в середине 1990-х годов ученые начинают изучать новую немаловажную роль LF — противоопухолевую.

В настоящее время показано, что LF человека и LF коровы оказывают противораковую активность как при профилактике, так и при лечении опухолей (Zhang et al., 2014; Tsuda et al., 2010).

Прямое ингибирование клеточного роста является одним из механизмов, с помощью которого LF способен подавлять рост опухоли. Эксперименты показали, что LF в некоторых типах опухолевых клеток стимулирует апоптоз и ингибирует пролиферацию (Damiens et al., 1999; Matsuda et al., 2007), блокируя переход из фазы G₁ в S фазу. Предполагается, что LF ингибирует рост клеток карциномы молочной железы именно за счет

остановки клеточного цикла на стадии G_1 , поскольку именно тогда он ингибирует циклин-зависимые киназы, увеличивая уровень ингибитора клеточного цикла p21, а также поддерживает pRb в гипофосфорилированной форме (Damiens et al., 1999).

Показано, что LF коровы оказывает ингибирующее действие на рост плоскоклеточного рака ротовой полости в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл, индуцируя активацию гена белка p53, являющегося транскрипционным фактором, регулирующим клеточный цикл. Выяснилось, что LF коровы избирательно действует на раковые клетки, останавливая клеточный цикл в фазе G_1/S и вызывая апоптоз, не затрагивая при этом кератиноциты здоровых тканей ротовой полости (Chea et al., 2018).

В экспериментах на клетках рака молочной железы установлено, что рекомбинантный LF человека способен эффективно ингибировать рост как клеток, не дающих метастазы, так и метастазирующих, за счет остановки клеточного цикла в S-фазе. Было показано, что инкубация опухолевых клеток с LF приводит к блеббингу плазматической мембраны, конденсации хроматина и фрагментации ДНК, что является характерными признаками апоптоза клеток (Iglesias-Figueroa et al., 2019).

Рекомбинантный LF человека в экспериментах на культуре клеток плоскоклеточного рака головы и шеи индуцировал дозозависимое торможение роста карциномы за счет остановки роста на стадиях G_0/G_1 . В модели *in vitro* было показано, что LF ингибирует высвобождение из клеток провоспалительных и прометастатических цитокинов, таких как IL-6, IL-8, GM-CSF и TNF- α . LF вызывал и поддерживал клеточную активацию NF- κ B в течение 4 ч после воздействия. Введение LF с питьевой водой мышам с подкожно имплантированными клетками SCCVII ингибировало рост опухоли на 75 % по сравнению с животными контрольной группы. Методом иммуногистохимического анализа было показано 20-кратное увеличение количества лимфоцитов внутри опухоли у мышей, получавших LF (Wolf et al., 2007).

В исследовании *in vitro* опухолевых клеток молочной железы собаки, инкубированных с LF коровы, было продемонстрировано угнетение пролиферации раковых клеток за счет остановки роста на стадии G₁ в сравнении с нормальными клетками (Yamada et al., 2008).

В клетках остеосаркомы LF из молока коровы подавлял экспрессию IL-1 β , IL-6, RANKL и фосфорилирование p65 транскрипционного фактора NF- κ B (Chea et al., 2019).

Нейтрофильный LF способен активировать синтез ракового онкосупрессора p53 по NF- κ B-зависимому пути (Oh et al., 2004).

Считается, что LF увеличивает содержание Fas в слизистой оболочке толстой кишки как на ранних, так и на поздних стадиях роста опухоли. Избирательно повышенная концентрация Fas увеличивает способность клеток-мишеней к связыванию с Fas-лигандом, экспрессируемым на поверхности NK-клеток, и индуцирует апоптоз (Fujita et al., 2004). В индукции апоптоза в клетках рака толстой кишки более эффективен LF, насыщенный селеном и железом (Dinayadura et al., 2009).

Важно отметить также, что, помимо описанных выше механизмов, LF обладает антиангиогенной активностью, которая подавляет рост опухолей. Ранние исследования на грызунах показали, что LF может ингибировать процесс ангиогенеза (Shimamura et al., 2004; Norrby et al., 2001).

Одним из молекулярных механизмов противоопухолевого действия LF, лежащим в основе его селективной противоопухолевой активности, является ингибирование V-АТФазы. V-АТФаза — протонный насос, критически важный для клеточного гомеостаза, обычно присутствующий во внутриклеточных компартментах. Однако, в раковых клетках из сформировавшихся метастазов V-АТФ-азы также присутствуют на плазматической мембране и обеспечивают кислотное микроокружение опухоли, играя ключевую роль в инвазии и метастазировании. Показано, что LF из молока коровы ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз, а также нарушает подкисление лизосом в линиях раковых клеток с

высокой степенью метастазирования, демонстрирующих плазмалеммальную V-АТФазу (Guedes et al., 2018).

Эксперименты *in vivo* показали, что LF эффективно защищает организм от вызываемого химическими канцерогенами развития опухолей и метастазов в различных органах, включая легкие, печень, кишечник, мочевой пузырь, язык, пищевод и молочные железы (Tsuda et al., 2005; Ward et al., 2005). При одновременном применении с канцерогенными гетероциклическими аминами или вскоре после окончания их введения LF предотвращает образование опухолей в толстой кишке и печени, возможно, путем ингибирования активности цитохрома P450 1A2 (CYP1A2) (Tsuda et al., 1998; Fujita et al., 2002; Tsuda et al., 2004). Однако, эксперименты на опухоли молочной железы, индуцированной 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридином, не выявили защитного действия LF. Это позволяет предположить, что эффект LF является ткане- и органоспецифичным (Haba et al., 2004).

Противоопухолевой активностью в условиях *in vitro* и *in vivo* обладают и пептиды, полученные из катионной области LF. И LF, и продукт его кислотного пепсинового гидролиза — лактоферрицин, оказались эффективными против рака молочной железы, рака легких, лейкоза и колоректального рака (Gifford et al., 2005).

Противодействие образованию опухолей толстой кишки под воздействием азоксиметана у крыс и метастазированию карциномы после ее трансплантации мышам вероятно связано с цитотоксическим действием LF коровы и его фрагмента лактоферрицина. Полагают, что механизмом противоопухолевой активности LF является повышение содержания каспазы-1 и IL-18 в клетках тонкой кишки, а также стимуляция цитотоксической активности Т- и НК-клеток. В клинических испытаниях было выявлено, что у пациентов, которые ежедневно на протяжении года принимали LF из молока коровы, наблюдалась значимая задержка роста колоректальных аденоматозных полипов, по сравнению с группой плацебо. Целостный LF

препятствует малигнизации полипов прямой кишки, т.е. превращению их из доброкачественной опухоли в злокачественную (Kozu et al., 2009).

Антиметастатические эффекты были обнаружены при интрагастральном введении LF коровы мышам с высокометастатической карциномой толстой кишки (Co 26Lu). Было показано, что пероральное введение LF коровы приводит к значительному увеличению CD4+, CD8+ и NK-клеток в крови мышей и усиливает антиметастатическую активность (Iigo et al., 1999).

Содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов и NK-клеток у мышей с опухолью при введении им LF коровы увеличивалось также в лимфоидной ткани и пластинках тонкой кишки. В собственной пластинке тонкой кишки LF также вызывал увеличение IgM+ и IgA+ В-лимфоцитов. Кроме того, в клетках, обработанных LF коровы, повышается уровень IL-18, а также происходит индукция интерферона- γ (IFN- γ) и каспазы-1, что может играть значительную роль в стимуляции иммунной системы (Wang et al., 2000; Iigo et al., 2004).

Эксперименты по изучению влияния LF на развитие карциномы Эрлиха у мышей (модель карциномы молочной железы) показали, что его системное введение *per os* ингибировало развитие опухоли. При этом наблюдались положительные сдвиги состояния антиоксидантной и иммунной систем: уменьшение перекисного окисления белков и усиление антиоксидантной защиты; восстановление уровня IL-1 β и TGF β 1 при увеличении в сыворотке крови TNF- α (Zalutsky et al., 2017).

Кроме «прямого» противоракового действия, доказанного, по большей части, в опытах на животных, LF, по-видимому, способен оказывать положительное влияние на организм после курса химиотерапии, учитывая, что он уменьшал нефротоксичность цисплатина у крыс (Kimoto et al., 2013).

Показано, что степень насыщения железом влияет на противораковые свойства LF. Мнение о том, что степень насыщения LF железом влияет на его противоопухолевую активность не высказывалось до 2008 года, когда

Kanwar с коллегами сообщили, что холо-форма LF при пероральном введении мышам проявляет цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Было отмечено, что как апо-, так и холо-форма LF, введенная в рацион мышей с лимфомой EL-4, приводила к восстановлению иммунной системы после завершения химиотерапии (паклитаксел/доксорубин) и к большему противоопухолевому эффекту. Результатом стало восстановление животных после химиотерапии: было зарегистрировано увеличение количества эритроцитов, лейкоцитов, TNF и IFN- γ . Насыщенный железом LF проявлял больший онкотоксический эффект в сравнении с апо-формой LF: холо-форма LF уменьшала васкуляризацию и приток крови к опухоли (Kanwar et al., 2008).

Показано, что холо-форма LF приводит к усилению ферроптоза — железозависимой формы программированной гибели клеток, ключевыми двигателями которой являются активные формы кислорода (АФК), образующиеся в ходе реакции Фентона (Dixon and Stockwell, 2012). В экспериментах на культуре клеток MDA-MB-231 насыщенный железом LF приводил к увеличению общего содержания железа, способствовал образованию АФК и усиливал ферроптоз. Наряду с этим холо-форма LF подавляла экспрессию HIF-1 α . Апо-форма LF, напротив, приводила к увеличению выработки восстановленного глутатиона (GSH) и ингибировала ферроптоз (Zheng et al., 2020).

Показано, что применение LF перед химиотерапией подавляет рост опухолей и усиливает терапевтический эффект. Добавление 0,5 % LF коровы в питьевую воду мышам, которым вводили циклофосфамид и метотрексат, нормализует состояние мембран клеток и функции иммунной системы. LF также эффективен в профилактике фиброзов на фоне терапии рака. После добавления 0,1 % LF коровы в рацион мышей выживаемость после сублетального облучения увеличивается в 1,5 раза, а после ежедневного интраперитонеального введения 4 мг белка в течение месяца выживаемость повышалась в 2 раза. Имеются данные, свидетельствующие о системном

влиянии LF на организм. При перевивке плоскоклеточной карциномы нормальным мышам ее рост ингибировался при введении LF, однако, в случае с иммунодефицитными мышам торможения роста не наблюдалось (Wolf et al., 2007). Аналогичная закономерность была получена при перевивке метастазирующей опухоли кишечника нормальным и бестимусным мышам (Зорина, 2019).

При рассмотрении LF в качестве лекарственного препарата следует учесть его важную особенность: LF способен проходить через гематоэнцефалический барьер. Эта способность LF была использована при создании магнитных наночастиц для тераностики опухолей мозга (Fillebeen et al., 1999; Kamemori et al., 2008).

1.9. Комплексы LF с противоопухолевыми веществами

В настоящее время для лечения злокачественных опухолей широко используются комплексы, созданные на основе взаимодействия LF с противоопухолевыми лекарственными средствами (Kumari et al., 2017). Конъюгация с макромолекулами приводит к постоянному высвобождению лекарственного средства, а также к повышению растворимости в водной среде гидрофобных молекул лекарственного средства (Dosio et al., 1997). Многие тестируемые препараты (темозоломид, 5-фторурацил, гемцитабин и др.) имеют большой противораковый потенциал, однако, большинство из них обладает низкой селективностью к опухолям, что приводит к высокой токсичности для нераковых клеток (Greish et al., 2010).

1.9.1. Комплекс лактоферрина с куркумином

Куркумин (Cur) — природный полифенол, который обладает антиоксидантными (Sharma et al., 1976; Ruby et al., 1995; Sugiyama et al., 1996), противовоспалительными (Srimal et al., 1973), антимикробными

(Mahady et al., 2002), противоопухолевыми (Kuttan et al., 1985) и химиопротекторными свойствами. Первая фаза клинических исследований показала, что Cur нетоксичен и может применяться даже в высоких дозах (12 г/сут), но в то же время он проявляет низкую биодоступность (Popat et al., 2014). Полагают, что основными причинами низкого содержания Cur в плазме крови, являются плохое всасывание и быстрая элиминация (Anand et al., 2007). К тому же терапевтический потенциал Cur ограничен его недостаточной растворимостью в воде (10–20 мг/мл). Однако, несмотря на низкую биодоступность, описана терапевтическая активность Cur в отношении различных заболеваний, включая рак, заболевания сердечно-сосудистой системы, рассеянный склероз, сахарный диабет II типа, атеросклероз, болезнь Альцгеймера (García-Alloza et al., 2007), болезнь Паркинсона (БП), артрит, неврологические заболевания и болезнь Крона (Mythri et al., 2012).

В последние годы изучению Cur как природного противоопухолевого агента уделялось большое внимание. Особенно актуальными представляются исследования, направленные на конъюгацию куркумина с веществами, которые способны доставить противоопухолевый агент к раковой клетке, а также повысить противоопухолевый эффект исходного препарата.

Одним из комплексов является конъюгированная форма LF с Cur. Cur-LF был протестирован на клетках карциномы прямой кишки человека (HCT116). На основании МТТ-теста было показано, что Cur-LF проявлял более высокую цитотоксичность в сравнении со свободным Cur благодаря адресной доставке и повышению растворимости после конъюгации. Методом проточной цитометрии было зарегистрировано, что после обработки комплексом клетки карциномы находились на стадии апоптоза (Chaharband et al., 2018).

1.9.2. Комплекс лактоферрина с темозоломидом

Целенаправленная доставка лекарственных веществ в головной мозг является трудновыполнимой задачей из-за их ограниченной способности проникать через ГЭБ. Злокачественные глиомы составляют 50–60 % всех первичных опухолей центральной нервной системы. Прогноз лечения пациентов с такими образованиями неблагоприятный, а качество жизни больных снижается вследствие тяжелых неврологических нарушений и осложнений на фоне применяемой терапии (Yukalchuk et al., 2016). Было установлено, что темозоломид (TMZ) является наиболее эффективным препаратом при лечении злокачественных глиом (Koukourakis et al., 2009). TMZ — противоопухолевый алкилирующий препарат, механизм действия которого заключается в присоединении метильной группы к ДНК, что приводит к нарушению структуры последней и гибели клетки (Stupp et al., 2005). Показано, что применение TMZ на ранних стадиях развития опухоли в сочетании с химиолучевой терапией увеличивает выживаемость пациентов и продлевает срок до начала прогрессирования опухоли (Yukalchuk et al., 2016).

Однако длительная терапия с использованием этого препарата приводит к резистентности и плохой восприимчивости при дальнейшем лечении (Zhang et al. 2012), а также к рецидиву опухоли у 60–75 % пациентов (Chamberlain et al., 2010; Veier et al., 2011). Кроме того, TMZ требует непрерывного введения из-за его плохой растворимости в физиологических средах и короткого периода полувыведения из плазмы (1,8 ч) (Newlands et al., 1992), а более высокие дозы препарата приводят к появлению различных токсических эффектов: гематологической токсичности, гепатотоксичности, острой кардиомиопатии, что вынуждает прекращать терапию (Huang et al., 2008; Verrocal et al., 2010; Kim et al., 2015).

Ограничения, связанные с применением TMZ, указывают на необходимость повышения терапевтического индекса препарата путем конъюгации с носителями, которые будут способствовать адресной доставке TMZ и повышению его растворимости. В 2015 году Antonietta Arcella с коллегами занялись изучением влияния LF человека на клетки глиомы. Исследователи проверили влияние LF отдельно и в сочетании с TMZ на двух первичных клеточных линиях (NMD и FN), полученных непосредственно из биоптатов от пациентов и на культуре опухолевых клеток глиобластомы человека U87MG. В эксперименте *in vitro* было показано, что все испытанные дозы LF человека (1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1 мг/мл) вызывают торможение роста глиобластомы примерно на 30 %. Также наблюдалось снижение экспрессии циклина D1, D4 и снижение фосфорилирования белка ERK1/2. Предположительно причиной ингибирования роста является остановка клеточного цикла в фазе G₀/G₁. Введение LF с TMZ усиливало эффект химиотерапии как *in vitro*, так и *in vivo*. Эта гипотеза была также подтверждена методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting): длительная инкубация (24, 48, 72 часа) клеточных культур U87MG и NMD с LF человека приводила к увеличению клеток в премитотической фазе G₀/G₁ и фазе G₂. В эксперименте на мышах, получавших LF, было зарегистрировано снижение массы опухоли на 30 % по сравнению с контрольной группой животных, о чем свидетельствовал как объемный анализ гистологических срезов, так и реконструкция объемных изображений магнитно-резонансной томографии (МРТ). У мышей, получавших LF, также наблюдалось заметное уменьшение отека: края опухоли становились более заметными. Этот эффект может быть использован в качестве предоперационного лечения, когда крайне важно наблюдать четкие границы опухоли. LF, применявшийся в сочетании с TMZ, потенцировал его эффект, ингибируя рост опухолевых клеток *in vitro* во всех тестируемых клеточных линиях. В исследованиях на мышах, получавших комбинированное лечение, наблюдалось увеличение продолжительности

жизни по сравнению с группой животных, которые получали отдельно TMZ (Arcella et al., 2015).

В 2017 году Sonali Kumari также делает вывод о том, что LF является одним из перспективных белков для лечения злокачественных глиом (Kumari et al., 2017). Известно, что рецепторы LF экспрессируются в клетках глиомы и на эндотелиальных клетках мозга (Huang et al., 2007; Mehra et al., 2013; Fang et al., 2014; Su et al., 2014). Группа ученых показала, что наночастицы, полученные конъюгацией LF с TMZ, способны эффективно пересекать ГЭБ и доставлять противоопухолевый агент целенаправленно к опухоли. Кроме того, предполагается, что LF снижает токсические эффекты TMZ. На клеточной культуре мышинной глиомы GL261 было показано, что клетки, обработанные наночастицами LF-TMZ, приобретают характерные морфологические признаки апоптоза. Также наблюдалось значительное уменьшение количества клеток, в сравнении со свободным TMZ. IC_{50} в случае TMZ-LF уменьшилась в 10 раз, в сравнении со свободным TMZ, что может быть связано с увеличенным внутриклеточным удержанием лекарственного препарата. На модели внутричерепной ортотопической глиомы у мышей была показана более чем 3-х кратная кумуляция TMZ в опухоли при доставке с помощью наночастиц, что может быть связано с повышенной проницаемостью ГЭБ для комплекса TMZ-LF. Использование комплекса TMZ-LF приводило к значительному уменьшению объема опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей с глиомой. (Kumari et al., 2017).

В настоящее время дозировка TMZ ограничена риском развития миелосупрессивного эффекта (Sengupta et al., 2012). При доставке TMZ с помощью LF не наблюдалось каких-либо изменений в гематологических параметрах. Результаты, описанные Sonali Kumari, показывают, что использование наночастиц LF-TMZ приводит к улучшению доставки лекарственного вещества через ГЭБ к опухоли, повышению концентрации TMZ внутри клеток и накоплению препарата в головном мозге. Конъюгация

с LF может привести к снижению дозировки TMZ и уменьшению общих побочных эффектов во время лечения, а также препятствовать развитию лекарственной устойчивости (Kumari et al., 2017).

1.9.3. Комплекс лактоферрина с 5-фторурацилом

5-фторурацил (5-FU) — один из препаратов, которые широко используются для лечения солидных опухолей, в том числе рака желудка, печени, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, молочной железы, меланомы. Это фторированный аналог пиримидинового основания урацила, который внутриклеточно преобразуется в его активную форму — 5-фтордезоксифуридин монофосфат, нарушающий синтез и функционирование ДНК и РНК опухолевых клеток. Эта активная форма 5-FU ингибирует активность тимидилатсинтазы (ТС) — фермента, являющегося одним из наиболее известных и важных мишеней для противоопухолевой терапии. ТС катализирует превращение уридина в тимидин и относится к основным ферментам, контролирующим репликацию ДНК (Longley et al., 2003).

5-FU широко используется при лечении меланомы, однако, он характеризуется тяжелой системной токсичностью (Di Paolo et al., 2001; Di Paolo et al., 2002). 5-FU малорастворим в воде, его биодоступность значительно ограничена в крови, печени и других органах в связи с быстрым метаболизмом под действием дигидропиримидиндегидрогеназы. 5-FU имеет период полураспада в плазме 8 ч 20 мин (Heggie et al., 1987). Эффективность 5-FU, как и всех антиметаболитов, зависит от возможности создания длительной терапевтической концентрации, однако его весьма высокая токсичность ограничивает длительность приема.

В 2017 году коллектив исследователей во главе с Kumari продемонстрировали усиление противоопухолевого эффекта 5-FU путем создания наночастицы на основе LF, предназначенной для эффективного лечения меланомы. В экспериментах *in vitro* на культуре мышинной меланомы

B16F10 было установлено, что 5-FU-LF усиливает цитотоксичность в 2,7 раза в сравнении со свободным 5-FU (Kumari et al., 2017).

Годом позже Kumari с коллегами описывают антипролиферативный эффект наночастиц 5-FU-LF в отношении клеток аденокарциномы толстой кишки человека (Colo-205) и создают новую наночастицу на основе LF, нагружая ее оксалиплатином. Обе наночастицы демонстрировали выраженный эффект в отношении клеток Colo-205 как *in vitro*, так и *in vivo*. МТТ-анализ показал, что в комплексе с LF в несколько раз увеличивается антипролиферативная активность обоих препаратов. Исследования клеточной локализации показали, что свободные лекарственные средства быстро проникают в клетки и также быстро выводятся, по-сравнению с наночастицами. Исследования на крысах демонстрируют улучшенные показатели фармакокинетики, повышение терапевтической эффективности и снижение токсичности наночастиц LF (Ahmed et al., 2018).

1.10. Олеиновая кислота

Жирные кислоты (ЖК) являются основными компонентами триацилглицеридов, фосфолипидов и других сложных липидов. Основная метаболическая роль ЖК заключается в том, что они являются источником энергии в результате их β -окисления. ЖК являются также компонентами фосфолипидов и гликолипидов биологических мембран.

Олеиновая кислота (C18:1:9 *cis*; 9-*cis*-октадиеновая) — наиболее распространенная в природе мононенасыщенная жирная кислота, концентрация которой в молоке составляет 8 г/л (Polidori et al., 2013). ОА состоит из 18 углеродных атомов (Рис. 1.10) и имеет одну двойную связь в положении $\Delta 9$ (между 9-м и 10-м атомами углерода). Практически во всех ЖК двойные связи находятся в *cis*-конформации, что приводит к сильному изгибу углеводородной цепи под углом приблизительно 30° . Остальные

связи в цепи одинарные и относительно них возможно свободное вращение (Ленинджер, 1985).

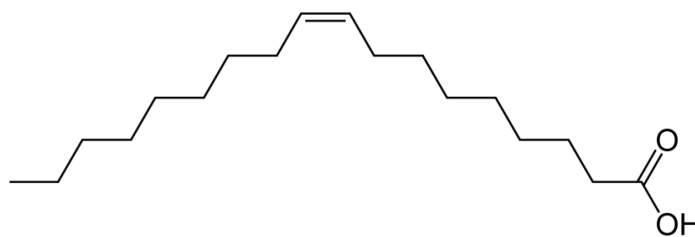


Рисунок 1.10 — Химическая структура ОА

В нормальных условиях *in vivo* неэтерифицированные ЖК связаны с мембранами либо с белками. В настоящее время благодаря методам рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ядерного магнитного резонанса известна детальная информация о центрах связывания ЖК во многих белках.

1.11. Комплексы белков молока с жирными кислотами

Комплекс, сформированный между α -лактальбумином и ОА впервые был открыт в 1995 году группой ученых из Лундского университета (Швеция) (Nakansson et al., 1995; Svensson et al., 2000) при изучении влияния α -лактальбумина на антибактериальную активность в отношении штамма *Streptococcus pneumoniae*. Активность этого комплекса была обнаружена при исследовании влияния фракций грудного молока на адгезию бактерий к эпителиальным клеткам респираторного тракта. Оказалось, что помимо блокировки адгезии, одна молочная фракция фактически убивала клетки карциномы, запуская процесс апоптоза (Nakansson et al., 1995). Гибель клеток сопровождалась характерными изменениями морфологии: ядерной конденсацией, образованием апоптотических тел и цитоплазматическим блэббингом. Активный молекулярный комплекс был получен из казеиновой

фракции грудного молока, и после осаждения при низком рН было показано, что он содержит α -лактальбумин (Svensson et al., 1999).

Позднее аналогичные комплексы были получены *in vitro* все той же группой ученых под руководством К. Сванборг при использовании метода ионообменной хроматографии апо-форм α -лактальбумина человека и коровы на колонке, предварительно кондиционированной ОА. В зависимости от видового происхождения α -лактальбумина полученные комплексы были названы HAMLET/BAMLET (**H**uman/**B**ovine **A**lpha-lactalbumin **M**ade **L**ethal to **T**umor cells).

Позже появились предположения относительно способности других белков образовывать онкотоксические комплексы при взаимодействии с ОА, и было показано, что, подобно HAMLET, ряд белков способен при образовании комплекса с жирной кислотой запускать механизмы программируемой гибели раковых клеток (Mossberg et al., 2010). Примерами таких комплексов являются BAMLET (Pettersson et al., 2006; Spolaore et al., 2010; Liskova et al., 2010; Tolin et al., 2010; Brinkmann et al., 2011), BLAGLET (Liskova et al., 2011; Fang et al., 2015), ELOA (Wilhelm et al., 2009; Vukojević et al., 2010), GAMLET, CAMLET (Atri et al., 2011), LIMLET (Jung et al., 2016) и другие комплексы ОА, например с парвальбумином щуки (Permyakov et al., 2012), LF коровы (Fang et al., 2014), IgG (Hoque et al., 2011).

Вероятно, способность образовывать подобные комплексы является общей чертой частично развернутых белков, которые имеют достаточное количество гидрофобных контактов для связывания жирной кислоты.

В таблице 1.2 представлены некоторые из способов получения цитотоксических комплексов белок-ОА.

Таблица 1.2. Различные способы получения цитотоксических комплексов белок-ОА [Адаптирована из статьи Brinkmann et al., 2013].

Метод	Эксперимент	Белок	Соотношение ОА к белку
Ионообменная хроматография	Апо-форма белка (полученная путем удаления Ca^{2+} с помощью ЭДТА) наносится на смолу для хроматографии, предварительно кондиционированную ОА и затем элюируется градиентом соли (NaCl)	α -ЛА лизоцим лошади	~ 1–5 ОА 5–35 ОА
Щелочной метод	Инкубация белков с ОА при 45 °С, рН=12, в присутствии ЭДТА. Удаление избытка ОА путем кислотного осаждения и последующим диализом	α -ЛА β -лактоглобулин парвальбумин щуки	4,5 ОА 17 ОА 13 ОА
Прямое титрование 1	Титрование ОА (в этанольном растворе) с ЭДТА рН=8,3 в 150 мМ NaCl	α -ЛА	18 ОА/ α -ЛА (45 °С) (~ 9 ОА остается после диализа)
Метод	Эксперимент	Белок	Соотношение ОА к белку
Термическая обработка 1	Растворение α -ЛА (без ЭДТА) в NaCl / P_i , добавить ОА в 120-кратном избытке, нагревание при 50–60 °С в течение 10 мин (инкубация при 70–80 °С снижает апоптотическую активность)	α -ЛА	Стехиометрия не определена
Термическая обработка 2	Растворение α -ЛА (без ЭДТА) в NaCl / P_i , добавление олеата натрия непосредственно в 2,5–15-кратном молярном избытке, нагревание при 60 °С в течение 30–60 мин	α -ЛА β -лактоглобулин	2,5–10
Кислотная обработка	Инкубация α -ЛА с ОА при 37 °С при рН 4,3	α -ЛА	Стехиометрия не определена

1.11.1. HAMLET

Наиболее изученным на данный момент среди комплексов белков молока с ОА, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, является HAMLET, который показал терапевтический эффект как в экспериментах *in vivo* (Svanborg et al., 2003; Casbarra et al., 2004; Mossberg et al., 2010; Xiao et al., 2013), так и в клинических испытаниях (Gustafsson et al., 2004). Комплекс HAMLET привлек значительное внимание исследователей благодаря своей способности эффективно и специфично убивать опухолевые клетки и воздействовать на антибиотикочувствительные и антибиотикорезистентные штаммы *Streptococcus pneumoniae* (Hakansson et al., 2000; Svensson et al., 2002; Svanborg et al., 2003; Mok et al., 2007; Mossberg et al., 2010; Mossberg et al., 2010; Hakansson et al., 2011).

На данный момент обнаружено более 60 линий опухолевых клеток, чувствительных к этому комплексу. Использование HAMLET в терапии рака представляется весьма перспективным и эффективным, учитывая положительные результаты, полученные на моделях *in vivo*: ксенотрансплантата глиобластомы человека у крыс, модели рака толстой кишки у крыс, внутривенной инокуляции пациентам с раком мочевого пузыря и местного лечения папиллом кожи.

Возможности будущего лечения злокачественных опухолей головного мозга с помощью HAMLET были описаны Фишером (Университетская больница Бергена, Норвегия). Терапевтическая эффективность комплекса была изучена в экспериментах на крысах, после ксенотрансплантации им глиобластомы человека (GBM). Местные инфузии HAMLET замедляли развитие опухоли: попадая в опухоль, комплекс вызывал апоптоз, тормозил развитие роста опухолей и увеличивал продолжительность жизни животных. Важно отметить, что комплекс не проявлял токсичности в отношении неопухолевых клеток (Fischer et al., 2004).

Пероральное введение HAMLET крысам с раком толстой кишки вызывало значительное уменьшение размеров опухолей и снижение количества полипов. Кроме того, было замечено, что комплекс способен избирательно накапливаться в опухолевой ткани. После его введения значительно уменьшалась экспрессия ключевых онкопротеинов, включая β -катенин, Ki-67, COX2 и VEGF. Токсического воздействия на здоровые ткани также не наблюдалось (Puthia et al., 2014).

В клинических испытаниях (Университетская больница Лунда, Швеция) пациенты с поверхностным раком мочевого пузыря получали инъекции HAMLET локально, в мочевой пузырь, в течение пяти дней подряд до плановой операции. Комплекс стимулировал выведение большого количества опухолевых клеток в мочу уже в первые два часа после инъекции, большинство клеток были мертвыми, с признаками апоптоза. Методом цистоскопии было зарегистрировано уменьшение размеров опухоли, а в биоптатах, как и в моче, было обнаружено большое количество апоптотических клеток (Mossberg et al., 2007).

Было показано, что введение комплекса HAMLET мышам приводит к торможению роста опухолевых клеток с перевитой карциномой мочевого пузыря (MB49) и уменьшению размера опухолей. В экспериментах *in vitro* также показано дозозависимое снижение жизнеспособности клеток MB49. С помощью TUNEL-анализа — метода, широко применяемого в исследованиях для детекции запрограммированной клеточной гибели, было зарегистрировано, что в клетках, обработанных комплексом HAMLET, происходит повреждение ДНК (Mossberg et al., 2010).

Результаты лечения пациентов с кожными папилломами были изучены и обобщены Густафссоном (Лундский университет, Швеция). Сорок два пациента с тяжелыми, резистентными к традиционной терапии папилломами на руках и ногах были включены в плацебо-контролируемое двойное слепое исследование и получали HAMLET или физиологический раствор ежедневно в течение 3 недель. За это время местное применение комплекса у пациентов

с кожными папилломами значительно снижало объем поражения (более чем на 75 %), а полное устранение всех поражений при лечении в течение 2 лет наблюдалось в 83 % случаях (Рис. 1.11). После первой фазы лечения у пациента №1 наблюдалось полное устранение поражения, а у пациентов №2 и №3 наблюдалось уменьшение объема поражения на 75% и более. Побочных реакций зарегистрировано не было (Gustafsson et al., 2004).

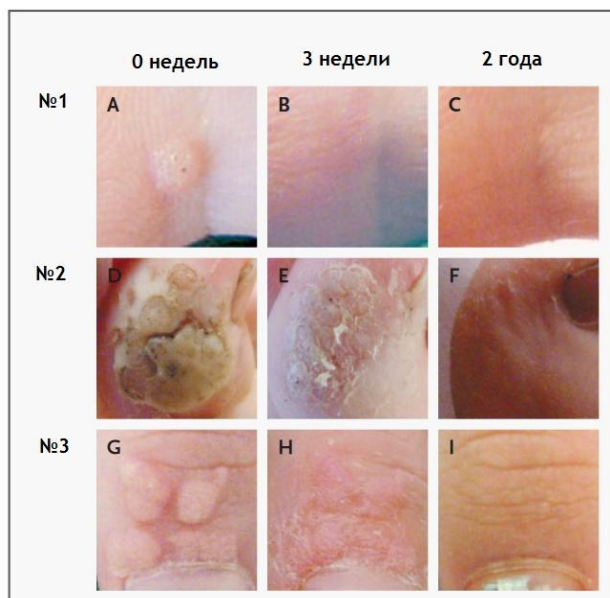


Рисунок 1.11 — Папилломы до и после лечения HAMLET.

Изображение папиллом кожи у трех пациентов. А, D, G — папилломы до начала лечения (при поступлении); В, Е, Н — папилломы после первых трех недель лечения HAMLET; С, F, I — папилломы спустя два года лечения [Gustafsson et al., 2004]

Было показано, что ОА в комплексе с α -лактальбумином также действует на мембраны эритроцитов, что приводит к гемолизу (Hoque et al., 2015; Hoque et al., 2016).

Несмотря на большое количество проведенных экспериментов, точный механизм противоопухолевой активности HAMLET остается неизвестен. К. Сванборг сравнивает комплекс HAMLET с Лернейской гидрой из греческой мифологии. Полагали, что это змееподобное многоголовое чудовище использовало свои многочисленные головы для нападения, и его практически невозможно было уничтожить, так как новые головы появлялись, когда одна была отрезана. HAMLET напоминает Лернейскую гидру с многочисленными головами, т.к. он атакует опухолевые клетки путем прямой инвазии и

взаимодействует независимо с несколькими органеллами (Рис. 1.12). Следовательно, летальный эффект обусловлен множественной атакой на целостность опухолевых клеток (Mok et al. 2007).

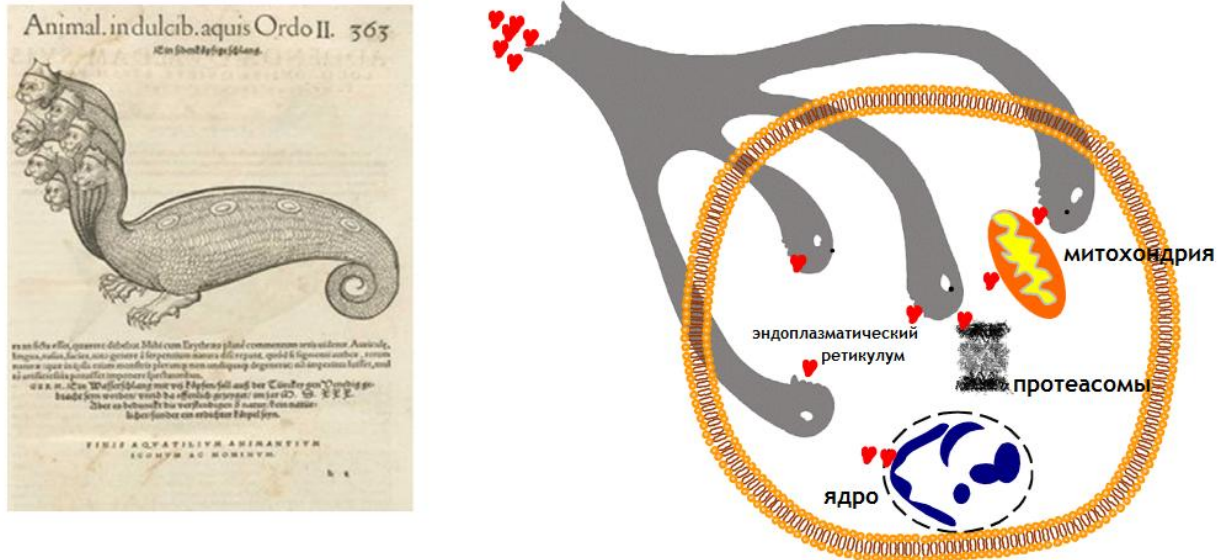


Рисунок 1.12 — HAMLET — биологическая Гидра.

Слева: Лернейская гидра (предлагается в качестве метафоры). Справа: Показано, что HAMLET имеет несколько мишеней в опухолевых клетках: митохондрии, протеасомы, эндоплазматический ретикулум и гистоны в ядрах клеток. Изображение, нарисовано Л. Густафссон [Mok et al. 2007]

Мишени, на которые действует комплекс, расположены как на поверхности клетки (клеточная мембрана, катионные каналы), так и внутри клетки (протеасомы, ядерные гистоны, митохондрии, лизосомы, α -актин, гексокиназы, АТФ-азы и ГТФ-азы) (Рис. 1.13) (Rath et al., 2015).

HAMLET начинает атаку на опухолевые клетки, связываясь с поверхностью. Этот механизм еще до конца не изучен, но показано, что для инвазии необходимы как разворачивание α -лактальбумина, так и присутствие ЖК. Показано, что ОА взаимодействует с фосфатидилсерином и О-гликозилированным муцином — молекулами, которыми обогащена поверхность опухолевых клеток (Halskau et al., 2005).

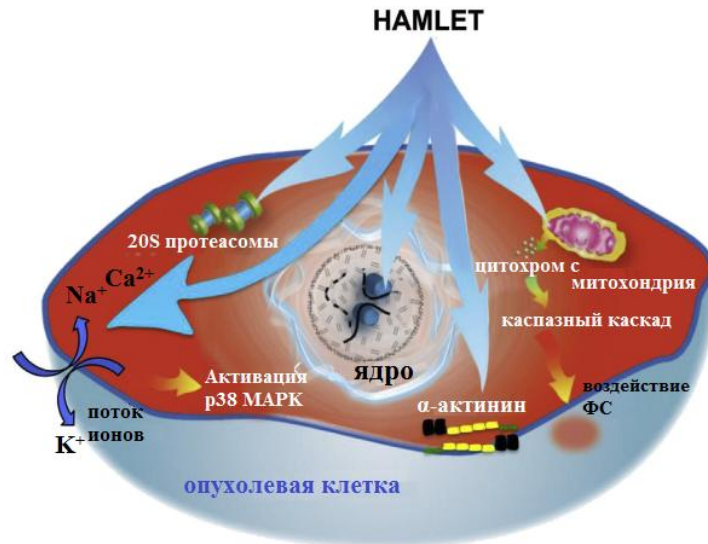


Рисунок 1.13 — Клеточные органеллы, участвующие в HAMLET-индуцированной гибели опухолевых клеток

Точный механизм поступления комплекса в клетку пока окончательно не выяснен. Предполагают, что решающая роль в транспорте HAMLET-подобных комплексов внутрь клетки принадлежит именно ОА (Knyazeva et al., 2008; Zherelova et al., 2009; Spolaore et al., 2010; Tolin et al., 2010; Liskova et al., 2011; Zherelova et al., 2013), которая, обладая собственной цитотоксичностью, инактивирует кальциевые и кальций-активируемые хлорные каналы плазмалеммы (Zherelova et al., 2009; Kataev et al., 2012). Описно, что ОА в концентрации ≥ 100 мкМ разрушает фосфолипидный матрикс мембраны и проникает внутрь клетки (Zherelova et al., 2013).

После попадания HAMLET внутрь опухолевой клетки он в первую очередь транслоцируется в ядро. Накапливаясь в ядре, комплекс взаимодействует с гистонами H2A, H2B, H3 и H4 и подавляет транскрипцию, что в свою очередь приводит к активации опухолевого супрессора p53 (Durringer et al., 2003; Brest et al., 2007).

Существуют данные о том, что цитотоксичность комплекса сопровождается повреждением митохондрий и снижением активности сигнального пути TOR (target of rapamycin), который регулирует рост клеток, деление, подвижность, выживание, синтез белка и транскрипцию. HAMLET активирует митохондриальный путь апоптоза, который сопровождается

выходом цитохрома *c* в цитозоль и активацией каспазного каскада (Aits et al., 2009).

Большинство ранних и некоторые последние исследования приписывают основную роль в цитотоксической активности HAMLET белковому компоненту — α -лактальбумину (Svanborg et al., 2003; Mossberg et al., 2010; Chaudhuri et al., 2016), однако, на сегодня большинство экспериментов указывают на то, что именно ОА является ключевым компонентом и играет первостепенную роль в противоопухолевой активности комплекса (Permyakov et al., 2012; Fontana et al., 2013), а белки выступают лишь в качестве переносчиков водонерастворимых кислот (Brinkmann et al., 2011; Fontana et al., 2013; Wen et al., 2013; Fang et al., 2014; Rath et al., 2015).

Показано, что помимо апоптоза, HAMLET способен также запускать макроаутофагию (Aits et al., 2009).

К. Сванборг с коллегами также провели эксперименты по формированию HAMLET-подобных комплексов с использованием *cis*- и *trans*-, моно- и полиненасыщенных ЖК, чтобы определить, могут ли другие ЖК образовывать аналогичные цитотоксические комплексы. Они показали, что только ОА (C18:1:9 *cis*) и вакцениевая (C18:1:11 *cis*) кислоты в сочетании с α -ЛА убивали раковые клетки, в то время как *trans*- и полиненасыщенные ЖК не обладали таким эффектом. Было установлено, что замена ЖК в составе комплекса приводила к значительным изменениям его цитотоксической активности. Так, C16 и C20 *cis*-ненасыщенные жирные кислоты также способны к формированию комплексов с α -лактальбумином, но их антиканцерогенная активность сильно снижена по сравнению с HAMLET. *Trans*-жирные кислоты с аналогичной длиной цепи и насыщенные жирные кислоты, как было показано, не связываются с α -лактальбумином (Svensson et al., 2003).

HAMLET обладает широким спектром действия и может запускать различные механизмы, которые приводят к гибели опухолевых клеток.

Преимущества этого комплекса как потенциального кандидата на противоопухолевый препарат определяются его способностью специфически проникать в опухолевые клетки, где он запускает несколько путей клеточной гибели, атакуя эндоплазматический ретикулум, митохондрии, нуклеосомы и протеасомы (Mok et al., 2007; Mossberg et al., 2010; Mossberg et al., 2010). Такого рода комплексы, созданные на основе взаимодействия белка и ЖК, представляют интерес в качестве противоопухолевых агентов.

1.11.2. BAMLET

Противоопухолевые свойства комплекса BAMLET на данный момент изучены достаточно подробно. Показано, что комплекс способен убивать опухолевые и недифференцированные клетки, и не оказывает значительного влияния на здоровые дифференцированные клетки.

Комплекс BAMLET проявляет токсическое действие *in vitro* в отношении клеток лимфомы мыши (L1210), карциномы молочной железы человека (MCF7), остеосаркомы человека (U-2-OS) (Rammer et al., 2010) и ряда клеточных линий, аналогично комплексу HAMLET.

In vitro эксперименты показали, что при инкубации эритроцитов человека с BAMLET происходит лизис, степень которого увеличивается с повышением концентрации. Цитотоксическое действие объясняется именно наличием жирной кислоты в комплексе, так как сам по себе белок не вызывает лизиса эритроцитов (Brinkmann et al., 2011).

Комплекс BAMLET оказывает токсическое влияние на клетки уротелиального рака мочевого пузыря человека, вызывая апоптоз (Xiao et al., 2013).

Показано, что α -лактальбумин коровы взаимодействует также с 5-доксистеариновой, стеариновой и пальмитиновой кислотами в растворе (Cawthern et al., 1997; Barbana et al., 2006; Yang et al., 2006), при этом параметры связывания зависят от состояния белка. У апо-формы α -

лактальбумина определен один участок связывания ЖК с константой связывания порядка 10^6 M^{-1} (Barbana et al., 2006). Связывание ЖК с апо-формой α -лактальбумина приводило к снижению термостабильности белка (Wehbi et al., 2005; Yang et al., 2006).

В 2021 году была опубликована статья о противоопухолевом потенциале BAMLET при плоскоклеточном раке полости рта (Sinevici et al., 2021). Цитотоксический эффект зависел от дозы и времени воздействия. Механизм цитотоксичности возникал в результате нескольких одновременных событий, включая остановку клеточного цикла и аутофагию.

1.11.3. CAMLET

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали эффективность комплекса α -лактальбумина верблюда с ОА, препятствующего прогрессированию некоторых видов рака.

В экспериментах *in vitro* было показано, что CAMLET обладает высокой токсической активностью в отношении следующих линий опухолевых клеток: гепатомы (HepG-2), рака толстой кишки (Caco-2), рака предстательной железы (PC-3) и рака молочной железы (MCF-7) (Uversky et al., 2017). Достоверных данных о механизмах токсического действия этого комплекса на опухолевые клетки пока не имеется. Однако полагают, что CAMLET способен индуцировать апоптоз и подавлять клеточное деление в фазах G_0/G_1 и G_2/M . Между тем было показано, что комплекс α -ЛА верблюда с ОА обладает способностью ингибировать апоптоз и остановку клеточного цикла. Эффективная противоопухолевая активность CAMLET может быть обусловлена ингибированием тирозинкиназы (Uversky et al., 2017).

Показано, что α -лактальбумин верблюда при 60° C способен образовывать комплекс также с линолевой кислотой. Однако результаты показывают, что линолевая кислота вызывает частичное разворачивание α -лактальбумина, в то время как ОА существенно не меняет структуру белка

(Atri et al., 2011). Тем не менее, оба комплекса в экспериментах на клетках рака простаты человека (DU145) в равной степени проявляли цитотоксическую активность.

В более поздних исследованиях было показано, что комплекс α -лактальбумина верблюда с ОА может также обладать высоким терапевтическим эффектом в лечении нейродегенеративных заболеваний. Так, например, в 2020 году было показано, что комплекс может стать потенциальным кандидатом в разработке препаратов для лечения БП (Ubaid et al., 2020).

1.11.4. Комплекс LF с ОА

Впервые на комплекс LF с олеиновой кислотой обратили внимание ученые из Китая в 2014 году. В экспериментах *in vitro* были изучены цитотоксические свойства комплекса на клетках рака печени (HepG2), толстой кишки (HT29) и молочной железы (MCF-7), согласно которым комплекс LF с ОА проявлял дозозависимую токсичность по отношению к перечисленным выше опухолевым клеткам. Авторами было показано, что ЛД₅₀ комплекса LF с ОА в 10 раз ниже, чем у HAMLET, что указывает на более выраженную способность LF/ОА подавлять рост раковых клеток данных культур. Одним из механизмов клеточной гибели ученые определили апоптоз (Fang et al., 2014).

В 2020 году еще одна исследовательская группа из Китая показала противораковое действие LF в комбинации с тремя ЖК: олеиновой, докозагексаеновой и линоленовой кислотой на рак пищевода как *in vitro*, так и *in vivo*. Сообщается, что LF в комплексе с тремя ненасыщенными ЖК ингибируют жизнеспособность, миграцию и инвазию клеток, индуцируют апоптоз. Отмечалось, что комбинация «лактоферрин + линоленовая кислота» проявляла самую высокую противоопухолевую активность *in vivo* в этой модели рака (Li et al., 2020).

1.11.5. ELOA

Установлено, что комплекс лизоцима лошади с ОА (ELOA), подобно комплексу HAMLET, обладает выраженным противоопухолевым эффектом. ELOA цитотоксичен в отношении различных типов клеток: эмбриональных клеток печени мыши, эмбриональных фибробластов мыши (MEFs), клеток нейробластомы человека (SH-SY5Y), феохромоцитомы крыс (PC12). Комбинированное окрашивание акридиновым оранжевым и бромистым этидием показало, что комплекс индуцирует апоптоз. Методами конфокальной микроскопии (CLSM) и флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS) показано, что ELOA изначально накапливается вблизи клеточной мембраны, которая, вероятно, и является первичной мишенью для цитотоксического действия комплекса (Wilhelm et al., 2009).

Цитотоксичность ELOA выражалась в образовании локальных неровностей и дефектов в липидах плазматической мембраны (Qian et al., 2008). Эти отдельные дефекты, возможно в виде липидных пор, не приводят к мгновенной гибели клетки, лишь после длительного воздействия (1–3 часа) плазматическая мембрана разрывается (Vukojević et al., 2010). ELOA, в отличие от других белково-липидных комплексов, не обнаруживается в цитоплазме или ядре до тех пор, пока целостность мембраны не будет утрачена (Vukojević et al., 2010).

Важно отметить, что в ряде экспериментов олигомеры лизоцима лошади без добавления ОА проявляли цитотоксичность и вызывали апоптоз (Malisauskas et al., 2005).

Показано, что ELOA обладает бактерицидной активностью в отношении *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Haemophilus influenzae* (Clementi et al., 2013).

1.11.6. β -лактоглобулин

β -лактоглобулин (β -ЛГ) является основным белком сыворотки коровьего молока, в которой его содержится около 50 % от общего белка. Было показано, что β -ЛГ связывается с различными гидрофобными молекулами, включая ретинол и длинноцепочечные жирные кислоты (Creamer et al., 2003).

В 2015 году Fang с соавторами методом простого смешивания и инкубации при 45 °С получили комплекс β -ЛГ с олеиновой и линолевой кислотами. В экспериментах на клеточных культурах рака шейки матки (HeLa) и молочной железы человека (MCF-7) оба комплекса проявляли схожую антиканцерогенную активность и приводили к гибели опухолевых клеток, вызывая апоптоз. Взаимодействие ОА и ЛА с белком осуществлялось через Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и водородные связи, константы связывания для кислот были одинаковыми (Fang et al., 2015).

Было показано, что предварительная ультразвуковая обработка может вызывать конформационные изменения в структуре белков и приводить к усилению связывания с ЖК. Так, комплексы ОА с β -ЛГ и α -ЛА, прошедшие предварительную обработку ультразвуком, обладали более высокой антиканцерогенной активностью, что связывают с влиянием ультразвука на связывание ОА с белком (Liu et al., 2020).

1.12. LIMLET

В настоящее время в так называемых наномедицине и нанофармации широко используются липосомальные системы доставки лекарственных веществ. Не так давно в литературе появились данные о комплексе олеиновой кислоты с липосомами, который был назван LIMLET. Комплекс представляет собой структуру, в которой молекулы ОА встроены в фосфолипидный бислой благодаря гидрофобным взаимодействиям. Средний

диаметр LIMLET лежит в диапазоне от 100 до 200 нм, что позволяет комплексу активно проникать в опухоль, при этом, не преодолевая эндотелиальный барьер в здоровых тканях. LIMLET проявлял характерную цитотоксичность в отношении клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) и рака легких (A549), в то время как липосомы без жирной кислоты такими свойствами не обладали. Комплекс продемонстрировал селективную, зависящую от концентрации, токсичность в отношении раковых клеток: значения ЛД₅₀ для клеток MDA-MB-231 и A549 составляли 1,3 и 2,2 нМ соответственно, тогда как для нормальной клеточной линии Vero (эпителиальные клетки почки обезьяны) этот показатель составлял 5,7 нМ (Jung et al., 2016).

В 2020 году ученые из Малайского университета получили смешанную липосому со средним диаметром 400 нм, в состав которой вошли две ненасыщенные ЖК: олеиновая и эруковая (Suk et al., 2020). Полагают, что смешанные липосомы являются потенциально новым подходом к дальнейшему развитию носителей различных лекарств для лечения рака.

1.13. Cyt-c-OA

В 2015 году группой испанских ученых под руководством Yamiа Delgado был описан HAMLET-подобный комплекс, в котором OA была связана с проапоптотическим белком — цитохромом *c*, выступающим не только в качестве переносчика ЖК, но и как самостоятельный противоопухолевый агент. Методом динамического светорассеяния было показано, что размер такого комплекса составляет 123 нм, что является одним из важных свойств систем доставки лекарственных веществ. Такой размер позволяет проникать частицам в опухолевые клетки, не проникая при этом в здоровые, поскольку диаметр пор кровеносных сосудов, питающих здоровые ткани значительно меньше (60-80 нм). В исследованиях *in vitro* Cyt-c-OA индуцировал гибель опухолевых клеток HeLa и A-549:

жизнеспособность клеток после 6 часов инкубации с комплексом составляла 10 %. Следует отметить, что в сравнении с аналогичными концентрациями BAMLET, комплекс с цитохромом *c* обладал бóльшим противоопухолевым эффектом, вероятно, за счет собственной проапоптотической активности цитохрома. Показано, что Cyt-*c*-ОА индуцирует апоптоз через активацию каспазы-3 и -9 в цитоплазме клеток-мишеней. Повышенная антиопухолевая активность комплекса цитохрома *c* с ОА была обусловлена, вероятнее всего, дополнительным каспазо-опосредованным механизмом активации апоптоза. Полагают, что использование цитохрома *c* усиливает действие ОА в HAMLET-подобных комплексах (Delgado et al., 2015).

1.14. Цитотоксический эффект олеиновой кислоты

Концепция о том, что жирные кислоты необходимы для нормального роста животных, включая человека, была впервые введена Burr и Burr в 1929 году, когда крысы линии Вистар были лишены пищевого жира, что привело к возникновению «нового дефицитного заболевания», включающего каудальный некроз. В 1929-30 г. впервые была описана значимая роль линоленовой (18:2 ω -6) и α -линоленовой (18:3 ω -3) кислот в восстановлении здоровья на примере животных, истощенных обезжиренной диетой. В эти же годы Burr и Burr ввели термин «эссенциальные жирные кислоты» (Burr and Burr, 1929; Burr and Burr, 1930).

Однако до 1960-х годов важность незаменимых жирных кислот для здоровья человека редко принималась во внимание. Их актуальность была впервые подчеркнута в исследованиях 1963 года, описывающих признаки дефицита незаменимых жирных кислот у младенцев, получавших смесь на основе обезжиренного молока, или у новорожденных, получавших обезжиренное парентеральное питание. Так было впервые показано, что человеку необходимо употреблять определенные полиненасыщенные

жирные кислоты (ПНЖК), которые не могут синтезироваться в организме (Hansen et al., 1963; Caldwell et al., 1972; Paulsrud et al., 1972).

Действие ЖК на организм достаточно сложное: ЖК могут влиять на многочисленные клеточные, сигнальные и метаболические пути; они также играют важную роль в иммунных реакциях и воспалительных процессах (Calder et al., 1996; Zhu et al., 2005). В литературе представлено достаточное количество данных, свидетельствующих о цитотоксичности ЖК. Показано, что ненасыщенные ЖК могут индуцировать апоптоз и некроз в ряде клеток, приводить к деполяризации митохондрий, высвобождению цитохромов, активации каспаз, накоплению внутриклеточных липидов и фрагментации ДНК (Penzo et al., 2002; Cury-Boaventura et al., 2006; Dymkowska et al., 2006; Martins de Lima et al., 2006; Oyanagi et al., 2008).

Некоторые исследования показали, что ЖК могут оказывать действие на мембраны клеток (Anel et al., 1993). К примеру, инкубация эритроцитов с ЖК приводит к нарушению целостности плазматической мембраны и гемолизу (Martins de Lima et al., 2006; Andrade et al., 2005; Azevedo-Martins et al., 2006; Lux et al., 2009). Однако чувствительность различных клеточных линий к воздействию ЖК зависит от концентрации, от типа кислоты и также от типа клеточных культур.

До сих пор роль ЖК в развитии рака остается неопределенной и в последние годы привлекает к себе большое внимание. Известно, что неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) являются цитотоксичными по отношению к ряду клеточных линий (Martins de Lima et al., 2006; Andrade et al., 2005; Cury-Boaventura et al., 2006).

В последние годы во многих исследованиях описывался вклад оливкового масла в общее состояние здоровья, частично благодаря высокому содержанию в его составе ОА (Sales-Campos et al., 2013). Эпидемиологические данные и исследования на животных и клеточных линиях доказывают, что ОА обладает антиканцерогенной активностью и ее можно рассматривать в роли противоопухолевого агента (Carrillo et al., 2012).

Высокое потребление ОА связывают со снижением риска развития рака, главным образом молочной железы, предстательной железы и тонкой кишки; в то же время было показано, что рацион, богатый общим количеством жиров, линолевой кислотой или насыщенными ЖК, связан с повышенным риском развития раковых заболеваний (Assmann et al., 1997; Solanas et al., 2002; Vinukumar et al., 2005).

Llor и Plons провели исследования *in vitro* для оценки влияния оливкового масла и ОА на клетки колоректального рака (HT-29) и обнаружили, что оливковое масло индуцирует апоптоз, дифференцировку клеток и регулирует экспрессию COX-2 и Bcl-2, которые связаны с воспалением и апоптозом. В этом исследовании не было продемонстрировано, что ОА оказывает прямое влияние на COX-2 или Bcl-2, но авторы показали специфическую индукцию апоптоза в клетках HT-29 (Llor et al., 2003).

Было показано, что ОА играет значительную химиопротекторную роль при раке молочной железы. Обработка опухолевых клеток молочной железы *in vitro* подавляла экспрессию онкогена *Her-2/neu*, который экспрессируется примерно в 20 % случаях карцином молочной железы и кодирует онкопротеин p185 Her-2/neu, контролирующего в нормальных условиях дифференцировку клеток, пролиферацию и апоптоз. Онкопротеин Her-2/neu играет значительную роль в развитии и прогрессировании некоторых видов опухолей (желудка, молочной железы): гиперэкспрессию Her-2/neu связывают с более агрессивным течением болезни, повышенным метастатическим потенциалом опухоли и менее благоприятным прогнозом. Более того, способность ОА действовать синергически с моноклональным антителом трастузумабом, используемым в качестве терапевтического препарата при раке путем нацеливания на p185 Her-2/neu, уже была описана ранее (Menendez et al., 2005). Повышенная экспрессия Her-2/neu зафиксирована также в клетках рака яичников, желудка и рака тела матки (Laudadio et al., 2007).

В исследованиях цитотоксичности белково-липидных комплексов все большее внимание уделяется токсическому эффекту ОА (Svensson et al., 2003; Knyazeva et al., 2008; Brinkmann et al., 2011; Permyakov et al., 2012). Князева с соавторами сообщают, о токсичности ОА при 300 мкМ (Knyazeva et al., 2008), а Svensson отмечает, что очень высокие концентрации ОА вызывают некроз, однако ОА не индуцирует апоптоз ни в одной из испытанных концентраций (Svensson et al., 2003).

Показано, что ОА в концентрации 200 мкМ приводила к фрагментации ДНК в клеточной линии J774 мышинных макрофагов (Martins Lima et al., 2006), S91 мышинной меланомы (Andrade et al., 2005) и свежевыделенных лимфоцитов человека (Cury-Boaventura et al., 2006). В то же время данная концентрация не оказывает цитотоксического влияния на клеточную линию В16-F0 мышинной меланомы, SK-Mel 23 и SK-Mel меланомы человека (Andrade et al., 2005), что говорит о том, что цитотоксическое действие ОА видоспецифично и зависит от типа клеток.

ОА показала ингибирующее действие на пролиферацию клеток аденокарциномы предстательной железы человека (LNCAP). Экспрессия мРНК простатспецифического антигена (PSA), индуцированного тестостероном, была значительно снижена. Это объясняется тем, что ОА ингибирует активность 5 α -редуктазы, которая блокирует превращение тестостерона в 5 α -дигидротестостерон (ДГТ), а затем ингибирует пролиферацию раковых клеток предстательной железы (Liu et al., 2009).

Обработка клеток TSCC (плоскоклеточного рака языка) олеиновой кислотой приводит к снижению клеточного деления в фазах G₀/G₁, увеличению доли апоптотических клеток по отношению к живым, снижению экспрессии циклина D1 и Bcl-2 и увеличению экспрессии p53 и расщепленной каспазы-3. Показано, что экспрессия p-Akt, p-mTOR, p-S6K, p-4E-BP1 и p-ERK1/2 в клетках TSCC была снижена, после обработки ОА.

В опытах *in vivo* на мышинной модели показано, что ОА ингибирует рост опухолей ксенотрансплантата TSCC. Иммуногистохимические анализы

демонстрируют, что ОА ингибирует экспрессию p-Akt, p-mTOR и p-S6K и индуцирует экспрессию расщепленной каспазы-3 в опухоли ксенотрансплантата.

Обработка ОА приводила к увеличению продукции активных форм кислорода и активности каспазы-3 в клетках лимфомы линии YAC-1 (Puertollano et al., 2005).

ОА значительно подавляет пролиферацию клеток рака пищевода (OE19, OE33), предположительно, за счет активации генов-супрессоров p53, p21 и p27 (Moon et al., 2014).

Цитотоксические свойства ОА были протестированы *in vitro* на клетках рака толстой кишки (Colo-320, Colo-741). Показано, что ОА обладает антипролиферативными эффектами, снижает экспрессию одного из ключевых онкопротеинов Ki-67. Также, наблюдалось уменьшение экспрессии BMP-2 и β -катенина (Mericli et al., 2017).

В экспериментах *in vitro* изучали действие ОА на клеточную линию A549 карциномы легкого. ОА приводила к повреждению клеток и высвобождению белка сурфактанта SP-B во внеклеточный компартмент и снижению его внутриклеточной экспрессии (Zhou et al., 2015).

Эксперименты *in vitro* на клетках линии Jurkat, Raji и лимфоцитах человека показали, что ОА приводит к активации каспазы-3, которая играет центральную роль в апоптозе, и каспазы-6. Также было показано, что ОА приводила к увеличению концентрации триглицеридов, накопление которых, вероятно, может являться механизмом защиты лимфоцитов от токсического влияния жирных кислот (Cury-Boaventura et al., 2006).

В экспериментах *in vivo* на мышинной модели аденокарциномы легких (LAC-1) было показано, что введение ОА мышам приводило к значительному торможению роста опухолей и увеличению продолжительности жизни животных (Piegari et al., 2017).

Было изучено влияние ОА на жизнеспособность клеток карциномы желудка и рака молочной железы с различной степенью метастазирования.

Показано, что ОА оказывает различное влияние на линии опухолевых клеток с высокой и низкой степенью метастазирования. АМФ-активируемая протеиназа (АМРК) была активирована в сильно агрессивных клетках: карциноме желудка HGC-27 и карциноме молочной железы MDA-MB-231, обработанных ОА. АМРК повышала скорость окисления ЖК и продукцию АТФ и таким образом значительно способствовала опухолевому росту. Инактивации АМРК ослабляла стимулирующее действие ОА на опухолевый рост. В карциноме желудка SGC7901 и карциноме молочной железы MCF-7, которые относятся к низкометастазирующим опухолям, ОА подавляла рост и выживаемость раковых клеток (Li et al., 2014).

Показано, что ОА ингибирует активность теломеразы, которая играет ключевую роль в иммортализации опухолевых клеток (Mizushina et al., 2012).

Также было продемонстрировано, что ОА способна оказывать синергетическое действие в комплексе с цитотоксическими препаратами, тем самым усиливая их противоопухолевое действие (Schwartz et al., 2004; Shaikh et al., 2010).

Большое количество исследований *in vitro* и *in vivo* показывает, что ОА обладает цитотоксичностью по отношению к разным типам клеток, способна подавлять их рост посредством различных механизмов. Однако, в параллель этим данным, было показано, что ОА способна также оказывать негативное влияние на здоровые клетки и даже в некоторых случаях оказывать стимулирующее воздействие на рост агрессивных опухолевых клеток.

Заключение по обзору литературы

Эффективная терапия онкологических заболеваний требует ингибирования многих факторов, включая пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, метастатическое распространение и др. Анализ публикаций, представленных в литературном обзоре, позволяет утверждать о несомненной актуальности изучения белково-липидных комплексов, в

частности комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой, как перспективном классе молекул со значительным терапевтическим потенциалом в лечении рака.

Лактоферрин является многофункциональным белком, отвечающим за ряд физиологических и патологических процессов. Каждой функции, которой обладает лактоферрин, соответствует несколько различных молекулярных механизмов, что обеспечивает максимальный биологический эффект в организме (Brock et al., 1980). Действие лактоферрина направлено на широкий спектр молекулярных мишеней, контролирующих пролиферацию опухолевых клеток, выживание, миграцию, инвазию и метастазирование. LF является мощным индуктором апоптоза, повышающим активацию каспаз, а также некроза и ферроптоза (холо-форма) (Iglesias-Figueroa et al., 2019; Zheng et al., 2020). Описано супрессирующее действие ЛФ на VEGF- и bFGF-индуцированный ангиогенез (Shimamura et al., 2004). Лактоферрин воздействует на АТФ-азы, что в свою очередь способствует изменению внеклеточной кислотности. Внеклеточная кислотность является одним из основных факторов, способствующих развитию множественной лекарственной устойчивости рака через протонирование и нейтрализацию химиотерапевтических препаратов (Gibbons et al., 2015). Обладая широким спектром биологической активности и сродством к широкому спектру рецепторов на опухолевых клетках, лактоферрин является привлекательным лигандом, направленным на различные мишени, для систем доставки лекарств.

Изучению противоопухолевых свойств ОА также посвящено большое количество работ. Описано, что ОА может подавлять сверхэкспрессию *Her2/neu* — хорошо охарактеризованного онкогена, который играет ключевую роль в этиологии, инвазивном прогрессировании и метастазировании некоторых видов рака у человека (Menendez et al., 2005). Кроме того, было показано, что олеиновая кислота индуцирует апоптоз. Также показано, что ОА ингибирует активность теломеразы (Mizushina et al.,

2012). Сообщалось, что ОА действует синергически с цитотоксическими препаратами, тем самым усиливая их противоопухолевый эффект.

Таким образом, конъюгация лактоферрина с олеиновой кислотой может обеспечить синергическую защиту при прогрессировании рака, действуя на различные отличительные признаки опухолевых клеток (Рис. 1.14), появляющиеся у них на пути перерождения из нормальных в раковые, а также привести к более эффективному и селективному воздействию.

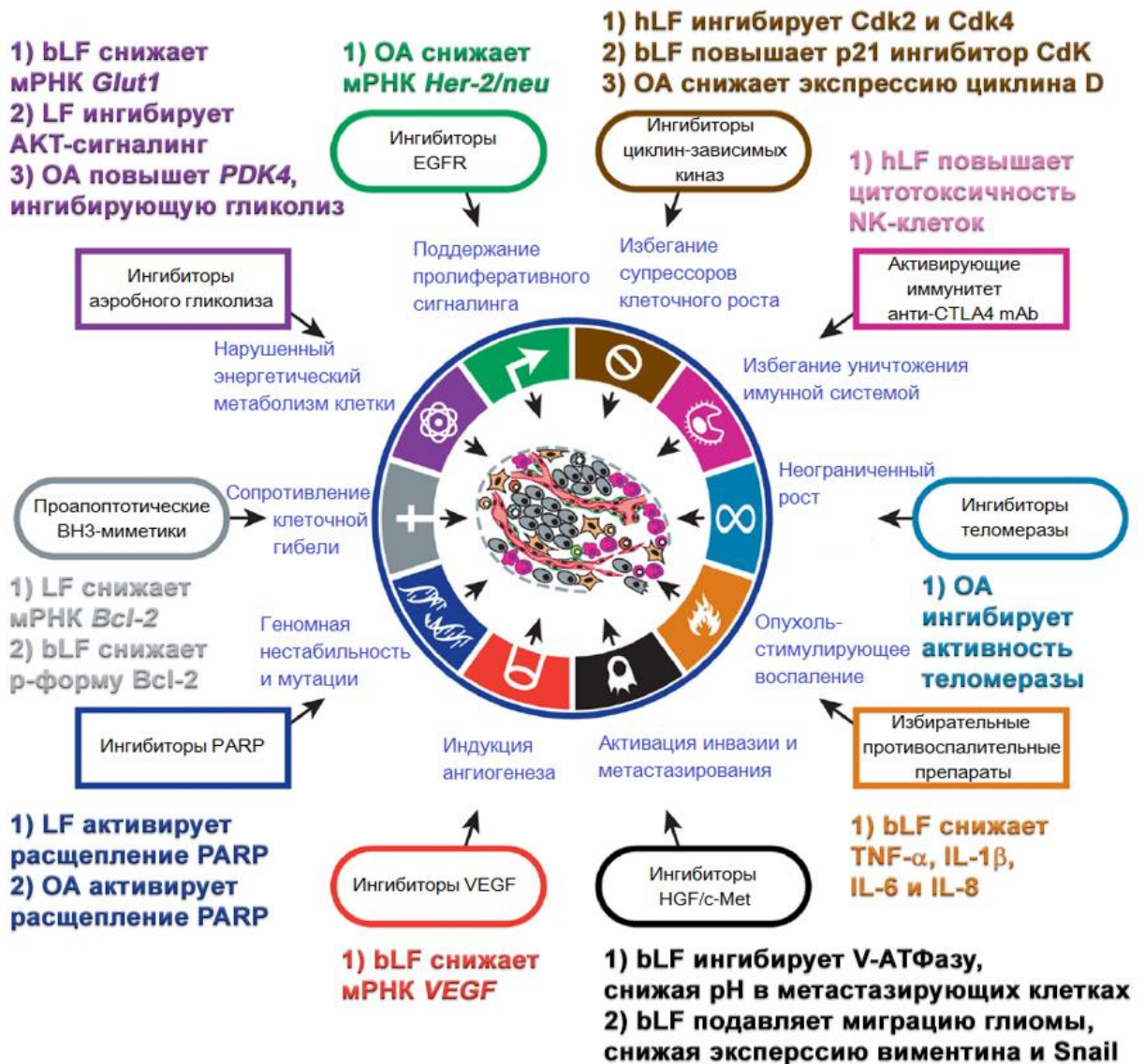


Рисунок 1.14 — Основные признаки опухолевых клеток, на которые воздействуют LF и ОА

[Адаптировано из статьи Hanahan and Weinberg, 2011]

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы, использованные в работе

В работе были использованы следующие реактивы: олеиновая кислота, линоленовая кислота, линолевая кислота, арахидоновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота («Biomedical», Франция); Bio-Gel P-6, Chelex 100, UNOsphere S, UNOsphere Q, агароза, окрашенные маркеры молекулярной массы («BioRad», США); CM-Сефадекс С-50 («Pharmacia», Швеция); Сефакрил S-200 HR, азид натрия, альбумин из сыворотки крови быка (BSA, квалификация — свободный от ЖК), 6-аминокапроновая кислота, бромфеноловый синий, глицерол, Кумасси G-250, 2-меркаптоэтанол, персульфат аммония, протеиназа К, Трис (гидроксиметил)-аминометан («Serva», Германия); диметилсульфоксид (ДМСО), 8-анилино-1-нафталин сульфонат (ANS), бензамидин-агароза, дигидрохлорид орто-дианизидина (o-DA), додецилсульфат натрия (SDS), триэтаноламин (ТЕА), изоамиловый спирт, бромистый этидий, резазурин, ксиленцианол («Sigma», США); лимонная кислота («Acros Organics», Бельгия); триптон, дрожжевой экстракт, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (МБА), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия); Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, глицин, декстран Т-70 («Panreac-AppliChem», Испания); NaOH , H_3PO_4 , CH_3COOH , хлороформ, этиловый спирт, метиленовый синий («Вектон», Россия); NaHCO_3 , цитрат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), гистопак-1077 («Merck», Германия); NaCl , Tween-20, H_3BO_3 , ацетат натрия, Тритон X-100, D-глюкоза («Хеликон», Россия); NaN_2PO_4 («Ampresco», США); Na_2CO_3 , формалин, NaBr («Реахим», Россия); HCl , H_2SO_4 («СигмаТек», Россия); YO-PRO («Invitrogen», США); йодистый пропиций («Beckman Coulter», Франция); HEPES («Биолот», Россия); N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид («GE-

Healthcare», Великобритания); БАД, содержащий лактоферрин молока коров («Jarrow formulas», США). Набор реактивов для определения неэстерифицированных жирных кислот (NEFA) («Randox», Великобритания).

Измерение значений pH буферных растворов производили на портативном pH-метре «Аквилон pH-410», точность измерения 0,01 pH. Для приготовления растворов использовали апиrogenную деионизированную воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм×см («Медиана-Фильтр», Россия).

В работе были использованы следующие буферные растворы: PBS (0,15 М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4), HBS-P+ (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES буфер, pH 7,5, 0,05 % полиоксиэтиленсорбитан). Использованные в работе растворы фильтровали с помощью шприцов через стерильные мембранные фильтры из смешанных эфиров целлюлозы (Syringe Filter, МЕС, «Jet Biofil», Китай, с размером пор 0,22 мкм, если не описано иначе).

Рекомбинантный лактоферрин человека, выделенный из молока трансгенных коз, был любезно предоставлен сотрудниками кафедры биохимии Белорусского Государственного Университета (г. Минск).

Протоколы получения образцов плазмы крови, грудного молока и цельной крови здоровых доноров согласованы с локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ».

2.2. Экспериментальные животные

В работе использовали 64 мышей-самцов линии СЗНА весом 16–28 г и 6 крыс-самцов линии Wistar массой 210 ± 15 г (питомник «Рапполово», РАМН, Санкт-Петербург). После получения из питомника и до начала проведения экспериментов животные проходили 14-дневный карантин. Животные содержались в стандартных условиях вивария (ГОСТ 33216-2014), рекомендуемых для содержания грызунов, в условиях контролируемого

температурного режима (20–24 °С), при циклическом освещении 12 часов свет/12 часов темнота и получали стандартную еду (комбинированный корм в виде брикетов) и воду *ad libitum*.

Эксперименты проводили с соблюдением этических норм по работе с лабораторными животными. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

2.3. Клеточные культуры

В качестве объектов исследований *in vitro* были использованы клетки промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60), мышинной гепатомы 22a (H22a) и клетки линии Jurkat клон E6-1 (Т лимфоциты человека), полученные из коллекции клеточных культур ФГБНУ Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

2.4. Получение белковых препаратов

2.4.1. Выделение лактоферрина грудного молока

Двухэтапный метод выделения лактоферрина из грудного молока был разработан в Отделе молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» (Zakharova et al., 2000). Грудное молоко (2000 мл) делипидировали центрифугированием в течение часа при 500 g и 30 минут при 10000 g (4 °С). После центрифугирования фильтровали на воронке Бюхнера под давлением вакуумного насоса через 6 слоев марли и 2 слоя фильтровальной бумаги. Полученный фильтрат снова подвергали центрифугированию в течение 30 минут при 10000 g (4 °С) и фильтровали на складчатом фильтре. Обезжиренное молоко наносили на колонку (5×12 см) с CM-Сефадексом С-50. Несвязавшиеся белки отмывали 500 мл PBS, а LF, задержавшийся на

колонке, элюировали линейным градиентом NaCl: по 300 мл от 0,15 М до 1М NaCl, содержащих 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4. На втором этапе LF подвергали гель-фильтрации на колонке с Сефакрилом S-200 HR (1×112 см), уравновешенным PBS. Фракции, содержавшие LF, объединяли, разделяли на аликвоты и хранили при –80 °С.

2.4.2. Выделение лактоферрина молока коров из БАД («Jarrow formulas»)

Для выделения больших количеств лактоферрина коровы использовали биологически активную добавку (БАД), содержащую LF молока коров («Jarrow formulas», США). Лиофильно высушенные белки извлекали из капсул и растворяли в PBS из расчета 10 мл буфера на 1 г белка. Нерастворимые компоненты, содержащиеся в БАД, осаждали методом центрифугирования в течение 30 минут при 12000 g (4 °С). Надосадочную жидкость после центрифугирования отделяли от осадка, добавляли сульфат аммония до насыщения 80 % и оставляли при температуре 4 °С на 2 часа. Затем LF осаждали центрифугированием в течение 30 минут при 12000 g (4 °С). Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме воды и переносили в диализные мешки. Диализ проводили против 500-кратного объема PBS в течение 12 часов при 4 °С.

Диализованный LF подвергали кристаллизации, добавляя по каплям этиловый спирт до конечной концентрации 20 %. Кристаллизацию проводили при интенсивном перемешивании и охлаждении на льду, после чего LF подвергали центрифугированию в течение 30 минут при 30000 g (4 °С). Осадок после центрифугирования ресуспендировали в минимальном объеме PBS и подвергали ионообменной хроматографии на колонке с UNOsphere S (5×40 см). После нанесения LF на смолу, колонку промывали раствором PBS до получения $A_{280} < 0,02$ в элюате. LF, задержавшийся на

колонке, элюировали линейным градиентом NaCl: по 10 мл 0,1 М — 2 М NaCl, содержащих 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4. Фракции, содержавшие LF, объединяли, диализовали против PBS, разделяли на аликвоты и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.3. Выделение церулоплазмينا плазмы крови человека

В качестве источника церулоплазмينا (CP) человека использовали плазму крови с добавлением цитрата натрия. Растворы, используемые для хроматографии, предварительно охлаждали на льду. К 700 мл предварительно размороженной и профильтрованной через флизелиновый фильтр цитратной плазмы добавляли забуференный до pH 7,5 ЭДТА до 0,5 мкМ и сухую 6-аминокапроновую кислоту до 2 мМ. На предварительно уравновешенную раствором PBS колонку с UNOsphere Q (7×5 см), наносили плазму и отмывали колонку от балластных белков раствором PBS и 20 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4) до значения оптической плотности $A_{280} < 0,005$ в элюате, и соединяли с хроматографом Bio-Rad DuoFlow 20 («Bio-Rad», США). Элюцию белков, сорбированных на колонке, осуществляли линейным градиентом концентрации по 200 мл от 0 М до 0,5 М NaCl, содержащих 20 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4). Фракции, элюированные с колонки и имевшие синий оттенок, объединяли, разбавляли в 10 раз 20 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4) и полученный объем наносили на колонку с неомицин-агарозой (6×2,5 см), уравновешенную 40 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4). После нанесения образца, колонку промывали 40 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4) до $A_{280} < 0,005$ в элюате. Дальнейшую элюцию белков проводили с помощью линейного градиента концентрации по 120 мл от 0 мМ до 100 мМ CaCl₂, содержащих 40 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4). Объединяли фракции, имеющие синий оттенок, фильтровали их через колонку с бензамидин-агарозой (5×1 см) и фильтрат концентрировали на ячейке Viva Spin 20 («GE-Healthcare», UK), дважды разбавляя сконцентрированный до 2 мл белок 18 мл 40 мМ ТЕА-НСl (pH 7,4). В

результате из 700 мл цитратной плазмы было выделено 170 мг СР, характеризующегося критерием чистоты $A_{610}/A_{280} = 0,052$, что соответствует чистоте более 99 %. Разбавленный до концентрации 12 мг/мл СР разделяли на аликвоты и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. Получение лактоферрина, насыщенного железом

Насыщенный железом LF получали добавлением 200 мкМ FeCl_3 к 50 мкМ апо-формы LF в 100 мМ Na-цитрат-гидрокарбонатном буфере (рН 8,0). Избыток железа удаляли с помощью диализа против 500-кратного объема 100 мМ Na-цитрат-гидрокарбонатного буфера (рН 8,0). Диализ проводили в течение 12 часов при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и затем повторяли, заменяя используемый буфер на PBS.

После диализа насыщенный железом LF наносили на колонку со смолой Chelex 100 (1×3 см), предварительно уравновешенную раствором PBS, и фильтровали белок при помощи промывки PBS. Смолу регенерировали с помощью уксусной кислоты.

2.6. Получение комплексов лактоферрина с жирными кислотами

Для получения комплексов с жирными кислотами (ЖК) навеску лактоферрина (120 мг) растворяли в 4 мл раствора PBS. Затем наслаивали 1 мл PBS и аккуратно добавляли 100 мкл этанола в верхний слой, чтобы избежать прямого воздействия спирта с белком. ЖК растворяли в небольшом объеме этанола (рассчитывали объем этанольного раствора, который нужно добавить для равного по молям отношения кислоты к лактоферрину для каждой ЖК), в процессе добавления раствора ЖК в этаноле белок перемешивали, а в качестве контроля использовали такой же объем PBS без LF.

После каждой добавки этанольного раствора ЖК регистрировали величину светопропускания (T , %) при 600, 700 и 800 нм.

Для определения способности белка связывать ЖК раствор LF титровали аликвотами ЖК (от 1 до 8 моль на моль белка), после каждой добавки ЖК 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. Избыток спирта удалялся при диализе в течение ночи при 4 °С против раствора PBS и последующей фильтрацией через фильтрующие насадки Syringe Filter («Jet Biofil», Китай) с диаметрами пор 0,45 мкм. Концентрацию белка после диализа определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000-02, «ОКБ-Спектр», Санкт-Петербург) при длине волны 280 нм. Процедуру комплексообразования белка с ЖК проводили при комнатной температуре. Для длительного хранения комплексы LF с ЖК замораживали и хранили при температуре -20 °С. На рис. 2.1. изображена схема получения комплекса LF с ОА. Для получения комплексов других белков с ОА использовали такой же протокол.

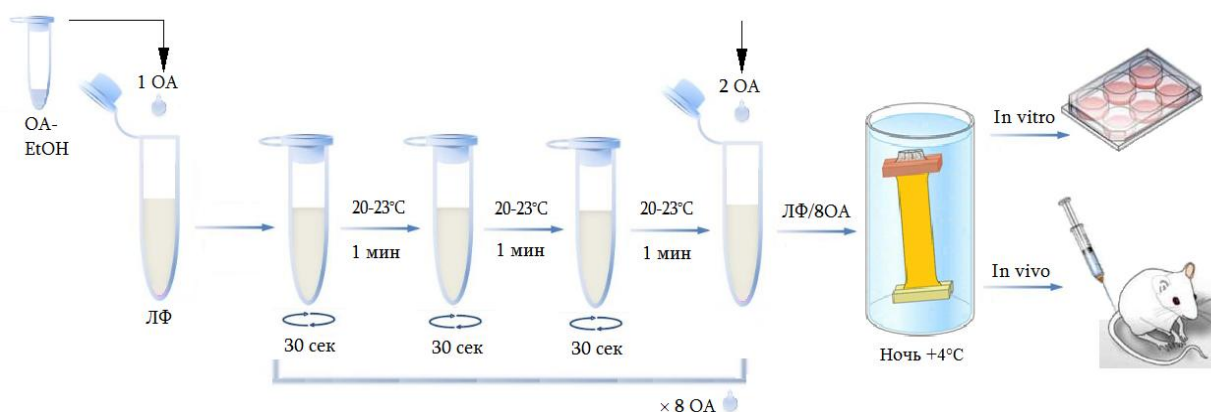


Рисунок 2.1 — Схема получения комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой

2.7. Анализ стехиометрии комплексов лактоферрина с жирными кислотами

Для количественного определения *in vitro* неэстерифицированных ЖК, связавшихся с LF после комплексообразования, диализа и последующей фильтрации полученных комплексов, пользовались колориметрическим ферментативным методом с использованием коммерческого набора реагентов: NEFA («Randox», Великобритания). Измерения были проведены согласно инструкции производителя.

Метод основан на превращении неэстерифицированных ЖК в присутствии АТФ и коэнзима А под действием ацил-коэнзим А синтетазы в ацил-коэнзим А, АМФ и пирофосфат; окислении ацил-коэнзима А под действием оксидазы ацетил-коэнзима А с образованием пероксида водорода. Последний под действием пероксидазы реагировал с 4-аминоптеридином и 3-метил-N-этил-N-(β-гидроксиэтил)-анилином с образованием пурпурного пигмента с максимумом поглощения при длине волны 550 нм. Поглощение пигмента прямо пропорционально концентрации ЖК в образце и при сравнении с градуировочной зависимостью, полученной для серии разбавлений стандарта с известной концентрацией жирной кислоты, позволяет рассчитать концентрацию жирной кислоты в образце.

Согласно инструкции производителя допустимо использовать и одну концентрацию стандарта, оперируя формулой:

$$C_{sample} = C_{standard} \times A_{sample} / A_{standard} ,$$

где C_{sample} и $C_{standard}$ — концентрация образца и стандарта соответственно (ммоль/л),

A_{sample} и $A_{standard}$ — поглощение при длине волны 550 нм в пробе тестируемого образца и стандарте соответственно.

2.8. Хроматография комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой

Гель-фильтрация комплекса LF/8ОА осуществлялась на колонке с Bio-Gel Р-6 (диапазон фракционирования 1–6 кДа) со скоростью потока 0,25 мл/мин. На колонку, предварительно уравновешенную PBS, наносили 100 мкл образца LF/8ОА в концентрации 40 мг/мл. После нанесения образца колонку промывали фосфатно-солевым буфером и собирали фракции по 500 мкл. Детекцию выхода белка с колонки осуществляли измерением оптической плотности на длине волны 280 нм. Во фракциях количественно определяли ЖК с использованием коммерческого ферментативного набора NEFA («Randox», Великобритания), в соответствии с инструкцией производителя. Перед гель-фильтрацией также была проведена количественная оценка связанной ОА с LF.

2.9. Спектральные методы исследования

2.9.1. Спектрофотометрия

Спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой области измеряли с помощью спектрофотометра СФ-2000-02 («ОКБ-Спектр», Санкт-Петербург). Определение концентрации белков проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Концентрацию белков рассчитывали с помощью основного закона светопоглощения (Бугера–Ламберта–Бера):

$$A_Y = \varepsilon_Y \times C \times l,$$

$$C = A_Y / \varepsilon_Y \times l,$$

где C — концентрация белка (М), A_Y — поглощение при длине волны Y нм, l — длина оптического пути в растворе (см), ε_Y — коэффициент молярной экстинкции белка ($M^{-1}cm^{-1}$).

Использованные в работе коэффициенты молярной экстинкции приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Коэффициенты молярной экстинкции используемых веществ

Вещество	λ , нм	ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$	Источник
CP	610	10000	[Noyer et al., 1980]
LF (апо-форма)	280	85700	[Gifford et al., 2012]
LF (насыщенный Fe^{3+})	465	4267	[Masson, 1970]
BSA	280	43824	[Phopin et al., 2019]

Коэффициент светопропускания определяли по формуле:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\% = 10^{-\epsilon Cl} \times 100\%,$$

где T — коэффициент светопропускания (%), I — интенсивность монохроматического пучка света, прошедшего через раствор, I_0 — интенсивность монохроматического пучка света, падающего на вещество.

2.9.2. Спектрометрия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма исследуемых препаратов измеряли в PBS при концентрации белка 0,1 мг/мл (дальний УФ) и 1 мг/мл (ближний УФ), используя спектрополяриметр Jasco J-810 («Jasco», Япония). Образцы предварительно инкубировали в течение 10 минут при 25 °С. Спектры дальней УФ-области регистрировали в диапазоне 190–250 нм с шагом 0,1 нм (скорость сканирования 2 нм в секунду) и шириной оптической щели 2 нм. Исследуемый образец помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 мм.

Спектры ближней УФ-области регистрировали в диапазоне 250–360 нм с шагом 0,1 нм (спектральная ширина щели 2 нм, скорость сканирования 2 нм в секунду). Образец помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов КД-спектры для каждого образца записывались 4 раза с последующим усреднением. Сглаживание спектров производилось с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором. В качестве линии

фона использовали КД-спектры, снятые для PBS. Результаты расчета усредняли по трем независимым экспериментам. Полученные данные выражали в виде молярной эллиптичности ($[\theta]$), которую рассчитывали по формуле (Kelly and Price, 2000):

$$[\theta] = (\text{MRW} \times \theta) / (10 \times c \times l),$$

где θ — эллиптичность ($^\circ$), c — концентрация белка (г/мл), l — длина оптического пути (см), MRW рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{MRW} = \text{MM} / N_{\text{a.o}}^{-1},$$

где MM — молекулярная масса белка (г/моль), $N_{\text{a.o}}$ — количество аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

2.9.3. Флуоресцентная спектроскопия

Регистрация спектров флуоресценции проводилась на спектрофлуориметре Jasco FP-6500 («Jasco», Япония) при длине волны возбуждения 280 нм (общая флуоресценция) и 295 нм (флуоресценция триптофанов) в диапазоне 305–500 нм.

Предварительно разбавленные до концентрации 1 мг/мл образцы помещали по отдельности в кварцевые кюветы. Стенки обычных кварцевых кювет могут включать оптические напряжения, влияющие на эллиптичность пучка света, что может приводить к артефактным сигналам, поэтому использовались лишенные напряжений кварцевые кюветы для измерения флуоресценции.

Образцы перед измерением предварительно инкубировали 10 минут при температуре 25 $^\circ\text{C}$, после чего записывался спектр образца в формате .txt, который в дальнейшем обрабатывался в программе Excel. Результаты расчета усредняли по трем независимым экспериментам.

Для получения комплексов LF и LF/8OA с флуоресцентным молекулярным зондом 8-анилино-1-нафталин сульфонатом (ANS) каждый белковый образец инкубировали с ANS (5 моль на 1 моль белка), в течение 1

часа, при комнатной температуре, в темноте. Спектры регистрировали в диапазоне 400–700 нм при длине волны возбуждения 390 нм, как описано выше.

2.9.4. Определение размеров частиц методом динамического светорассеяния

Размеры частиц определяли при помощи метода динамического светорассеяния (англ. Dynamic light scattering — DLS) на лазерном анализаторе Zetasizer Nano S (Malvern, Великобритания). Исследуемые образцы рекомбинантного LF, LF коровы, а также их комплексов с ОА (2 мг/мл в PBS) предварительно центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g и фильтровали через стерильные фильтры. После этого 50 мкл исследуемого образца вносили в одноразовые прозрачные кюветы из полистирола с длиной оптического пути 10 мм (Sarstedt, Германия). Кювету с образцом помещали в термостатирующую ячейку анализатора и проводили измерения при 25 °С. Все измерения проводили три раза для каждого из образцов. Полученные данные о размере частиц были проанализированы с помощью программного обеспечения Nano — 7.12, поставляемого вместе с прибором.

2.10. Изучение белок-белкового взаимодействия с помощью биосенсоров на эффекте поверхностного плазмонного резонанса

Для характеристики прочности взаимодействия белок-белковых комплексов между белками СР и LF (или LF/8ОА) и определения равновесной константы комплексообразования использовали биосенсорный подход, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Измерение межмолекулярных взаимодействий при помощи ППР проводили на приборе Biacore X100 («GE-Healthcare», UK) с использованием

стандартного чипа CM5 (карбоксиметил-декстрановый чип) с поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном. Чип активировали эквимолярной смесью N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимида (NHS) (0,2 М) и затем инъецировали раствор СР (20 мкг/мл) в 0,5 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,5 (Рис. 2.2).

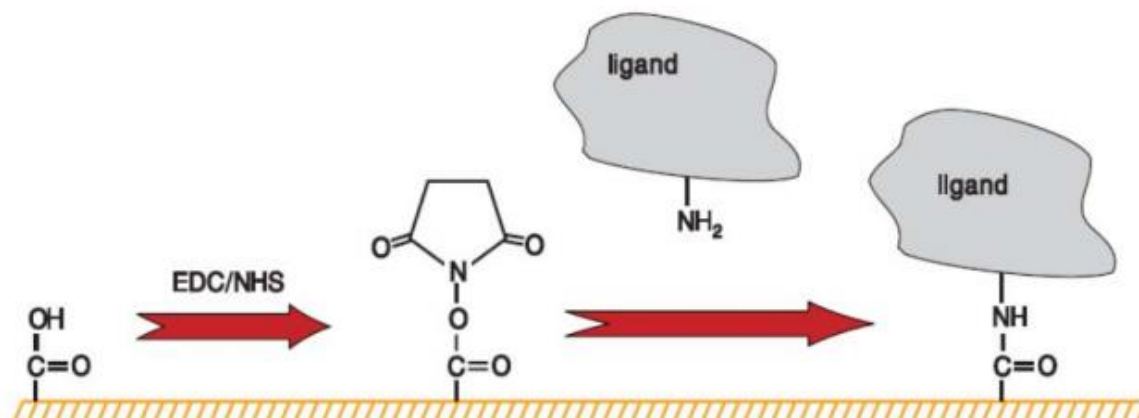


Рисунок 2.2 — Способ иммобилизации биомолекул на сенсорной поверхности. Карбоксильные группы декстрана активируют с помощью смеси N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида (EDC+NHS), которые образуют коротко живущие эфирные группы, реагирующие с аминогруппами лиганда с образованием амидной связи

Скорость потока буфера при 12-минутной иммобилизации составляла 5 мкл/мин. Для блокирования оставшихся свободных групп чипа добавляли 1 М этаноламин-HCl, рН 8,5.

Для оценки аффинности возрастающие концентрации аналита (А) — LF— инъецировали над покрытым СР чипом со скоростью потока 30 мкл/мин в HBS-P+. Каждый анализ взаимодействия состоял из четырех этапов: 1) инъекция HBS-P+ в течение 1 мин; 2) инъекция А (LF, LF/80А) в течение 1 мин; 3) стадия диссоциации в течение 5 мин (промывка HBS-P+ без А); 4) регенерация в течение 90 сек. с помощью HBS-P+, содержащего 1 М NaCl и 0,1 М этаноламин. Часть проточной ячейки без иммобилизованного СР выступала в качестве контроля для определения неспецифического

связывания А с чипом ($< 2\%$ сигнала от максимального при насыщении А). Для каждой концентрации А контрольная кривая связывания вычиталась из соответствующей кривой связывания с иммобилизованным СР. Равновесная константа диссоциации K_D комплекса СР-LF (СР-LF/80А) была определена по зависимости установившегося значения ответа (RU) от концентрации А. Полученные данные соответствовали уравнению Лэнгмюра, описывающему модель одноцентрового связывания (1:1):

$$R_{eq} / R_{max} = [A] / ([A] + K_D),$$

где R_{eq} — значение ответа (RU) при достижении равновесия; R_{max} — ответ (RU) при насыщении поверхности аналитом, K_D — равновесная константа диссоциации. Помимо числовых параметров получали сенсограммы, на которых можно наблюдать процессы ассоциации и диссоциации. Рисунок типичной сенсограммы приведен ниже (Рис. 2.3).

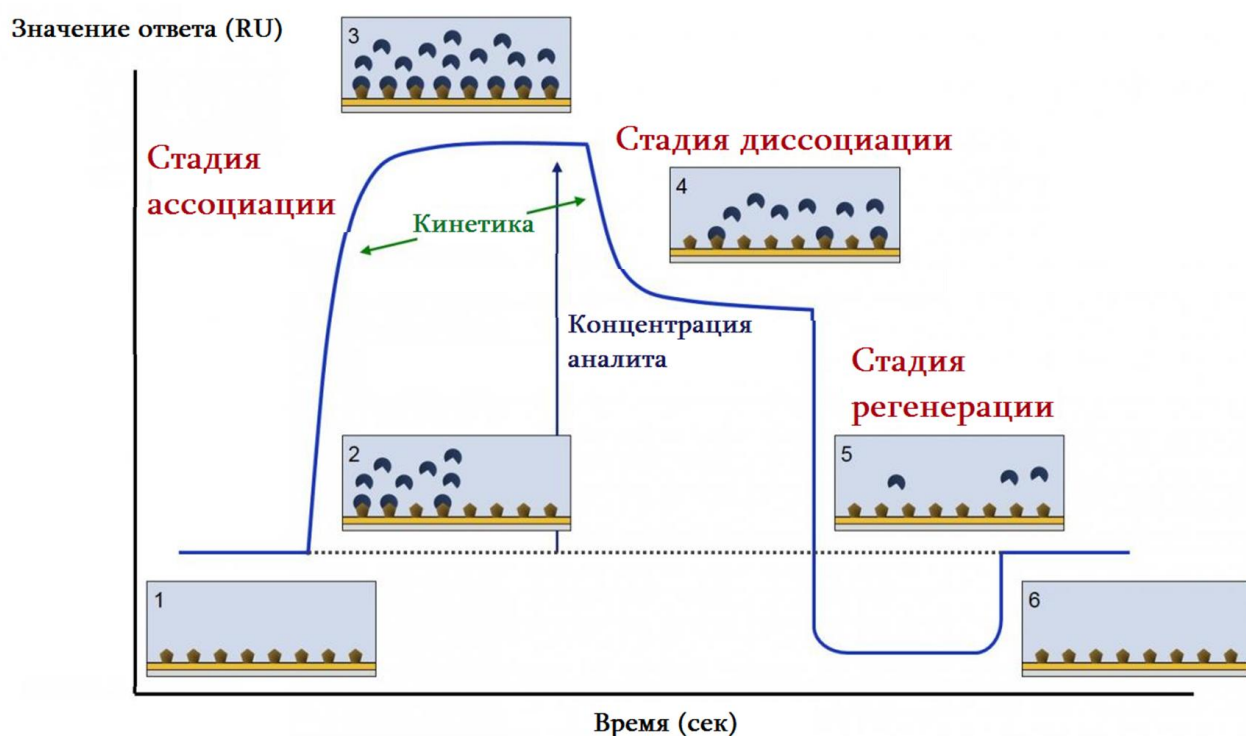


Рисунок 2.3 — Схема типичной сенсограммы. Коричневыми фигурами обозначен исследуемый лиганд, присоединенный к поверхности ячейки, синими фигурами — взаимодействующее с лигандом вещество (аналит)

2.11. Клеточные методы

2.11.1. Культивирование клеток линии HL-60

Клетки линии HL-60 культивировали в CO₂-инкубаторе (5 %) при 37 °С при 100 % увлажнении воздуха во флаконах для суспензионных культур с фильтрами на крышках. Использовали среду RPMI-1640 («Биолот», Россия), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («FLOW LABORATORIES», Великобритания), 0,1 % глутамина («Биолот», Россия) и 25 мМ Нерес-буфера. Раз в неделю клетки из среды осаждали центрифугированием при 1500 g, осадок ресуспендировали в минимальном объеме свежей среды и 1/5 объема переносили во флакон со свежей средой.

2.11.2. Культивирование клеток линии Jurkat

Клетки линии Jurkat культивировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («FLOW LABORATORIES», Великобритания), 100 мкг/мл гентамицина («Биолот», Россия) и 2 мкМ L-глутамина («Биолот», Россия) при 37 °С во влажной атмосфере в CO₂-инкубаторе с содержанием углекислого газа 5 %. Пересев производили каждые три дня с кратностью 1:5.

2.11.3. Культивирование клеток мышинной гепатомы 22a

Клетки линии H22a культивировали в среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», Великобритания), 0,1 мг/мл гентамицина («Биолот», Россия) и 0,6 мг/мл глутамина («Биолот», Россия) в CO₂-инкубаторе с содержанием углекислого газа 5 % в условиях контролируемого температурного режима (37 °С). При достижении клетками близкой к 100 % конfluenceности слоя их отмывали от

среды, заливали на 1–2 минуты прогретым при 37 °С раствором трипсин-Версен, останавливали реакцию средой с сывороткой, отмывали клетки и пересевали в новые флаконы с кратностью 1:10.

2.12. Исследование токсического действия веществ на опухолевые и нормальные клетки *in vitro*

2.12.1. Изучение жизнеспособности клеток линии HL-60 и Jurkat методом проточной цитометрии

Для анализа влияния тестируемых препаратов на жизнеспособность клеток линии HL-60 и Jurkat, суспензию клеток вносили в лунки 24-луночного плоскодонного планшета в концентрации 300 тыс. клеток в 300 мкл полной культуральной среды. В лунки вносили препараты LF и LF/80А в концентрации 2 мг/мл. Спустя 1 ч (для клеточной линии HL-60) и 24 ч инкубации (для клеточной линии Jurkat) при 37 °С во влажной атмосфере и 5 % CO₂ проводили окраску клеток в пробирках для проведения цитометрического учета 12×75 мм («Beckman Coulter», США). Интенсивность реакций апоптоза и некроза оценивали по связыванию с клетками двух маркеров: YO-PRO — флуоресцентного красителя, который свободно проникает в клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, и связывается с нуклеиновыми кислотами, и пропидий йодида (PI) — красителя, который свободно проникает в клетки, находящиеся в состоянии некроза. Конечная концентрация красителя YO-PRO, который добавляли к суспензии клеток, составлял 100 нМ, а PI — 3 нМ. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 5 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации проводили анализ на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток.

2.12.2 Изучение жизнеспособности клеток гепатомы 22а методом окрашивания метиленовым синим

Для оценки прямого токсического действия в отношении опухолевых клеток *in vitro* в 96-луночные планшеты помещали $3,2 \times 10^4$ клеток гепатомы 22а на 1 лунку в объеме 100 мкл среды DMEM с добавлением 5 % фетальной сыворотки с антибиотиками и культивировали до образования субконфлуентного монослоя. В различных концентрациях добавляли исследуемые препараты и инкубировали 24 часа при 37 °С. Затем клетки фиксировали 10%-ным раствором формалина и окрашивали 0,05%-ным метиленовым синим, после чего краситель растворяли в 0,3 М HCl и измеряли поглощение при длине волны 620 нм. Цитотоксический индекс (ЦИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЦИ} = 100 - (A_o \times 100\% / A_k),$$

где A_o — поглощение в лунках, куда были добавлены исследуемые препараты, A_k — поглощение в лунках, где культивировали клетки гепатомы с добавлением фосфатно-солевого буфера вместо препаратов.

2.12.3. Анализ гемолитической активности

Для изучения токсического действия тестируемых препаратов на мембраны эукариотических клеток использовали гемолитический тест, который основан на фотометрической детекции свободного гемоглобина, вышедшего из поврежденных эритроцитов.

Эритроциты выделяли из цитратной крови здоровых доноров после трёх циклов отмывки клеток от плазмы раствором PBS и последующим центрифугированием (600 g, 10 мин). Содержание эритроцитов в полученной эритроцитарной массе принимали за 100 % и разбавляли раствором PBS до соотношения клетки: буфер = 1:8.

В лунки 96-луночного планшета с плоским дном («Nuova Aptaca SRL», Италия) вносили 200 мкл разбавленных до нужной концентрации тестируемых препаратов и по 20 мкл суспензии эритроцитов (Рис. 2.4). Планшет инкубировали в течение 1 часа при 37 °С с использованием термошейкера (300 об/мин). В качестве положительного контроля полного гемолиза использовали вместо PBS апиrogenную деионизированную воду («Медиана-Фильтр», Россия). Результаты расчета усредняли по трем независимым экспериментам, в каждом из которых измерения выполняли в четырех повторах.

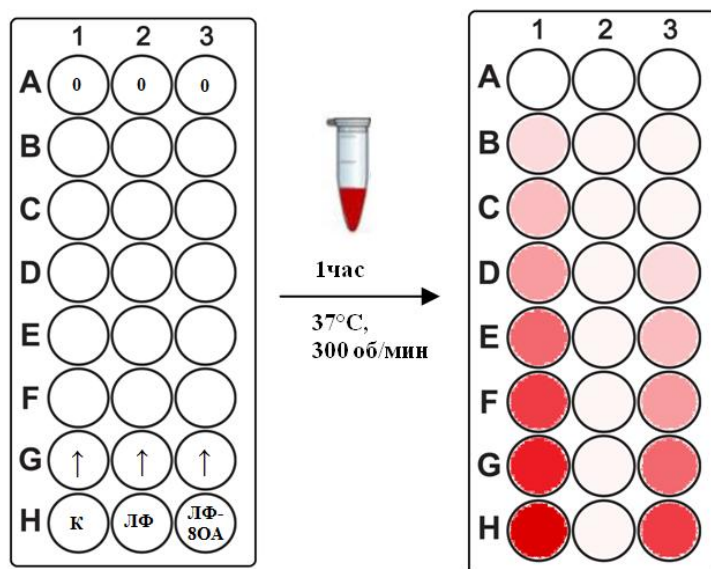


Рисунок 2.4 — Схема эксперимента по изучению гемолитической активности тестируемых препаратов

Гемолиз оценивали с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) по A_{412} (полоса Соре гемоглобина — максимум поглощения гема) в надосадочной жидкости, перенесенной в новый планшет после осаждения эритроцитов в лунках исходного планшета. Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\Gamma (\%) = ((\text{ОП}_c - \text{ОП}_0) / (\text{ОП}_{100} - \text{ОП}_0)) \times 100\% ,$$

где $ОП_c$ — оптическая плотность надосадочной жидкости исследуемых препаратов, $ОП_0$ — контрольная оптическая плотность, $ОП_{100}$ — оптическая плотность полностью лизированных клеток.

Для изучения защитного действия церулоплазмينا в отношении мембран эритроцитов, к вышеописанной системе в условиях планшета в лунки с LF и LF/8 ОА добавляли СР из расчета 1 моль СР на 1 моль LF. После часовой инкубации с эритроцитами оценивали степень гемолиза, как описано ранее.

2.13. Исследования токсического действия веществ на опухолевые клетки *in vivo*

2.13.1. 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 внутривенно 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. В течение суток, в особенности первых часов, после введения препарата, животные находились под непрерывным наблюдением для изучения острой токсичности. Для регистрации картины интоксикации учитывали общее состояние и поведение животных, поведенческие реакции, интенсивность и характер двигательной активности, состояние шерстного покрова, потребление корма и воды, возможную гибель животных. Выбор одной дозы препарата был обусловлен результатом предварительных исследований, показавшим отсутствие

токсичности лактоферрина. Также, при выборе доз руководствовались анализом литературных данных.

2.13.2. Исследование влияния LF и LF/80A на гибель мышей с гепатомой 22a

Для солидного роста опухоли клетки гепатомы 22a прививали мышам под кожу в область спины в количестве 2×10^5 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 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 (Рис. 2.5). Время появления опухолей и их размер регистрировали каждые два дня.

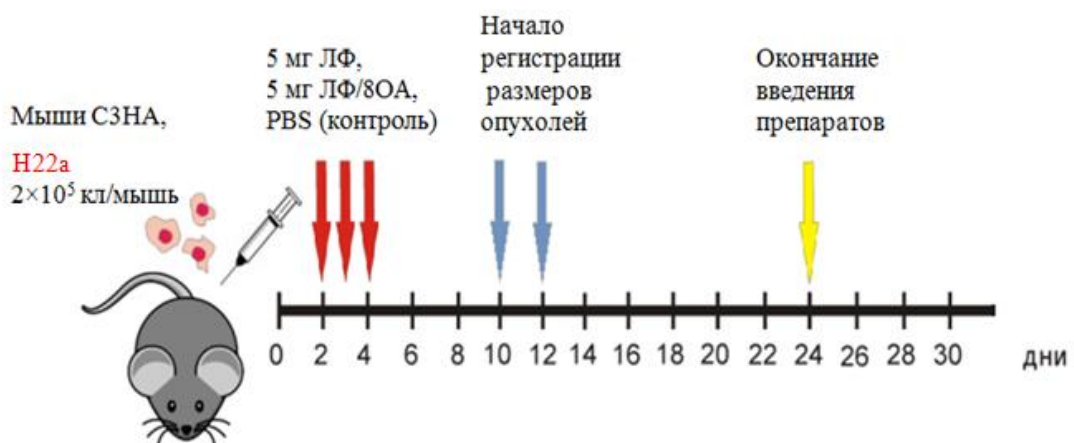


Рисунок 2.5 — Схема *in vivo* эксперимента по изучению влияния тестируемых препаратов

С 10 дня после перевивки опухоли у всех мышей измеряли размеры опухоли с определением ее объема по следующей формуле (Хабриев, 2005):

$$V = (a \times b^2) / 2 ,$$

где a, b — длина и ширина опухолевого узла.

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). Процент торможения опухолевого роста определяли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100\% ,$$

где V_k и V_o — средний объем опухоли (мм^3) в контрольной и опытной группе соответственно.

Индекс роста опухоли определяли по формуле:

$$\text{ИРО} = S_o / S_k ,$$

где S_o — площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе мышей, получавших исследуемые препараты, мм^2 ; S_k — площадь под кинетической кривой роста опухоли мышей контрольной группы, мм^2 .

Для измерения площади под кинетической кривой роста использовали метод трапеций:

$$S = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i + V_{i+1}}{2} \cdot t_i = \frac{V_1 + V_2}{2} \cdot t_1 + \frac{V_2 + V_3}{2} \cdot t_2 + \dots + \frac{V_{n-1} + V_n}{2} \cdot t_{n-1} ,$$

где V_i — объем опухоли в соответствующем измерении под номером i , мм^3 ; n — число измерений; t_1 — время между первым и вторым измерениями, сутки; t_2 — время между вторым и третьим измерениями, сутки; t_{n-1} — время между последним и предпоследним измерениями, сутки.

Для сравнительной характеристики скорости изменения показателя выживаемости использовали медиану выживаемости, определяемую как период времени, за который погибает половина исследуемой группы (Старинский и соавт., 2007). Расчет проводили по следующей формуле:

$$\text{Med} = i + \frac{\bar{P}_i - 50}{\bar{P}_i + \bar{P}_{i+1}} ,$$

где Med — медиана выживаемости; i и $i+1$ — дни (месяцы, годы) наблюдения, между которыми заключается 50%-ный кумулятивный

показатель наблюдаемой выживаемости; \bar{P}_i и \bar{P}_{i+1} — кумулятивные показатели наблюдаемой выживаемости, соответствующие i и $i+1$ дням наблюдения;

Увеличение продолжительности жизни животных рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ}(\%) = \frac{\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100,$$

где УПЖ — увеличение продолжительности жизни (%), СПЖ₀ — средняя продолжительность жизни опытной группы (дни), СПЖ_к — средняя продолжительность жизни контрольной группы (дни).

$$\text{T/C}(\%) = \frac{\text{СПЖ}_0}{\text{СПЖ}_k} \times 100,$$

СПЖ₀ — средняя продолжительность жизни опытной группы (дни), СПЖ_к — средняя продолжительность жизни контрольной группы (дни), Т — леченая группа, С — контрольная группа.

2.14. Анализ концентрации неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крыс

Эксперименты проводились на крысах-самцах (n=6) линии «Вистар» массой 210 ± 15 г. Животные были разделены на две опытные группы по 3 крысы в каждой. Животным экспериментальной группы вводили внутрибрюшинно 50 мг/кг LF человека (в апо-форме) в 1 мл PBS однократно. Контрольные животные получали внутрибрюшинно плацебо (PBS) однократно по аналогичной схеме. Сразу после инъекции LF (t=0мин), через 30 мин, 1 ч и каждый последующий час (в течение 5 часов) у животных отбирали по 0,2 мл крови для анализа концентрации жирных кислот. Кровь отбирали из латеральной хвостовой вены. Образцы крови центрифугировали в течение 5 минут при 3500 g. Концентрацию неэстерифицированных

жирных кислот в плазме крови анализировали, как описано в разделе 2.7. Исследования проводили в день получения крови.

2.15. Получение клеток *E. coli*

Все растворы и оборудование, использованные для данного вида работ, были стерилизованы с помощью автоклава в течение 30 мин, при 120 °С и давлении 2 бара. Для получения клеток штамма *E. coli* DH5α единичную колонию *E. coli* высевали в 10 мл LB среды (1 % триптон; 0,5 % дрожжевой экстракт; 0,17 М NaCl, рН 7,5) и культивировали в течение ночи (16–18 ч) при 37 °С и интенсивном перемешивании в шейкере-инкубаторе ЕС-20/60 («Biosan», Латвия). На следующий день 100 мкл ночной культуры переносили в 10 мл свежей стерильной LB среды и культивировали в течение нескольких часов при 37 °С и покачивании до достижения $OD_{600}=0,3-0,4$ ОЕ. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с («Thermo Scientific», США) против стерильной LB среды и определяли концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) по формуле:

$$1 \times OD_{600} = 3 \times 10^8 \text{ КОЕ/мл.}$$

Клетки осаждали центрифугированием в стерильных пробирках в течение 5 минут при температуре 4 °С на 3000g. Осадок клеток аккуратно ресуспендировали в 1 мл LB среды. Для дальнейшей работы бактерии разбавляли до конечной концентрации 4×10^5 КОЕ/мл 50%-ной LB средой.

2.16. Оценка антимикробного действия LF и LF/80A в отношении штамма *E. coli* DH5α

В лунки 96-луночного планшета с плоским дном («Nuova Aptaca SRL», Италия) вносили по 100 мкл растворов тестируемых препаратов в 0,01 М натрий-фосфатном буфере рН 7,4 (готовили двукратные серийные

разбавления LF и LF/80A). Во все лунки вносили по 100 мкл приготовленной суспензии бактерий (конечная концентрация бактерий в лунке составляла 4×10^4 КОЕ/мл) и затем добавляли по 40 мкл 360 мкМ раствора резазурина (См. таблицу 2.2).

К положительному контролю (жизнеспособные бактерии) вместо растворов тестируемых препаратов добавляли 100 мкл 0,01М натрий-фосфатного буфера pH 7,4. Отрицательным контролем (отсутствие активно метаболизирующих клеток) служили *E. coli*, подвергнутые термической обработке (98 °С, 20 мин) и *E. coli* с добавлением NaN_3 до 0,05 %. Состав проб представлен в таблице 2.2. Планшет инкубировали при 37 °С в термошейкере PST-60HL-4 («Biosan», Латвия). Измерения проводили каждые 30 минут в течение 4 часов с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) на длинах волн 530 нм и 630 нм.

Метаболическую активность бактерий после инкубации с тестируемыми препаратами оценивали по возрастанию показателя ($A_{530} - A_{630}$). Антимикробную активность выражали как концентрацию белка, которая вызывала снижение в 2 раза величины ($A_{530} - A_{630}$) по сравнению с контрольными клетками (MIC_{50}).

Таблица 2.2. Состав проб в эксперименте по изучению влияния исследуемых препаратов на дыхательную активность бактерий *E. coli* DH5 α

Вещество	Исходная концентрация	Объем	Конечная концентрация в лунке
LF / LF/80A	20 мг/мл	100 мкл	2 мг/мл
Суспензия <i>E. coli</i> в 1/2 LB среды	4×10^5 КОЕ/мл	100 мкл	4×10^4 КОЕ/мл
Резазурин	360 мкМ	40 мкл	60 мкМ

2.17. Электрофоретические методы

2.17.1. Диск-электрофорез в щелочной системе

Электрофорез (ЭФ) белков в нативном состоянии с $pI < 7$ проводили в 7,5%-ном разделяющем ПААГ, который содержал 375 мМ Tris-HCl буфер с pH 8,9. В качестве концентрирующего геля использовали 5%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ Tris-HCl буфер с pH 6,8. Для полимеризации в смесь буфера и акриламида (акриламид/метиленабисакриламид=30/0,8, w/w) добавляли TEMED до 0,1 % и 25%-ный персульфат аммония до конечной концентрации 0,1 %. В качестве электродного буфера использовали Tris-глициновый буфер (Tris 6 г, глицин 28,8 г, на 1 л H₂O), pH 8,3. Перед проведением ЭФ буфер разбавляли в 10 раз дистиллированной водой. Исследуемый образец (1–10 мкг белка) наносили в соотношении 4:1 (v/v) с 62,5 мМ Tris-HCl-буфером, pH 6,8, содержащим 0,001 % бромфенолового синего и 50 % глицерола. ЭФ проводили в течение 2,5–3 часов при комнатной температуре и напряжении электрического поля 15–20 В/см (2–5 мА на 1 см геля) в аппарате для вертикального ЭФ. В качестве маркера, позволяющего визуально определить время завершения ЭФ, использовали краситель бромфенол синий. После ЭФ гели окрашивали на белок 0,5%-ным Кумасси бриллиантовым синим G-250 в 25%-ном этаноле и 5%-ной H₃PO₄ в течение 10–15 мин. Для отмывки использовали 25%-ный этанол.

2.17.2. Выявление о-дианизидин-оксидазной активности после диск-электрофореза

Специфическую оксидазную активность СР выявляли путем окрашивания гелей раствором хромогенного субстрата — о-ДА. Для этого гели после ЭФ помещали на 10 минут в 0,4 М Na-ацетатный буферный раствор, pH 4,5, для приведения геля к условиям, необходимым для окраски (ЭФ проводился при pH 8,3), а затем добавляли 1%-ный раствор дигидрохлорида о-ДА в 1%-ном Тритоне X-100 до конечной концентрации 0,05 % и инкубировали при комнатной температуре в течение 1–2 часов (до развития окраски).

2.17.3. Электрофорез в присутствии SDS в высокомолярной Tris-буферной системе

Для разделения белков по молекулярной массе использовали ЭФ в ПААГ с 750 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,9. В качестве концентрирующего геля использовали 6%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ Tris-HCl буфер, pH 6,8. В гель добавляли сахарозу до 10 % и SDS до 0,1 %. Для полимеризации в смесь растворов добавляли TEMED и 25%-ный персульфат аммония до конечной концентрации 0,1 %. В качестве электродного буфера использовали Tris- глициновый буфер (Tris 6 г, глицин 28,8 г, на 1 л H₂O), pH 8,3. Перед проведением ЭФ буфер разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и добавляли 0,1 % SDS. Для приготовления пробы исследуемый образец (1–10 мкг белка) смешивали в соотношении 4:1 (v/v) с 125 мМ 1М Tris-HCl, pH 6,8, содержащим 2 % SDS, 0,1 % 2-меркаптоэтанола, 0,001 % бромфенолового синего и 50 % глицерола. Перед нанесением пробу нагревали при температуре 98 °С в течение 2 минут. ЭФ проводили в течение 2,5–3 часов при комнатной температуре и при напряжении электрического поля 15–20 В/см в камере для вертикального ЭФ. После ЭФ гель отмывали от SDS в растворе 50%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты в течение ночи. Окраска на белок и отмывка аналогичны тем, которые использовали для диск-ЭФ.

2.17.4. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили в горизонтальных пластинах 1%-ного агарозного геля (1 % агарозы, 0,5^x TBE-буфер, 1–4 мкг/мл бромистый этидий). В качестве электродного буфера использовали 0,5^x TBE-буфер (44,5 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 44,5 мМ борная кислота, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) (Маниатис и соавт., 1984). Для приготовления геля необходимое количество агарозы заливали 0,5^x TBE-буфером и плавил при 90–95 °С до

полного расплавления агарозы. После охлаждения до 50–60 °С для визуализации ДНК в смесь добавляли бромистый этидий, который является интеркалирующим агентом и образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290–330 нм.

Форму с затвердевшим агарозным гелем помещали в стандартную горизонтальную камеру Sub Cell GT («BioRad», США), заполненную 0,5^x TBE-буфером. Перед нанесением ДНК-проб в гель их смешивали с 5-кратным буфером для проб (30%-ный глицерин (v/v), 0,025%-ный ксиленцианол (w/v), 0,025%-ный бромфеноловый синий (w/v)). К анализируемому образцу добавляли буфер для нанесения образцов (в объемном отношении 1:1 с образцом) и наносили в лунки геля.

Камеру подключали к источнику питания (напряжение 5 В/см длины геля), и проводили ЭФ ДНК в направлении от катода к аноду в течение 1,5–2 часов. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полос красителей.

Для анализа результатов гель вынимали из формы и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью УФ-трансиллюминатора.

2.18. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК получали из культуры клеток линии HL-60 и выделяли методом хлороформ-изоамиловой экстракции. После инкубации клеток HL-60 с тестируемыми препаратами отбирали из лунок планшета суспензию клеток и переносили в соответствующие центрифужные пробирки (1,5 мл), которые затем центрифугировали 5 минут при 5000 g. Супернатант после центрифугирования удаляли, к осадку добавляли 500–800 мкл (в зависимости от количества/объема осадка) буфера для выделения ДНК (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0, 100 мМ NaCl). К полученным образцам добавляли 10%-ный SDS до конечной концентрации 1 % и 3–5 мкл

протеиназы К (10 мг/мл). Готовые пробы инкубировали в течение ночи при 55 °С.

После ночной инкубации пробы оставляли на 30 минут на 4 °С (для лучшего отделения белковой фракции). Последующую экстракцию ДНК осуществляли с помощью смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1 v/v). К пробам добавляли равный объем смеси хлороформа со спиртом и тщательно перемешивали в течение 5 минут до появления молочного цвета. После этого центрифугировали образцы при комнатной температуре, в течение 10 минут при 13400 g. Верхнюю фазу отбирали и снова подвергали очистке. Проводили 3^х очистку от белков (до появления прозрачной верхней фазы). После этого ДНК осаждали добавлением 2,5 объема охлажденного (-20 °С) перегнанного этанола и центрифугировали при 13400 g в течение 10 мин. Полученный осадок отмывали 70%-ным этанолом, центрифугировали образцы при 13400 g (10 минут). Супернатант удаляли аккуратным переворачиванием центрифужных пробирок (1,5 мл) на фильтровальную бумагу. Осадок ДНК убирали сушиться на 37 °С (0,5–1,5 часа). Высушенный осадок ДНК растворяли в 200 мкл апирогенной деионизированной воды.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически с помощью прибора Nanodrop 2000с («Thermo Scientific», США). Фрагментацию ДНК исследовали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (по методу, описанному в пункте 2.17.4).

2.19. Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы (НФ) выделяли из донорской крови с 1,2 г/л ЭДТА (в качестве антикоагулянта). Кровь смешивали с 6%-ным раствором декстрана Т-70 в 0,85%-ном NaCl (5:1, v/v) и осаждали эритроциты в течение 1 часа при комнатной температуре. Плазму, обогащенную лейкоцитами, собирали в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Далее примесь эритроцитов удаляли гипотоническим лизисом, добавляя к осадку клеток

сначала 3 мл охлажденного 0,2%-ного NaCl, а затем восстанавливали изотоничность путем добавления 3 мл 1,6%-ного NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали 7 мин при 400 g. Если смесь клеток после центрифугирования содержала эритроциты, то гипотонический лизис проводили повторно. Осадок клеток ресуспендировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4), наслаивали на 4 мл гистопака-1077 (плотность 1,077 г/л) и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Полученный осадок нейтрофилов отмывали PBS, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы, и хранили при 4 °C в течение нескольких часов. Все эксперименты с НФ проводили непосредственно в день взятия крови и проведения эксперимента. Доля нейтрофилов в клеточной суспензии составляла 97–98 %, а доля жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим — не менее 96 %.

2.20. Анализ влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на нейтрофилы

В лунки 96-луночного планшета с плоским дном («Nuova Aptaca SRL», Италия) вносили разбавленные до нужной концентрации тестируемые препараты LF и LF/80A и добавляли по 10 мкл суспензии нейтрофилов в PBS, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы. Планшет инкубировали в течение 1 часа при 37 °C с использованием термошейкера (300 об/мин). По завершении инкубации измеряли концентрацию миелопероксидазы (МПО) во всех лунках методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2.21. Твердофазный иммуноферментный анализ миелопероксидазы

Концентрацию МПО определяли твердофазным иммуноферментным анализом, методом «сэндвича». В лунки полистирольного планшета для ИФА (Jet Biofil, China) помещали по 100 мкл раствора моноклональных

антител против МПО (клон МРО18) в концентрации 5 мкг/мл в боратном буферном растворе (BBS:150 мМ NaCl, 10 мМ H₃BO₃, 1,25 мМ NaOH, pH 8,4). Планшет оставляли герметично закрытым и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

На следующий день планшет промывали буфером для промывки (150 мМ NaCl, 10 мМ H₃BO₃, 1,25 мМ NaOH, 0,05 % Tween 20) и для блокировки оставшихся сайтов связывания в каждую лунку добавляли по 100 мкл блокирующего буфера, содержащего бычий сывороточный альбумин (200 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,8 мМ C₆H₈O₇, 21,3 мМ Na₃C₆H₅O₇, 20 мМ NaBr, 0,05 % Tween 20). Планшет инкубировали на термошейкере при 37 °С в течение 2 часов и затем, пропуская стадию промывки, вносили по 10 мкл исследуемых образцов и стандартных растворов МПО. Планшет инкубировали на термошейкере при 37 °С в течение 2 часов и трижды промывали буфером для промывки. Затем в планшет добавляли антитела 2F7, меченные пероксидазой хрена (1:6000), инкубировали 45 минут при 37 °С и трижды промывали промывочным буфером. Пероксидазную метку проявляли, добавляя 100 мкл смеси на основе 3,3', 5,5' — тетраметилбензидина и H₂O₂. Среднее время инкубации для фермент-субстратной реакции составляло от 5 до 10 мин, после чего в каждую лунку добавляли по 50 мкл стоп-реагента (1 М серной кислоты). После остановки ферментативной реакции сигнал измеряли с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) на длине волны 450 нм.

На основании стандартных разбавлений строили калибровочную кривую. Зависимость A₄₅₀ от концентрации МПО аппроксимировали прямой по методу наименьших квадратов, коэффициент детерминированности (R²) составлял не менее 0,99 (Microsoft Excel 2008). С помощью полученного уравнения $A_{450} = k[\text{МПО}] + b$ рассчитывали содержание МПО в исследуемых образцах.

2.22. 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.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Специфичность взаимодействия лактоферрина с жирными кислотами

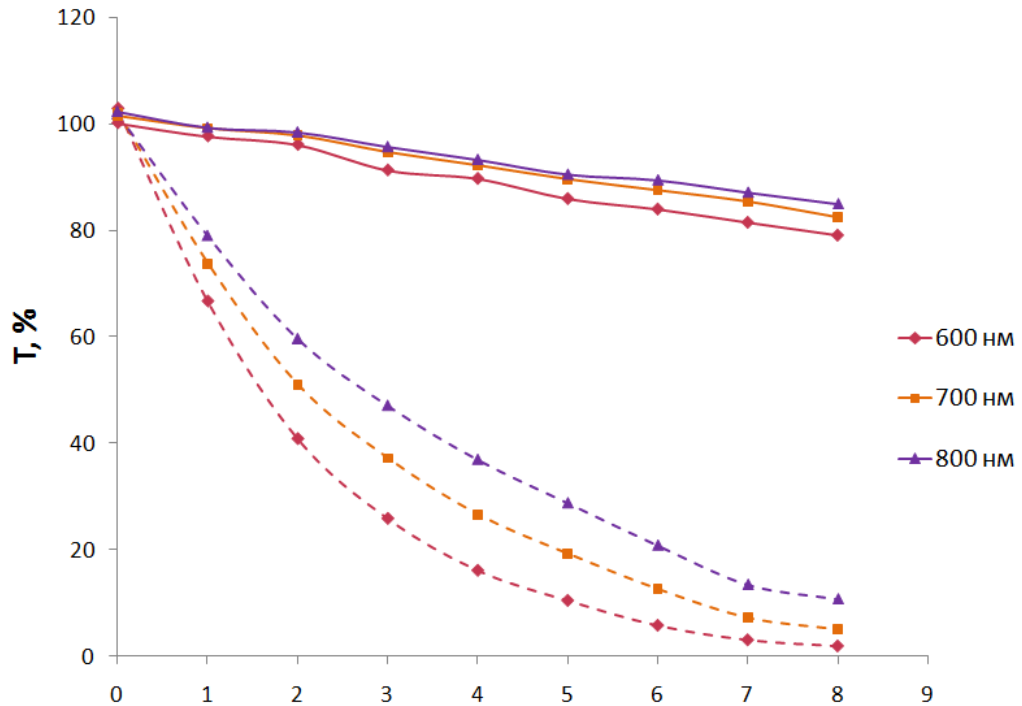
Свойства связывания между белком и различными жирными кислотами обычно характеризуются стехиометрией (молярным соотношением лиганда, связанного с белком) и константой ассоциации (k_a). Нами была изучена специфичность взаимодействия апо-формы рекомбинантного лактоферрина человека с рядом ненасыщенных жирных кислот (арахидоновая, линоленовая, линолевая, олеиновая) и двумя насыщенными ЖК (пальмитиновая и стеариновая). При добавлении растворов ненасыщенных ЖК в этаноле к LF мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания ЖК с физиологическим раствором (Рис. 3.1).



Рисунок 3.1 — Раствор рекомбинантного лактоферрина (апо-форма) после добавления 8 моль ОА на 1 моль белка. В качестве контроля — раствор PBS с ОА (8 моль)

Таким образом, титрование белка раствором жирных кислот в этаноле, позволяет избежать образования мицелл ЖК в водной фазе. Отсутствие мицелл олеиновой кислоты (ОА) при титровании LF и монотонное уменьшение пропускания света при титровании PBS без белка

продемонстрировано при регистрации процента светопропускания в видимой области спектра (Рис. 3.2).



Количество олеиновой кислоты на 1 моль лактоферрина, моль

Рисунок 3.2 — Кривая зависимости коэффициента светопропускания от количества молей олеиновой кислоты, приходящейся на 1 моль лактоферрина (сплошная линия). Штрихпунктирной линией обозначена аналогичная зависимость при титровании раствора PBS без белка

Титрование белка показало, что один моль LF способен связать до 8 молей ОА, до 6 молей линолевой кислоты и до 5 молей линоленовой и арахидоновой кислот в данных экспериментальных условиях (Таблица 3.1). Насыщенные ЖК, пальмитиновая и стеариновая, не взаимодействовали с LF.

Таблица 3.1. Стехиометрия взаимодействия лактоферрина с ненасыщенными жирными кислотами

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

3.2. Определение образования комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой методом гель-фильтрации

В качестве проверки образования комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой использовали метод гель-фильтрации, который основан на эффекте молекулярного сита и позволяет разделять смеси веществ в соответствии с их размерами. Для анализа комплекса в качестве неподвижной фазы была выбрана колонка со смолой Bio-Gel P-6 (размер пор 1–6 кДа), PBS был выбран в качестве подвижной фазы. Данные хроматографического профиля, полученного в условиях эксклюзионной хроматографии, показали пик, соответствующий 280 нм (Рис. 3.3), приблизительно гауссовой формы. Дополнительных пиков на профиле не было. При элюции PBS в свободном объеме колонки был обнаружен LF, объем удерживания составил 4 мл, время удерживания — 14 минут.

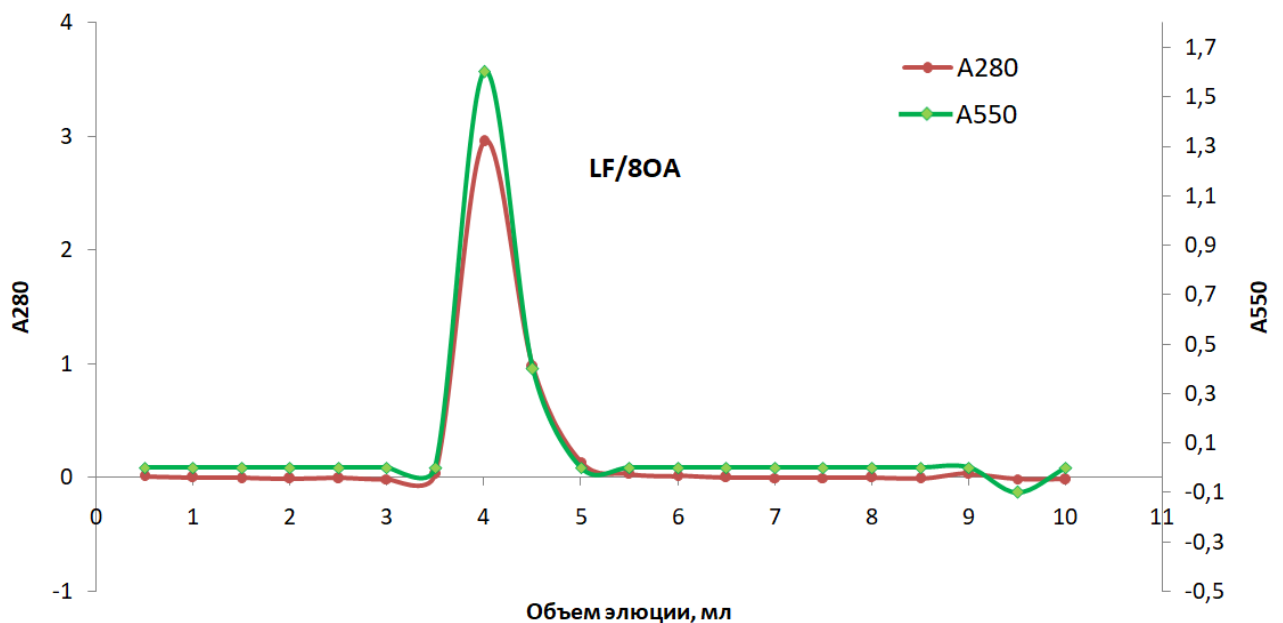


Рисунок 3.3 — Профиль элюции LF/80А на колонке с Bio-Gel P-6 (скорость потока PBS — 0,5 мл/мин). Пик соответствует LF. Основная горизонтальная ось: объем элюции, мл; основная вертикальная ось: поглощение при 280 нм; дополнительная вертикальная ось: поглощение при 550 нм

После хроматографии проводили анализ концентрации ЖК и количество моль ОА, приходящейся на 1 моль белка, в образце после диализа

и фильтрации комплекса через фильтрующие насадки (до гель-фильтрации) и во фракциях после гель-фильтрации комплекса LF/8OA на Bio-Gel P-6.

Исследование, проведенное при помощи гель-фильтрации, показало, что и до, и после хроматографии комплекса LF/8OA, 1 моль лактоферрина связывал одинаковое количество жирной кислоты: 1 моль белка связывал $7,8 \pm 0,2$ и $7,6 \pm 0,2$ моль олеиновой кислоты, соответственно. В таблице 3.2 приведены данные измерений количественного определения связавшейся с LF олеиновой кислоты до и после гель-фильтрации.

Таблица 3.2. Стехиометрия взаимодействия лактоферрина с олеиновой кислотой до и после гелифильтрации на Bio-Gel P6

	OA/LF, моль/моль	Количество LF, мг
До хроматографии	$7,8 \pm 0,2$	$4 \pm 0,2$
После хроматографии	$7,6 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,2$

Таким образом, методом гель-фильтрации с последующим измерением неэстерифицированных ЖК в пробах показано взаимодействие LF с OA и образование между ними постоянного комплекса.

3.3. Определение размеров частиц методом динамического светорассеяния

Методом динамического рассеяния света (ДРС) была изучена зависимость размера комплексов LF от количества моль OA на моль белка. В ходе эксперимента фиксировалась концентрация LF (2 мг/мл) и изменялось количество OA, приходящейся на 1 моль белка. Изучалась система, содержащая от 0 до 8 моль OA на 1 моль LF. На основе полученных методом ДРС результатов был построен график зависимости размера частиц в комплексе от количества OA (Рис. 3.4).

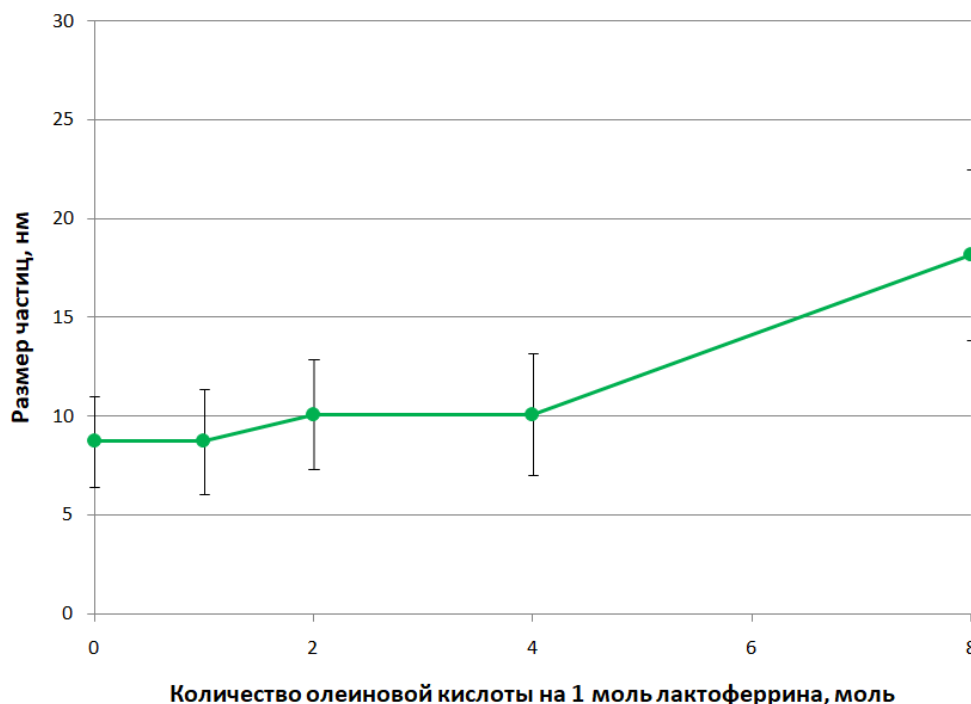


Рисунок 3.4 — Зависимость размера частиц LF/8OA от количества молей ОА, приходящихся на 1 моль белка, полученная методом динамического рассеяния света

Методом ДРС было показано, что комплекс LF/8OA состоял из мелких частиц, со средним размером около 18 нм. Эти данные согласуются с результатами измерения радиуса гирации около 8 нм, полученного методом малоуглового рассеяния нейтронов для частиц LF/8OA.

3.4. Спектры флуоресценции триптофанов

LF обладает собственной флуоресценцией, поскольку содержит ароматические аминокислоты — триптофан (10), тирозин (21) и фенилаланин (30). При длине волны возбуждения флуоресценции $\lambda_{ex} = 280$ нм испускание света в основном обусловлено остатками триптофана и тирозина, а при $\lambda_{ex} = 295$ нм возбуждается только флуоресценция остатков триптофана.

В эксперименте регистрировали спектры собственной флуоресценции LF и его комплекса с ОА при возбуждении на длинах волн, которые соответствуют максимумам поглощения тирозина и триптофана (общая

флуоресценция, 280 нм) и триптофана (295 нм). Спектры флуоресценции LF и LF/80A представлены на рисунках 3.5 и 3.6. Анализ спектральных характеристик показал, что флуоресценция при возбуждении светом длиной волны 280 и 295 нм характеризовались значениями максимума интенсивности $\lambda_{\text{макс}}=330-330,2$ нм, что свидетельствует о существенном вкладе в спектры остатков триптофана.

Нами не было выявлено существенных различий в интенсивности общей и триптофановой флуоресценции LF и LF/80A. Из представленных графиков видно, что при исследовании препаратов были получены аналогичные по форме спектры с максимумом поглощения 330 нм, что свидетельствует об отсутствии значимых структурных изменений в лактоферрине при добавлении к нему 8 моль олеиновой кислоты на 1 моль белка.

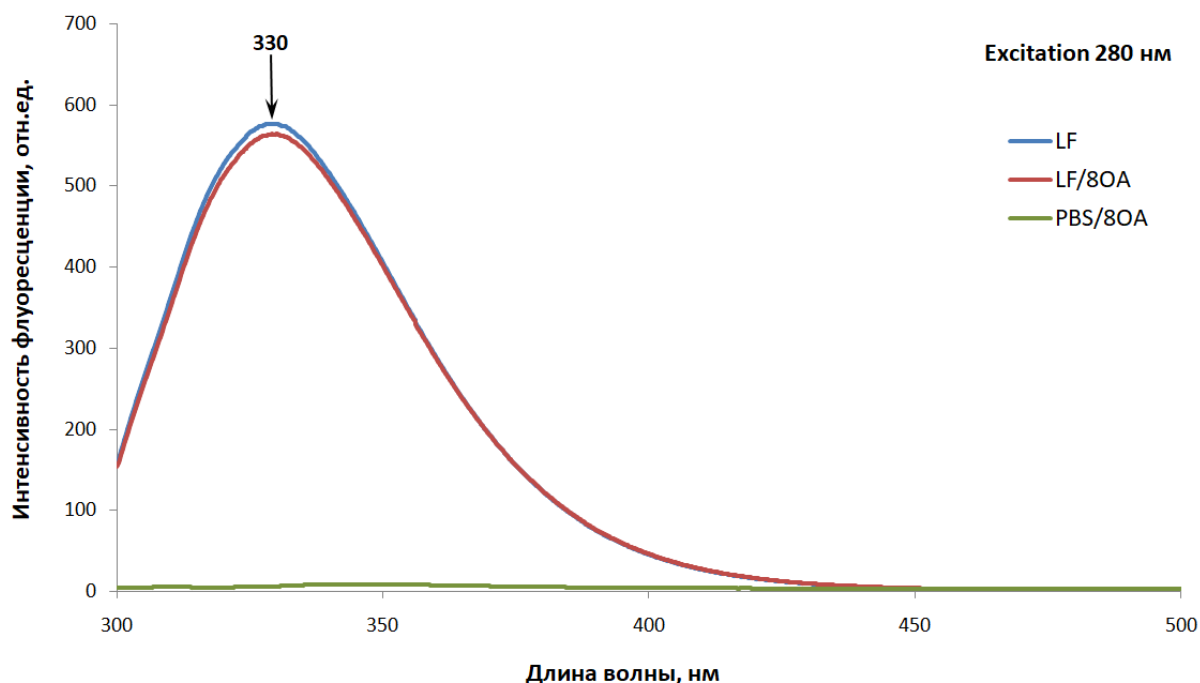


Рисунок 3.5 — Интенсивность собственной флуоресценции LF и LF/80A при возбуждении $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм

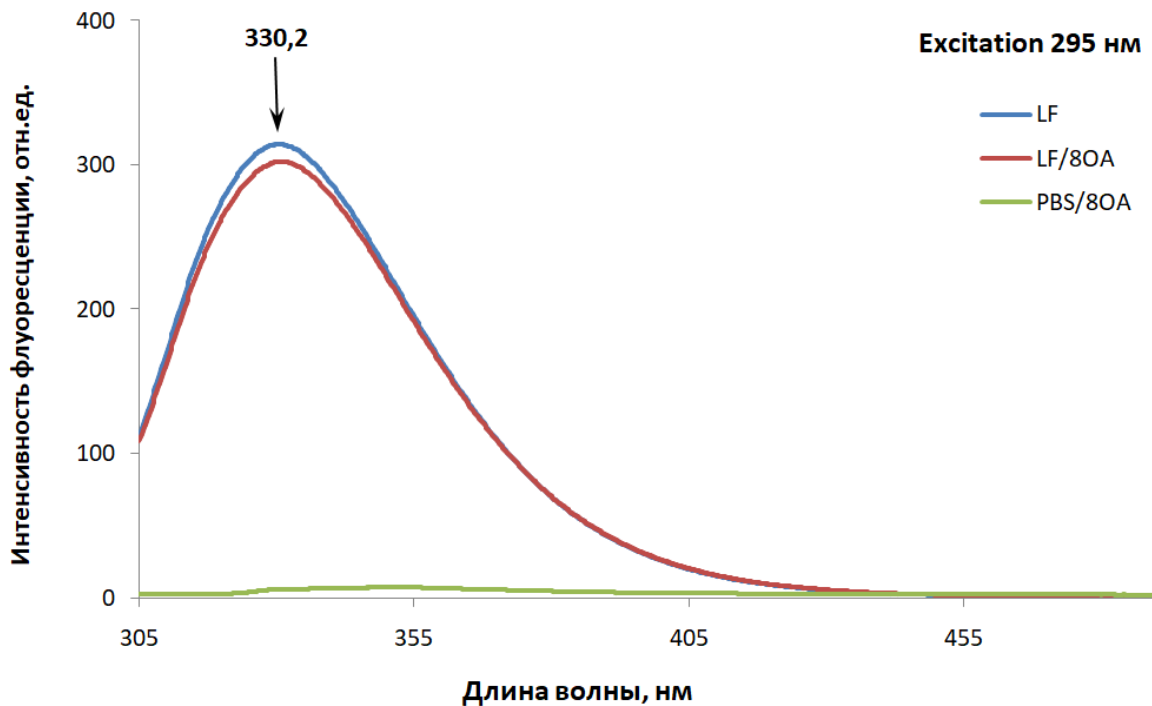


Рисунок 3.6 — Интенсивность собственной флуоресценции LF и LF/80A при возбуждении $\lambda_{\text{возб}}=295$ нм

Также нами были проведены эксперименты по измерению флуоресценции LF и LF/80A при добавлении к ним гидрофобного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (ANS). На рисунке 3.7 представлены спектры флуоресценции препаратов после связывания с ANS. Из графика видно, что свободный ANS практически не флуоресцировал в PBS, в то время как интенсивность флуоресценции LF и его комплекса с OA после связывания с зондом увеличивалась в десятки раз, что обусловлено способностью ANS взаимодействовать с кластерами гидрофобных аминокислот белка.

Связывание ANS с LF и LF/80A приводило к смещению максимума флуоресценции до ~ 479 нм и 476 нм, соответственно. Спектр интенсивности флуоресценции комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой расположен чуть выше, чем спектр лактоферрина, что может быть связано с увеличением числа гидрофобных участков, доступных для ANS.

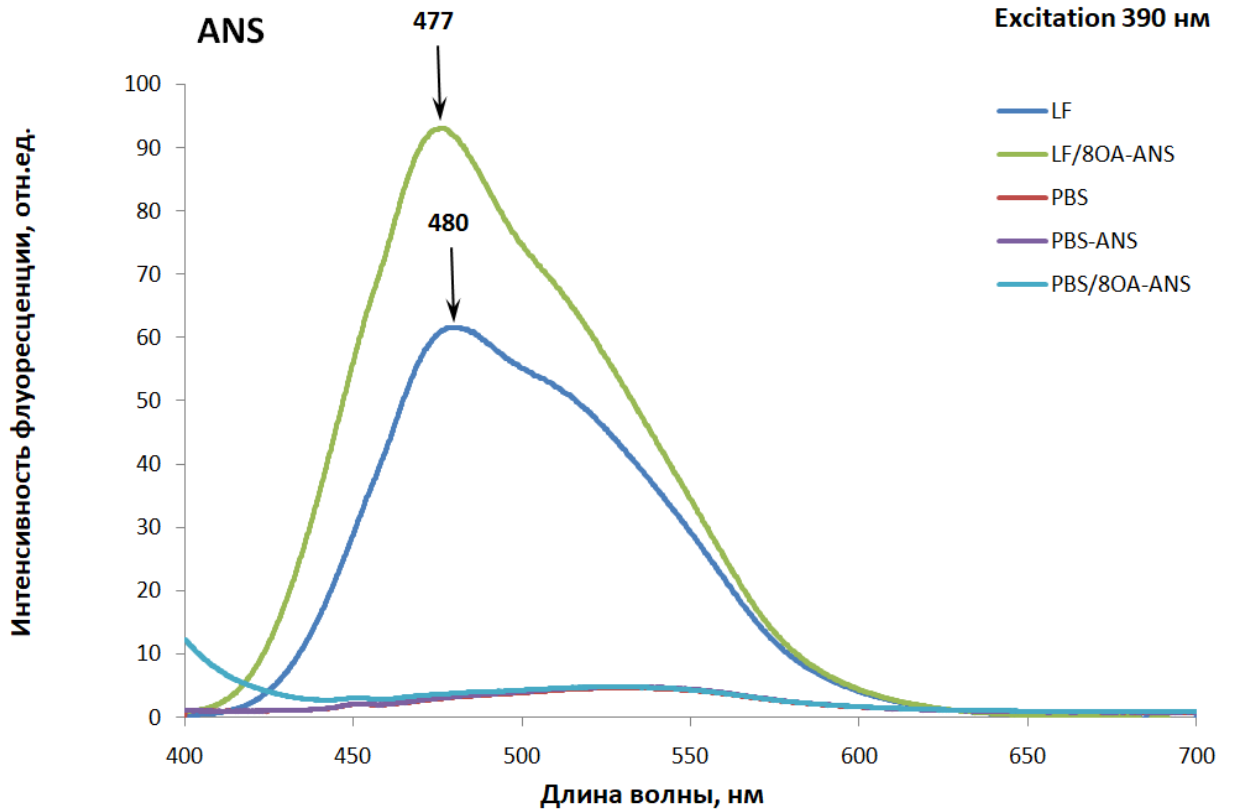


Рисунок 3.7 — Интенсивность флуоресценции LF и LF/80A после связывания с ANS

3.5. Спектроскопия кругового дихроизма

Наиболее информативным методом получения сведений о вторичной структуре пептидов и белков в растворе является метод кругового дихроизма (КД), который основан на различной абсорбции веществом света, поляризованного по кругу в правом и левом направлении. КД-спектроскопия широко используется для изучения взаимодействий между малыми молекулами и белками благодаря ее высокой чувствительности. Для получения характеристик белков наибольший интерес представляют спектры в диапазоне длин волн 190–250 нм (ближний УФ), формируемые, в основном, за счет вклада пептидных связей и дающие представление о вторичной структуре белка.

Методом КД-спектроскопии в дальнем ультрафиолетовом диапазоне были проведены эксперименты по изучению изменений вторичной

структуры LF в присутствии ОА. На рисунке 3.8 представлены КД-спектры дальней УФ-области в интервале длин волн 200–250 нм для LF с ОА и без нее. Как видно из графика, КД-спектры LF характеризовались повышенной отрицательной молярной эллиптичностью и отрицательными пиками при 212 нм и 220 нм, что характерно для α -спиралей в белке.

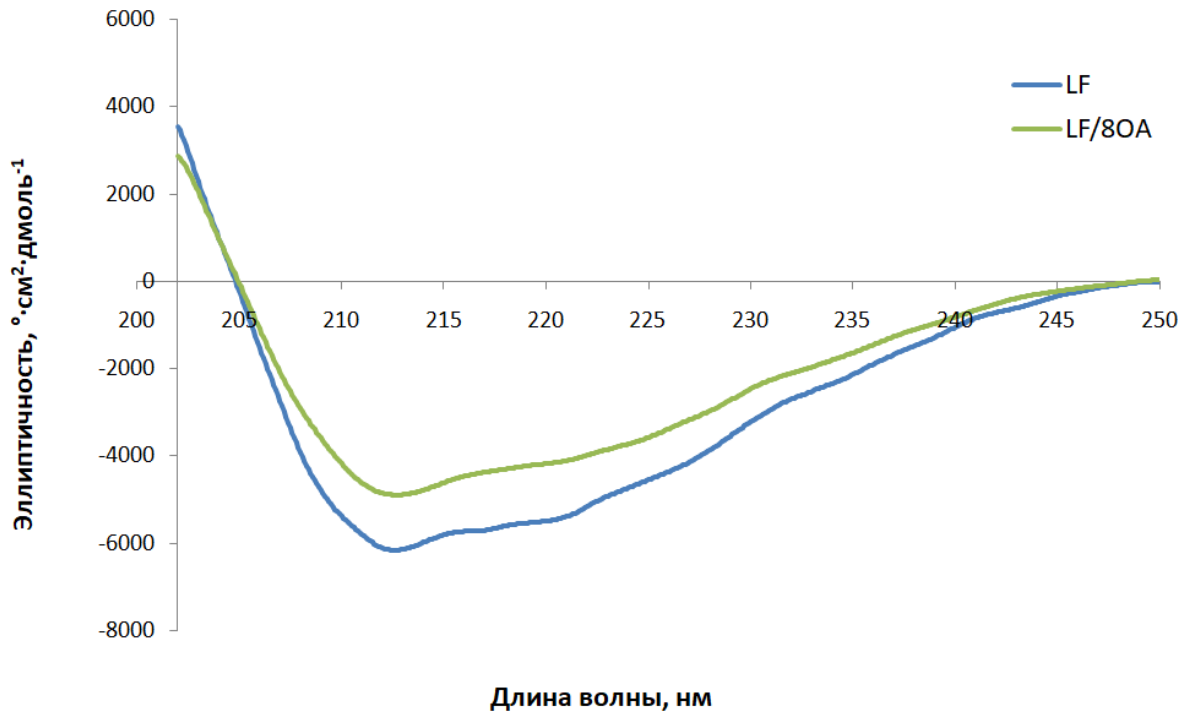


Рисунок 3.8 — Спектры кругового дихроизма LF и LF/80A в дальней УФ-области

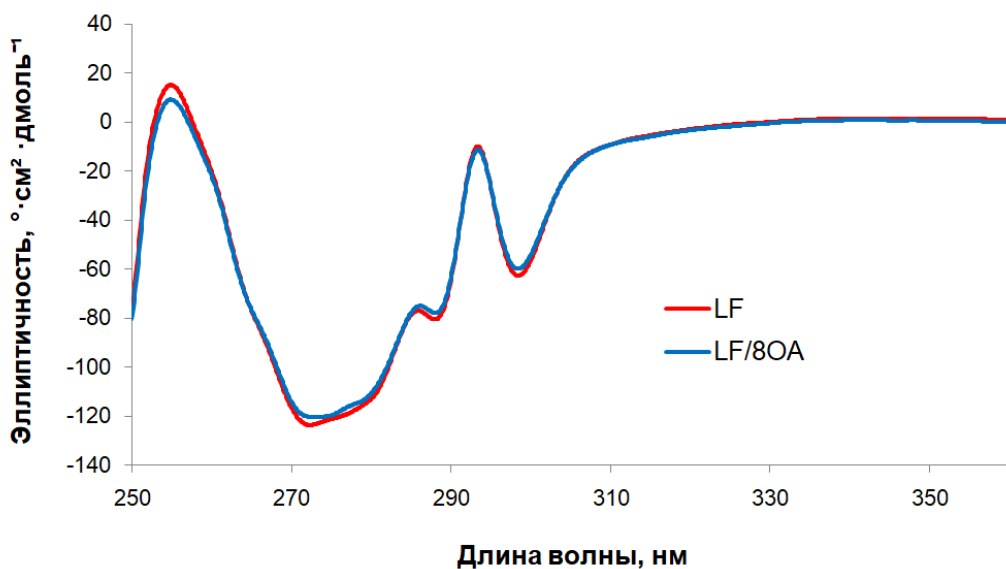


Рисунок 3.9 — Спектры кругового дихроизма LF и LF/80A в ближней УФ-области

Добавление к белку 8 моль ОА приводило к незначительному уменьшению отрицательных значений спектра. Спектры КД в ближней УФ-области, зарегистрированные в диапазоне длин волн 250–360 нм, показали сходную эллиптичность для LF и его комплекса с ОА (Рис. 3.9).

3.6. Анализ взаимодействия с церулоплазмином комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой методом диск-электрофореза

Взаимодействие СР с LF, а также с комплексом LF и ОА, было проанализировано методом диск-электрофореза в ПААГ без добавления детергентов. Образование комплекса СР с исследуемыми белками можно наблюдать по снижению его электрофоретической подвижности после окраски хромогенным субстратом о-дианизидином. На полученных электрофореграммах (Рис. 3.10) видно, что контрольные дорожки (№5 и №6), на которые был нанесен чистый СР, отличались от остальных.

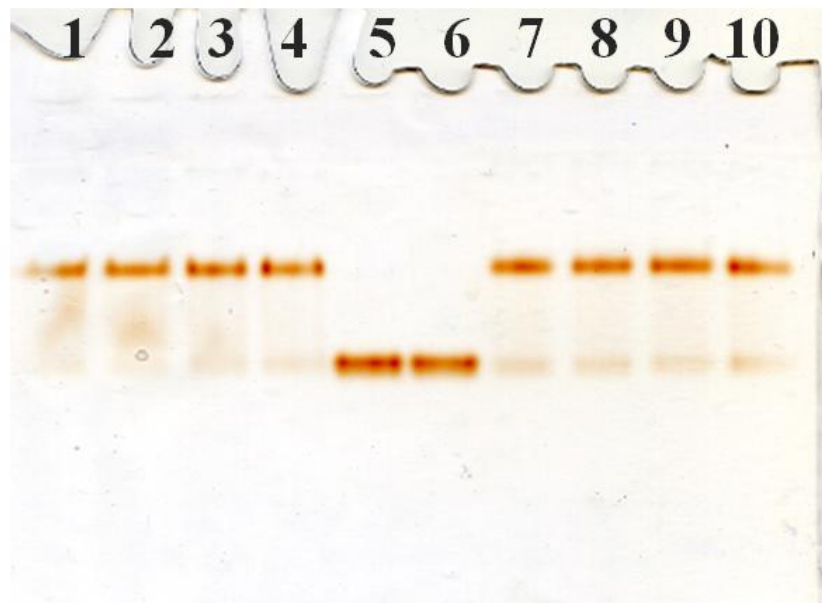


Рисунок 3.10 — Диск-электрофорез комплексов LF-СР и LF/8ОА-СР в ПААГ без детергентов. Окраска о-дианизидином. 1 — СР+LF (8 мкг), 2 — СР+LF (4 мкг), 3 — СР+LF (2 мкг), 4 — СР+LF (1 мкг), 5,6 — СР (по 1 мкг), 7 — СР+LF/8ОА (1 мкг), 8 — СР+LF/8ОА (2 мкг), 9 — СР+LF/8ОА (4 мкг), 10 — СР+LF/8ОА (8 мкг)

Электрофоретическая зона СР смещалась при добавлении к нему LF (дорожки №1–№4) и LF/8ОА (дорожки №7–№10), что свидетельствует об образовании комплекса между СР и LF. Добавление к LF олеиновой кислоты не приводило к диссоциации комплекса LF/СР.

Взаимодействие лактоферрина с СР также было изучено методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

3.7. Изучение взаимодействия методом поверхностного плазмонного резонанса

Был проведен анализ взаимодействия различных видов LF и его комплексов с ОА с иммобилизованным на поверхности микрочипа СР. На рисунках 3.11–3.13 приведены сенсограммы кинетического анализа взаимодействия СР с комплексами LF и интактным LF.

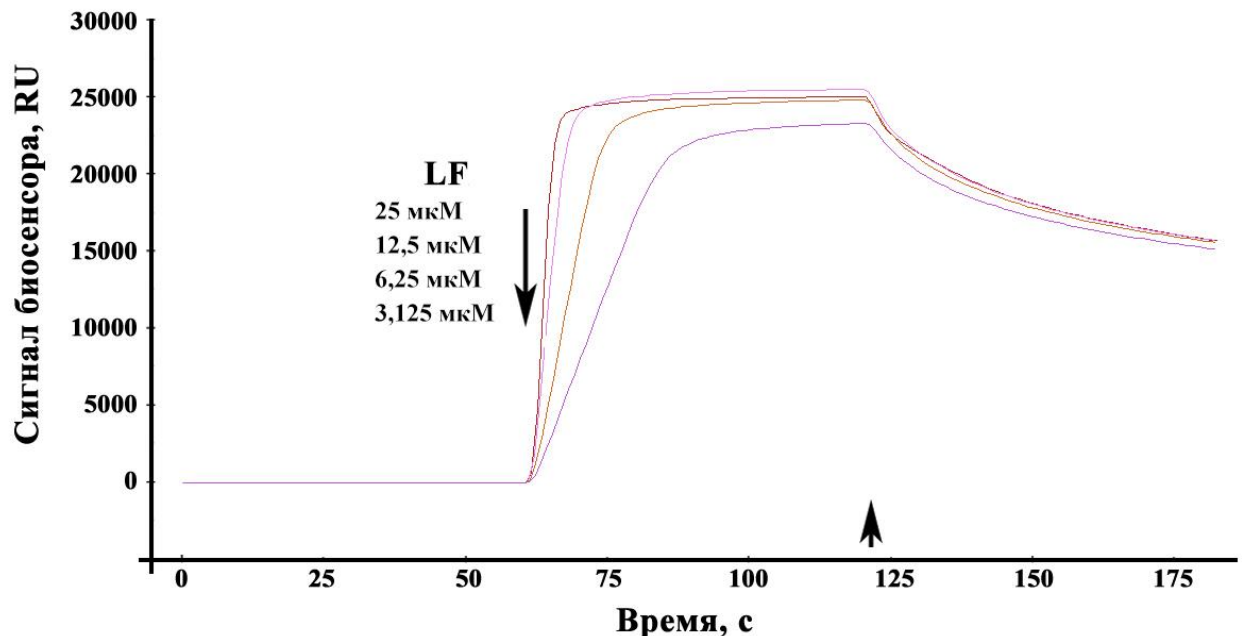


Рисунок 3.11 — Сенсограмма, полученная при изучении взаимодействия LF человека с СР, иммобилизованным на чипе CM5, с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Biacore X100. Слева приведены используемые концентрации LF в мкМ. Направленная вниз стрелка указывает время начала ввода LF, направленная вверх — время начала промывки сенсора буфером без белка

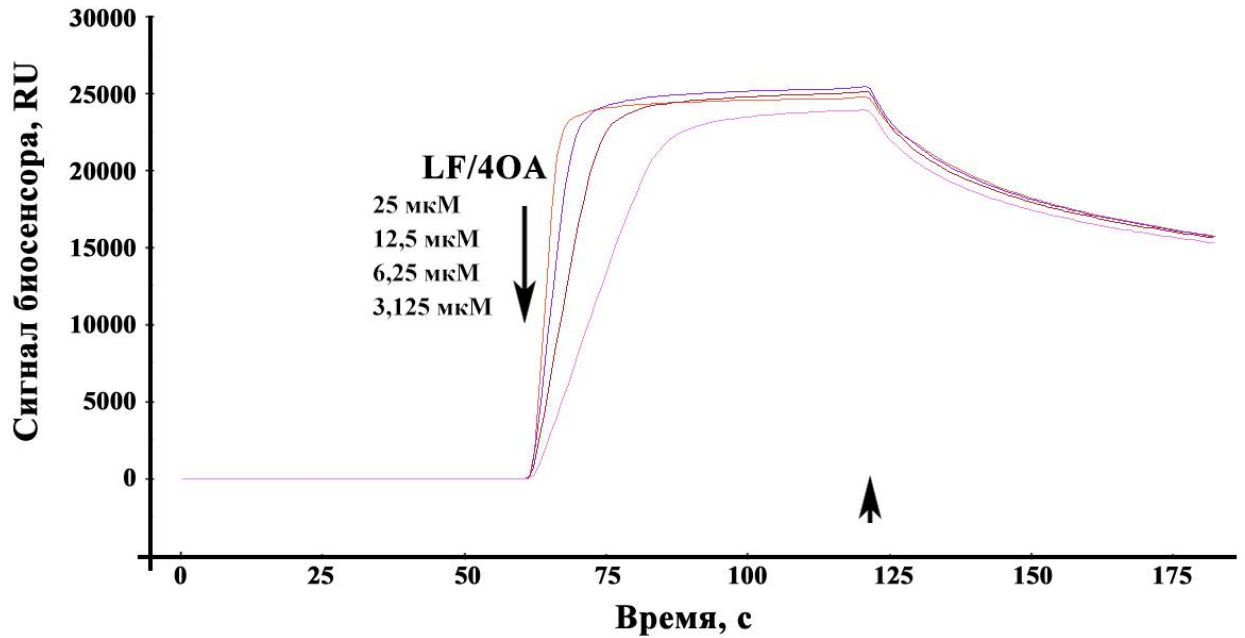


Рисунок 3.12 — Сенсограмма, полученная при изучении взаимодействия LF/40A с CP, иммобилизованным на чипе CM5, с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Biacore X100. Слева приведены используемые концентрации LF в мкМ. Направленная вниз стрелка указывает время начала ввода LF/40A, направленная вверх — время начала промывки сенсора буфером без белка

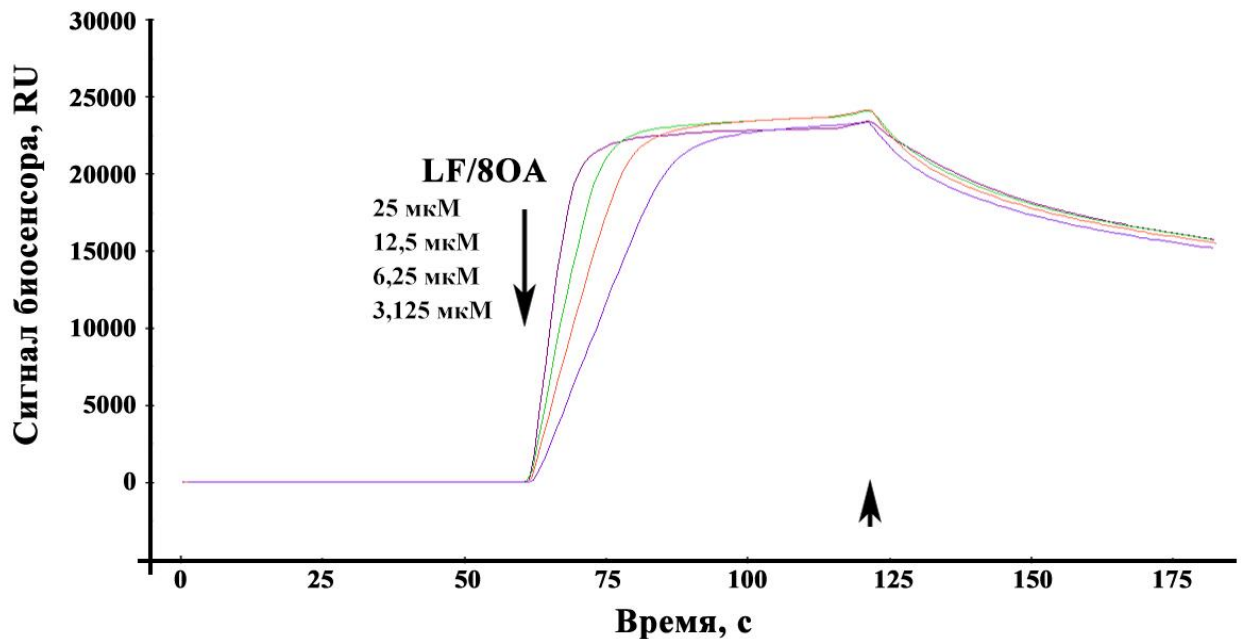


Рисунок 3.13 — Сенсограмма, полученная при изучении взаимодействия LF/80A с CP, иммобилизованным на чипе CM5, с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Biacore X100. Слева приведены используемые концентрации LF в мкМ. Направленная вниз стрелка указывает время начала ввода LF/80A, направленная вверх — время начала промывки сенсора буфером без белка

При помощи ППР были изучены кинетики ассоциации и диссоциации взаимодействующих веществ. В таблицах 3.3–3.5 приведены параметры, описывающие кинетику взаимодействия различных видов LF и их комплексов с олеиновой кислотой с иммобилизованным СР.

Таблица 3.3. Параметры, описывающие кинетику взаимодействия СР человека (иммобилизован при концентрации 20 мкг/мл) с рекомбинантным LF человека и его комплексами с ОА

Аналит	rLF	rLF/4ОА	rLF/8ОА
Концентрации, мкМ	3,125–25	3,125–25	3,125–25
K_D , нМ	367 ± 40	397 ± 46	407 ± 27
k_a , 1/М×с	90480 ± 11000	110200 ± 14000	75320 ± 5800
k_d , 1/с	0,033 ± 0,004	0,044 ± 0,005	0,031 ± 0,002
R_{max} , RU	23740 ± 180	23444 ± 160	22339 ± 120
U-значение	7	7	4

Таблица 3.4. Параметры, описывающие кинетику взаимодействия СР человека (иммобилизован при концентрации 20 мкг/мл) с LF коровы и его комплексами с ОА

Аналит	bLF	bLF/4ОА	bLF/8ОА
Концентрации, мкМ	3,125–25	3,125–25	3,125–25
K_D , нМ	155±7	165 ±10	148 ±12
k_a , 1/М×с	41410 ± 2700	47920 ± 3900	56030 ± 5800
k_d , 1/с	0,0064 ± 0,0003	0,0079 ± 0,0005	0,0083 ±0,0007
R_{max} , RU	31940 ± 160	31403 ± 190	30331 ± 210
U-значение	4	5	7

Таблица 3.5. Параметры, описывающие кинетику взаимодействия СР человека (иммобилизован при концентрации 20 мкг/мл) с LF человека и его комплексами с ОА

Аналит	hLF	hLF/4ОА	hLF/8ОА
Концентрации, мкМ	3,125–25	3,125–25	3,125–25
K_D , нМ	195 ± 28	212 ± 23	328 ± 20
k_a , 1/М×с	245800 ± 39000	149100 ± 19000	45930 ± 3500
k_d , 1/с	0,048 ± 0,007	0,032 ± 0,004	0,0151 ± 0,001
R_{max} , RU	25193 ± 120	25225 ± 130	24538 ± 150
U-значение	9	7	5

Из таблиц 3.3, 3.4 и 3.5 видно, что значения равновесной константы диссоциации K_D и константы скорости диссоциации k_d , а также значения максимальной связывающей способности поверхности анализатора R_{max} схожи для всех видов LF и их комплексов с олеиновой кислотой. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что CP формировал комплексы со всеми типами LF и комплексами LF с ОА. Добавление ОА не оказывало статистически значимого влияния на комплексообразование с CP. U-значения критерия, характеризующего степень совпадения сенсограмм с линиями тренда, не превышали 15, что свидетельствует о корректности расчета величин кинетических параметров.

3.8. Антибактериальная активность лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой

Антибактериальную активность апо-формы LF, а также его комплекса с ОА оценивали по замедлению роста *E. coli* (штамм DH5 α) спектрофотометрическим методом в присутствии резазурина — метаболического маркера дыхательной активности. Результаты оценки антибактериальной активности исследуемых агентов в отношении *E. coli* спустя 4,5 часа инкубации представлены в таблице 3.6 в виде значения концентрации белка, которая вызывала снижение в 2 раза величины (A_{530} – A_{630}) по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 3.14).

Таблица 3.6. Антибактериальная активность LF и LF/8OA в отношении *E. coli*

Агент	MIC ₅₀ [*] , мкМ
LF	82 ± 4
LF/8OA	142 ± 7

* — выражена как концентрация белка, приводившая к снижению показателя A_{530} – A_{630} в 2 раза по сравнению с контролем. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0,05$).

Как видно из представленных данных, оба исследуемых агента обладали высокой антибактериальной активностью в отношении *E. coli* (штамм DH5 α). Однако LF проявлял большую бактериостатическую активность по сравнению с комплексом LF/80A.

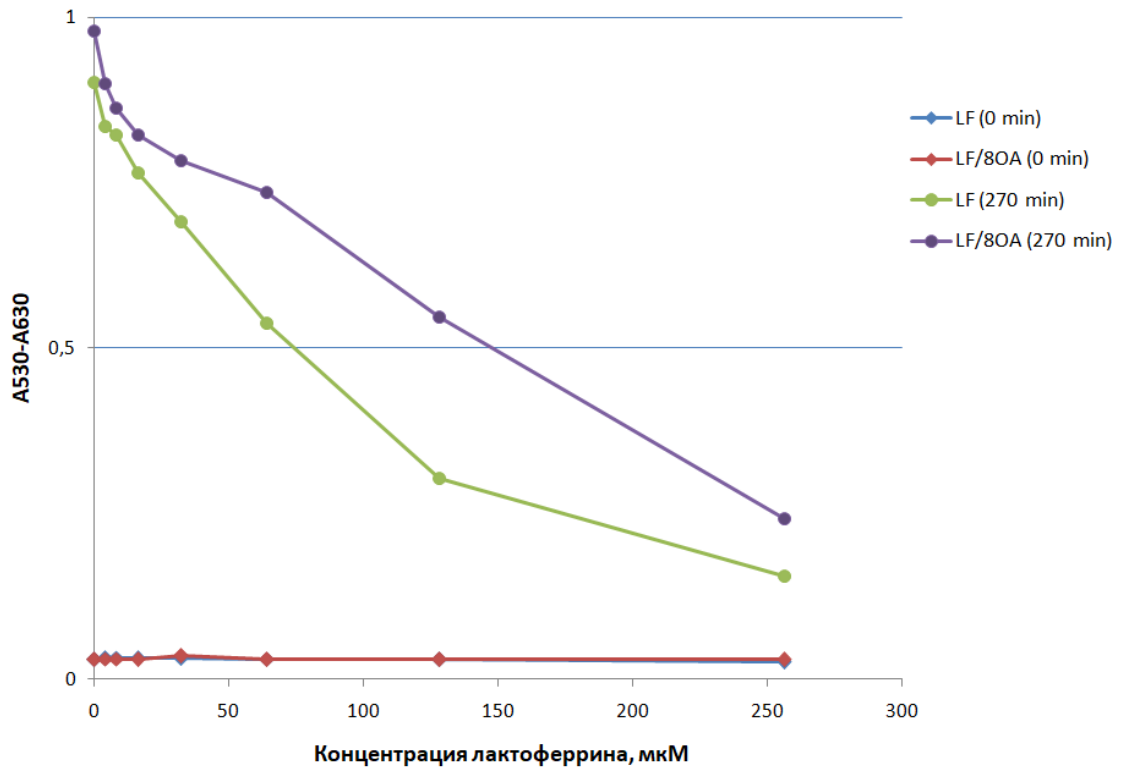


Рисунок 3.14 — Зависимость показателя A530–A630 от концентрации белка.

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 α (4×10^4 КОЕ/мл) в присутствии 60 мкМ резазурина

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

Оценку токсичности препаратов LF и LF/80A в отношении зрелых неопухолевых клеток и действия препаратов в отношении клеточных мембран оценивали при помощи гемолитического теста по лизису эритроцитов крови человека. 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. На рисунке 3.15 можно видеть, что интактный LF в диапазоне исследуемых концентраций 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 условиях.

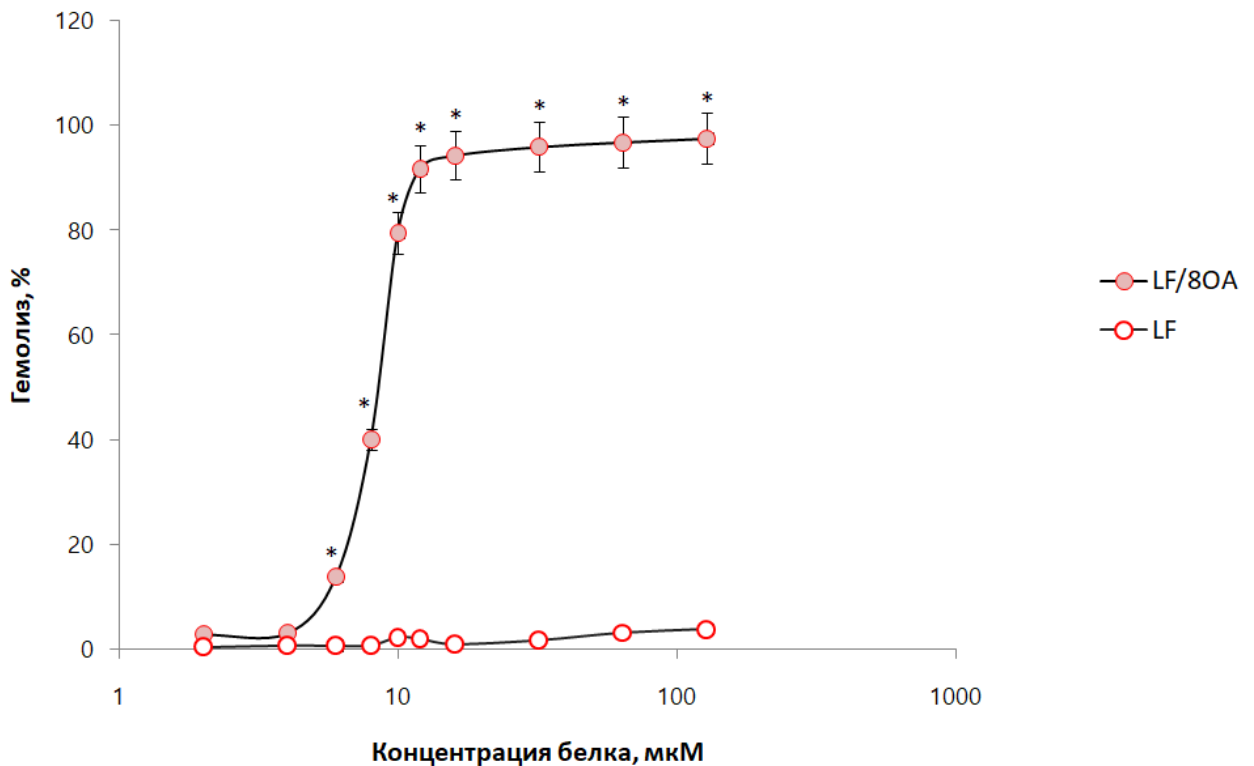


Рисунок 3.15 — Сравнение гемолитического эффекта комплекса LF/80A с LF. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным LF

При сравнении гемолитической активности комплексов LF с олеиновой кислотой был проведен сравнительный анализ апо-формы и насыщенной железом формы белка. Результаты представлены на рисунке 3.16. 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.

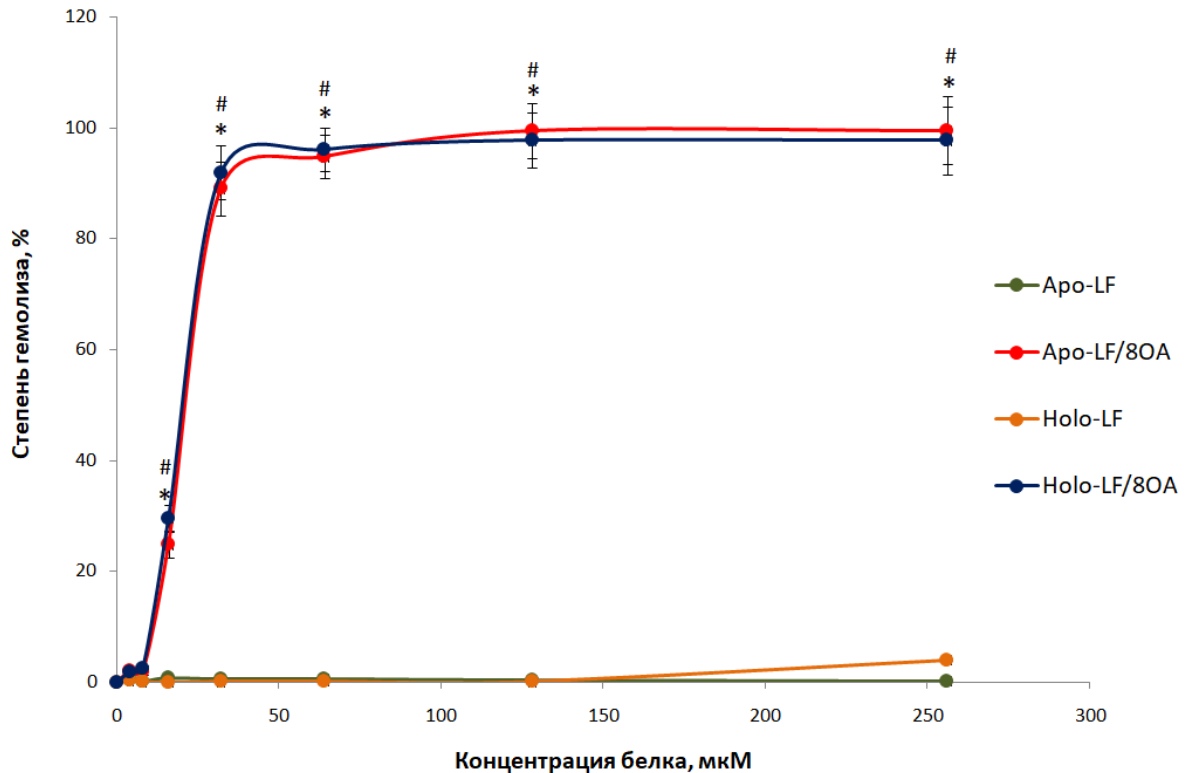


Рисунок 3.16 — Сравнение гемолитического эффекта апо-LF и холо-LF и их комплексов с ОА. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке. * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) для апо-LF/80А сравнению с контрольным апо-LF. # — статистически значимые различия ($p < 0,05$) для холо-LF/80А сравнению с контрольным холо-LF

Клеточные культуры в экспериментах *in vitro* изолированы, и отсутствует возможность воспроизвести всю совокупность защитно-приспособительных механизмов, запускающихся в организме. Нами было показано, что СР — белок острой фазы воспаления, являющийся антиоксидантом, защищал эритроциты от гемолитического действия апо-LF/80А. На Рисунке 3.17 представлены данные по влиянию СР на гемолиз, индуцированный комплексом LF/80А.

Показано, что добавление СР к комплексу LF/80А способствовало снижению гемолитического эффекта, а в соотношении 1 СР : 1 LF/80А полностью ингибирует гемолиз. Нами было показано, что бычий сывороточный альбумин (BSA) в комплексе с ОА обладал низкой гемолитической активностью в сравнении с LF/80А (Рис. 3.18).

Гемолитическая активность комплекса BSA/80A в максимальной концентрации (256 мкМ) оказалась в 14 раз ниже активности LF/80A, который приводил к полному разрушению эритроцитов в суспензии (100 % гемолиз).

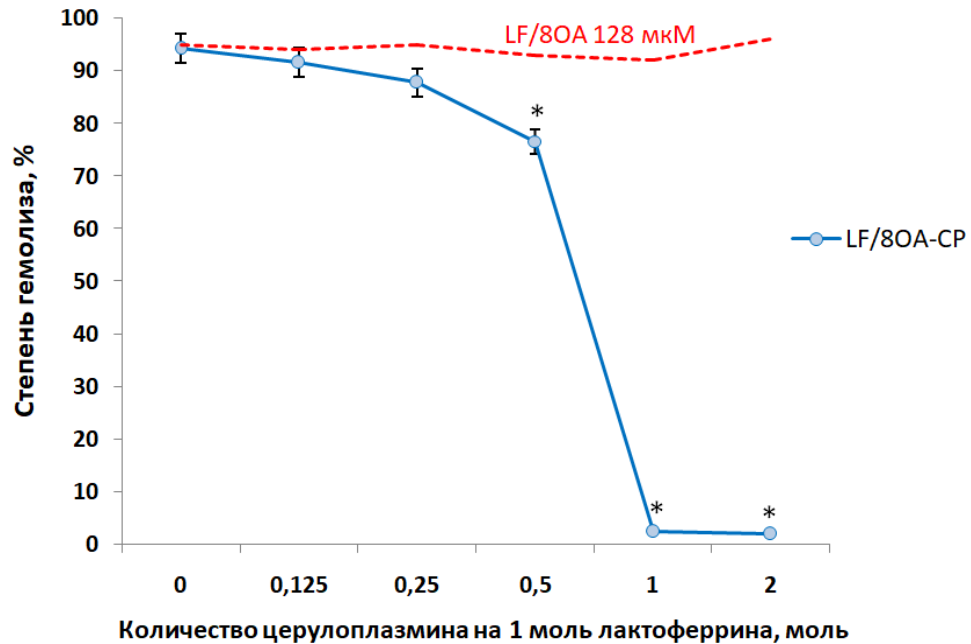


Рисунок 3.17 — Влияние CP на гемолитический эффект комплекса 128 мкМ LF/80A. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с LF/80A

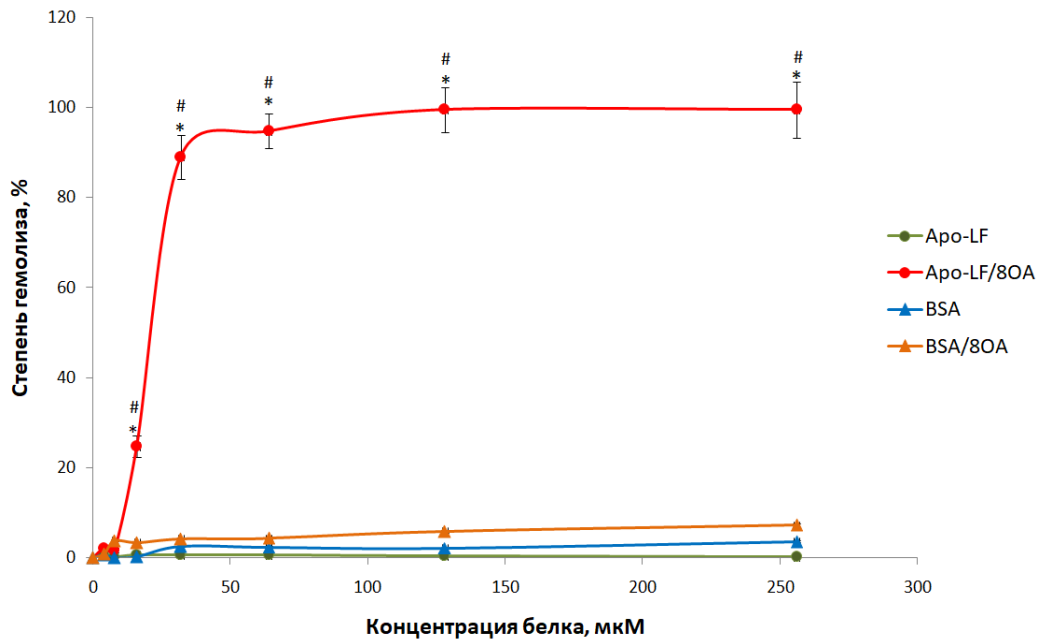


Рисунок 3.18 — Сравнение гемолитического эффекта LF/80A и BSA/80A. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с белком без добавления ЖК. # — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с BSA/80A

3.10. Исследование активации нейтрофилов в присутствии комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой

Дегрануляцию нейтрофилов определяли в условиях *in vitro* по количеству высвобождаемой из клеток миелопероксидазы (МПО). МПО измеряли методом ИФА в надосадочной жидкости суспензии нейтрофилов после часовой инкубации с LF и LF/80A в присутствии глюкозы. Как видно из данных, представленных на рисунке 3.19, LF не оказывал влияния на нейтрофилы и не приводил к высвобождению МПО, в то время как при воздействии LF/80A на нейтрофилы было зарегистрировано достоверное высвобождение МПО.

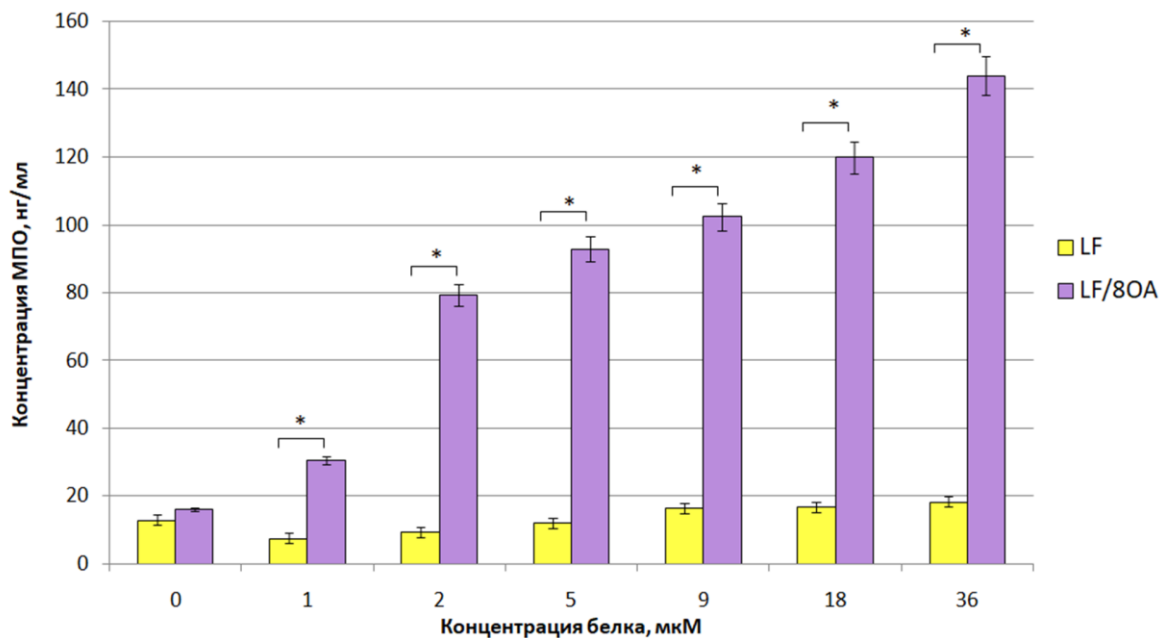


Рисунок 3.19 — Концентрация МПО после часовой инкубации нейтрофилов человека с LF (желтый маркер) и LF/80A (фиолетовый маркер) в различных концентрациях. * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению LF

Показано, что комплекс LF/80A в концентрациях 1–36 мкМ достоверно повышал выход МПО из нейтрофилов. Аналогично экспериментам с эритроцитами была проверена способность СР предотвращать токсическое действие комплекса в отношении нейтрофилов человека (Рис. 3.20).

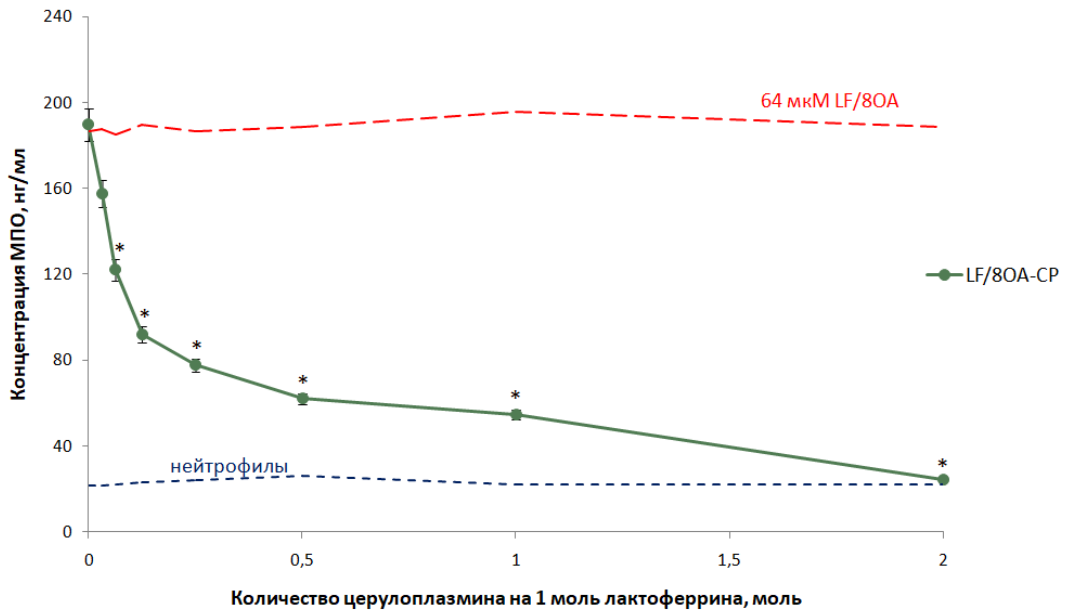


Рисунок 3.20 — Концентрация МПО после часовой инкубации нейтрофилов человека с 64 мкМ LF/80A в присутствии различных концентраций CP (зеленый маркер). Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с LF/80A

Показано, что инкубация нейтрофилов с LF/80A в присутствии CP приводила к уменьшению высвобождения МПО из нейтрофилов в сравнении с клетками, которые инкубировались с комплексом без добавления CP. Добавление в среду CP даже в соотношении меньше 0,5 моль CP на 1 моль LF/80A приводило к ослаблению выхода МПО, что свидетельствовало о защитном эффекте CP.

Также показано, что комплекс олеиновой кислоты с сывороточным альбумином (основным переносчиком олеиновой кислоты в плазме) оказывает менее выраженный эффект на процесс дегрануляции нейтрофилов, в сравнении с LF/80A (Таблица 3.7).

Таблица 3.7. Концентрация миелопероксидазы нейтрофилов человека после инкубации их с комплексами лактоферрина и бычьего сывороточного альбумина с олеиновой кислотой

Концентрация белка, мкМ	LF/80A	BSA/80A
	Концентрация МПО, нг/мл	
0	$16,1 \pm 3,5$	$20,3 \pm 2,4$
0,6	$14,45 \pm 1,0$	$15,9 \pm 2,7$
1,1	$30,5 \pm 2,4$	$13,6 \pm 4,9$

Концентрация белка, мкМ	LF/80A	BSA/80A
	Концентрация МПО, нг/мл	
2,3	79,4 ± 2,9	16,3 ± 5,2
4,6	92,9 ± 7,2	23,4 ± 3,7
9,1	102,4 ± 11,5	31,1 ± 7,1
18,3	119,9 ± 12,1	57,9 ± 7,8
36,5	143,9 ± 9,5	76,1 ± 6,1

Показано, что в диапазоне концентраций от 1 до 18 мкМ концентрация МПО после воздействия на нейтрофилы LF/80A в 3 раза превышала значение концентрации МПО после инкубации с BSA/80A. В диапазоне концентраций от 18 мкМ эти различия уменьшались (Рис. 3.21). Комплекс LF/80A *in vitro* проявлял дозозависимую цитотоксичность в отношении нейтрофилов человека, которая в разы превышает в аналогичных экспериментах цитотоксическое действие BSA/80A. Однако это цитотоксическое действие практически полностью нивелировалось добавлением в среду церулоплазмينا в соотношении 1:1.

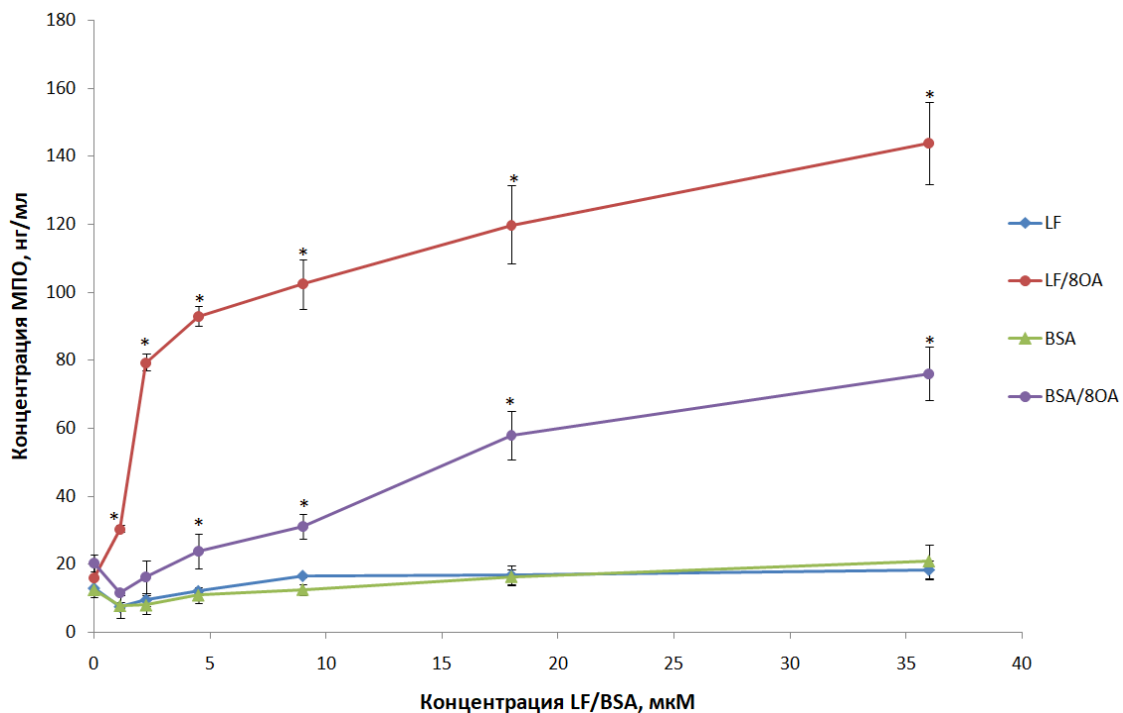


Рисунок 3.21 — Концентрация МПО после часовой инкубации нейтрофилов человека с LF (синий маркер), LF/80A (красный маркер), BSA (зеленый маркер), BSA/80A (сиреневый маркер). Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными белками (без добавления ОА)

3.11. Влияние исследуемых препаратов на апоптоз клеток *in vitro*

В данной работе была изучена жизнеспособность (апоптоз, некроз) клеток линии Jurkat клон Е6-1 — Т лимфобластов человека и HL-60 — промиелоцитарной лейкемии человека после инкубации с LF и его комплексом с ОА. Качественная оценка апоптоза была изучена методом электрофореза ДНК в агарозном геле, а количественная оценка — методом проточной цитофлуориметрии.

3.11.1. Анализ фрагментации ДНК в агарозном геле

Качественную оценку степени фрагментации ДНК, проводили методом горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Фрагменты ДНК апоптозных клеток образуют характерную «апоптозную лестницу». Это связано с тем, что при апоптозе ДНК упорядоченно расщепляется, что ведет к накоплению наборов фрагментов ДНК, которые имеют различную электрофоретическую подвижность и при электрофорезе в агарозном геле формируют «лестницу». Результаты степени оценки фрагментации ДНК после инкубации клеток линии HL-60 с LF/8ОА представлены на рисунке 3.22.

На представленной электрофореграмме комплексов LF с ОА видно, что на дорожке №4 (контроль) выявляется одна полоса, которая характерна для высокомолекулярной ДНК. С 1-й по 3-ю дорожку можно видеть фрагменты ДНК, что свидетельствует об апоптозе в клетках линии HL-60 после инкубации с комплексами LF/8ОА.

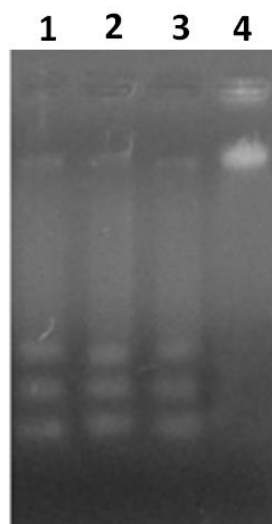


Рисунок 3.22 — Апоптотическая фрагментация ДНК клеток линии HL-60, визуализированная в агарозном геле при окрашивании бромидом этидия. Дорожки 1,2 и 3 соответствуют bLF/80A, hLF/80A и rLF/80A. Для сравнения включена контрольная ДНК (4)

3.11.2. Анализ жизнеспособности клеток линии HL-60 методом проточной цитофлуориметрии

Для оценки количественного соотношения клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, как правило, комбинируют катионные красители, например PI и YO-PRO-1. Такая комбинация позволяет отследить «цикл смерти»: на ранних стадиях апоптотические клетки окрашиваются только YO-PRO-1; после повреждения цитоплазматической мембраны клетки начинают пропускать PI, который подавляет флуоресценцию YO-PRO-1. Живые клетки не окрашиваются ни PI, ни YO-PRO-1 (Войткова, 2010).

Методом проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) была проведена оценка сценария клеточной гибели (апоптоз/некроз) после культивирования клеток HL-60 и Jurkat с тестируемыми препаратами. По результатам ПЦФ комплекс LF/80A вызывал апоптоз клеток линии HL-60 (Таблица 3.8).

Спустя 18 часов культивации с LF/80A количество опухолевых клеток на стадии раннего апоптоза, интенсивно окрашиваемых YO-PRO-1, возрастало. Также можно заметить статистически значимое увеличение клеток, окрашенных двумя красителями, на стадии позднего апоптоза.

Комплекс LF с 4 молями ОА на 1 моль белка также вызывал увеличение опухолевых клеток на стадии раннего и позднего апоптоза, однако, в случае 8 моль ОА было также отмечено статистически значимое увеличение клеток на стадии некроза (Рис. 3.23).

Таблица 3.8. Динамика соотношения клеток, негативных и позитивных в отношении красителей YO-PRO-1/PI, в культуре клеток HL-60, обработанных LF/8ОА

Действующий агент	Число клеток, негативных по обоим красителям (живые клетки), %	Число клеток, позитивных по YO-PRO-1 (ранний апоптоз), %	Число клеток, позитивных по обоим красителям (поздний апоптоз, некроз), %
Контроль	92,67 ± 1,43	3 ± 0,00	4,33 ± 1,43
bLF	83,33 ± 1,43	6 ± 2,48	10,67 ± 1,43
bLF/4ОА	69 ± 2,48 *	8 ± 2,48	23 ± 1,43 *
bLF/8ОА	55 ± 2,48 *	13,67 ± 1,43 *	31,33 ± 2,48 **
rLF	82 ± 1,43	6,66 ± 1,43	11,34 ± 1,43
Действующий агент	Число клеток, негативных по обоим красителям (живые клетки), %	Число клеток, позитивных по YO-PRO-1 (ранний апоптоз), %	Число клеток, позитивных по обоим красителям (поздний апоптоз, некроз), %
rLF/4ОА	69 ± 2,48 *	8,67 ± 1,43	22,33 ± 2,48 *
rLF/8ОА	52,67 ± 1,43 *	14,67 ± 1,43 *	32,66 ± 1,43 **
hLF	82 ± 2,48	6,33 ± 1,43	11,67 ± 2,48
hLF/4ОА	68 ± 2,48 *	9 ± 2,48	23 ± 1,43 *
hLF/8ОА	55 ± 2,48 *	11,34 ± 3,79 *	33,66 ± 5,17 **
Различия по сравнению с контролем *p < 0,05, ** p < 0,01.			

Результаты проточной цитофлуориметрии свидетельствуют о наличии цитотоксического эффекта комплекса LF/8ОА в отношении клеток промиелоцитарной лейкемии человека, который усиливается с изменением стехиометрии: чем больше моль ОА связано с LF, тем сильнее выражен

цитотоксический эффект. Основным механизмом клеточной гибели под действием LF/8OA на данную культуру опухолевых клеток являлся апоптоз.

При сравнении влияния различных видов LF, а также его комплексов с OA, 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 (Рис. 3.24).

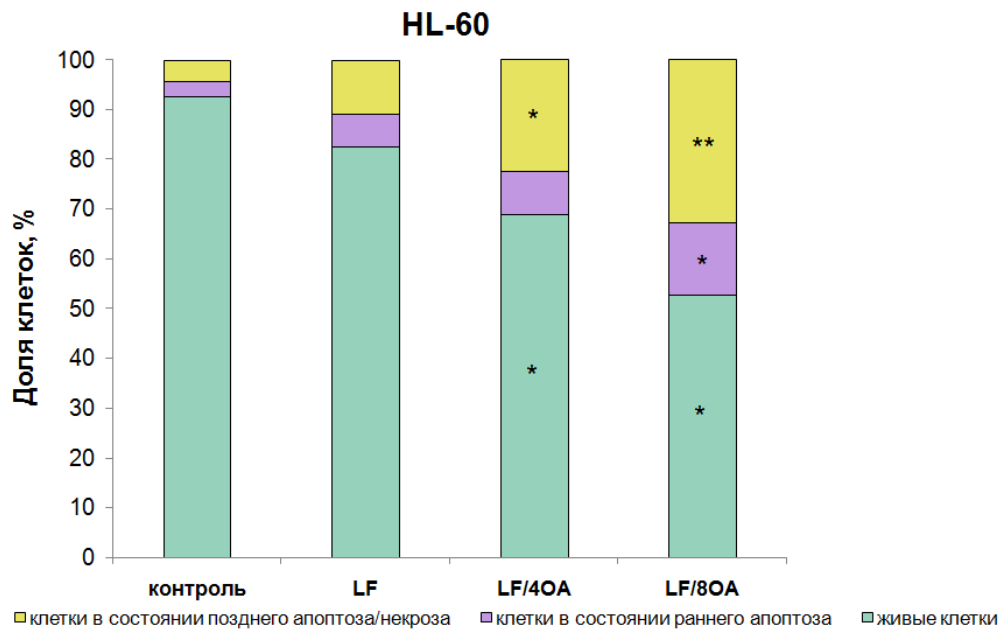


Рисунок 3.23 — Исследование уровня апоптоза и некроза клеток линии HL-60 после 18 часов инкубации с рекомбинантным LF и его комплексом с OA по данным проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в % от общего числа клеток каждой группы в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, ** — отличия достоверны ($p < 0,01$) по сравнению с контролем

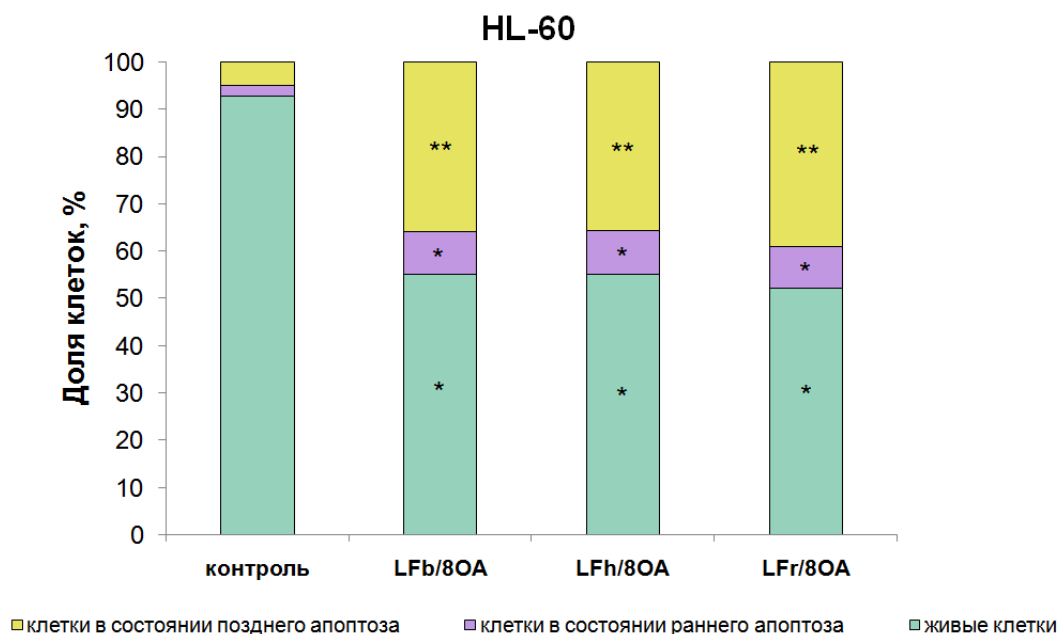


Рисунок 3.24 — Исследование уровня апоптоза и некроза клеток линии HL-60 после 18 часов инкубации с комплексами различных видов LF с OA по данным проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в % от общего числа клеток каждой группы в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, ** — отличия достоверны ($p < 0,01$) по сравнению с контролем

3.11.3. Анализ жизнеспособности клеток линии Jurkat методом проточной цитофлуориметрии

Была проведена оценка апоптоза и некроза после культивирования клеток Jurkat с апо-формой LF и с насыщенной железом формой (холо-ЛФ). По результатам проточной цитофлуориметрии комплекс LF/80A, как и в случае с клетками HL-60, вызывал апоптоз клеток линии Jurkat (Таблица 3.9).

Показано, что после инкубации с холо-LF/80A, количество клеток на стадии раннего апоптоза, позитивных по YO-PRO-1, достоверно увеличивалось по сравнению с контролем более чем в 5 раз (Рис. 3.25). Следует отметить, что комплексы холо-LF с 1, 2 и 4 моль OA на 1 моль белка не показали значимых отличий по сравнению с группой контроля.

Таблица 3.9. Динамика соотношения клеток, негативных и позитивных в отношении красителей YO-PRO-1/PI, в культуре клеток Jurkat, обработанных LF/8OA

Действующий агент	Число клеток, негативных по обоим красителям (живые клетки), %	Число клеток, позитивных по YO-PRO- 1 (ранний апоптоз), %	Число клеток, позитивных по обоим красителям (поздний апоптоз, некроз), %
Контроль	82,5 ± 3,33	10,67 ± 1,75	6,83 ± 0,74
апо-LF	79,3 ± 3,7	13,8 ± 1,92	6,9 ± 0,34
апо-LF/2 OA	79,1 ± 4,04	14 ± 1,63	6,9 ± 0,24
апо-LF/4 OA	78,63 ± 3,84	13,9 ± 1,35	7,47 ± 0,49
апо-LF/8 OA	33,7 ± 4,82 *	57,3 ± 7,39 *	9 ± 1,08
холо-LF	79,6 ± 2,78	13,6 ± 0,78	7,34 ± 0,88
холо-LF/2 OA	78,3 ± 3,06	15 ± 1,06	6,7 ± 1,41
холо-LF/4 OA	76,56 ± 3,86	15,86 ± 1,14	7,76 ± 1,25
холо-LF/8 OA	33,5 ± 4,37 *	57,1 ± 5,18 *	9,4 ± 1,61
* — различия по сравнению с контролем, $p < 0,05$			

Комплекс OA с апо-формой LF показал идентичную картину, с преобладанием клеток на стадии раннего апоптоза (Рис. 3.26). Комплексы апо-LF с меньшим содержанием в своем составе молекул OA так же не демонстрировали цитотоксический эффект в условиях данного эксперимента. Таким образом, было показано, что комплекс LF/8OA обладал цитотоксическим эффектом в экспериментах *in vitro*. В клетках линии HL-60, после воздействия комплекса, было отмечено достоверное ($p < 0,05$ по сравнению с контролем) увеличение числа клеток на стадии раннего и позднего апоптоза, а также некроза. В культуре клеток Jurkat комплекс приводил к увеличению числа клеток на стадии раннего апоптоза. Клетки на стадии позднего апоптоза и некроза достоверно не отличались от контроля. Цитотоксический эффект в отношении клеток HL-60 и Jurkat не зависел от степени насыщения LF железом в составе комплекса с OA.

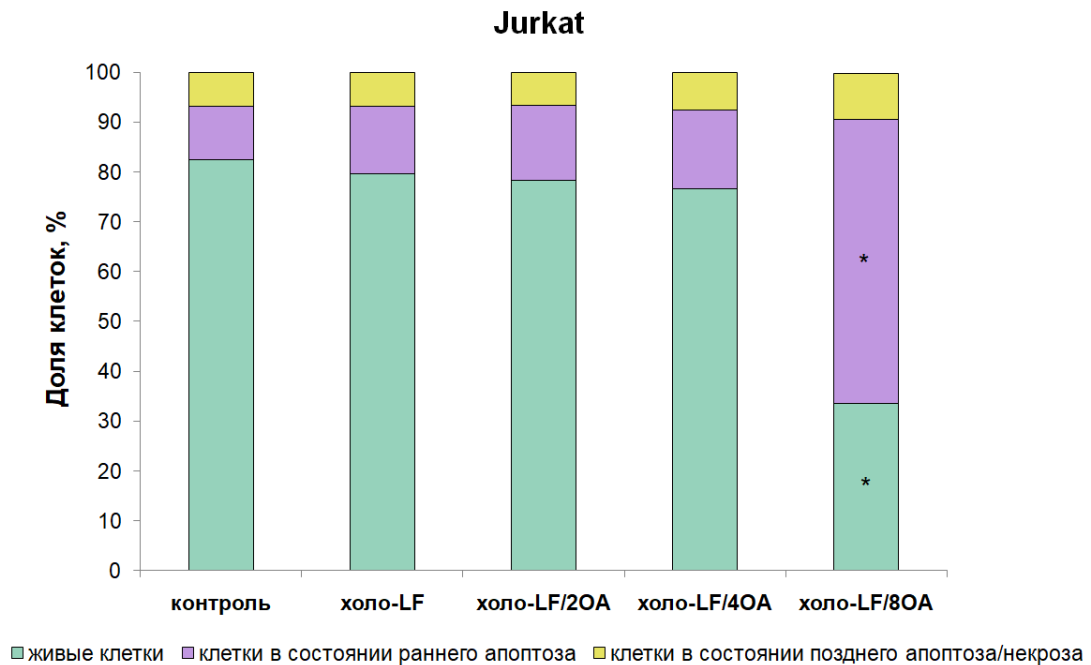


Рисунок 3.25 — Исследование уровня апоптоза и некроза клеток линии Jurkat после 24 часов инкубации с холо-LF и его комплексами с ОА по данным проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в % от общего числа клеток каждой группы в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

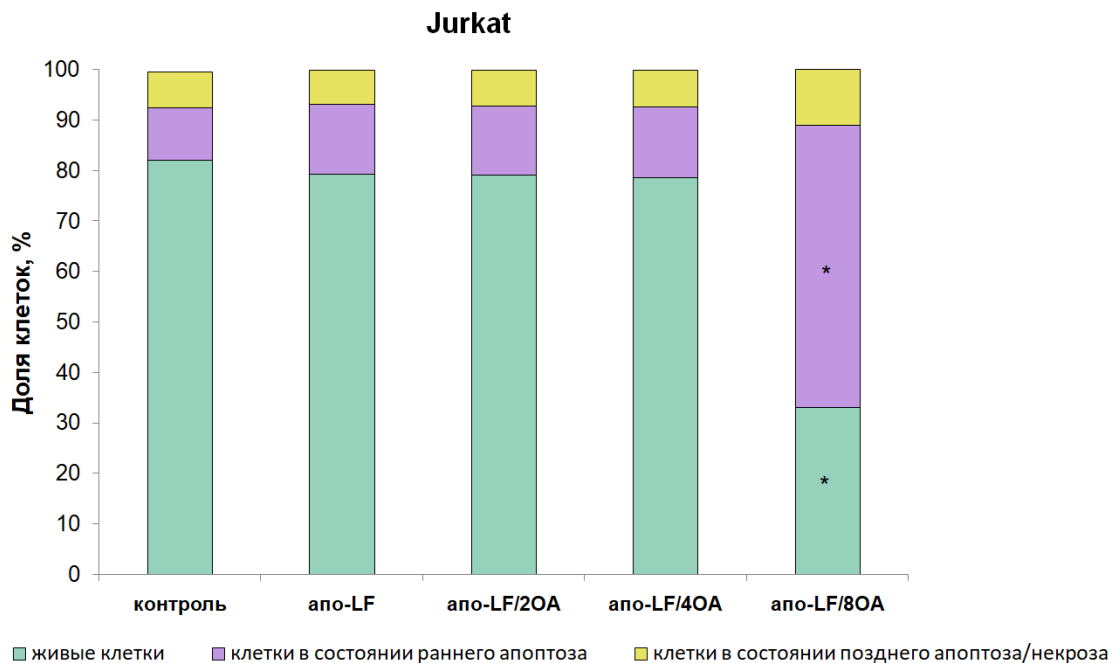


Рисунок 3.26 — Исследование уровня апоптоза и некроза клеток линии Jurkat после 24 часов инкубации с апо-LF и его комплексами с ОА по данным проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в % от общего числа клеток каждой группы в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

Данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии, соответствуют результатам, полученным при проведении электрофореза в агарозном геле, в котором мы наблюдали ярко выраженную «апоптозную лестницу». При некрозе аналогичная картина не обнаруживается: в некротических клетках и тканях ДНК быстро и хаотично деградирует.

3.11.4. Исследование влияния лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой на гибель гепатомы 22а

Была изучена цитотоксическая активность лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой в опытах *in vitro* на культурах трансформированных клеток.

Полученные *in vitro* на мышинной гепатоме 22а данные свидетельствуют о значительном цитотоксическом эффекте LF/8ОА. При окрашивании метиленовым синим было обнаружено, что в результате 24-часовой инкубации в концентрации 50 мкМ комплекс LF/8ОА достоверно снижал число живых клеток на 60 % по сравнению с контролем. При обработке клеток H22а более низкими концентрациями LF/8ОА наблюдалась четкая дозозависимая противоопухолевая активность (Рис. 3.27). Концентрация препарата, вызывающего гибель 50 % клеток (IC_{50}) составила 21 мкМ.

Лактоферрин в диапазоне концентраций от 6 мкМ до 50 мкМ и при данном времени обработки вызывал обратный эффект и стимулировал рост H22а, что согласуется с данными, полученными нами в модели *in vivo* на мышцах линии СЗНА (графики не приводятся).

С помощью окрашивания метиленовым синим также был проведен сравнительный анализ цитотоксического эффекта LF/8ОА с интактными LF и ОА. Солюбилизация ОА затруднена, т.к. ЖК нерастворимы в водных растворах. Решение этой проблемы обычно достигается при использовании органических растворителей или термической обработки. Однако следует

учитывать, что органический растворитель может повлиять на жизнеспособность клеток (Baker et al., 1999). Так, например, концентрация этилового спирта, который широко используется для растворения ЖК, не должна превышать 0,05 % в среде для культивирования клеток. Этого растворителя также следует избегать при изучении воздействия ЖК на клетки, способные окислять этот спирт. Для солюбилизации длинноцепочечных ЖК, помимо этанола, широко используют диметилсульфоксид (ДМСО), хотя цитотоксичность этого растворителя также необходимо учитывать (Alsabeeh et al., 2017).

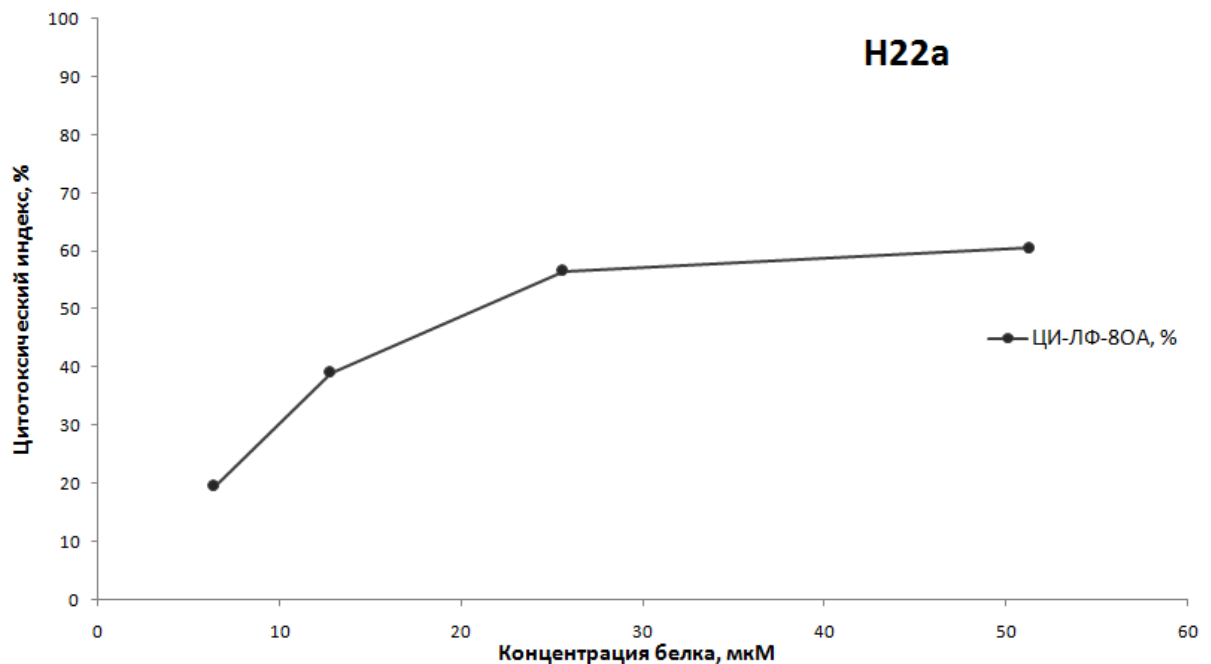


Рисунок 3.27 — Жизнеспособность клеток H22a после 24 часов обработки с 6, 12, 25 и 50 мкМ LF/80A. Определение жизнеспособности производилось методом окрашивания метиленовым синим. LF без добавления OA вызывал обратный эффект и стимулировал рост опухолевых клеток (данные на графике не приводятся). Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке

В эксперименте, направленном на изучение цитотоксичности, интактную OA растворяли в ДМСО. После 24-часовой инкубации H22a с LF, 80A и LF/80A было обнаружено, что LF/80A проявлял дозозависимую противоопухолевую активность уже при концентрации 5 мкМ, чего не

наблюдалось в случае с контрольным LF и 8OA в тех же концентрациях (Параллельно был проведен эксперимент, в котором в качестве растворителя для LF и LF/8OA вместо фосфатно-солевого буфера использовали ДМСО. Статистически значимых различий не было обнаружено. Данные и графики не приводятся). Жизнеспособность клеток в случае инкубации с 8OA и LF/8OA в максимальной концентрации 25 мкМ составила 87 % и 66 %, соответственно. На рисунке 3.28 показано, что комплекс LF/8OA оказывал более выраженное антиканцерогенное действие на клетки гепатомы 22a в сравнении с OA и LF в условиях проведения эксперимента.

При интерпретации данных, полученных при изучении влияния интактной OA на жизнеспособность клеток, нельзя исключать тот факт, что в состав питательных сред входит бычий сывороточный альбумин (БСА) (1,7–3,5 мг на 100 мл). С этим белком OA способна образовывать комплекс, обладающий противоопухолевой активностью и на данный момент, хорошо описанный в литературе.

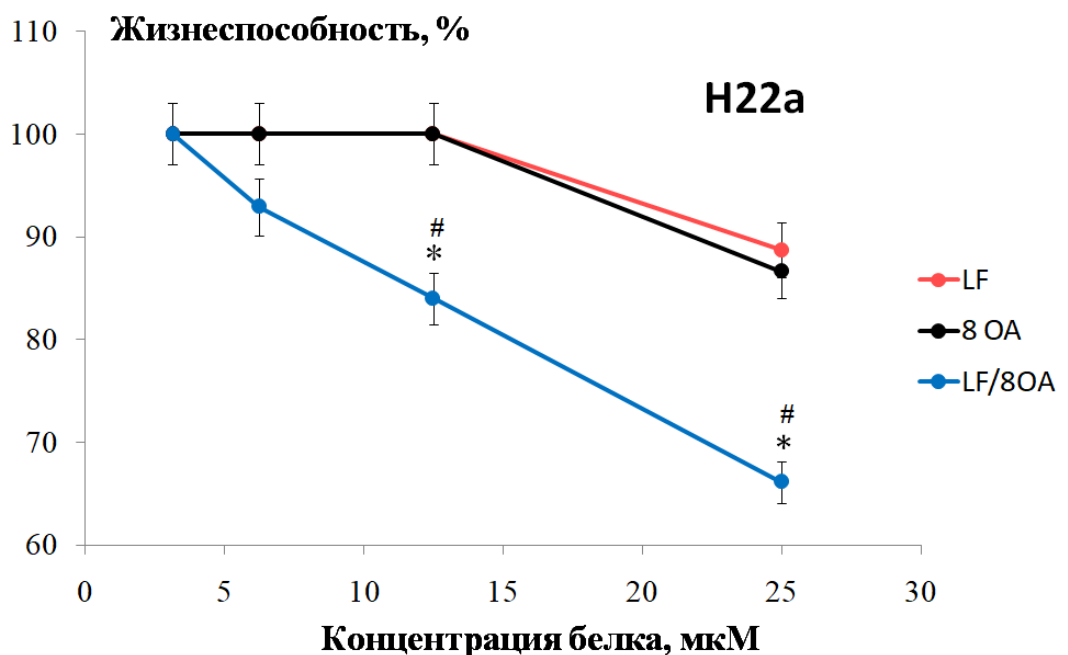


Рисунок 3.28 — Жизнеспособность клеток H22a после 24 часов инкубации с 3.125, 6.25, 12.5 и 25 мкМ LF (красный маркер), 8 OA (черный маркер) и LF/8 OA (синий маркер). OA была растворена в ДМСО. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=3$ по каждой точке, * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с LF. # — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с 8 OA

3.12. Исследование влияния LF/80A на острую и отсроченную токсичность *in vivo*

При определении острой токсичности в течение первых суток наблюдали общее состояние мышей, а также возможный летальный исход. После однократного внутрибрюшинного введения комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой в дозе 2000 мг/кг мы не наблюдали явной картины интоксикации. В течение первого часа после введения наблюдалось небольшое снижение двигательной активности, которая вскоре полностью восстанавливалась. До окончания эксперимента мыши были активны, состояние шерстного и кожного покрова соответствовало норме. Ввиду того, что гибель мышей в течение эксперимента не наступала, полумлетальную дозу ЛД₅₀ определить не удалось.

3.13. Исследование влияния LF и LF/80A на гибель мышей с гепатомой 22a

Для проведения исследования по изучению противоопухолевой эффективности комбинации LF с ОА, 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 опухолей.

Противоопухолевую эффективность препаратов лактоферрина и его комплекса с ОА *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 по схеме (Рис. 2.5, Материалы и методы) 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 60–120мм³. 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 гепатомы использовали кинетические кривые роста опухолей (Рис. 3.29). Как видно из графика, начиная с 10-го дня, объемы опухоли у мышей, получавших физиологический раствор и 5 мг LF, быстро увеличивались. Однократное ежедневное введение комплекса LF/8OA в дозе 5 мг на мышью приводило к торможению роста на всех сроках наблюдения, а в некоторых случаях к полному рассасыванию опухолевых узлов. При введении мышам LF без добавления олеиновой кислоты в дозе 5 мг на мышью 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 мм³, в то время как среднее значение объемов опухоли у мышей, получавших PBS, быстро увеличивалось и достигало 5400 мм³. В группе мышей, получавших LF, активность препарата была сходной с группой контроля: средний объем опухоли в группе составил 4500 мм³. 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.

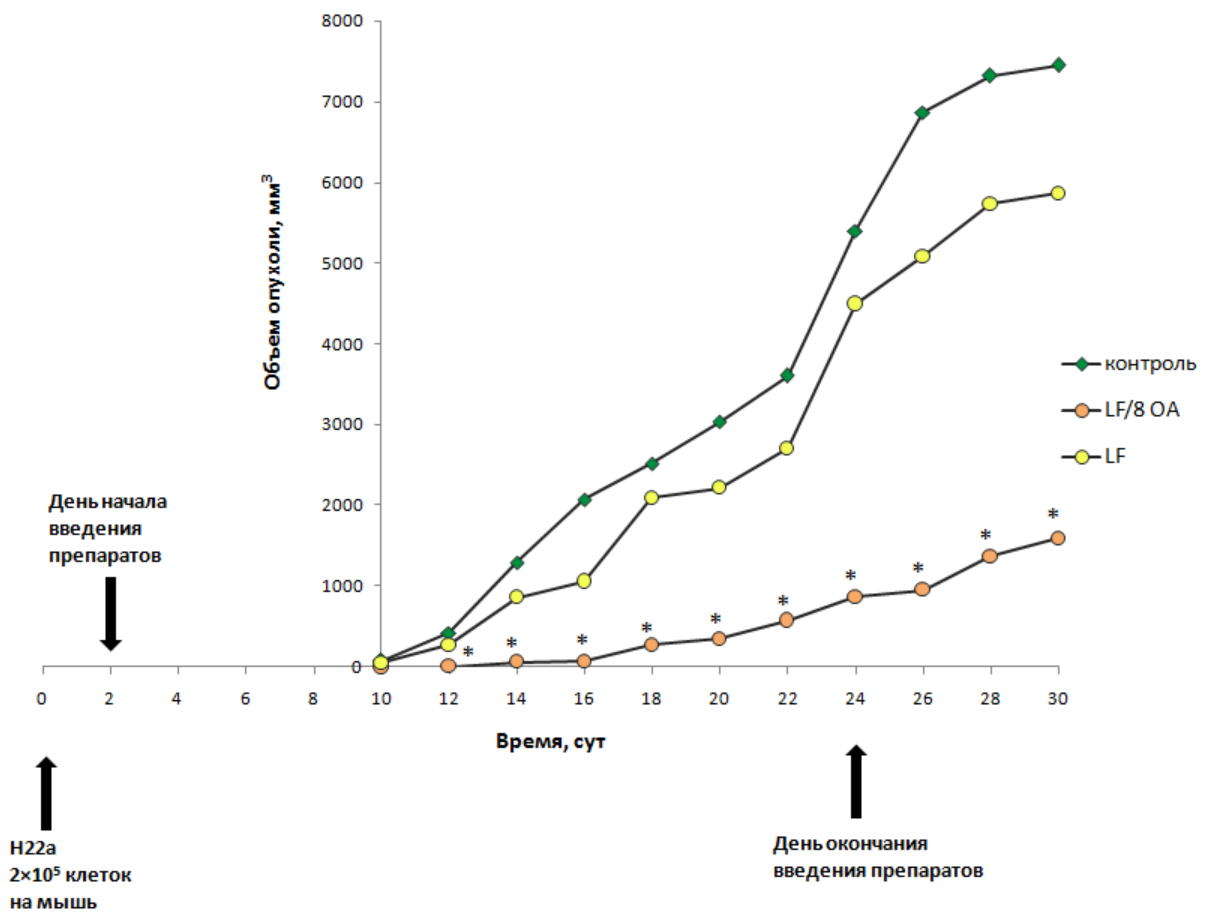


Рисунок 3.29 — Динамика роста опухолей (средние объемы опухолей) у мышей линии СЗНА, после трансплантации 2×10^5 клеток Н22а и введения исследуемых препаратов. Статистический анализ объемов опухолей между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. * ($p < 0,01$) — достоверные различия между экспериментальной группой и контрольной группой

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 опухоли у мышей группы LF/8OA по сравнению с контролем (98 %). На 30-е сутки после перевивки

опухоли процент торможения роста опухоли в группе LF/80A составлял примерно 79 % по отношению к контролю, в то время как у группы мышей, которым вводили лактоферрин, этот показатель составил 21 % (Рис. 3.30).

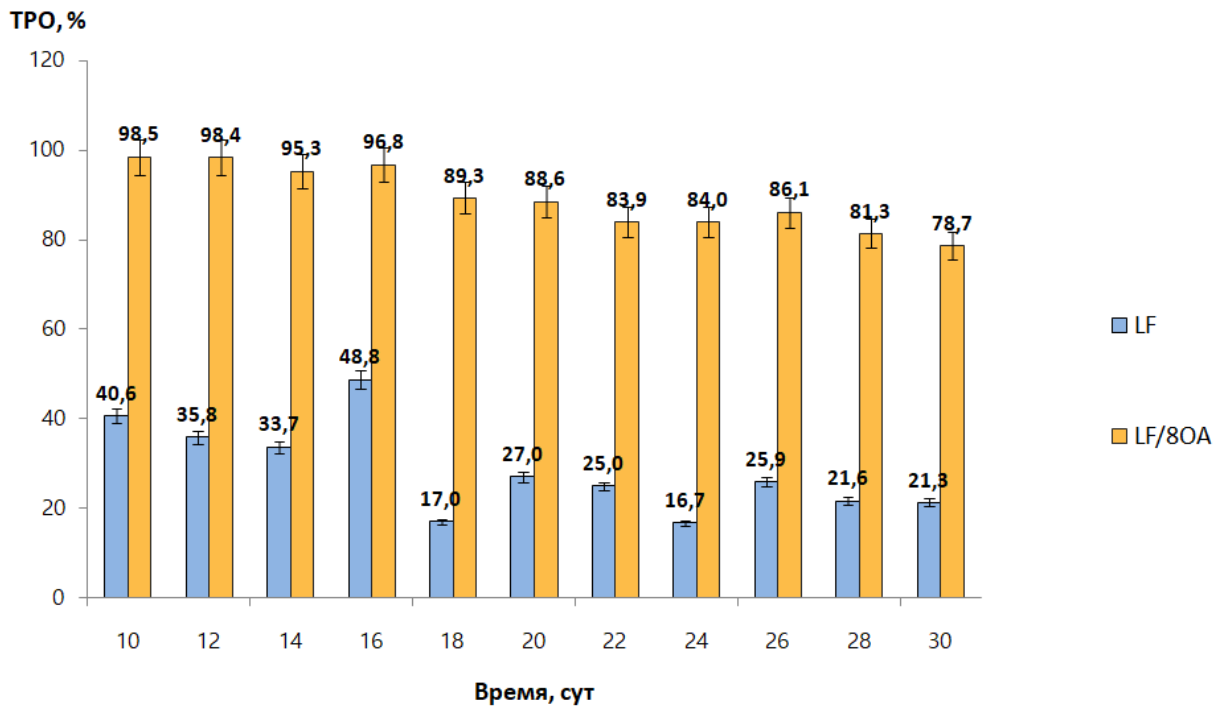


Рисунок 3.30 — Динамика торможения роста H22a у мышей линии СЗНА после введения тестируемых препаратов относительно контроля. Между группами LF/80A и LF зарегистрированы статистически значимые различия ($p < 0,05$)

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/80A и LF ежедневно (24-дневный курс) ИРО составлял 0,14 и 0,63 соответственно.

Одной из важнейших характеристик при изучении новых эффективных фармакологических веществ является выживаемость. Все животные были оставлены для наблюдения за выживанием в стандартных условиях вивария с ежедневным контролем. 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 3.31 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: $T/C \geq 150 \%$ 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.

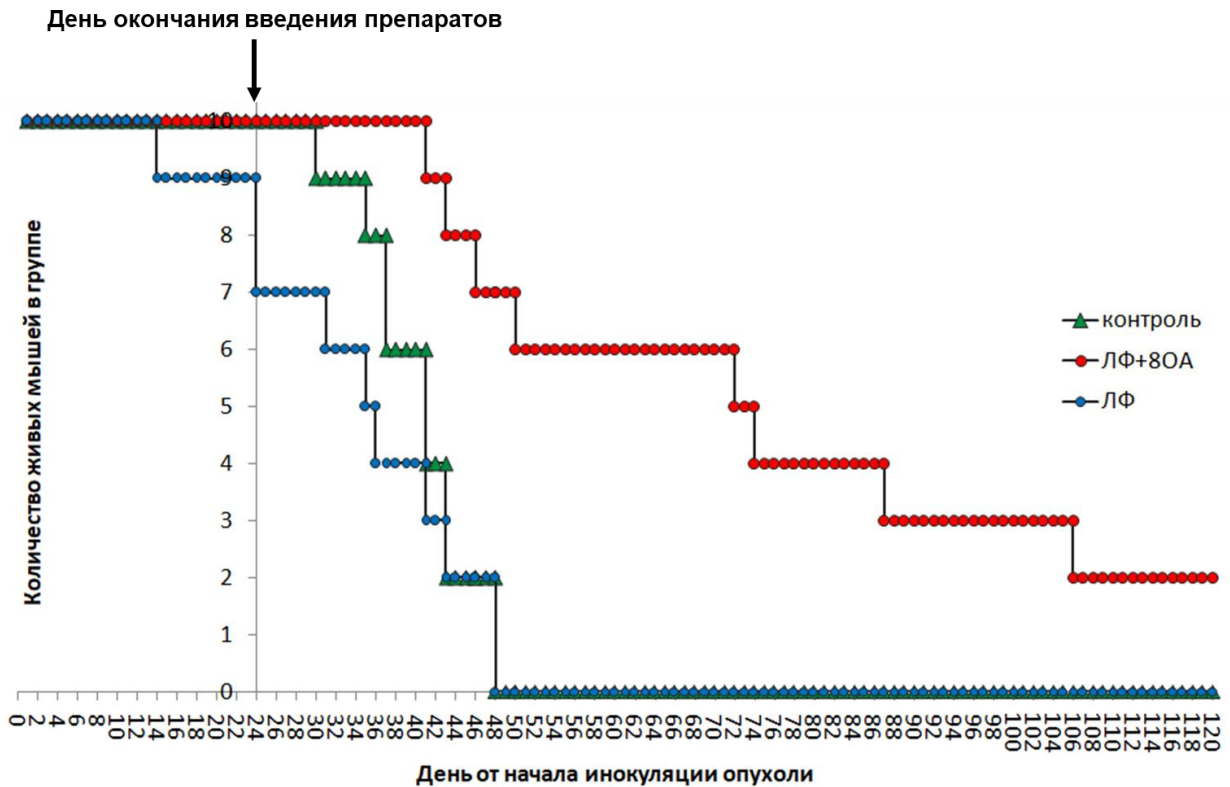


Рисунок 3.31 — Кривые кумулятивной выживаемости Каплана-Мейера на модели гепатомы 22a у мышей самцов линии СЗНА после подкожной инокуляции и последующего лечения LF (синий маркер, n=10), LF/80A (красный маркер, n=10). Контрольной группе мышей вводили 0,25 мл PBS (зеленый маркер, n=10). Для сравнения между группами использовали двухвыборочный статистический анализ с использованием критерия Гехана-Вилкоксона

Во время эксперимента животных из опыта не выводили, патологоанатомического вскрытия после смерти животных также не производили. В таблице 3.10 представлены основные показатели продолжительности жизни животных в зависимости от группы лечения.

Таким образом, при изучении противоопухолевой активности в отношении клеток мышинной гепатомы 22a *in vivo*, было установлено, что ежедневное введение комплекса LF/80A в дозе 5 мг на мышью 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.

Таблица 3.10. 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	$p < 0,01$ *	$p > 0,05$ *	—
* — указана статистическая значимость при сравнении кривой выживания опытной группы с кривой выживания контрольной группы			

3.14. Влияние лактоферрина человека на концентрацию неэстерифицированных жирных кислот *in vivo*

Результаты исследований влияния на липолиз LF человека после его внутрибрюшинного введения крысам представлены на рисунке 3.32. Как следует из данных, представленных на графике, в течение 1–5 часов после однократной внутрибрюшинной инъекции LF человека крысам (50 мг/кг), наблюдалось увеличение концентрации НЭЖК в сыворотке крови в 2,6–4,5 раза. Максимальная концентрация НЭЖК в группе животных, которые получали LF, наблюдалась спустя 3 часа после инъекции.

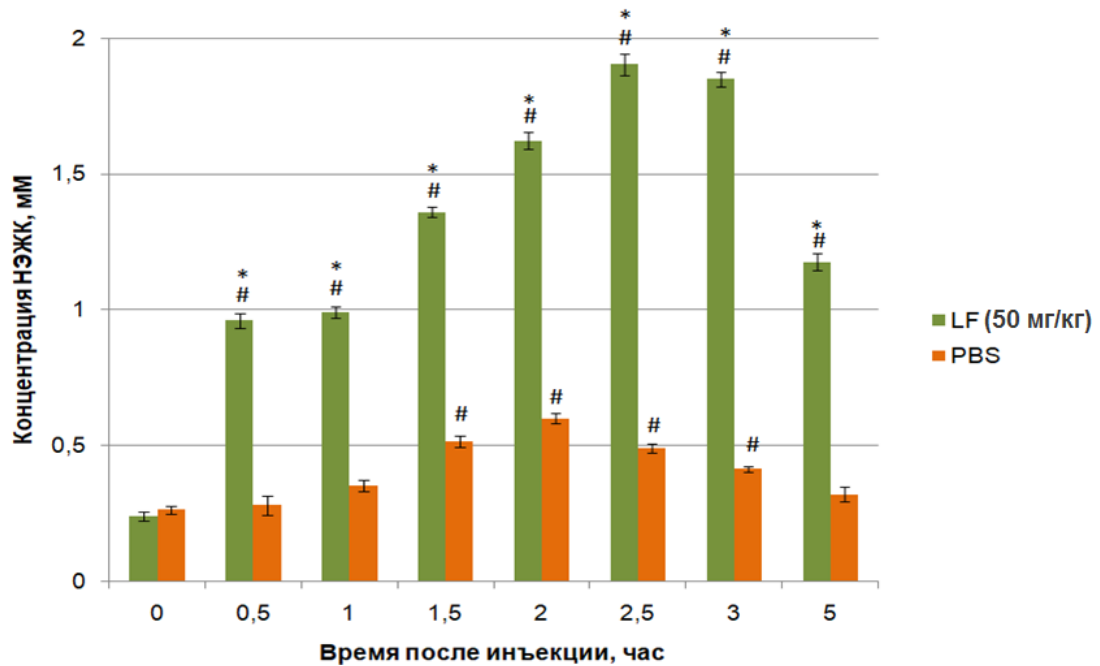


Рисунок 3.32 — Динамика изменения концентрации неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови крыс после внутрибрюшинного введения LF человека (зеленые столбцы). Контрольной группе крыс LF заменяли на PBS (оранжевые столбцы). Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. # — статистически значимые различия по сравнению с точкой «0», * — статистически значимые различия между группами

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные в ходе выполненного исследования, значительно расширяют представления о противоопухолевом потенциале LF и принципиальных отличиях активности белка в зависимости от комплексообразования с ненасыщенными жирными кислотами. Из литературы известно, что фармакологические эффекты LF достаточно широки, он демонстрирует высокую биодоступность, отсутствие значимых побочных эффектов, его действие нацелено на широкий спектр молекулярных мишеней, контролирующих пролиферацию опухолевых клеток, их выживание, миграцию, инвазию и метастазирование (Cutone et al., 2020). Благодаря способности взаимодействовать не только со специфическими рецепторами, но и с сигнальными рецепторами эндоцитоза и TLR на различных типах клеток, LF преодолевает гематканевые барьеры (Зорина, 2019). LF способен проходить через гематоэнцефалический барьер (Fillebeen et al., 1999; Kamemori et al., 2008). Известно, что и ТФ преодолевает гематоэнцефалический барьер, используя собственный рецептор — TfR1, с которым взаимодействует и LF (Sakamoto et al., 2006). Недавно были обнаружены принципиальные отличия апо- и холо-формы LF по отношению к опухолевым клеткам молочной железы (Zhang et al., 2021). Так холо-форма LF усиливала генерацию активированных кислородных метаболитов, продуктов окисления липидов, запуская процессы ферроптоза и подавляя экспрессию *TfR1*. Напротив, апо-форма LF подавляла окислительный стресс и ферроптоз, и, действуя через HIF-зависимый сигнальный путь, повышала экспрессию *TfR1*, необходимого для поступления железа в опухолевые клетки (Zhang et al., 2021). Тот факт, что апо-форма LF индуцирует HIF-сигнальный путь и запускает экспрессию генов, отвечающих за выживание клеток в условиях гипоксии (Zakharova et al., 2012), находится в очевидном противоречии с многочисленными данными литературы о противоопухолевой активности LF. Однако, в настоящей работе в случае

использования LF без олеиновой кислоты мы как раз наблюдали усиление роста клеток гепатомы *in vivo* и *in vitro*.

Хотя олеиновая кислота преобладает в триглицеридах, запасаемых в жировой ткани млекопитающих, а введение LF лабораторным животным вызывало достоверное увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот (Рис. 3.32), у нас нет оснований предполагать возможность формирования *in vivo* существенных количеств комплекса LF с олеиновой кислотой. В противном случае введение LF без олеиновой кислоты вызывало бы противоопухолевый эффект сравнимый с защитным эффектом их комплекса. Первоначально исследователи онкотоксических белковых комплексов предполагали, что олеиновая кислота является единственной жирной кислотой, обладающей таким свойством, однако впоследствии стало ясно, что и другие ненасыщенные жирные кислоты (цис-конформации) образуют онкотоксические комплексы. Несмотря на это, ОА применяют намного чаще, поскольку она является наиболее эффективной, распространенной и легкодоступной, а также обладает собственной цитотоксичностью, например, недавно была описана экспериментальная модель острого респираторного дистресс-синдрома, индуцируемая введением крысам олеиновой кислоты (Huang et al., 2022). Учитывая сказанное выше, в данной работе было некорректно использовать олеиновую кислоту, как контроль специфичности действия ее комплекса с LF. Если последний хорошо растворим вплоть до концентрации 500 мкМ LF и 4 мМ олеиновой кислоты, то без транспортного белка олеиновая кислота не растворима в водносолевой фазе (Рис. 3.1). В ряде опытов для сравнения с LF мы использовали альбумин сыворотки крови как носитель для олеиновой кислоты.

В ходе настоящего исследования был разработан метод получения комплекса лактоферрина с жирными кислотами, в частности, с олеиновой кислотой. Разработанный подход основан на процессах постепенного смешивания раствора ЖК в этаноле с белком, диализа следов этанола и

филтрации (Рис. 2.1). При добавлении растворов ненасыщенных ЖК в этаноле к белку мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания ЖК с водной фазой (Рис. 3.1, 3.2). 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 вовсе (Таблица 3.2). В нашем случае титрование белка показало, что один моль LF способен связать до 8 моль ОА. Однако различные вариации методов получения подобного рода комплексов приводили исследователей к различным коэффициентам стехиометрии между использованными белками с жирными кислотами (Таблица 1.2). 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 (Рис. 3.4). Близкие значения (16 нм) были получены также методом малоуглового рассеяния нейтронов (Примечание: данные получены совместно с д.б.н. В.В. Егоровым). 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 (два радиуса гирации) до 10,0–11,5 нм (максимальный размер) (Sabatucci et al., 2007; Samygina et al., 2013), 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.

В части настоящей работы, посвященной анализу спектральных свойств LF и LF/8ОА показано, что спектр КД, полученный для LF в дальнем УФ-диапазоне, отражает повышенную отрицательную молярную эллиптичность с отрицательными пиками 212 нм и 220 нм, что характерно для α -спиралей в белке. Добавление к белку 8 моль ОА приводило к незначительному уменьшению отрицательных значений спектра (Рис. 3.8). Это указывает на то, что ОА может оказывать прямое влияние на аминокислотные остатки LF, приводить к стабилизации пространственной структуры белка, за счет увеличения доли альфа-спиральных структур. Отсутствие значительных пертурбаций вторичной структуры, вызванных связыванием олеиновой кислоты, в нашем случае можно объяснить использованием мягких условий комплексообразования (рН 7,4, 22 °С). Нами не было выявлено существенных различий в интенсивности общей и триптофановой флуоресценции LF и LF/8ОА, что также свидетельствует об отсутствии значимых изменений внутри глобулы лактоферрина при добавлении к нему 8 молекул олеиновой кислоты (Рис. 3.5 и 3.6).

Для прецизионного анализа изменений свойств лактоферрина с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса были определены кинетические параметры комплексообразования LF и его комплекса LF/8ОА с его природным лигандом, СР, и получены весьма близкие величины констант скорости ассоциации и диссоциации комплекса (Таблицы 3.3–3.5). На основании этого можно сделать вывод, что связывание с LF 8 моль олеиновой кислоты не сказывается на его способности к белок-белковым взаимодействиям. Природный лиганд лактоферрина, СР — является белком острой фазы воспаления, ферроксидазой и универсальным антиоксидантом (Беловаи Карякина, 2010). Ранее была показана возможность образования комплекса между лактоферрином и церулоплазмином (Zakharova et al., 2000). Комплекс СР-LF был выделен из грудного молока (Соколов и соавт., 2006), а также обнаружен в слезной жидкости (Соколов и соавт., 2013). Заметим, что при введении апо-формы LF крысам взаимодействие с СР,

функционирующим как основная ферроксидаза плазмы крови, приводит к насыщению LF ионами железа. При добавке AgCl в пищу крыс происходило выключение ферроксидазной активности CP, сопровождавшееся усилением HIF-зависимых защитных эффектов апо-формы LF, а именно пролонгированной индукции синтеза CP и эритропоэтина у животных (Kostevich et al., 2016). Отрицательная обратная связь между железосвязывающим белком LF и взаимодействующим с ним CP, ускоряющим окисление и мобилизацию Fe(II) из депонирующих его органов, вероятно играет роль и при опухолевом росте. Учитывая, что апо-форма LF индуцирует синтез HIF-зависимых генов, *CP*, *TfR1*, *EPO*, отвечающих и за обеспечение опухолевых клеток железом и кислородом, наличие у CP способности ускорять насыщение LF ионами Fe(III) выключает активность LF, опосредованную HIF-сигналингом.

На следующем этапе работы была изучена цитотоксическая активность лактоферрина и его комплекса с олеиновой кислотой в опытах *in vitro* на культурах нормальных и трансформированных клеток. Рассмотрение токсических свойств комплекса LF/8OA показало наличие высокой гемолитической активности по сравнению с LF. Установлено, что лактоферрин и его комплексы с олеиновой кислотой в концентрации до 8 мкМ не вызывают разрушения эритроцитов в суспензии (4×10^6 кл/мл). Комплекс LF/8OA уже в концентрации 8,5 мкМ обладает высокой гемолитической активностью, которая увеличивается с повышением концентрации агента. В то же время лактоферрин, не содержащий OA, не обладает таким эффектом на эритроциты вплоть до концентрации 250 мкМ (Рис. 3.15).

Комплекс также обладал провоспалительной активностью в отношении нейтрофилов человека, приводя к их активации, дегрануляции и высвобождению из клеток миелопероксидазы — гем-содержащего фермента азурофильных гранул нейтрофилов. Оказалось, что комплекс LF/8OA, начиная с концентрации 1 мкМ, способен вызывать дегрануляцию

нейтрофилов в суспензии (3×10^7 кл/мл), которая увеличивается с повышением концентрации комплекса (Таблица 3.7, Рис. 3.19). Учитывая, что активность секретируемой нейтрофилами миелопероксидазы в плазме крови находится под контролем СР (Sokolov et al., 2018), мы изучили его влияние на цитотоксичность комплекса LF/80A. В наших опытах впервые было показано защитное действие СР, которое выражалось в ингибировании токсической активности комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой, проявляемой в отношении эритроцитов. В частности, что добавление СР защищало эритроциты от гемолитического действия: в соотношении 1:1 (СР:LF) церулоплазмин полностью ингибировал гемолиз, индуцированный LF/80A (Рис. 3.17). Аналогичный защитный эффект СР мы обнаружили и в отношении нейтрофилов человека (Рис. 3.20). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что СР защищает эритроциты от гемолитического действия LF/80A, а также препятствует дегрануляции нейтрофилов опосредованного комплексом белок-ЖК.

Нами было показано, что комплекс бычьего сывороточного альбумина с ОА не оказывает выраженного токсического влияния на нормальные клетки. Альбумин — основной белок, который способен связывать неэстерифицированные жирные кислоты и выполнять функции основного транспортера жирных кислот в плазме (Parks et al., 1983). Показано, что для жирных кислот — основного лиганда альбумина — имеется 7 сайтов связывания (Ghuman et al., 2005). Мы показали, что гемолитическая активность комплекса BSA/80A в 14 раз ниже активности комплекса лактоферрина с ОА. Таким образом, на наш взгляд преждевременно рассматривать LF исключительно как инертный носитель для жирной кислоты, поскольку замена лактоферрина на BSA, выполняющего роль транспортера жирных кислот в плазме, выразилась в кардинальном снижении цитотоксичности.

Цитотоксическая активность комплекса LF/80A была протестирована на опухолевых культурах клеток: H22a, HL-60, а также на клеточной линии

Jurkat — иммортализованных Т-лимфоцитах. Концентрация препарата, вызывающего гибель 50 % клеток мышинной гепатомы 22a при окрашивании трипановым синим, составила 21 мкМ. Жизнеспособность клеток в случае инкубации с 8ОА и LF/8ОА в максимальной концентрации 25 мкМ составила 87 % и 66 % (Рис. 3.28) после 20 часов инкубации с опухолевой культурой. С помощью метода проточной цитофлуориметрии было проведено детальное изучение механизмов клеточной гибели. В данной работе впервые показано, что препарат лактоферрина с олеиновой кислотой при попадании в опухолевую клетку на ранних этапах инкубации запускает апоптоз. Выраженный цитотоксический эффект напрямую зависел от стехиометрии: чем больше моль ОА было связано с LF, тем более сильный цитотоксический эффект мы наблюдали. При замене белка в комплексе на LF коровы не было выявлено достоверно значимых отличий: все комплексы обладали цитотоксической активностью, в равной степени запуская процессы апоптоза и некроза (Рис. 3.24).

Результаты экспериментов по оценке степени токсичности комплекса в зависимости от насыщения белка железом, проводили на иммортализованной клеточной линии Т-лимфоцитов. По результатам проточной цитофлуориметрии комплекс LF/8ОА, как и в случае с клетками HL-60, вызывал апоптоз клеток линии Jurkat. Показано, что после инкубации с холо-LF/8ОА количество клеток на стадии раннего апоптоза более чем в 5 раз увеличивалось по сравнению с контролем (Рис. 3.25). Значимых различий между апо- и холо-формой LF обнаружено не было: оба комплекса запускали процесс апоптоза. Спустя сутки инкубации с LF/8ОА (25 мкМ) с клетками Jurkat мы обнаружили более половины клеток на стадии раннего апоптоза. На этом этапе было принято решение использовать для экспериментов по подавлению роста опухолей апо-форму LF, для которой известна железо-зависимая бактериостатическая активность.

Для ответа на вопрос: сохраняется антибактериальное действие LF после связывания ОА, нами была изучена антимикробная активность в

системе *in vitro* с использованием суспензии *E. coli* в жидкой питательной среде. Антибактериальное действие LF известно и неоднократно описано в литературе. Ненасыщенный железом лактоферрин создает дефицитную по катионам металлов среду, в которой рост и развитие микроорганизмов замедляется. Антимикробную активность лактоферрина в отношении *E. coli* связывают с непосредственным контактом между гликопротеином и микробной оболочкой (Бухарин и соавт., 2011). 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 (Таблица 3.6). Такой эффект можно объяснить тем, что олеиновая кислоты влияет на способность LF взаимодействовать с компонентами бактериальной мембраны.

Изучение противоопухолевого действия комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой *in vivo* проводили на модели мышинной гепатомы 22a. Терапию проводили, начиная со следующих суток после прививки клеток гепатомы 22a (Рис. 2.5). В течение всего срока эксперимента проводилась оценка роста опухоли. Для этого измеряли линейные размеры опухоли и рассчитывали её объем. Подкожное курсовое введение LF/80A в течение 24 суток животным — носителям опухоли вызывало значимый терапевтический эффект. К моменту завершения курса инъекций препаратов (24-й день) значение среднего объема опухолей у мышей, получавших комплекс белка с жирной кислотой, оказалось более чем в 5 раз меньше, чем в группе животных, которые получали инъекции LF (Рис. 3.29). Об эффективности комплекса говорило то, что через неделю после завершения терапевтического воздействия индекс ТРО принимал значение 79 %. Аналогичный курс инъекций LF не приводил к такому эффекту, значение индекса ТРО в данной группе мышей достигало 21 % (Рис. 3.30). Интересно, что в группе мышей, получавших LF/80A, наблюдалась тенденция к задержке появления первых опухолевых узлов по сравнению с группой

контроля и LF. Более того, при использовании LF/80А частота ремиссии составила 20 %: у животных наблюдалось полное рассасывание опухолевого узла.

При исследовании выживаемости нами было показано, что инъекции LF/80А приводят к увеличению продолжительности жизни по сравнению с контролем на 173 %. Для адекватного и эффективного лечения асцитных и солидных опухолей этот показатель должен составлять не менее 50 %, что говорит о достаточно высокой эффективности изученного в данной работе комплекса. Полученные на модели мышинной гепатомы данные свидетельствуют о высокой противоопухолевой активности комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой. Стоит отметить, что инъекции комплекса не вызывали местных аллергических или токсических реакций. При изучении на мышах острой и отсроченной токсичности комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой в дозе 2 г/кг не наблюдалось интоксикации, изменения общего состояния животных, состояние шерстного и кожного покрова соответствовало норме. Гибель мышей в течение эксперимента не наступала, поэтому полуметальную дозу ЛД₅₀ определить не удалось. Вероятно, обнаруженное в опытах *in vitro* защитное действие СР против цитотоксичности LF/80А может служить объяснением отсутствия выраженной токсичности комплекса при введении мышам. В нескольких обзорах СР отведена роль фактора, положительно влияющего на рост опухолей, который сопровождается увеличением концентрации СР в плазме крови (Linder, 1977; Вавалова и соавт. 2005). Нельзя исключить, что для более эффективного применения комплекса LF/80А в будущем потребуются учитывать концентрацию СР, как фактора, влияющего на эффективность противоопухолевой активности комплекса лактоферрина с олеиновой кислотой.

Полученные в результате диссертационного исследования физико-химические характеристики LF и его комплекса с ОА, а также активность в

отношении опухолевых и нетрансформированных клеток *in vitro* и *in vivo* суммированы в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Сравнение свойств LF и его комплекса с ОА

	LF	LF/80А
Размер частицы	9 нм	18 нм
Связывание церулоплазмينا	k_d $0,033 \pm 0,004$ 1/с, K_D 367 ± 40 нМ	k_d $0,031 \pm 0,002$ 1/с, K_D 407 ± 27 нМ
Антибактериальная активность против <i>E. coli</i>	MIC_{50} 82 ± 4 мкМ	MIC_{50} 142 ± 7 мкМ
Гемолитическая активность	Вплоть до 256 мкМ отсутствует	9 мкМ вызывает 50 % гемолиз (подавляется церулоплазмином — 1:1, моль/моль)
Активация нейтрофилов	Вплоть до 36 мкМ отсутствует	9 мкМ увеличивает в 6 раз экзоцитоз миелопероксидазы (подавляется церулоплазмином — 2:1, моль/моль)
Жизнеспособность культуры клеток гепатомы МН22а	Стимулировал рост клеток в диапазоне 6–50 мкМ	Цитотоксический эффект в диапазоне 6–50 мкМ
Острая токсичность (мыши)	Не обнаружена при введении 2000 мг/кг	Не обнаружена при введении 2000 мг/кг
Рост перевиваемой гепатомы и гибель мышей с опухолью (на 30-е сутки, из которых 24 дня вводили препарат)	Торможение роста на 21 % (индекс роста опухоли — 0,63), погибло 4 мышей (60 % выжило)	Торможение роста на 79 % (индекс роста опухоли — 0,14), выжило 10 мышей (100 %)

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 4.1). Теоретический анализ публикаций, представленных в литературном обзоре, позволяет утверждать о несомненной актуальности изучения подобных противоопухолевых комплексов в качестве потенциального инструмента биотерапии злокачественных новообразований.

Таблица 4.1. 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 /Vcl-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 ₅₀ ~ 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 мышечной 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α -ЛА — альфа-лактальбумин

β -ЛГ — β -лактоглобулин

а.о. — аминокислотные остатки

апо-LF — свободная от Fe^{3+} форма лактоферрина

АФК — активные формы кислорода

БП — болезнь Паркинсона

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

ГЭБ — гематоэнцефалический барьер

ДГТ — дигидротестостерон

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРС — динамическое рассеяние света

ЖК — жирная кислота

ЗНО — злокачественные новообразования

ИРО — индекс роста опухоли

ИФА — иммуноферментный анализ

КД — круговой дихроизм

ЛД₅₀ — средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы

ЛПС — липополисахариды

МБА — N,N'-метиленбисакриламид

МПО — миелопероксидаза

мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ — магнитно-резонансная томография

МЭ — меркаптоэтанол

НЭЖК — неэстерифицированные жирные кислоты

ОП — оптическая плотность

ПААГ — полиакриламидный гель

ППР — поверхностный плазмонный резонанс

ПСА — простатический специфический антиген

РНК — рибонуклеиновая кислота

ТЕМЕД — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ТРО — процент торможения роста опухоли

ТС — тимидилатсинтаза

ТФ — трансферрин

холо-LF — железонасыщенная форма лактоферрина

ЦИ — цитотоксический индекс

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход

ЭФ — электрофорез

5-FU — 5-фторурацил

5-FU-LF — комплекс лактоферрина с 5-фторурацилом

ALT (alternative lengthening of telomeres) — механизм альтернативного удлинения теломер

AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) — АМФ активлируемая протеиназа

ANGPT (angiotensin) — ангиотензин

ANS — анилинонафталин-8-сульфонат

BAMLET — Bovine Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells

Bcl-2 — белки-ингибиторы апоптоза

bFGF (basic fibroblast growth factor) — фактор роста фибробластов

BLAGLET— Bovine LActoGlobulin made LEthal to Tumor cells

CAMLET — Camel Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells

CLSM (confocal laser scanning microscopy) — лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

COX 2 — индуцибельная циклооксигеназа

CP — церулоплазмин

Cur — куркумин

Cur-LF — комплекс лактоферрина с куркумином

Cyt-c-OA — комплекс лактоферрина с цитохромом С

ELOA — Equine Lysozyme with Oleic Acid

FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) — метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией

Fas (CD95, APO-1) — относится к классу рецепторов TNF/NGF (36 кДа)

FCS (fluorescence correlation spectroscopy) — флуоресцентная корреляционная спектроскопия

GAMLET — Goat Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GSH — восстановленный глутатион

H22a — мышьяная гепатома 22a

HAMLET — Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells

Her-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) — второй рецептор фактора роста эпидермиса

HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) — гипоксия-индуцибельный фактор 1 α

IAP (proteins inhibitors of apoptosis) — ингибиторы белков апоптоза

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) — концентрация полумаксимального ингибирования

IFN- γ — интерферон «гамма»

IgG — иммуноглобулины G

IgM — иммуноглобулины M

IgA — иммуноглобулины A

IL-18 — интерлейкин 18

IL-1 β — интерлейкин-1 β

IL-4 — интерлейкин 4

IL-6 — интерлейкин 6

IL-8 — интерлейкин 8

Ki-67 — маркер пролиферативной активности опухолевой клетки

LF — лактоферрин

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

LF-TMZ — наночастицы LF, нагруженные темозоломидом

LIMLET — комплекс олеиновой кислоты с липосомами

- MDR (multidrug resistance) — множественная лекарственная устойчивость
- NEFA (non-esterified fatty acids) — ненасыщенные жирные кислоты
- NF-κBp65 — ядерный фактор транскрипции семейства NF-κB
- NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) — ядерный фактор «каппа-би»
- ОА — олеиновая кислота
- p21 — белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A
- p27 — белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1B
- p53 — опухолевый супрессор
- PBS — phosphate buffer saline (150 мМ NaCl, 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4)
- PDGF (Platelet-derived growth factor) — фактор роста тромбоцитов
- pRb (retinoblastoma protein) — белок ретинобластомы, опухолевый супрессор
- RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) — мембранный белок из семейства TNF
- SAR-CoV-1 (severe acute respiratory syndrome coronavirus) — тяжёлый острый респираторный синдром
- SDS — додецилсульфат натрия
- SP-B — белок сурфактанта В
- TGFβ1 (transforming growth factor beta) — трансформирующий ростовой фактор «бета»
- TKI (tyrosine kinase inhibitor) — ингибитор тирозинкиназы
- TME (tumor microenvironment) — микроокружение опухоли
- TMZ (temozolomide) — темозоломид

TNF- α (tumor necrosis factor) — фактор некроза опухоли «альфа»

TOR (target of rapamycin) — мишень рапамицина млекопитающих

Tris — трис-(оксиметил)-аминометан

VEGF (vascular endothelial growth factor) — сосудистый эндотелиальный фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белова, С.В. Церулоплазмин структура, физико-химические и функциональные свойства / С.В.Белова, Е.В. Карякина // Успехи современной биологии. — 2010. — Т. 130. — №2. — С. 180–189.
2. Бухарин, А. В. Роль лактоферрина в противoinфекционной защите / А.В. Бухарин, А.В. Валышев, И.В. Валышева // Успехи современной биологии. — 2011. — Т. 131 — № 2. — С. 135–144.
3. Вавилова, Т.П. Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов / Т.П.Вавилова, Ю.Н.Гусарова, О.В.Королева, А.Е.Медведев // Биомедицинская химия. — 2005. — Т. 51. — № 3. — С. 263–275.
4. Войткова, В.В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (Обзор литературы) / В.В. Войткова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра сибирского отделения российской академии медицинских наук. — Иркутск. — 2010. — Т. 6-1 — №76. — С. 220–225.
5. Гапонова, А.В. Эпителиально-мезенхимальный переход: злокачественная прогрессия и перспективы противоопухолевой терапии / А.В. Гапонова, С. Родин, А.А. Мазина, П.Ю. Волчков // Actanaturae (русскоязычная версия). — 2020. — Т. 12. — №3 (46). — С. 4–23.
6. Григорьева, Д.В. Лактоферрин с олеиновой кислотой индуцирует гемолиз эритроцитов крови человека / Д.В. Григорьева, В.Е. Луценко, А.Ю. Власенко, И.В. Горудко, С.Н. Черенкевич, А.В. Соколов // Свободные радикалы в химии и жизни : сб. тез. докл. Междунар. конф. — Минск, 2015. — С. 83–84.
7. Залуцкий, И.В. Влияние экзогенного лактоферрина на развитие экспериментальной модели карциомы молочной железы / И.В. Залуцкий, В.С. Лукашевич, Н.Ю. Лукьянова, С.Б. Кондрашова, Ю.А. Рудниченко,

- А.А. Басалай, В.Ф. Чехун // Доклады Национальной академии наук Беларуси. — 2017. — Т. 61. — № 5. — С. 103–108.
8. Зильбер, Л.А. Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей / Л.А. Зильбер. — М.: МЕДГИЗ, 1946. — 72 с
9. Зорина, В.Н. Перспективы применения лактоферрина и его производных в лечении онкологических заболеваний / В.Н. Зорина // Вопросы онкологии. — 2019. — Т. 65 — № 6. — С. 785–790.
10. Ильина, А.М. Технология получения биологически активного комплекса «иммуноглобулин-лактоферрин-лактопероксидаза» из вторичного молочного сырья: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.07 / Ильина Анна Михайловна. — Москва, 2009. — 193 с.
11. Имянитов, Е.Н. Общие представления о таргетной терапии / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11. — № 3. — С. 123–130.
12. Кисличко, А.Г. Таргетная терапия при лечении метастатического колоректального рака / А.Г. Кисличко, М.С. Рамазанова, М.Ю. Попов, Е.А. Глушков // Вятский медицинский вестник. — 2012. — Т. 2. — С. 8–11.
13. Кистенева, О.А. Онкология в истории медицины / О.А. Кистенева, А.В. Нестеренко, А.И. Былдина // InternationalScientificReview. — 2017. — Т. 1. — № 32. — С. 92–93.
14. Копнин, Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены // Канцерогенез / Под ред. Д. Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 125–156.
15. Костецкая, Т.В. Развитие и становления науки об опухолях: ключевые аспекты / Т.В. Костецкая, А.Н. Батян, В.О. Лемешевский // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. — 2020. — № 4. — С. 59–69.

16. Кривчик, А.А. Патогенез опухолей: (Принципы их профилактики и лечения): Учеб.-метод. пособие / А.А. Кривчик, Ф.И. Висмонт; под ред. А.А. Кривчик. — Минск: БГМУ, 2002 — 22 с.
17. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1 / А. Ленинджер; Перевод с англ. В.В. Борисова и др.; Под ред. В.А. Энгельгардта, Я.М. Варшавского. — М.: Мир, 1985. — 365 с.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
19. Николаев, А.А. Лактоферрин и его роль в репродукции (обзор литературы) / А.А. Николаев, А.Е. Сухарев // Проблемы репродукции. — 2015. — Т. 21. — № 6. — С. 33–38.
20. Петров, Н.Н. Общее учение об опухолях (Патология и клиника). СПб.: Гигиена и санитария, 1910. — 373 с.
21. Соколов, А.В. Влияние лактоферрина на ферроксидазную активность церулоплазмينا / А.В. Соколов, М.О. Пулина, Е.Т. Захарова и др. // Биохимия. — 2005. — Т. 70. — С. 1231–1236.
22. Соколов, А.В. Обнаружение и выделение комплекса церулоплазмин-лактоферрин из грудного молока / А.В. Соколов, М.О. Пулина, Е.Т. Захарова, А.С. Сусорова, О.Л. Рунова, Н.И. Колодкин, В.Б. Васильев // Биохимия. — 2006. — Т. 71. — С. 208–215.
23. Соколов, А.В. Комплекс церулоплазмينا и лактоферрина в слезной жидкости / А.В.Соколов, М.О.Пулина,О.Л.Рунова, Е.Т.Захарова,В.Б. Васильев // Медицинский Академический Журнал. — 2013. — Т. 13. — №2. — С. 39–43.
24. Стуков, А.Н. Индекс роста опухоли как интегральный критерий / А.Н. Стуков, М.А. Иванова, А.К. Никитин // Вопросы онкологии. — 2001. — Т. 47. — № 5. — С. 616–618.
25. Стуков, А.Н. Оценка эффекта противоопухолевой терапии в эксперименте на основании площади под кинетической кривой роста

- опухоли / А.Н. Стуков, М.А. Иванова, А.К. Никитин // Матер. 5-го Всерос. съезда онкологов. — Казань, 2000. — Т. 1. — С. 226–227.
26. Татосян, А.Г. Онкогены // Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 103–124.
27. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 647 с.
28. Хвастунов, Р.А. Таргетная терапия в онкологии / Р.А. Хвастунов, Г.В. Скрыпникова, А.А. Усачев // Лекарственный вестник. — 2014. — Т. 8. — № 4 (56). — С. 3–10.
29. Adlerova, L. Lactoferrin: a review / L. Adlerova, A. Bartoskova, M. Faldyna // *Veterinárni Medicína*. — 2008. — Vol. 53 — No 9. — P. 457–468.
30. Agwa, M.M. Lactoferrin coated or conjugated nanomaterials as an active targeting approach in nanomedicine / M.M. Agwa, S. Sabra // *Int J Biol Macromol*. — 2021. — Vol. 167 — P. 1527–1543.
31. Ahmed, F. Evaluation of antiproliferative activity, safety and biodistribution of oxaliplatin and 5-Fluorouracil loaded lactoferrin nanoparticles for the management of colon adenocarcinoma: an in vitro and an in vivo study / F. Ahmed, S. Kumari, A.K. Kondapi // *Pharm Res*. — 2018. — Vol. 35. — No 9. — P. 178.
32. Alsabeeh, N. Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions / N. Alsabeeh, B. Chausse, P.A. Kakimoto, A.J. Kowaltowski, O. Shirihai // *BiochimBiophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. — 2018. — Vol. 1863. — No 2. — P. 143–151.
33. Anand, P. Bioavailability of curcumin: problems and promises / P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal // *Mol Pharm*. — 2007. — Vol. 4. — No 6. — P. 807–818.
34. Anderson, B.F. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution / B.F. Anderson, H.M. Baker, E.J. Dodson, G.E. Norris, S.V. Rumball, J.M.

- Waters, E.N. Baker // Proc Natl Acad Sci USA. — 1987. — Vol. 84. — No 7. — P. 1769–1773.
35. Anderson, B.F. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution / B.F. Anderson, H.M. Baker, G.E. Norris, D.W. Rice, E.N. Baker // J Mol Biol. — 1989. — Vol. 209. — № 4. — P. 711–734.
36. Andrade, L.N. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines / L.N. Andrade, T.M. de Lima, R. Curi, A.M. Castrucci // Toxicol In Vitro. — 2005. — Vol. 19. — No 4. — P. 553–560.
37. Anel, A. Membrane partition of fatty acids and inhibition of T-cell function / A. Anel, G.V. Richieri, A.M. Kleinfeld // Biochemistry. — 1993. — Vol. 32. — No 2. — P. 530–536.
38. Arcella, A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth / A. Arcella, M.A. Oliva, S. Staffieri, S. Aalberti, G. Grillea, M. Madonna, M. Bartolo, L. Pavone, F. Giangaspero, G. Cantore, A. Frati // J Neurosurg. — 2015. — Vol. 123. — No 4. — P. 1026–1035.
39. Arnold, R.R. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism / R.R. Arnold, J.E. Russell, W.J. Champion, J.J. Gauthier // Infect Immun. — 1981. — Vol. 32. — No 2. — P. 655–660.
40. Arnold, R.R. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms / R.R. Arnold, M. Brewer, J.J. Gauthier // Infect Immun. — 1980. — Vol. 28. — No 3. — P. 893–898.
41. Artym, J. The role of lactoferrin in the proper development of newborns / J. Arty, M. Zimecki // Advances in Hygiene and Experimental Medicine. — 2005. — Vol. 59. — P. 421–432.
42. Assmann, G. International consensus statement on olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. The Olive Oil and the Mediterranean Diet Panel / G. Assmann, G. de Backer, S. Bagnara, J. Betteridge, G. Crepaldi, A. Fernandez-Cruz, J. Godtfredsen, B. Jacotot, R.

- Paoletti, S. Renaud, G. Ricci, E. Rocha, E. Trautwein, G.C. Urbinati, G. Varela, C. Williams // *Eur J Cancer Prev.* — 1997. — Vol. 6. — No 5. — P. 418–421.
43. Atri, M.S. Structure and stability analysis of cytotoxic complex of camel α -lactalbumin and unsaturated fatty acids produced at high temperature / M.S. Atri, A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, B. Goliaei, Y. Sefidbakht, H.H. Alijanvand, A. Sharifzadeh, A. Niasari-Naslaji // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2011. — Vol. 28. — No 6. — P. 919–928.
44. Azevedo-Martins, A.K. Fatty acid-induced toxicity and neutral lipid accumulation in insulin-producing RINm5F cells / A.K. Azevedo-Martins, A.P. Monteiro, C.L. Lima, S. Lenzen, R. Curi // *Toxicol In Vitro.* — 2006. — Vol. 20. — No 7. — P. 1106–1113.
45. Baggiolini, M Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes / M. Baggiolini, C. De Duve, P.L. Masson, J.F. Heremans // *J. Exp. Med.* — 1970. — Vol. 131. — No 3. — P. 559–570.
46. Baker, E. Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework / E.N. Baker, H.M. Baker, R.D. Kidd // *Biochemical Cell Biology.* — 2002. — Vol. 80. — No 1. — P. 27–34.
47. Baker, E.N. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin / E.N. Baker, H.M. Baker // *Biochimie.* — 2009. — Vol. 91. — No 1. — P. 3–10.
48. Baker, E.N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E.N. Baker, H.M. Baker // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2005. — Vol. 62. — No 22. — P. 2531–2539.
49. Baker, H. M. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release / H. M. Baker, E. N. Baker // *Biometals.* — 2004. — Vol. 17. — No 3. — P. 209–216.
50. Baker, H.M. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme / H.M. Baker, B.F. Anderson, E.N. Baker // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2004. — Vol. 100. — No 23. — P. 3579–3583.

51. Baker, H.M. Metal substitution in transferrins: specific binding of cerium (IV) revealed by the crystal structure of cerium-substituted human lactoferrin / H.M. Baker, C.J. Baker, C.A. Smith, E.N. Baker // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. — 2000. — Vol. 5. — No 6. — P. 692–698.
52. Baker, R.C. Cytotoxicity of short-chain alcohols / R.C. Baker, R.E. Kramer // *Annu Rev PharmacolToxicol*. — 1999. — Vol. 39. — P. 127–150.
53. Balan, M. Honokiol inhibits c-Met-HO-1 tumor-promoting pathway and its cross-talk with calcineurin inhibitor-mediated renal cancer growth / M. Balan, S. Chakraborty, E. Flynn, D. Zurakowski, Pal, S // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7. — No 1. — P. 5900.
54. Barbana, C. Interaction of bovine α -lactalbumin with fatty acids as determined by partition equilibrium and fluorescence spectroscopy / C. Barbana, M.D. Perez, L. Sanchez, M. Dalgalarondo, J.M. Chobert, T. Haertle, M. Calvo // *Int. Dairy. J.* — 2006. — Vol. 16. — No 1. — P. 18–25.
55. Barbiroli, A. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging / A. Barbiroli, F. Bonomi, G. Capretti, S. Iametti, M. Manzoni, L. Piergiovanni, M. Rollini // *Food Control*. — 2012. — Vol. 26. — No 2. — P. 387–392.
56. Baveye, S. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process / S. Baveye, E. Ellass, J. Mazurier, G. Spik, D. Legrand // *Clin Chem Lab Med*. — 1999. — Vol. 37. — No 3. — P. 281–286.
57. Beeckman, D.S.A. Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages / D.S.A. Beeckman, C. M. Van Droogenbroeck, B. J. De Cock, P. Van Oostveldt, D.C. Vanrompay // *Veterinary Research*. — 2007. — Vol. 38. — No 5. — P. 729–739.

58. Beier, D. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells-much more complex than expected / D.Beier, J.B.Schulz, C.P.Beier // *Mol Cancer*. — 2011. — Vol. 10. — P. 128.
59. Bellamy, W. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1992. — Vol. 1121. — No 1-2. — P. 130–136.
60. Benito, J. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment / J. Benito, Z. Zeng, M. Konopleva, W.R. Wilson // *Int. J. Hematol. Oncol*. — 2013. — Vol. 2. — No 4. — P. 279–288.
61. Bennett, R.M. Lactoferrin content of peripheral blood cells / R.M. Bennett, T. Kokocinski // *Br J Haematol*. — 1987. — Vol. 39. — No 4. — P. 509–521.
62. Berlutti, F. Antiviral properties of lactoferrin - a natural immunity molecule / F. Berlutti, F. Pantanella, T. Natalizi, A. Frioni, R. Paesano, A. Polimeni // *Molecules*. — 2011. — Vol. 16. — No 8. — P.6992–7018.
63. Berndt, N. Advances of small molecule targeting of kinases / Berndt N, R.M. Karim, E. Schonbrunn // *CurrOpin Chem Biol*. — 2017. — Vol. 39. — P. 126–132.
64. Berrocal, A. Extended-schedule dose-dense temozolomide in refractory gliomas / A.Berrocal, P.Perez Segura, M.Gil, C.Balana, J.Garcia Lopez, R.Yaya, J.Rodriguez, G.Reynes, O.Gallego, L.Iglesias // *J Neurooncol*.— 2010. — Vol. 96. — No 3. — P. 417–422.
65. Bezault, J. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors anddevelopment of experimental metastases in mice / J. Bezault, R. Bhimani, J. Wiprovnick, P. Furmanski // *Cancer Res*. — 1994. — Vol. 54. — No 9. — P. 2310–2312.
66. Binder, M. On the antiquity of cancer: Evidence for metastatic carcinoma in a young man from ancient Nubia (c. 1200 BC) / M. Binder, C. Roberts, N.

- Spencer, D. Antoine, C. Cartwright // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9. — No 3. — P. e90924.
67. Binukumar, B. Dietary fat and risk of breast cancer / B. Binukumar, A. Mathew // *World J Surg Oncol*. — 2005. — Vol. 3. — No 1. — P. 45.
68. Birgens, H.S. Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia / H.S. Birgens // *Scandinavian Journal of Haematology*. — 1985. — Vol. 34. — No 4. — P. 326–331.
69. Bokkhim, H. Evaluation of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin / H. Bokkhim, T. Tran, N. Bansal, L. Grøndahl, B. Bhandari // *Food Chem*. — 2014. — Vol. 152. — P. 121–127.
70. Brinkmann, C.R. Protein-fatty acid complexes: biochemistry, biophysics and function / C.R. Brinkmann, S. Thiel, D.E. Otzen // *FEBS J*. — 2013. — Vol. 280. — No 8. — P. 1733–1749.
71. Brinkmann, C.R. Preparation and comparison of cytotoxic complexes formed between oleic acid and either bovine or human α -lactalbumin / C.R. Brinkmann, S. Thiel, M.K. Larsen, T.E. Petersen, J.C. Jensenius, C.W. Heegaard // *J. Dairy Res*. — 2011. — Vol. 94. — No 5. — P. 2159–2170.
72. Brinkmann, C.R. The toxicity of bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells is highly dependent of oleic acid and induces killing in cancer cell lines and non-cancer derived primary cells / C.R. Brinkmann, C.W. Heegaard, T.E. Petersen, J.C. Jensenius, S. Thiel // *FEBS J*. — 2011. — Vol. 278. — No 11. — P. 1955–1967.
73. Brock, J.H. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant / J.H. Brock // *Arch. Dis. Child*. — 1980. — Vol. 55. — No 6. — P. 417–421.
74. Buckett, W.M. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples / W.M. Buckett, M.J. Luckas, M.R. Gazvani, I.A. Aird, D.I. Lewis // *Jones J Androl*. — 1997. — Vol. 18. — No 3. — P. 302–304.

75. Burr, G.O. A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet / G.O. Burr, M.M Burr // *J Biol Chem.* — 1929. — Vol. 82. — P. 345–367.
76. Burr, G.O. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition / G.O. Burr, M.M Burr // *J Biol Chem.* — 1930. — Vol. 86. — P. 587–621.
77. Calder, P.C. Sir David Cuthbertson Medal Lecture. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids / P.C. Calder // *Proc Nutr Soc.* — 1996. — Vol. 55. — No 2. — P. 737–774.
78. Caldwell, M.D. Essential fatty acid deficiency in an infant receiving prolonged parenteral alimentation / M.D. Caldwell, H.T. Jonsson, H.B.Jr. Othersen // *J Pediatr.* — 1972. — Vol. 81. — No 5. — P. 894–898.
79. Carrillo, C. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review / C.Carrillo, M. del M.Cavia, S.R.Alonso-Torre // *Nutr Hosp.*— 2012. — Vol. 27. — No 6. — P. 1860–1865.
80. Casbarra, A. Conformational analysis of HAMLET, the folding variant of human alpha-lactalbumin associated with apoptosis / A. Casbarra, L. Birolo, G. Infusini, F.D. Piaz, M. Svensson, P. Pucci, C. Svanborg, G. Marino // *Protein Sci.* — 2004. — Vol. 13. — No 5. — P. 1322–1330.
81. Cawthern, K.M. Interactions of alpha-lactalbumin with fatty acids and spin label analogs / K.M.Cawthern, M.Narayan, D.Chaudhuri, E.A.Permyakov, L.J.Berliner // *J Biol Chem.* — 1997. — Vol. 272. — No 49. — P. 30812–30816.
82. Cesare, A.J. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications / A.J. Cesare, R.R. Reddel // *Nat Rev Genet.* — 2010. — Vol. 11. — No 5. — P. 319–330.
83. Chaharband, F. Formulation and in vitro evaluation of curcumin-lactoferrin conjugated nanostructures for cancerous cells / F.Chaharband, G.Kamalinia, F.Atyabi, S.A.Mortazavi, Z.H.Mirzaie, R.Dinarvand // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* — 2018. — Vol. 46. — No 3. — P. 626–636.

84. Chamberlain, M.C. Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas / M.C. Chamberlain // *Expert Rev Neurother.* — 2010. — Vol. 10. — No 10. — P. 1537–1544.
85. Chea, C. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma / C. Chea, M. Miyauchi, T. Inubushi, A.N. Febriyanti, A. Subarnbhesaj, P.T. Nguyen, M. Shrestha, S. Haing, K. Ohta, T. Takata // *PLoS One.* — 2018 — Vol. 13 — No 1 — P. e0191683.
86. Chea, C. Molecular mechanisms underlying the inhibitory effects of bovine lactoferrin on osteosarcoma / C. Chea, S. Haing, M. Miyauchi, M. Shrestha, H. Imanaka, T. Takata // *BiochemBiophys Res Commun.* — 2019. — Vol. 508. — No 3. — P. 946–952.
87. Chen, C.J. Epidemiology of virus infection and human cancer / C.J. Chen, S.L. You, W.L. Hsu, H.I. Yang, M.H. Lee, H.C. Chen, Y.Y. Chen, J. Liu, H.H. Hu, Y.J. Lin, Y.J. Chu, Y.T. Huang, C.J. Chiang, Y.C. Chien // *Recent Results Cancer Res.* — 2021. — Vol. 217. — P. 13–45.
88. Chen, X. Therapeutic strategies for targeting telomerase in cancer / X. Chen, W.J. Tang, J.B. Shi, M.M. Liu, X.H. Liu // *Med Res Rev.* — 2020. — Vol. 40. — No 2. — P. 532–585.
89. Chen, Z. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in human head and neck cancer. clinical / Z. Chen, P.S. Malhotra, G.R. Thomas, F.G. Ondrey, D.C. Duffey, C.W. Smith, I. Enamorado, N.T. Yeh, G.S. Kroog, S. Rudy, L. McCullagh, S. Mousa, M. Quezado, L.L. Herscher, C. Van Waes // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 5. — No 6. — P. 1369–1379.
90. Cirioni, O. Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline / O. Cirioni, A. Giacometti, F. Barchiesi, G. Scalise // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* — 2000. — Vol. 46. — No 4. — P. 577–582.

91. Clementi, E.A. A complex of equine lysozyme and oleic acid with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* / E.A.Clementi, K.R.Wilhelm, J.Schleucher, L.A. Morozova–Roche,A.P.Hakansson // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8. — No 11. — P. e80649.
92. Comerie–Smith, S.E. Tear lactoferrin levels and ocular bacterial flora in HIV positive patients / S.E. Comerie–Smith, J. Nunez, M. Hosmer, R.L. Farris // *Adv. Exp.Med. Biol.* — 1994. — Vol. 350. — P. 339–344.
93. Coughlin, R.T. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli* / R.T. Coughlin, S. Tonsager, E.J. McGroarty // *Biochemistry*. — 1983. — Vol. 22. — No 8. — P. 2002–2007.
94. Creamer, L.K. β -Lactoglobulin // *Encyclopedia of Dairy Sciences* / ed. H. Roginski, J. W. Fuquay, and P. F. Fox. — 1st ed. — New York: Academic Press, 2002. — P. 319–386
95. Cury–Boaventura, M.F. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes / M.F. Cury–Boaventura, R. Gorjao, T.M. de Lima, P. Newsholme, R. Curi // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 78. — No 13. — P. 1448–1456.
96. Cutone, A. Lactoferrin's anti–cancer properties: safety, selectivity, and wide range of action / A. Cutone, L. Rosa, G.Ianiri, M.S. Lepanto, M.C.Bonaccorsi di Patti, P.Valenti, G.Musci // *Biomolecules*. — 2020. — Vol. 10. — No 3. — P. 456.
97. Damiens, E. Lactoferrin inhibits G1 cyclin–dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma / E. Damiens, I. El. Yazidi, J. Mazurier, I. Duthille, G. Spik, Y. Boilly–Marer // *J Cell Biochem.* — 1999. — Vol. 74. — No 3. — P. 486–498.
98. Delbridge, A.R. The BCL–2 protein family, BH3–mimetics and cancer therapy / A.R. Delbridge, A. Strasser // *Cell Death Differ.* — 2015. — Vol. 22. — No 7. — P. 1071–1080.

99. Delgado, Y. Development of HAMLET-like Cytochrome c–Oleic Acid Nanoparticles for Cancer Therapy / Y. Delgado, M. Morales–Cruz, J. Hernandez–Roman, G. Hernandez, K. Griebenow // *J NanomedNanotechnol.* — 2015. — Vol. 6. — No 4. — P. 1–8.
100. Dhennin–Duthille, I. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen–activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line / I. Dhennin–Duthille, M. Masson, E. Damiens, C. Fillebeen, G. Spik, J. Mazurier // *J Cell Biochem.* — 2000. — Vol. 79. — No 4. — 583–593.
101. Dixon, S.J. Ferroptosis: an iron–dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, B.R. Stockwell // *Cell.* — 2012. — Vol. 149. — No 5. — P. 1060–1072.
102. Di Paolo, A. Relationship between 5–fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients / A. Di Paolo, R. Danesi, A. Falcone, L. Cionini, F. Vannozzi, G. Masi, G. Allegrini, E. Mini, G. Bocci, P.F. Conte, M. Del Tacca // *Ann Oncol.* — 2001. — Vol. 12. — No 9. — P. 1301–1306.
103. Di Paolo, A. Relationship between plasma concentrations of 5–fluorouracil and 5–fluoro–5,6–dihydrouracil and toxicity of 5–fluorouracil infusions in cancer patients / A. Di Paolo, T. Ibrahim, R. Danesi, M. Maltoni, F. Vannozzi, E. Flamini, W. Zoli, D. Amadori, M. Del Tacca // *Ther Drug Monit.* — 2002. — Vol. 24. — No 5. — P. 588–593.
104. Dinayadura, R. To study the apoptotic pathways activated by Selenium saturated bovine lactoferrin (Se–bLF) treatment for colon cancer: Ph.D Thesis. — Melbourne, VIC, Australia, 2009. — 93 p.
105. Dosio, F. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel–albumin conjugate / F. Dosio, P. Brusa, P. Crosasso, S. Arpicco, L. Cattel // *J Control Release.* — 1997. — Vol. 47. — No 3. — P. 293–304.

106. Durringer, C. HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei / C. Durringer, A. Hamiche, L. Gustafsson, H. Kimura, C. Svanborg // *J Biol Chem.* — 2003. — Vol. 278. — No 43. — P. 42131–42135.
107. Dymkowska, D. Short-term and long-term effects of fatty acids in rat hepatoma AS-30D cells: the way to apoptosis / D. Dymkowska, J. Szczepanowska, M.R. Wieckowski, L. Wojtczak // *BiochimBiophys Acta.* — 2006. — Vol. 1763. — No 2. — P. 152–163.
108. 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. — No 7. — P. 1602–1619.
109. Ellison 3rd, R. T. Damage of the outer membrane of enteric gramnegative bacteria by lactoferrin and transferrin / R.T. Ellison 3rd, T.J. Giehl, F.M. LaForce // *Infect Immun.* — 1988. — Vol. 56. — No 11. — P. 2774–2781.
110. Ellison 3rd, R.T. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme / R.T. Ellison 3rd, T.J. Giehl // *Journal of Clinical Investigation.* — 1991. — Vol. 88. — No 4. — P. 1080–1091.
111. Elzoghby, A.O. Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials* // A.O. Elzoghby, M.A. Abdelmoneem, I.A. Hassanin, M.M. Abd Elwakil, M.A. Elnaggar, S. Mokhtar, J.Y. Fang, K.A. Elkhodairy // *Biomaterials.* — 2020. — Vol. 263. — P. 120355.
112. Evan, G.I. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer / G.I. Evan, K.H. Vousden // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — No 6835. — P. 342–348.
113. Fang, B. Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET / B.Fang, M.Zhang, M.Tian, L.Jiang, H.Y.Guo, F.Z. Ren // *BiochimBiophys Acta.* — 2014. — Vol. 1841. — No 4. — P 535–543.

114. Fang, B. Self-assembled β -lactoglobulin-oleic acid and β -lactoglobulin-linoleic acid complexes with antitumor activities / B.Fang, M.Zhang, M.Tian, F.Z.Ren // *J Dairy Sci.* — 2015. — Vol. 98. — No 5. — P. 2898–2907.
115. Fang, J.H. Magnetic core-shell nanocapsules with dual-targeting capabilities and co-delivery of multiple drugs to treat brain gliomas / J.H.Fang, Y.H.Lai, T.L.Chiu, Y.Y.Chen, S.H.Hu, S.Y.Chen // *Adv Healthc Mater.* — 2014. — Vol. 3. — No 8. — P. 1250–1260.
116. Farnaud, S. Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties / S. Farnaud, R. Evans // *Molecular Immunology.* — 2003. — Vol. 40. — No 7. — P. 395–405.
117. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // J.Ferlay, I.Soerjomataram, R.Dikshit, S.Eser, C.Mathers, M.Rebelo, D.M.Parkin, D.Forman, F.Bray // *Int J Cancer.*— 2015. — Vol. 136. — No 5. — E. 359–386.
- 118.** Ferlay, J. Cancer statistics for the year 2020: An overview / J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D.M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray // *Int J Cancer.* — 2021. — doi: 10.1002/ijc.33588. Epub ahead of print. PMID: 33818764.
119. Fernandes, K.E. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens / K.E. Fernandes, D.A. Carter // *Front Microbiol.* — 2017. — Vol. 8. — P. 1–10.
120. Fillebeen, C. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier / C.Fillebeen, L.Descamps, M.P.Dehouck, L.Fenart, M.Benaïssa, G.Spik, R.Cecchelli, A.Pierce // *J Biol Chem.* — 1999. — Vol. 274. — No 11. — P. 7011–7017.
121. Fischer, W. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells(HAMLET) kills human glioblastoma cells in brainxenografts by an apoptosis-like mechanism andprolongs survival / W. Fischer, L. Gustafsson,

- A.K. Mossberg, J. Gronli, S. Mork, R. Bjerkvig, C. Svanborg // *Cancer Res.* — 2004. — Vol. 64. — No 6. — P. 2105–2112.
122. Florian, P.E. On the antiviral activity of lactoferrin / P.E. Florian, M. Trif, R.W. Evans, J. Rom // *Biochem.* — 2009. — Vol. 46. — No 2. — P. 187–197.
123. Fontana, A. The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid / A.Fontana, B.Spolaore, P. Polverino de Laureto // *Biochim Biophys Acta.* — 2013. — Vol. 1834. — No 6. — P. 1125–1143.
124. Fox, P.L. The copper–iron chronicles: the story of an intimate relationship / P.L. Fox // *Biometals.* — 2003. — Vol. 16. — No 1. — P. 9–40.
125. Francesca, B. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans* / B. Francesca, M. Ajello, P. Bosso, C. Morea, P. Andrea, A. Giovanni, V. Piera // *Biometals.* — 2004. — Vol. 17. — No 3. — P. 271–278.
126. Fransson, G.B. Iron in human milk / G.B. Fransson, B. Lonnerdal // *J. Pediatr.* — 1980. — Vol. 96. — No 3 Pt 1. — P. 380–384.
127. Frydecka, I. Lactoferrin–induced up–regulation of zeta (zeta) chain expression in peripheral blood T lymphocytes from cervical cancer patients / I.Frydecka, M.Zimecki, D.Bocko, A.Kosmaczewska, R.Teodorowska, L.Ciszak, M.Kruzel, J.Wlodarska–Polinsk, K. Kuliczkowski, J.Kornafel // *Anticancer Res.* — 2002. — Vol. 22. — No 3. — P. 1897–1901.
128. Fujiki, H. Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled “Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors” (I to VI reports) / H. Fujiki // *Cancer Sci.* — 2014. — Vol. 105. — No 2. — P. 143–149.
129. Fujita, K. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane–treated rats / K. Fujita, E. Matsuda, K. Sekine, M. Iigo, H. Tsuda // *Carcinogenesis.* — 2004. — Vol. 25. — No 10. — P. 1961–1966.

130. Garcia–Alloza, M. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model / M.Garcia–Alloza, L.A.Borrelli, A.Rozkalne, B.T.Hyman, B.J.Bacsikai // *J Neurochem.* — 2007. — Vol. 102. —No 4. — P. 1095–1104.
131. Ghuman J.Structural basis of the drug–binding specificity of human serum albumin / J.Ghuman, P.A.Zunszain, I.Petitpas, A.A.Bhattacharya, M.Otagiri, S. Curry // *J. Mol. Biol.* — 2005. — V.353. — No1. — P. 38–52.
132. Gibons, J. Iron–free and iron–saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer / J. Gibons, J. Kanwar, R. Kanwar // *BMC Cancer.* — 2015. — <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1441-4>.
133. Gifford, J.L. Lactoferricin: a lactoferrin–derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties / J.L. Gifford, H.N. Hunter, H.J. Vogel // *Cell Mol. Life Sci.* — 2005. — Vol. 62. — No 22. — P. 2588–2598.
134. Gifford, J.L. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin / J.L. Gifford, H. Ishida, H.J. Vogel // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7. — P. e51026.
135. Giuliano, S. Mechanisms of resistance to anti–angiogenesis therapies / S. Giuliano, G. Pages // *Biochimie.* — 2013. — Vol. 95. — No 6. — P. 1110–1119.
136. Gomez, H. Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri* / H. Gomez, T. Ochoa, L. Carlin, T. Cleary // *J. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 187. — No 1. — P. 87–95.
137. González–Chávez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. González–Chávez, S. Arévalo–Gallegos, Q. Rascón–Cruz // *Int J Antimicrob Agents.* — 2009. — Vol. 33. — No 4. — P. 301.e1–8.
138. Greish, K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting / K. Greish // *Methods Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 624. — P. 25–37.

139. Grossmann, J.G. X-ray solution scattering reveals conformational changes upon iron uptake in lactoferrin, serum and ovotransferrins / J.G. Grossmann, M. Neu, E. Pantos, F.J. Schwab, R.W. Evans, E. Towns-Andrews, P.F. Lindley, H. Appel, W.G. Thies, S.S. Hasnain // *J. Mol. Biol.* — 1992. — Vol. 225. — No 3. — P. 811–819.
140. Groves, M.L. The isolation of the red protein from milk / M.L. Groves // *J Am Chem Soc.* — 1960. — Vol. 82. — P. 3345–3350.
141. Guedes, J.P. Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro / J.P. Guedes, C.S. Pereira, L.R. Rodrigues, M. Côrte-Real // *Front Oncol.* — 2018. — DOI: 10.3389/fonc.2018.00200.
142. Gustafsson, L. Changes in proteasome structure and function caused by HAMLET in tumor cells / L. Gustafsson, S. Aits, P. Onnerfjord, M. Trulsson, P. Storm, C. Svanborg // *PLoS One.* — 2009. — Vol. 4. — No 4. — P. e5229.
143. Gustafsson, L. Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid / L. Gustafsson, I. Leijonhufvud, A. Aronsson, A.K. Mossberg, C. Svanborg // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — No 26. — P. 2663–2672.
144. Gutteberg, T.J. The latency of serum acute phase proteins in meningococcal septicemia, with special emphasis on lactoferrin / T.J. Gutteberg, B. Haneberg, T. Jorgensen // *Clin Chim Acta.* — 1984. — Vol. 136. — No 2–3. — P.173–178.
145. Haba, R. Effects of lactoferrin, soya germ and polyamine on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)-pyridine(PhIP)-induced breast carcinogenesis in rats / R. Haba, S. Watanabe, M. Wada, S. Udaka // *Biofactors.* — 2004. — Vol. 22. — No 1–4. — P. 127–131.
146. Hakansson A.P. Apoptosis-like death in bacteria induced by HAMLET, a human milk lipid-protein complex / A.P. Hakansson, H. Roche-Hakansson,

- A.K. Mossberg, C. Svanborg // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — No 3. — P. e1771710.
147. Hakansson, A. A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* / A.Hakansson, M.Svensson, A.K.Mossberg, H.Sabharwal, S.Linse, I.Lazou, B.Lonnerdal, C.Svanborg // *Mol Microbiol*. — 2000. — Vol. 35.— No 3. — P. 589–600.
148. Hakansson, A. Apoptosis induced by a human milk protein / A.Hakansson, B.Zhivotovsky, S.Orrenius, H.Sabharwal, C.Svanborg // *Proc Natl Acad Sci*. — 1995. — Vol. 92. — No 17. — P. 8064–8068.
149. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. — 2011. — Vol. 144. — No5. — P. 646–674.
150. Hansen, A.E. Role of linoleic acid in infant nutrition: clinical and chemical study of 428 infants fed on milk mixtures varying in kind and amount of fat / A.E. Hansen, H.F. Wiese, A.N. Boelsche, M.E. Haggard, D.J.D. Adam, H. Davis // *Pediatrics*. — 1963. — Vol. 31. — No 2. — P. 171–192.
151. Hansford, S. Boveri at 100: Theodor Boveri and genetic predisposition to cancer / S. Hansford, D.G. Huntsman // *J Pathol*. — 2014. — Vol. 234. — No 2. — P. 142–145.
152. Hayes, T.G. Phase I trial of oral talactoferrin alfa in refractory solid tumors / T.G. Hayes, G.F. Falchook, G.R. Varadhachary, D.P. Smith, L.D. Davis, H.M. Dhingra, B.P. Hayes, A. Varadhachary // *Invest New Drugs*. — 2006. — Vol. 24. — No 3. — P. 233–240.
153. He, C. Yhhu3813 is a novel selective inhibitor of c-Met Kinase that inhibits c-Met-dependent neoplastic phenotypes of human cancer cells / C. He, J. Ai, W. Xing, Y. Chen, H. Zhang, M. Huang, Y. Hu, J. Ding, M. Geng // *Acta Pharmacol. Sin*. — 2014. — Vol. 35. — No 1. — P. 89–97.
154. Heggie, G.D. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile / G.D.Heggie, J.P.Sommadossi,

- D.S.Cross, W.J.Huster, R.B.Diasio // *Cancer Res.* — 1987. — Vol. 47. — No 8. — P. 2203–2206.
155. Hirai, Y. Concentrations of lactoferrinand iron in human milk at different stages of lactation / Y. Hirai, N. Kawakata, K. Satoh, Y. Ikeda, S. Hisayasu, H. Orimo, Y. Yoshino // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* — 1990. — Vol. 36. — No 6. — P. 531–544.
156. Ho, J.C.S. HAMLET – A protein–lipid complex with broad tumoricidal activity / J.C.S. Ho, A. Nadeem, C. Svanborg // *BiochemBiophys Res Commun.* — 2017. — Vol. 482. — No 3. — P. 454–458.
157. Hollstein, M. p53 mutations in human cancers / M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. Harris // *Science.* — 1991. — Vol. 253. — No 5015. — P. 49–53.
158. Hsieh, Y.S. Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c–Met–mediated epithelial–to–mesenchymal transition / Y.S. Hsieh, C.H. Liao, W.S. Chen, J.T. Pai, M.S. Weng // *J. Cell. Biochem.* — 2017. — Vol. 118. — No 12. — P. 4639–4651.
159. Huang, G. Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardiac and nephric toxicity / G.Huang, N.Zhang, X.Bi, M.,Dou // *Int J Pharm.* — 2008. — Vol. 355. — No 1–2. — P. 314–320.
160. Huang, J. D–tagatose protects against oleic acid–induced acute respiratory distress syndrome in rats by activating PTEN/PI3K/AKT pathway / J.Huang, B.Wang, S.Tao, Y.Hu, N.Wang, Q.Zhang, C.Wang, C.Chen, B.Gao, X.Cheng, Y.Li // *Front Immunol.* — 2022. — Vol. 13. — P. 928312.
161. Huang, R.Q. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain / R.Q.Huang, W.L.Ke, Y.H.Qu, J.H.Zhu, Y.Y.Pei, C.Jiang // *J Biomed Sci.* — 2007. — Vol. 14. — No 1. — P. 121–128.
162. Huggins, C. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic

- carcinoma of the prostate / C. Huggins, C.V. Hodges // *CA Cancer J Clin.* — 1972. — Vol. 22. — No 4. — 232–240.
163. Iglesias–Figuerola, B.F. Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F–actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells / B.F. Iglesias–Figuerola, T.S. Siqueiros–Cendón¹, D.A. Gutierrez, R.J. Aguilera, E.A. Espinoza–Sánchez, S. Arévalo–Gallegos, A. Varela–Ramirez, Q. Rascón–Cruz // *Apoptosis.* — 2019. — Vol. 24. — No 7–8. — P. 562–577.
164. Iigo, M. Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine / M. Iigo, D.B. Alexander, J. Xu, M. Futakuchi, M. Suzui, T. Kozu, T. Akasu, D. Saito, T. Kakizoe, K. Yamauchi, F. Abe, M. Takase, K. Sekine, H. Tsuda // *Biometals.* — 2014. — Vol. 27. — No 5. — P. 1017–1029.
165. Iigo, M. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice / M. Iigo, T. Kuhara, Y. Ushida, K. Sekine, M.A. Moore, H. Tsuda // *Clin Exp Metastasis.* — 1999. — Vol. 17. — No 1. — P. 35–40.
166. Iigo, M. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase–1 and interleukin–18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis / M.Iigo, M.Shimamura, E.Matsuda, K.Fujita, H.Nomoto, J.Satoh, S.Kojima, D.B.Alexander, M.A.Moore, H.Tsuda // *Cytokine.* — 2004. — Vol. 25. — No 1. — P. 36–44.
167. Ikeda, M. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells / M. Ikeda, A. Nozaki, K. Sugiyama, T. Tanaka, A. Naganuma, K. Tanaka, H. Sekihara, K. Shimotohno, M. Saito, N. Kato // *Virus Res.* — 2000. — Vol. 66. — No 1. — P. 51–63.

168. Iyer, A.K. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting / A.K.Iyer, G.Khaled, J.Fang, H.Maeda // *Drug Discov Today*. — 2006. — Vol. 11. — No 17–18. — P. 812–818.
169. Janssen, P.T. A simple test for lacrimal glandfunction: a tear lactoferrin assay by radial immunodiffusion / P.T. Janssen, O.P. van Bijsterveld // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. — 1983. — Vol. 220. — No 4. — P. 171–174.
170. Jensen, O.L. The concentration of lactoferrin in tears of normals and of diabetics / O.L. Jensen, B.S. Gluud, H.S. Birgens // *Acta Ophthalmol. (Copenh)*. — 1986. — Vol. 64. — No 1. — P. 83–87.
171. Jensen, H. Antimicrobial properties of lactoferrin / H. Jensen, R.E. Hancock // *Biochimie*. — 2009. — Vol. 91. — No 1. — P. 19–29.
172. Jiang, R. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells / R. Jiang, V. Lopez, S.L. Kelleher, B. Lönnnerdal // *Journal of cellular physiology*. — 2011. — Vol. 226. — No 11. — P. 3022–3031.
173. Johanson, B. Isolation of an iron containing red protein from human milk / B. Johanson // *Acta Chemica Scandinavica*. — 1960. — Vol. 14 — No 2. — P. 510–512.
174. Jung, S. Oleic acid-embedded nanoliposome as a selective tumoricidal agent / S.Jung, S.Lee, H.Lee, J.Yoon, E.K.Lee // *Colloids Surf B Biointerfaces*. — 2016. — Vol. 146. — P. 585–589.
175. Kamemori, N. Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats / N.Kamemori, T.Takeuchi, A.Sugiyama, M.Miyabayashi, H.Kitagawa, H.Shimizu, K.Ando, E.Harada // *J Vet Med Sci*. — 2008. — Vol. 70. — No 3. — P. 313–315.
176. Kanwar, J.R. 'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy / J.R.Kanwar, K.P.Palmano, X.Sun,

- R.K.Kanwar, R.Gupta, N.Haggarty, A.Rowan, S.Ram, G.W.Krissansen // Immunol Cell Biol. — 2008. — Vol. 86. — No 3. — P. 277–88.
177. Kanyshkova, T.G. Lactoferrin and its biological functions / T.G. Kanyshkova, V.N. Buneva, G.A. Nevinsky // Biochemistry (Moscow). — 2001. — Vol. 66. — No 1. — P. 1–7.
178. Kaplan, E.I. Nonparametric estimation from incomplete observations / E.I. Kaplan, P. Meier // J. Am Stat Assoc. — 1958. — Vol. 53. — P. 457.
179. Karpozilos, A. The treatment of cancer in Greek antiquity / A. Karpozilos, N. Pavlidis // Eur. J. Cancer. — 2004. — Vol. 40. — No 14. P. 2033–2040.
180. Kijlstra, A. Lactoferrin levels in normal human tears / A. Kijlstra, S.H. Jeurissen, K.M. Koning // Br J Ophthalmol. — 1983. — Vol. 67. — No 3. — P. 199–202.
181. Kim, S.S. Encapsulation of temozolomide in a tumor-targeting nanocomplex enhances anti-cancer efficacy and reduces toxicity in a mouse model of glioblastoma / S.S.Kim, A.Rait, E.Kim, J.DeMarco, K.F.Pirollo, E.H.Chang // Cancer Lett. — 2015. — Vol. 369. — No 1. — P. 250–258.
182. Kimoto, Y. Protective effect of lactoferrin on Cisplatin-induced nephrotoxicity in rats / Y.Kimoto, M.Nishinohara, A.Sugiyama, A.Haruna, T.Takeuchi // J Vet Med Sci. — 2013. — Vol. 75. — No 2. — P. 159–164.
183. Kirkpatrick, C.H. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defence mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis / C.H. Kirkpatrick, I. Green, R.R. Rich, A.L. Schade // J Infect Dis. — 1971. — Vol. 124. — No 6. — P. 539–544.
184. Knyazeva, E.L. Who Is Mr HAMLET? Interaction of human alpha-lactalbumin with monomeric oleic acid / E.L. Knyazeva, V.M. Grishchenko, R.S. Fadeev, V.S. Akatov, S.E. Permyakov, E.A. Permyakov // Biochemistry. — 2008. — Vol. 47. — No 49. — P. 13127–13137.
185. Kondapi, A.K. Targeting cancer with lactoferrin nanoparticles: recent advances / A.K.Kondapi // Nanomedicine (Lond). — 2020. — Vol. 15. — No 21. — P. 2071–2083.

186. Kontomanolis, E.N. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review / E.N. Kontomanolis, A. Koutras, A. Syllaios, D. Schizas, A. Mastoraki, N. Garmpis, M. Diakosavvas, K. Angelou, G. Tsatsaris, A. Pagkalos, T. Ntounis, Z. Fasoulakis // *Anticancer Res.* — 2020. — Vol. 40. — No 11. — P. 6009–6015.
187. Kostevich, V.A. 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, A.Y.Vlasenko, N.N.Kolmakov, E.T.Zakharova, V.B.Vasilyev // *Biometals.* — 2016. — Vol. 26. — No 4. — P. 691–704.
188. Koukourakis, G.V. Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article / G.V. Koukourakis, V. Kouloulis, G.Zacharias, C.Papadimitriou, P.Pantelakos, G.Maravelis, A.Fotinas, I.Beli, D.Chaldeopoulos, J.Kouvaris // *Molecules.* — 2009. — Vol. 14. — No 4. — P. 1561–1577.
189. Kozu, T. Effect of orally administered bovinel on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical / T. Kozu, G. Iinuma, Y. Ohashi, Y. Saito, T. Akasu, D. Saito, D.B. Alexander, M. Iigo, T. Kakizoe, H. Tsuda // *Trial Cancer Prev Res (Phila).* — 2009. — Vol. 2. — No 11. — P. 975–983.
190. Kretschmar, J.L. The role of oncogenes in cancer / J.L. Kretschmar // *Mil Med.* — 1990. — Vol. 155. — No 2. — P. 83–86.
191. Kumari, S. Lactoferrin nanoparticle mediated targeted delivery of 5-fluorouracil for enhanced therapeutic efficacy / S.Kumari, A.K.Kondapi // *Int J Biol Macromol.* — 2017. — Vol. 95. — P. 232–237.
192. Kumari, S. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433) / S.Kumari, S.M.Ahsan, J.M.Kumar, A.K.Kondapi, N.M.Rao // *Sci Rep.* — 2017. — Vol. 7. — No 1. — P. 6602.

193. Kuttan, R. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*) / R. Kuttan, P. Bhanumathy, K. Nirmala, M.C. George // *Cancer*. — 1985. — Vol. 29. — No 2. — P. 197–202.
194. Lacassagne, A. The Relation between Hormones and cancer / A. Lacassagne // *Can Med Assoc J*. — 1937. — Vol. 37. — No2. — P. 112–117.
195. LaForce, F.M. Release of lactoferrin by polymorphonuclear leukocytes after aerosol challenge with *Escherichia coli* / F.M. LaForce, D.S. Boose // *Infect Immun*. — 1987. — Vol. 55. — No 9. — P. 2293–2295.
196. Lambert, L.A. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins / L.A. Lambert, H. Perri, T.J. Meehan // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. — 2005. — Vol. 140. — No 1. — P. 11–25.
197. Lang, J. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans / J. Lang, N. Yang, J. Deng, K. Liu, P. Yang, G. Zhang, C. Jiang // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — No 8. — P. e23710.
198. Laudadio, J. HER2 testing: a review of detection methodologies and their clinical performance / J. Laudadio, D.I. Quigley, R. Tubbs, D.J. Wolff // *Expert Rev Mol Diagn*. — 2007. — Vol. 7. — No 1. — P. 53–64.
199. Lee, S. Requirement of the JNK-associated Bcl-2 pathway for human lactoferrin-induced apoptosis in the Jurkat leukemia T cell line / S. Lee, S. Won, C. Pyo, N. Yoo, J. Kim, S. Choi // *Biochimie*. — 2009. — Vol. 91. — No 1. — P. 102–108.
200. Leitch, E.C. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme / E.C. Leitch, M.D.P. Willcox // *Journal of Medical Microbiology*. — 1999. — Vol. 48. — No 9. — 867–871.
201. Levay, P.F. Lactoferrin: a general review / P.F. Levay, M. Viljoen // *Haematologica*. — 1995. — Vol. 80. — No 3. — P. 252–267.

202. Lewandowska, A.M. Environmental risk factors for cancer – review paper / A.M. Lewandowska, M. Rudzki, S. Rudzki, T. Lewandowski, B. Laskowska // *Ann Agric Environ Med.* — 2019. — Vol. 26. — No 1. — P. 1–7.
203. Li, H. The Combination of two bioactive constituents, lactoferrin and linolenic acid, inhibits mouse xenograft esophageal tumor growth by downregulating lithocholytaurine and inhibiting the JAK2/STAT3–related pathway / H. Li, Q. Yao, L. Min, S. Huang, H. Wu, H. Yang, L. Fan, J. Wang, Zheng N // *ACS Omega.* — 2020. — Vol. 5. — No 33. — P. 20755–20764.
204. Li, S. High metastatic gastric and breast cancer cells consume oleic acid in an AMPK dependent manner / S.Li, T.Zhou, C.Li, Z.Dai, D.Che, Y.Yao, L.Li, J.Ma, X.Yang, G.Gao // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9. — No 5. — P. e97330.
205. Li, X. Autophagy and autophagy–related proteins in cancer / X. Li, S. He, B. Ma // *Mol Cancer.* — 2020. — Vol. 19. — No 1. — P. 12.
206. Linder, M.C. Iron and copper metabolism in cancer, as exemplified by changes in ferritin and ceruloplasmin in rats with transplantable tumors / M.C.Linder // *Adv Exp Med Biol.* — 1977. — Vol. 92. — P. 643–664.
207. Liskova, K. Cytotoxic complexes of sodium oleate with β –lactoglobulin / K. Liskova, M.A.E. Auty, V. Chaurin, S. Min, K. H. Mok, N. O'Brien, A.L. Kelly // *Eur J Lipid Sci Technol.* — 2011. — Vol. 113. — No 10. — P. 1207–1218.
208. Liskova, K. Effect of denaturation of alpha–lactalbumin on the formation of BAMLET (bovine alpha–lactalbumin made lethal to tumor cells) / K. Liskova, A.L. Kelly, N. O'Brien, A. Brodkorb // *J Agric Food Chem.* — 2010. — Vol. 58. — No 7. — P. 4421–4427.
209. Liu, J. Anti–androgenic activity of fatty acids / J.Liu, K.Shimizu,R.Kondo // *Chem Biodivers.* — 2009. — Vol. 6. — No 4. — P 503–512.

210. Liu, J. Improved antitumor activity and IgE/IgG-binding ability of α -Lactalbumin/ β -lactoglobulin induced by ultrasonication prior to binding with oleic acid / J. Liu, W.M. Chen, Y.H. Shao, Y.P. Liu, Z.C. Tu // *J Food Biochem.* — 2020. — Vol. 44. — No 12. — P. e13502.
211. Llor, X. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes / X. Llor, E. Pons, A. Roca, M. Alvarez, J. Mane, F. Fernandez-Banares, M.A. Gassull // *Clin Nutr.* — 2003. — Vol. 22. — No 1. — P. 71–79.
212. Longley, D.B. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies / D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston // *Nat Rev Cancer.* — 2003. — Vol. 3. — No 5. — P. 330–338.
213. Lonnerdal, B. Lactoferrin: molecular structure and biological function / B. Lonnerdal, S. Iyer // *Annual Review of Nutrition.* — 1995. — Vol. 15. — P. 93–110.
214. Lux, C.A. Hypersusceptibility of neutrophil granulocytes towards lethal action of free fatty acids contained in enzyme-modified atherogenic low density lipoprotein / C.A. Lux, A. Koschinski, K. Dersch, M. Husmann, S. Bhakdi // *Atherosclerosis.* — 2009. — Vol. 207. — No 1. — P. 116–122.
215. Mahady, G.B. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen / G.B. Mahady, S.L. Pendland, G. Yun, Z.Z. Lu // *Anticancer Res.* — 2002. — Vol. 22. — No 6C. — P. 4179–4181.
216. Majka, G. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations / G. Majka, K. Śpiewak, K. Kurpiewska, P. Heczko, G. Stochel, M. Strus, M. Brindell // *Anal Bioanal Chem.* — 2013. — Vol. 405. — No 15. — P. 5191–5200.
217. Malisauskas, M. Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? / M. Malisauskas, J. Ostman, A. Darinskas, V. Zamotin, E. Liutkevicius,

- E.Lundgren, L.A.Morozova–Roche // *J Biol Chem.* — 2005. — Vol. 280. — No 8. — P. 6269–6275.
218. Martins de Lima, T. Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774) / T. Martins de Lima, M.F. Cury–Boaventura, G. Giannocco, M.T. Nunes, R. Curi // *Clin Sci.* — 2006. — Vol. 111. — No 5. — P. 307–317.
219. Masci, J.R. Complete response of severe, refractory oral candidiasis is to mouthwash containing lactoferrin and lysozyme / J.R. Masci // *AIDS.* — 2000. — Vol. 14. — No 15. — P. 2403–2404.
220. Masson, P. L. Lactoferrin, an iron–binding protein in neutrophilic leukocytes / P.L. Masson, J.F. Heremans, E. Schonke // *J. Exp. Med.* — 1969. — Vol. 130 — No 3. — P. 643–658.
221. Masson, P.L. An iron binding protein common to many external secretion / P.L. Masson, J.F. Heremans, C. Dive // *Clin Chim Acta.* — 1966. — Vol. 14. — P. 735–739.
222. Masson, P.L. Lactoferrin in milk from different species / P.L. Masson, J.F. Heremans // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1971. — Vol. 39. — No 1. — P. 119–129.
223. Masutomi, K. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells / K. Masutomi, E.Y. Yu, S. Khurts, I. Ben–Porath, J.L. Currier, G.B. Metz, M.W. Brooks, S. Kaneko, S. Murakami, J.A. DeCaprio, R.A. Weinberg, S.A. Stewart, W.C. Hahn // *Cell.* — 2003. — Vol. 114. — No 2. — P. 241–253.
224. Matsuda, Y. Post–initiation chemopreventive effects of dietary bovin lactoferrin on 4–(methylnitrosamino)–1–(3–pyridyl)–1–butanoneinduced lung tumorigenesis in female A/J mice / Y. Matsuda, K. Saoo, K. Hosokawa, K. Yamakawa, M. Yokohira, Y. Zeng, H. Takeuchi, K. Imaida // *Cancer Lett.* — 2007. — Vol. 246. — No 1–2. — P. 41–46.

225. Mayeur, S. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease / S. Mayeur, S. Spahis, Y. Pouliot, E. Levy // *Antioxid. Redox Signal.* — 2016. — Vol. 24. — No 14. — P. 813–836.
226. McIntosh G.H. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine–induced intestinal cancers in rats / G.H. McIntosh, G.O. Register, R.K. Le Leu, P.J. Royle, G.W. Smithers // *J Nutr.* — 1995. — Vol. 125. — No 4. — P. 809–816.
227. Meads, M.B. Environment–mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease / M.B. Meads, R.A. Gatenby, W.S. Dalton // *Nat. Rev. Cancer.* — 2009. — Vol. 9. — No 9. — P. 665–674.
228. Mehra, N.K. Receptor–based targeting of therapeutics / N.K.Mehra, V.Mishra, N.K.Jain // *TherDeliv.* — 2013. — Vol. 4. — No 3. — P. 369–394.
229. Menendez, J.A. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her–2/neu (erbB–2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her–2/neu oncogene amplification / J.A. Menendez, L. Vellon, R. Colomer, R. Lupu // *Ann Oncol.* — 2005. — Vol. 16. — No 3. — P.359–371.
230. Mercer, N. Applications of site–specific labeling to study HAMLET, a tumoricidal complex of alpha–lactalbumin and oleic acid / N. Mercer, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, P.K. Qasba // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6. — No 10. — P. e26093.
231. Mericli, F. Fatty acid composition and anticancer activity in colon carcinoma cell lines of *Prunus dulcis* seed oil / F.Mericli, E.Becer, H.Kabadayi, A.Hanoglu, D.YigitHanoglu, D.Ozkum Yavuz, T.Ozek, S.Vatansever // *Pharm Biol.* — 2017. — Vol. 55. — No 1. — P. 1239–1248.
232. Metz–Boutigue, M. H. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins / M. H. Metz–Boutigue, J.

- Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jollès // *Eur. J. Biochem.* — 1984. — Vol. 145. — No 3.— P. 659–676.
233. Mizushina, Y. Anti-cancer targeting telomerase inhibitors: β -rubicin and oleic acid / Y. Mizushina, T. Takeuchi, F. Sugawara, H. Yoshida // *Mini Rev Med Chem.* — 2012. — Vol. 12. — No11. — P. 1135–1143.
234. Mok, K.H. HAMLET, protein folding, and tumor cell death / K.H. Mok, J. Pettersson, S. Orrenius, C. Svanborg // *BiochemBiophys Res Commun.* — 2007. — Vol. 354. — No 1. — P. 1–7.
235. Montreuil, J. Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk / J. Montreuil, J. Tonnelat, S. Mullet // *BiochimicaetBiophysica Acta.* — 1960. — Vol. 45. — P. 413–421.
236. Moon, H.S. Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6 axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells / H.S. Moon, S. Batirel, C.S. Mantzoros // *Metabolism.* — 2014. — Vol. 63. — No 11. — P. 1447–1454.
237. Moore, P.S. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology / P.S. Moore, Y. Chang // *Nat Rev Cancer.* — 2010. — Vol. 10. — No 12. — P. 878–89.
238. Moore, S. A. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution / S. A. Moore, B. F. Anderson, C. R. Groom, M. Haridas, E. N. Baker // *Journal of Molecular Biology.* — 1997. — Vol. 274. — No 2. — 222–236.
239. Morishita, S. Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice / S. Morishita, T. Ono, C. Fujisaki, Y. Ishihara, M. Murakoshi, H. Kato, M. Hosokawa, K. Miyashita, K. Sugiyama, H. Nishino // *J Oleo Sci.* — 2013. — Vol. 62. — No 2. — P. 97–103.
240. Mossberg, A.K. HAMLET treatment delays bladder cancer development / A.K. Mossberg, Y. Hou, M. Svensson, B. Holmqvist, C. Svanborg // *J Urol.* — 2010. — Vol. 183. — No 4. — P. 1590–1597.

241. Mossberg, A.K. Structure and function of human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes / A.K. Mossberg, K. Hun Mok, L.A. Morozova-Roche, C. Svanborg // *FEBS J.* — 2010. — Vol. 277. — No 22. — P. 4614–4625.
242. Mythri, R.B. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease / R.B. Mythri, M.M. Bharath // *Curr Pharm Des.* — 2012. — Vol. 18. — No 1. — P. 91–99.
243. Nachmias, B. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer / B. Nachmias, Y. Ashhab, D. Ben-Yehuda // *Semin. Cancer Biol.* — 2004. — Vol. 14. — No 4. — P. 231–243.
244. Naidu, S.A.G. COVID-19 during pregnancy and postpartum / S.A.G. Naidu, R.A. Clemens, P. Pressman, M. Zaigham, K.J.A. Davies, A.S. Naidu // *J Diet Suppl.* — 2022. — No 19 (1). — P. 78–114.
245. Newlands, E.S. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856) / E.S. Newlands, G.R. Blackledge, J.A. Slack, G.J. Rustin, D.B. Smith, N.S. Stuart, C.P. Quarterman, R. Hoffman, M.F. Stevens, M.H. Brampton et al // *Br J Cancer.* — 1992. — Vol. 65. — No 2. — P. 287–291.
246. Norrby, K. Orally administered bovine lactoferrin systemically inhibits VEGF(165)-mediated angiogenesis in the rat / K. Norrby, I. Mattsby-Baltzer, M. Innocenti, S. Tuneberg // *Int J Cancer.* — 2001. — Vol. 91. — No 2. — P. 236–240.
247. Noyer, M. Purification and characterization of undegraded human ceruloplasmin / M. Noyer, F.E. Dwulet, Y.L. Hao, F.W. Putnam // *Anal. Biochem.* — 1980. — V. 102. — No 2. — P. 450–458.
248. Ochoa, T.J. Effect of lactoferrin on enteric pathogens / T.J. Ochoa, T.G. Cleary // *Biochimie.* — 2009. — Vol. 91. — No 1. — P. 30–34.
249. Ocker, M. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer / M. Ocker, D. Neureiter, M. Lueders, S. Zopf, M.

- Ganslmayer, E.G. Hahn, C. Herold, D. Schuppan // *Gut*. — 2005. — Vol. 54. — No 9. — P. 1298–1308.
250. Oh, S.M. Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF- κ B activation cascade / S.M. Oh, C.W. Pyo, Y. Kim, S.Y. Choi // *Oncogene*. — 2004. — Vol. 23. — No 50. — P. 8282–8291.
251. Oliveira, P.A. Chemical carcinogenesis / P.A. Oliveira, A. Colaço, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. LF. De-La-Cruz, C. Lopes // *An Acad Bras Cienc*. — 2007. — Vol. 79. — No 4. — P. 593–616.
252. Omata, Y. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin / Y. Omata, M. Satake, R. Maeda, A. Saito, K. Shimazaki, K. Yamauchi, Y. Uzuka, S. Tanabe, T. Sarashina, T. Mikami // *The Journal of Veterinary Medical Science*. — 2001. — Vol. 63. — No 2. — P. 187–190.
253. Ondrey, F.G. Constitutive expression of proinflammatory cytokines and survival in head and neck squamous cell carcinoma cell lines / F.G. Ondrey, J.B. Sunwoo, G. Dong, Z. Chen, C.C. Bancroft, C. Van Waes // *Mol Carcinog*. — 1999. — Vol. 26. — P. 119–129.
254. Orsi, N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives / N. Orsi // *Biometals*. — 2004. — Vol. 17. — No 3. — P. 189–196.
255. Ostan, N.K. Lactoferrin binding protein B—a bi-functional bacterial receptor protein / N. K. Ostan, R.H. Yu, D. Ng, C.C.L. Lai, A. K. Pogoutse, V. Sarpe, M. Hepburn, J. Sheff, S. Raval, D.C. Schriemer, T.F Moraes, A.B. Schryvers // *PLoS Pathogens*. — 2017. — Vol. 13. — No 3. — P. e1006244.
256. O'Sullivan, R.J. Rapid induction of alternative lengthening of telomeres by depletion of the histone chaperone ASF1 / R.J. O'Sullivan, N. Arnoult, D.H. Lackner, L. Oganessian, C. Haggblom, A. Corpet, G. Almouzni, J. Karlseder // *Nat Struct Mol Biol*. — 2014. — Vol. 21. — No 2. — P. 167–174.

257. Oyanagi, E. L-Carnitine suppresses oleic acid-induced membrane permeability transition of mitochondria / E. Oyanagi, H. Yano, Y. Kato, H. Fujita, K. Utsumi, J. Sasaki // *Cell BiochemFunct.* — 2008. — Vol. 26. — No 7. — P. 778–786.
258. Parks, J.S. Interactions of the carboxyl group of oleic acid with bovine serum albumin: a ¹³C NMR study / J.S. Parks, D.P. Cistola, D.M. Small, J.A. Hamilton // *J Biol Chem.* — 1983. — Vol. 258. — No 15. — P.9262–9269.
259. Paulsrud, J.R. Essential fatty acid deficiency in infants induced by fat-free intravenous feeding / J.R. Paulsrud, L. Pensler, C.F. Whitten, S. Stewart, R.T. Holman // *Am J Clin Nutr.* — 1972. — Vol. 25. — No 9. — P. 897–904.
260. Penzo, D. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death / D. Penzo, C. Tagliapietra, R. Colonna, V. Petronilli, P. Bernardi // *BiochimBiophys Acta.* — 2002. — Vol. 1555. — No 1–3. — P. 160–165.
261. Pereira, C.S. Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H⁺-ATPase / C.S. Pereira, J.P. Guedes, M. Gonçalves, L. Loureiro, L. Castro, H. Gerós, L.R. Rodrigues, M. Côrte-Real // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7. — No 38. — P. 62144–62158.
262. Permyakov, S.E. Oleic acid is a key cytotoxic component of HAMLET-like complexes / S.E.Permyakov, E.L.Knyazeva, L.M.Khasanova, R.S.Fadeev, A.P.Zhadan, H.Roche-Hakansson, A.P.Hakansson, V.S.Akatov, E.A.Permyakov // *Biol Chem.* — 2012. — Vol. 393. — No 1–2. — P. 85–92.
263. Pettersson, J. α -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death / J. Pettersson, A.K. Mossberg, C. Svanborg // *BiochemBiophys Res Commun.* — 2006. — Vol. 345. — No 1. — P. 260–270.

264. Phillips, D.H. Fifty years of benzo(a)pyrene / D.H. Phillips // *Nature*. — 1983. — Vol. 303. — No 5917. — P. 468–472.
265. Philonenko, P. A. Comparison of homogeneity tests for different alternative hypotheses / P. Philonenko, S. Postovalov // *Statistical Models and Methods for Reliability and Survival Analysis: monograph*. — London: Wiley–ISTE. — 2013. — Chap. 12. — P. 177–194.
266. Phopin, K. Insight into the Molecular Interaction of Cloxyquin (5–chloro–8–hydroxyquinoline) with Bovine Serum Albumin: Biophysical Analysis and Computational Simulation / K.Phopin, W.Ruankham, S.Prachayasittikul, V.Prachayasittikul, T.Tantimongcolwat // *Int J Mol Sci*. — 2019. — V. 21. — No 1. — P. 249.
267. Piegari, M. Delay of lung adenocarcinoma (LAC–1) development in mice by dietary oleic acid / M. Piegari, E.A. Soria, A.R. Eynard, M.A. Valentich // *Nutr Cancer*. — 2017. — Vol. 69. — No 7. — P. 1069–1074.
268. Polidori, P. Oleic acid in milk of different mammalian species / P. Polidori, S. Vincenzetti // In book: *Oleic Acid: Dietary Sources, Functions and Health Benefits*. — 2013. — Vol. 7. — P. 127–140.
269. Popat, A. Curcumin–cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity / A. Popat, S. Karmakar, S. Jambhrunkar, C. Xu, C. Yu // *Colloids Surf B Biointerfaces*. — 2014. — Vol. 117. — P. 520–527.
270. Pott, P. The chirurgical works / P. Pott // *Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet* / Eds. Hawes, W. Clarke and R. Collins. Printed by T.J. Carnegy for L. Hawes, W. Clarke and R. Collin, London, 1775. — Vol. III. — P. 60–68.
271. Puertollano, M.A. Polyunsaturated fatty acids induce cell death in YAC–1 lymphoma by a caspase–3–independent mechanism / M.A. Puertollano, M.A. de Pablo, G. Alvarez de Cienfuegos // *Anticancer Res*. — 2003. — Vol. 23. — No 5A. — P. 3905–3910.

272. Qian, S. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores / S.Qian, W.Wang, L.Yang, H.W.Huang // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2008. — Vol. 105. — No 45. — P. 17379–17383.
273. Qin, S. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy / S. Qin, A. Li, M. Yi, S. Yu, M. Zhang, K. Wu // *J Hematol Oncol.* — 2019. — Vol. 12. — No 1. — 27.
274. Rammer, P. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells / P. Rammer, L. Groth-Pedersen, T. Kirkegaard, M. Daugaard, A. Rytter, P. Szyniarowski, M. Høyer-Hansen, L.K. Povlsen, J. Nylandsted, J.E. Larsen, M. Jäättelä // *Mol Cancer Ther.* — 2010. — Vol. 9. — No 1. — P. 24–32.
275. Rapacz, P. Tear lysozyme and lactoferrin levels in giant papillary conjunctivitis and vernal conjunctivitis / P. Rapacz, J. Tedesco, P.C. Donshik, M. Ballou // *CLAO J.* — 1988. — Vol. 14. — No 4. — P. 207–209.
276. Rath, E.M. Structure and Potential Cellular Targets of HAMLET-like Anti-Cancer Compounds made from Milk Components / E.M. Rath, A.P. Duff, A.P.Håkansson, C.S.Vacher, G.J. Liu, R.B. Knott, W.B. Church // *J Pharm Pharm Sci.* — 2015. — Vol. 18. — No 4. — P. 773–824.
277. Rey, M.W. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin / M.W. Rey, S.L. Woloshuk, H.A. deBoer, F.R. Pieper // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 18. — No 17. — P. 5288.
278. Ribatti, D. The history of the angiogenic switch concept / D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, A.M. Roccaro, A. Vacca // *Leukemia.* — 2007. — Vol. 21. — No 1. — P. 44–52.
279. Rizal Eh Suk, V. Mixed oleic acid-erucic acid liposomes as a carrier for anticancer drugs / V. Rizal Eh Suk, I. Chung, M. Misran // *Curr Drug Deliv.* — 2020. — Vol. 17. — No 4. — P. 292–302.

280. Rosa, L. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis / L. Rosa, A. Cutone, M.S. Lepanto, R. Paesano, P. Valenti // *Int J Mol Sci.* — 2017. — Vol. 18. — No 9. — P. 1985–2011.
281. Ruby, A.J. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids / A.J.Ruby, G.Kuttan, K.D.Babu, K.N.Rajasekharan, R.Kuttan // *Cancer Lett.* — 1995. — Vol. 94. — No 1. — P. 79–83.
282. Sabatucci, A. Structural characterization of the ceruloplasmin:lactoferrin complex in solution / A.Sabatucci, C.B.Angelucci, M.Maccarrone, I.Cozzani, E.Dainese, M.Beltramini, B.Salvato, P.Vachette, V.B.Vasilyev, A.Sokolov, M.Pulina // *Journal of Molecular Biology.* — 2007. — Vol. 371. — No 4. — P. 1038–1046.
283. Sabra, S. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications / S. Sabra, M.M. Agwa// *Int J Biol Macromol.* — 2020. — Vol. 164. — P. 1046–1060.
284. Sakamoto, K. Interaction of human lactoferrin with cell adhesion molecules through RGD motif elucidated by lactoferrin-binding epitopes / K.Sakamoto, Y.Ito, T.Mori, K.Sugimura // *J Biol Chem.* — 2006. — Vol. 281. — P. 24472–24478.
285. Samygina, V.R. Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins / V.R.Samygina, A.V.Sokolov, G.Bourenkov, M.V.Petoukhov, M.O.Pulina, E.T.Zakharova, V.B.Vasilyev, H.Bartunik, D.I. Svergun // *PLoS ONE.* — 2013. — Vol. 8. — No 7. — P. e67145.
286. Sales-Campos, H. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease / H. Sales-Campos, P. R. Souza, B.C. Peghini, J. S. Silva, C. R.Cardoso // *Mini Rev Med Chem.* — 2013. — Vol. 13. — No 2. — P. 201–210.
287. Schaible, U.E. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased

- susceptibility to tuberculosis / U.E. Schaible, H.L. Collins, F. Priem, S.H. Kaufmann // *J Exp Med.* — 2002. — Vol. 196. — No 11. — P. 1507–1513.
288. Schryvers, A.B. Bacterial lactoferrin receptors / A.B. Schryvers, R. Bonnah, R.H. Yu, H. Wong, M. Retzer // *Adv Exp Med Biol.* — 1998. — Vol. 443. — P. 123–133.
289. Schwartz, B. Nutritional–pharmacological combinations—a novel approach to reducing colon cancer incidence / B.Schwartz, Y.Birk, A.Raz, Z.Madar // *Eur J Nutr.* — 2004. — Vol. 43. — No 4. — P. 221–229.
290. Scott, A.M. Antibody therapy of cancer / A.M.Scott, J.D.Wolchok, L.J. Old // *Nat Rev Cancer.* — 2012. — Vol. 12. — No 4. — P. 278–287.
291. Sengupta, S. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy / S.Sengupta, J.Marrinan, C.Frushman, P.Sampath // *Clin Dev Immunol.* — 2012. — Vol. 2012. — P. 831090.
292. Shaikh, I.A. Enhancing cytotoxic therapies for breast and prostate cancers with polyunsaturated fatty acids / I.A.Shaikh, I.Brown, K.W.Wahle, S.D.Heys // *Nutr Cancer.* — 2010. — Vol. 62. — No 3. — P. 284–296.
293. Sharma, O.P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds / O.P.Sharma // *BiochemPharmacol.* — 1976. — Vol. 25. — No 15. — P. 1811–1812.
294. Shay, J.W. Role of telomeres and telomerase in cancer / J.W. Shay, W.E. Wright // *Semin Cancer Biol.* — 2011. — Vol. 21. — No 6. — P. 349–353.
295. Shay, J.W. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase / J.W. Shay, W.E. Wright // *Carcinogenesis.* — 2005. — Vol. 26. — No 5. — P. 867–874.
296. Shimamura, M. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis / M. Shimamura, Y. Yamamoto, H. Ashino, T. Oikawa, T. Hazato, H. Tsuda, M. Iigo // *Int. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 111. — No 1. — P. 111–116.
297. Sinevici, N. The novel therapeutic potential of bovine α -lactalbumin made lethal to tumour cells (BALMET) and oleic acid in oral squamous cell carcinoma (OSCC) / N. Sinevici, N. Harte, I. O'Grady, Y. Xie, S. Min, K.H.

- Mok, J. O'Sullivan// *Eur J Cancer Prev.* — 2021. — Vol. 30. — No 2. — P. 178–187.
298. Sokolov, A.V. Effect of lactoferrin on oxidative features of ceruloplasmin / A.V. Sokolov, K.V.Ageeva, M.O. Pulina et al. // *BioMetals.* — 2009. — V. 22. — P. 521–529.
299. Sokolov, A.V. Capacity of ceruloplasmin to scavenge products of the respiratory burst of neutrophils is not altered by the products of reactions catalyzed by myeloperoxidase / A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, E.Y. Varfolomeeva, D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, S.O. Kozlov, I.V. Kudryavtsev, E.V. Mikhailchik, M.V. Filatov, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasenko, J. Arnhold, V.B. Vasilyev // *Biochem. Cell Biol.* — 2018. — Vol. 96. — No 4. — P. 457–467.
300. Solanas, M. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA–induced mammary tumors compared with a high corn oil diet / M. Solanas, A. Hurtado, I. Costa, R. Moral, J.A. Menendez, R. Colomer, E. Escrich // *Int J Oncol.* — 2002. — Vol. 21. — No 4. — P. 745–753.
301. Sorensen, M. The proteins in whey / M. Sorensen, J.P.L. Sorensen // *C R Trav Lab Carlsberg.* — 1939. — Vol. 23. — No 1. — P. 55–99.
302. Spolaore, B. α -Lactalbumin forms with oleic acid a high molecular weight complex displaying cytotoxic activity / B.Spolaore, O.Pinato, M.Canton, M.Zambonin, P.Polverino de Laureto, A.Fontana // *Biochemistry.* — 2010. — Vol. 49. — No 39. — P. 8658–8667.
303. Srimal, R.C. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent / R.C. Srimal, B.N. Dhawan // *J Pharm Pharmacol.* — 1973. — Vol. 25. — No 6. — P. 447–452.
304. Strouhal, E. Neolithic case of a multiple myeloma from Mauer (Vienna, Austria) / E. Strouhal, H. Kritscher // *Anthropologie.* — 1990. — Vol. 28. — P. 79–87.

305. Stupp, R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma / R.Stupp, W.P.Mason, M.J.van den Bent, M.Weller, B.Fisher, M.J.Taphoorn, K.Belanger, A.A.Brandes, C.Marosi, U.Bogdahn, J.Curschmann, R.C.Janzer, S.K.Ludwin, T.Gorlia, A.Allgeier, D.Lacombe, J.G.Cairncross, E.Eisenhauer, R.O.Mirimanoff // *N Engl J Med.* — 2005. — Vol. 352. — No 10. — P. 987–996.
306. Su, Z. Lactoferrin–modified poly(ethylene glycol)–grafted BSA nanoparticles as a dual–targeting carrier for treating brain gliomas / Z.Su, L.Xing, Y.Chen, Y.Xu, F.Yang, C.Zhang, Q.Ping, Y.Xiao // *Mol Pharm.* — 2014. — Vol. 11. — No 6. — P. 1823–1834.
307. Sugiyama, Y. Involvement of the–diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahy–drocurcumin / Y. Sugiyama, S. Kawakishi, T. Osawa // *Biochem. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 52. — No 4. — P. 519–525.
308. Svanborg, C. HAMLET kills tumor cells by an apoptosis–like mechanism–cellular, molecular, and therapeutic aspects / C. Svanborg, H. Agerstam, A. Aronson, R. Bjerkvig, C. Durringer, W. Fischer, L. Gustafsson, O. Hallgren, I. Leijonhuvud, S. Linse, A.K. Mossberg, H. Nilsson, J. Pettersson, M. Svensson // *Adv Cancer Res.* — 2003. — Vol. 88. — P. 1–29.
309. Svensson, M. Conversion of alpha–lactalbumin to a protein inducing apoptosis / M.Svensson, A.Hakansson, A.K.Mossberg, S.Linse, C.Svanborg // *Proc Natl Acad Sci.* — 2000. — Vol. 97. — No 8. — P. 4221–4226.
310. Svensson, M. Hamlet–a complex from human milk that induces apoptosis in tumor cells but spares healthy cells / M. Svensson, C. Durringer, O. Hallgren, A.K. Mossberg, A. Hakansson, S. Linse, C. Svanborg // *Adv Exp Med Biol.* — 2002. — Vol. 503. — P.125–132.
311. Svensson, M. Lipids as cofactors in protein folding: stereo–specific lipid–protein interactions are required to form HAMLET (human alpha–lactalbumin made lethal to tumor cells) / M. Svensson, A.K. Mossberg, J.

- Pettersson, S. Linse, C. Svanborg // *Protein Sci.* — 2003. — Vol. 12. — No 12. — P. 2805–2814.
312. Svensson, M. Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells / M. Svensson, H. Sabharwal, A. Hakansson, A.K. Mossberg, P. Lipniunas, H. Leffler, C. Svanborg, S. Linse // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — No 10. — P. 6388–6396.
313. Tabak, L. Changes in lactoferrin and other proteins in a case of chronic parotitis / L. Tabak, I.D. Mandel, M. Herrera, H. Baumash // *J Oral Pathol.* — 1978. — Vol. 7. — No 2. — P. 91–99.
314. Tachezy, J. *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin / J. Tachezy, J. Kulda, I. Bahnikova, P. Suchan, J. Razga, J. Schrevel // *Experimental Parasitology.* — 1996. — Vol. 83. — No 2. — P. 216–228.
315. Takakura, N. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice / N. Takakura, H. Wakabayashi, H. Ishibashi, S. Teraguchi, T. Tamura, H. Yamaguchi, S. Abe // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2003. — Vol. 47. — No 8. — P. 2619–2623.
316. Teixeira, F.J. Whey protein in cancer therapy: A narrative review / F.J. Teixeira, H.O. Santos, S.L. Howell, G.D. Pimentel // *Pharmacol Res.* — 2019. — Vol. 144. — P. 245–256.
317. Togawa, J. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance / J. Togawa, H. Nagase, K. Tanaka, M. Inamori, T. Umezawa, A. Nakajima, M. Naito, S. Sato, T. Saito, H. Sekihara // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* — 2002. — Vol. 283. — No 1. — P. 187–195.
318. Tolin, S. The oleic acid complexes of proteolytic fragments of alpha-lactalbumin display apoptotic activity / S. Tolin, G. De Franceschi, B. Spolaore, E. Frare, M. Canton, P. Polverino de Laureto, A. Fontana // *FEBS J.* — 2010. — Vol. 277. — No 1. — P. 163–173.

319. Tsuda, H. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms — a review of experimental and clinical studies / H. Tsuda, K. Sekine, K. Fujita, M. Iigo // *Biochem Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80. — No 1. — P. 131–136.
320. Tsuda, H. Cancer prevention by bovine lactoferrin: From animal studies to human trial / H. Tsuda, T. Kozu, G. Inuma, Y. Ohashi, Y. Saito, D. Saito, T. Akasu, D.B. Alexander, M. Futakuchi, K. Fukamachi, J. Xu, T. Kakizoe, M. Iigo // *Biometals.* — 2010. — Vol. 23. — No 3. — P. 399–409.
321. Tsuda, H. Cancer prevention by natural compounds / H. Tsuda, Y. Ohshima, H. Nomoto, K. Fujita, E. Matsuda, M. Iigo, N. Takasuka, M.A. Moore // *Drug Metab Pharmacokinet.* — 2004. — Vol. 19. — No 4. — P. 245–263.
322. Tsuda, H. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats / H. Tsuda, K. Sekine, J. Nakamura, Y. Ushida, T. Kuhara, N. Takasuka, D.J. Kim, M. Asamoto, H. Baba–Toriyama, M.A. Moore, H. Nishino, T. Kakizoe // *Adv Exp Med Biol.* — 1998. — Vol. 443. — P. 273–284.
323. Turchany, J.M. Giardicidal activity of lactoferrin and N–terminal peptides / J.M. Turchany, S.B. Aley, F.D. Gillin // *Infect Immun.* — 1995. — Vol. 63. — No 11. — P. 4550–4552.
324. Ubaid, S. Elucidating the neuroprotective role of formulated camel α -lactalbumin–oleic acid complex by curating the SIRT1 pathway in Parkinson's disease model / S. Ubaid, M. Rumman, B. Singh, M.S. Akhtar, A.A. Mahdi, S. Pandey // *ACS Chem Neurosci.* — 2020. — Vol. 11. — No 24. — P. 4416–4425.
325. Uversky, V.N. Divergent anticancer activity of free and formulated camel milk α -lactalbumin / V.N. Uversky, E.M. El–Fakharany, M.M. Abu–Serie, H.A. Almehdar, E.M. Redwan // *Cancer Invest.* — 2017. — Vol. 35. — No 9. — P. 610–623.

326. Van der Strate, B.W.A. Antiviral activities of lactoferrin / B.W.A. van der Strate, L. Belijaars, G. Molema, M.C. Harmsen, D.K. Meijer // *Antiviral Res.* — 2001. — Vol. 52. — No 3. — P. 225–239.
327. Velasco Cabrera, M. Lactoferrin in tears incontact lens wearers / M. Velasco Cabrera, J. Sanchez, F. Rodriguez // *CLAO J.* — 1997. — Vol. 23. — No 2. — P. 127–129.
328. Vogelstein, B. Cancer genes and the pathways they control / B. Vogelstein, K.W. Kinzler // *Nat Med.* — 2004. — Vol. 10. — No 8. — P. 789–799.
329. Vukojević, V. Lipoprotein complex of equine lysozyme with oleic acid (ELOA) interactions with the plasma membrane of live cells / V.Vukojević, A.M.Bowen, K.Wilhelm, Y.Ming, Z.Ce, J.Schleucher, P.J.Hore, L.Terenius, L.A.Morozova–Roche // *Langmuir.* — 2010. — Vol. 26. — No 18. — P. 14782–14787.
330. Wakabayashi, H. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models / H. Wakabayashi, K. Uchida, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa, H. Yamaguchi // *J Antimicrob Chemother.* — 2000. — Vol. 46. — No 4. — P. 595–601.
331. Wang, B. Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion / B. Wang, Y.P. Timilsena, E. Blanch, B. Adhikari // *Crit Rev Food Sci Nutr.* — 2019. — Vol. 59. — No 4. — P. 580–596.
332. Ward, P.P. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview / P.P. Ward, E. Paz, O.M. Conneely // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2005. — Vol. 62. — No 22. — P. 2540–2548.
333. Wehbi, Z. Effect of heat treatment on denaturation of bovine alpha-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters / Z.We hbi, M.D.Pérez, L.Sánchez, C.Pocoví, C.Barbana, M.Calvo // *J Agric Food Chem.* — 2005. — Vol. 53. — No 25. — P. 9730–9736.
334. Weinberg, E.D. Acquisition of iron and other nutrients invivo / E.D. Weinberg // *Virulence mechanisms of bacterial pathogens / Edited by J.A.*

- Roth et al. — 2nd ed. — Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1995. — P. 79–93.
335. Weinberg, E.D. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broadspectrum potential / E.D. Weinberg // *J Pharm Pharmacol.* — 2001. — Vol. 53. — No 10. — P. 1303–1310.
336. Whiteside, T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth / T.L. Whiteside // *Oncogene.* — 2008. — Vol. 27. — No 45. — P. 5904–5912.
337. Wilhelm, K. Protein oligomerization induced by oleic acid at the solid–liquid interface–equine lysozyme cytotoxic complexes / K.Wilhelm, A.Darinkas, W.Noppe, E.Duchardt, K.H.Mok, V.Vukojević, J.Schleucher, L.A.Morozova–Roche // *FEBS J.* — 2009. — Vol. 276. — No 15. — P. 3975–3989.
338. Wolf, J.S. IL (interleukin)–1 α promotes nuclear factor– κ B and AP–1–induced IL–8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas / J.S. Wolf, Z. Chen, G. Dong, J.B.Sunwoo, C.C.Bancroft, D.E.Capo, N.T.Yeh, N.Mukaida, C.Van Waes // *Clinical Cancer Research.* — 2001. — Vol. 7. — No 6. — P. 1812–1820.
339. Wolf, J.S. Oral lactoferrin results in T–cell dependent tumor iInhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo / J.S. Wolf, G. Li, A. Varadhachary, K. Petrak, M. Schneyer, D. Li, J. Ongkasuwan, X. Zhang, R.J. Taylor, S.E. Strome, B.W.Jr. O'Malley // *Clin Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13. — No 5. — P. 1601–1610.
340. Wong, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment / R.S. Wong // *J Exp Clin Cancer Res.* — 2011. — Vol. 30. — No 1. — P. 87.
341. Xiao, Z. A molecular complex of bovine milk protein and oleic acid selectively kills cancer cells in vitro and inhibits tumour growth in an orthotopic rat bladder tumour model / Z.Xiao, A.Mak, K.Koch, R.B.Moore // *BJU Int.* — 2013. — Vol. 112. — No 2. — P. 201–210.

342. Xue, H. Lactoferrin Inhibits IL-1 β -Induced Chondrocyte Apoptosis Through AKT1-Induced CREB1 Activation / H. Xue, Y. Tu, T. Ma, X. Liu, T. Wen, M. Cai, Z. Xia, J. Mei // *Cell Physiol Biochem.* — 2015. — Vol. 36. — No 6. — P. 2456–2465.
343. Yamada, Y. The antiproliferative effect of bovine lactoferrin on canine mammary gland tumor cells / Y. Yamada, R. Sato, S. Kobayashi, C. Hankanga, O. Inanami, M. Kuwabara, Y. Momota, N. Tomizawa, J. Yasuda // *J Vet Med Sci.* — 2008. — Vol. 70. — No 5. — P. 443–448.
344. Yamaguchi, H. Potential usefulness of bovine lactoferrin for adjunctive immunotherapy for mucosal Candida infections / H. Yamaguchi, S. Abe, N. Takakura // *Biometals.* — 2004. — Vol. 17. — No 3. — P. 245–248.
345. Yao, Q. The combination of lactoferrin and linolenic acid inhibits colorectal tumor growth through activating AMPK/JNK-related apoptosis pathway / Q. Yao, H. Li, L. Fan, S. Huang, J. Wang, N. Zheng // *PeerJ.* — 2021. — Vol. 9. — P. e11072.
346. Yang, F. Jr. Structural changes of alpha-lactalbumin induced by low pH and oleic acid / F. Jr. Yang, M. Zhang, J. Chen, Y. Liang // *Biochim Biophys Acta.* — 2006. — Vol. 1764. — No 8. — P. 1389–1396.
347. Yap, T. A. HGF/c-MET targeted therapeutics: Novel strategies for cancer medicine / T. A. Yap, S. K. Sandhu, S. M. Alam, J. S. de Bono // *Curr. Drug Targets.* — 2011. — Vol. 12. — No 4. — P. 2045–2058.
348. Yu, R. H. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors / R. H. Yu, A. B. Schryvers // *Biochem Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80. — No 1. — P. 81–90.
349. Zakharova, E. T. Interaction of lactoferrin with ceruloplasmin / E. T. Zakharova, M. M. Shavlovski, M. G. Bass, A. A. Gridasova, M. O. Pulina, V. DeFilippis, M. Beltramini, P. DiMuro, B. Salvato, A. Fontana, V. B. Vasilyev, V. S. Gaitskhoki // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2000. — Vol. 374. — No 2. — P. 222–228.

350. Zakharova, E.T. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha / E.T. Zakharova, V.A. Kostevich, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev // *Biometals*. — 2012. — Vol. 25. — P. 1247–1259.
351. Zarembek, K.A. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion / K.A. Zarembek, J.A. Sugui, Y.C. Chang, K.J. Kwon-Chung, J.I. Gallin // *The Journal of Immunology*. — 2007. — Vol. 17. — No 10. — P. 6367–6373.
352. Zhang, H. HGF/c-MET: A promising therapeutic target in the digestive system cancers / H. Zhang, Q. Feng, W.D. Chen, Y.D. Wang // *Int J Mol Sci*. — 2018. — Vol. 19. — No 11. — P. 3295.
353. Zhang, J. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance / J.Zhang, M.F.Stevens, T.D.Bradshaw // *Curr Mol Pharmacol*. — 2012. — Vol. 5. — No 1. — P. 102–114.
354. Zhang, Y. Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy / Y. Zhang, C.F. Lima, L.R. Rodrigues // *Nutr. Rev*. — 2014. — Vol. 72. — No 12. — P. 763–773.
355. Zhang, M. Study on the Anti-tumor Activity and Structural Changes of Bovine Lactoferrin-Oleic Acid and Linoleic Acid Complex / M.Zhang, B.Fang, L. Chen // *Chemical Engineering Transactions*. — 2015. — Vol. 46. — P. 1399–1404.
356. Zhang, Z. Holo-lactoferrin: the link between ferroptosis and radiotherapy in triple-negative breast cancer / Z.Zhang, M.Lu, C.Chen, X.Tong, Y.Li, K.Yang, H.Lv, J.Xu, L.Qin // *Theranostics*. — 2021. — Vol. 11. — No 7. — P. 3167–3182.
357. Zhou, D.J. Effects of oleic acid on SP-B expression and release in A549 cells / D.J.Zhou, Y.Chen, X.J.Zhang, C.Ma, J.Qiu, J.H.Zhou // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. — 2015. — Vol. 19. — No 18. — P. 3438–3443.

358. Zhu, Y. Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad / Y. Zhu, S. Schwarz, B. Ahlemeyer, S. Grzeschik, S. Klumpp, J. Krieglstein // *Neurochem Int.* — 2005. — Vol. 46. — No 2. — P. 127–135.
359. Zimecki, M. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells / M.Zimecki, J.Mazurier, G. Spik, J.A.Kapp // *Immunology.* — 1995. — Vol. 86. — No 1. — P. 122–127.
360. Zimecki, M. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4–CD8– murine thymocytes / M. Zimecki, J. Mazurier, M. Machnicki, Z. Wieczorek, J. Montreuil, G. Spik // *Immunol Lett.* — 1991. — Vol. 30. — No 1. — P. 119–123.
361. Zlatina, K. The N–glycans of lactoferrin: more than just a sweet decoration / K. Zlatina, S.P. Galuska // *Biochem Cell Biol.* — 2021. — Vol. 99. — No 1. — P. 117–127.
362. Zucali, J.R. Lactoferrin decreases monocyte–induced fibroblast production of myeloid colony–stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin–1 / J.R. Zucali, H.E. Broxmeyer, D. Levy, C. Morse // *Blood.* — 1989. — Vol. 74. —No 5. — P. 1531–1536.