



Радиопротекторные и антивирусные (SARS-CoV) свойства лактоферрина (миниобзор).

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

*Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания животных – филиал
ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».*



Действие ионизирующего излучения приводит к росту образования **свободных радикалов**, вызывающих повреждение ДНК, белков, мембранных липидов, выполняющих важные клеточные функции.

Окислительный стресс, вызванный интенсивным образованием активных форм кислорода (АФК), инициирует перекисное окисление липидов. Снижение активности компонентов антиоксидантной системы ослабляет резистентность организма.

Защитный эффект антиоксидантов в условиях радиационного воздействия связан с их способностью подавлять процессы свободно-радикального окисления и повышать активность собственных антиоксидантных систем. Препараты, обладающие общей антиоксидантной активностью, рассматриваются как перспективные радиозащитные средства.

Лактоферрин (ЛФ), многофункциональный белок грудного молока, обладает выраженной антиоксидантной активностью. Польза ЛФ показана при онкологии, поражениях кожи, остеопорозе, железодефицитных состояниях, некротическом энтероколите новорожденных, муковисцидозе, при дисбактериозе кишечника, он необходим для развития плода и новорожденного.

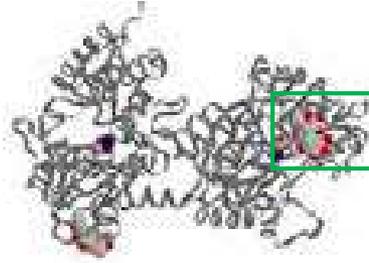
Пространственная организация ЛФ

Лактоферрин, гликопротеин с молекулярной массой ~80 кДа, относится к классу железосодержащих белков трансферринов.

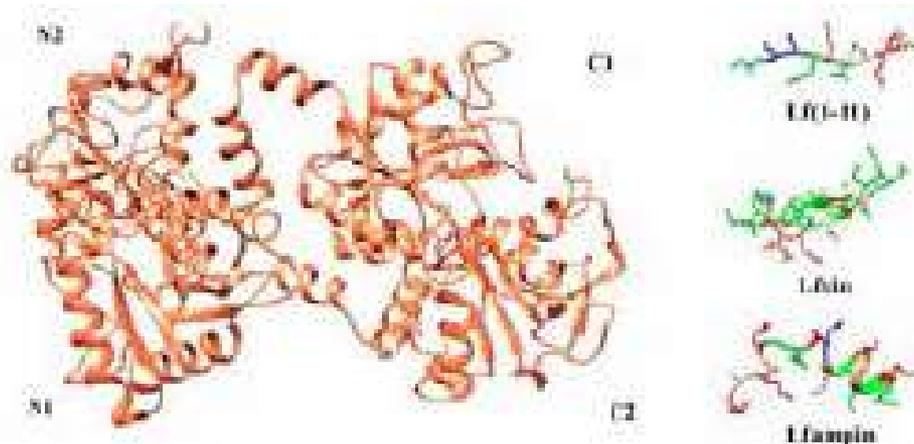
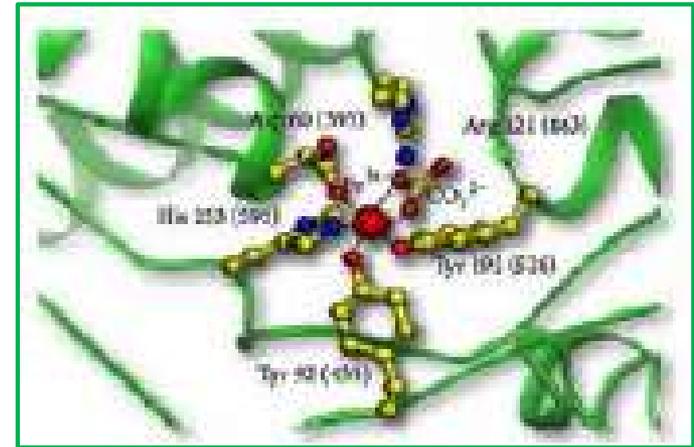
Молекула ЛФ содержит два активных центра, фиксирующих железо (Fe^{3+}), которые располагаются на двух функциональных доменах белка.



апо-форма
(не связанная
с ионами железа)



холо-форма
(связанная
с ионами железа)



3-D структура Холо-bLF, LF(1-11), Lfbin, и Lfampin. N1, N2, C1 и C2 - домены каждой доли. Атом железа показан в виде красной сферы, выделены взаимодействующие с ним аминокислотные остатки Lf. LF(1-11) показан с конформацией, которую он имеет в интактном LF. Цвета пептидов указывают на аминокислотные свойства: зеленый - гидрофобный; синий - отрицательно заряженный; красный - положительно заряженный; серый - полярный.



Опыт: 27 морских свинок массой около 350 г. Животных облучали γ -квантами ^{137}Cs в дозе 2,5 Гр (мощность дозы 20,45 мГр/сек). В результате облучения у животных развивалась костно-мозговая форма острой лучевой болезни (ОЛБ).

Подкожное ежедневное введение.

Опытным животным: ЛФ из молозива кроликов (крЛФ) в дозе 65 или 300 мг/кг морским свинкам с 1 по 14 сут (первое введение через 24 ч после облучения). ЛФ был насыщен на 15–20 % ионами железа (Fe^{3+}) и растворен в ФР)

Контрольным животным: ФР

Оценивали: выживаемость в течение 30 сут после облучения, количество лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови. Обследование проводили за 3–4 дня до и на 7, 12, 16, 18, 21 и 32-е сут после облучения.

Выживаемость: **К - 53,8 %**, ЛФ(65 мкг/кг) - 85,7 %, **ЛФ(300 мкг/кг) - 100 %**.

Лимфоциты на 12-е сут после облучения (в разгар цитопении): ЛФ - $(2,5 \pm 0,2) \times 10^9/\text{л}$., К - $(1,4 \pm 0,1) \times 10^9/\text{л}$.

Нейтрофилы на 16-е сут после облучения: ЛФ(65 мкг/кг) - $(2,0 \pm 0,3) \times 10^9/\text{л}$, **ЛФ(300 мкг/кг) - $(3,5 \pm 0,9) \times 10^9/\text{л}$** , **К - $(0,8 \pm 0,2) \times 10^9/\text{л}$** .

На 18-е сут после облучения: ЛФ(65 мкг/кг) - $(5,9 \pm 0,6) \times 10^9/\text{л}$, К - $(2,9 \pm 0,5) \times 10^9/\text{л}$.

ЛФ не оказывал лечебного эффекта на течение **кишечной формы** ОЛБ у мышей.

У крыс предварительное однократное введение ЛФ перед воздействием ускоренных электронов в дозах 255 или 266 Гр снижало выраженность некоторых симптомов церебральной формы ОЛБ.

Радиозащитный эффект препаратов лактоферрина может быть связан с их способностью ингибировать металлозависимые реакции свободно-радикального окисления за счет связывания катионов металлов переменной валентности, катализирующих реакции образования активных форм кислорода (АФК).

ЛФ способен ингибировать радиационное повреждение.

Влияние способа применения.

Опыт 1.

1. Мыши двух групп месяц содержались *на диетах* с добавлением 0,1% bLF (ЛФ из коровьего молока) и без LF.
2. Затем мышей обрабатывали тотальным однократным рентгеновским облучением в сублетальной дозе (6,8 Гр) и исследовали выживаемость. **Выживаемость** через 30 дней после облучения: **ЛФ – 85%, К - 62%**.
Масса тела через 15 дней после облучения достоверно выше у ЛФ-мышей.. Гемоглобин, гематокрит были выше в группе ЛФ за 5 суток до и на 15-5 сутки после облучения.

Опыт 2.

1. Мышей обрабатывали тотальным однократным рентгеновским облучением в сублетальной дозе (6,8 Гр)
2. Опытной группе однократно **внутрибрюшинно** вводили ЛФ в дозе 4 мг/животное, К-группе – ФР.
Выживаемость 30 дней после облучения **ЛФ-мышей - 92%, К - 50%**.

Механизмы антирадиационного эффекта ЛФ

1. **In vitro** ЛФ проявлял антирадикальную активность в двух системах генерирования гидроксильных радикалов ($\cdot\text{OH}$), но не был активен против супероксид анионов ($\text{O}_2\cdot^-$).
2. Улучшение **бактериальной флоры кишечника** и защита от нее против инфекции иммуномодулирующей функцией. Пероральное введение ЛФ мышам снижало кишечную активность энтеробактерий и клостридий, а также ингибировало бактериальную транслокация из кишечника в лимфатические узлы. Сообщалось также о снижении частоты сепсиса и смертности от сепсиса при введении ЛФ детям с экстремально низкой массой тела при рождении [23].
3. Одной из причин смерти от облучения может быть **инфекция** из-за снижения иммунитета. Возможно, что вызванное LF улучшение кишечной бактериальной флоры и защита от инфекции могут тормозить развитие и обострение инфекционных заболеваний, улучшая выживаемость.

ЛФ может быть использован в качестве радиопротектора для уменьшения побочных эффектов лучевой терапии, с применением в виде пищевой добавки.

Применение : при облучениях в низких дозах, индуцирующих сублетальные нарушения, в т.ч. - радиационный рак, для снижения последствий случайного облучения на АЭС и в радиотерапии.

[Nishimura et al. J. Radiat. Res. 2014. Vol.55. No.2. P.277-82]

Радиопротекторное действие ЛФ на мышах с сублетальным рентгеновским облучением.

Опыт:

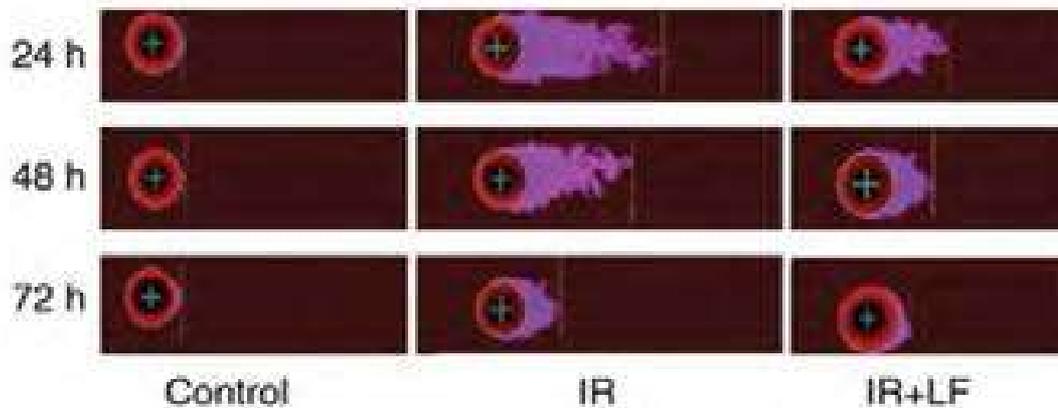
К - необлученные мыши, получавшие стандартную диету без ЛФ, К+ - доза 7 Гр, стандартная диета, ЛФ - доза 7 Гр, бЛФ (0,1%) + станд. диета (кормили ежедневно в течение 7 дней до облучения и в течение 30 суток после облучения).

Результаты:

ЛФ после сублетального рентгеновского облучения:

- повышает выживаемость мышей;
- уменьшает радиационно-индуцированное снижение массы тела;
- восстанавливает гематологические показатели (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты);
- повышает антиоксидантную способность (\uparrow СОД, \downarrow МДА);
- уменьшает повреждение ДНК.

ЛФ может предотвращать лучевое повреждение и может иметь потенциал для лечения онкологических пациентов, получающих лучевую терапию.



Метод ДНК-комет - лимфоциты после облучения.

[Feng et al. Experimental and therapeutic medicine 2018, 16: 3143-3148]

После лучевой терапии у онкологических больных часто возникает травма кишечника.

ЛФ увеличивал время выживания облученных мышей и уменьшал повреждение кишечника за счет снижения воспалительных цитокинов и снижения экспрессии NF-κB.

Опыт 1:

Внутрибрюшинное введение ЛФ в дозах 0, 2, 4 или 6 мг на животное. Тотальное однократное рентгеновское облучение 8 Гр.

Введение ЛФ продолжали в течение 3 дней.

Выживание: 0 - **4.30±1.34**, 2 - 4.20±0.71, 4 - 5.75±2.44, **6 - 6.70±2.54** суток.

Опыт 2:

Внутрибрюшинное введение ЛФ в дозах 0, 2, 4 мг на животное. Тотальное однократное рентгеновское облучение 5 Гр.

По результатам гистологии радиационно-индуцированное повреждение кишечника было значительно улучшено в группах 2 и 4.

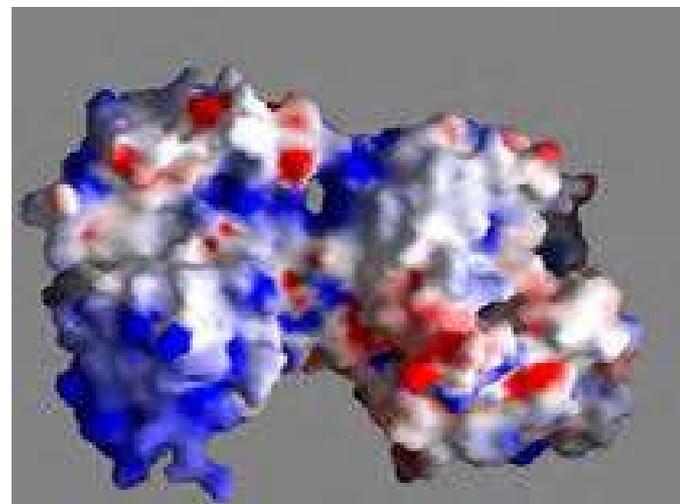
Уровни провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α в сыворотке крови достоверно снижались в группах 2 и 4 на 3- и 9 сутки. Также снижалась радиационно-индуцированная экспрессия IKKα/β и NF-κB.

ЛФ как врожденная защита человека от инфекций

ЛФ содержится во многих слизистых выделениях, выполняет мощную защитную функцию.

ЛФ способен удерживать железо при кислом рН (очаги инфекции и воспаления), это - катион ($pI \sim 9$), что объясняет его способность связываться с микробными и вирусными анионными поверхностными структурами, а также с такими молекулами, как ДНК, гепарин, гликозаминогликаны.

Вид биологической жидкости	концентрация чЛФ, мг/мл
Молозиво	8 (7-10)
Молоко	1,5-4
Семенная жидкость	0,112
Слезы	2
Слюна	0,008
Суставная жидкость	0,001
Вагинальный секрет	0,008
Плазма	0,0004



Распределение поверхностного заряда молекулы чЛФ. Синий: положительный; красный: отрицательный

При остром воспалении концентрация чЛФ в крови увеличивается до 20 мкг/мл за счет нейтрофилов.

[Berlutti et al. Molecules. 2011. Vol.16. No.8. P.6992–7018.]

Бактерии

Бактериостатическое действие ЛФ зависит от его способности связывать железо, необходимое для выживания и роста бактерий. Оно обратимо при добавлении Fe^{3+} .

Бактерицидное железо-независимое действие ЛФ: необходимо прямое взаимодействие ЛФ с липополисахаридом (ЛПС) грамотрицательных или липотейхоевой кислотой грамположительных бактерий. ЛФ связывается с липидом А ЛПС, индуцируя высвобождение ЛПС. Эта бактерицидная активность ЛФ находится в N-концевой области в виде производного катионного пептида, называемого лактоферрицин (ЛФцин), и в несколько раз активнее интактного ЛФ.

Грам-положительные:

Streptococcus mutans
Streptococcus pneumoniae
Legionella pneumophila
Staphylococcus aureus
Micrococcus luteus
Bacillus cereus
Helicobacter felis
Helicobacter pylori

Грам-отрицательные:

Pseudomonas aeruginosa
Vibrio cholerae
Haemophilus influenzae
Klebsiella pneumoniae
Escherichia coli (неэнтеропатогенные штаммы)
Actinobacillus actinomycetecomitans
Prevotella intermedia
Prevotella nigrescens



Грибы

Candida albicans
Candida krusei

Простейшие

Toxoplasma gondii
Pneumocystis carinii



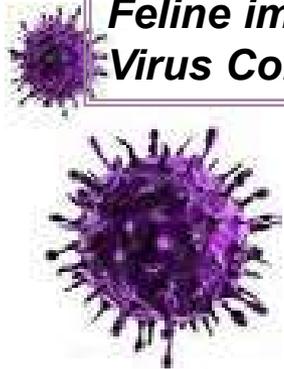
С 1994 года была показана мощная противовирусная активность чЛФ и бЛФ против оболочечных и голых вирусов. В большинстве этих исследований не было отмечено особых различий в противовирусном эффекте ЛФ, тестированном в апо- и в холо- формах. В обеих формах ЛФ действует на ранней стадии вирусной инфекции, предотвращая проникновение вируса в клетку хозяина либо путем блокирования клеточных рецепторов, либо путем прямого связывания с вирусными частицами.

BLF часто обладает более высокой противовирусной активностью, чем чЛФ.

Противовирусная активность лактоферрина (+заряженного производного ЛФ) продемонстрирована против цитомегаловирусной инфекции человека (HCMV) *in vitro*.

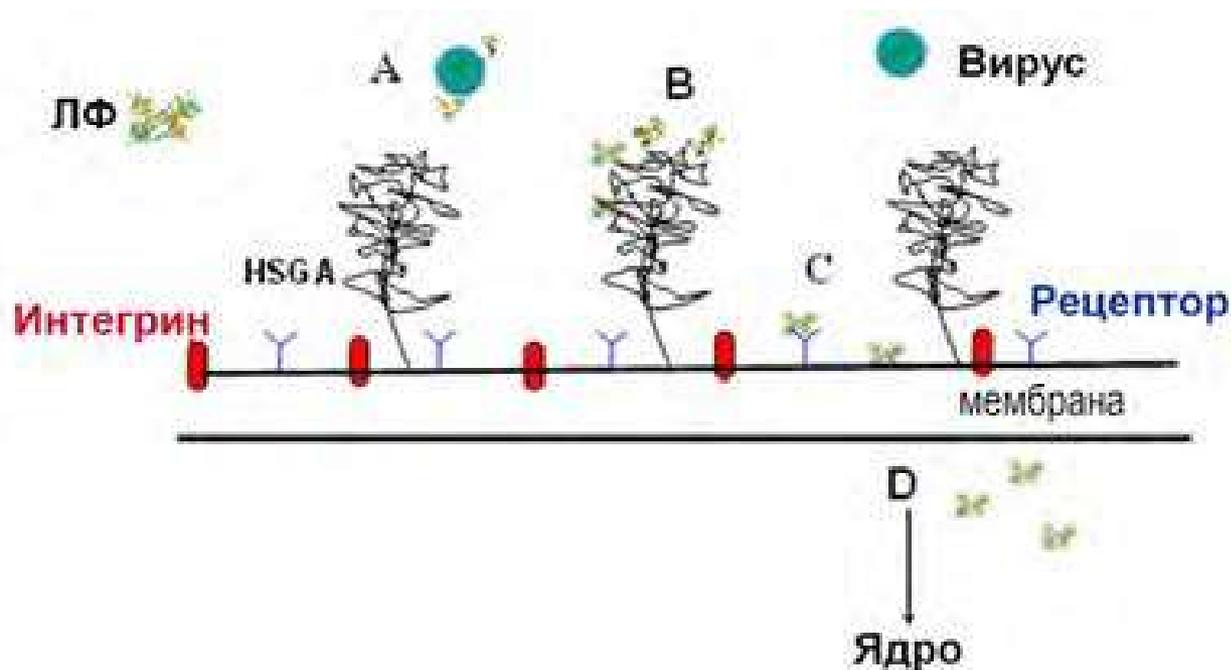
Human cytomegalovirus (HCMV); Herpes simplex virus type 1,2 (HSV-1,2); Human Immunodeficiency Virus (HIV); Human Hepatitis C Virus (HCV); Human Hepatitis B Virus (HBV); Human Papillomavirus (HPV); Respiratory Syncytial Virus (RSV); Parainfluenza Virus (PIV); alphaviruses (Sindbis virus and Semliki Forest virus); Hantavirus; Rotavirus; Adenovirus; Picornavirus; Influenza A Virus; Japanese Encephalitis Virus; Feline immunodeficiency virus (FIV, бЛФ); Feline Calicivirus (FCV); Friend Virus Complex (FVC, у мышей)

[Berlutti et al. *Molecules*. 2011. Vol.16. No.8. P.6992–7018.]



Механизмы противовирусного действия ЛФ

- прямая связь с вирусами (А);
- связывание с гепарансульфатом глюкозаминогликана (HSGA). Эти молекулы являются первыми сайтами закрепления на поверхности клетки и помогают вирусу установить первичный контакт с клетками-хозяевами (В);
- блокировка клеточных рецепторов с предотвращением проникновения вирусов в клетку (С);
- внутриклеточная локализация с нарушением репликации вирусных частиц в клетке хозяина (D).



[Berlutti et al. *Molecules*. 2011. Vol.16. No.8. P.6992–7018.]

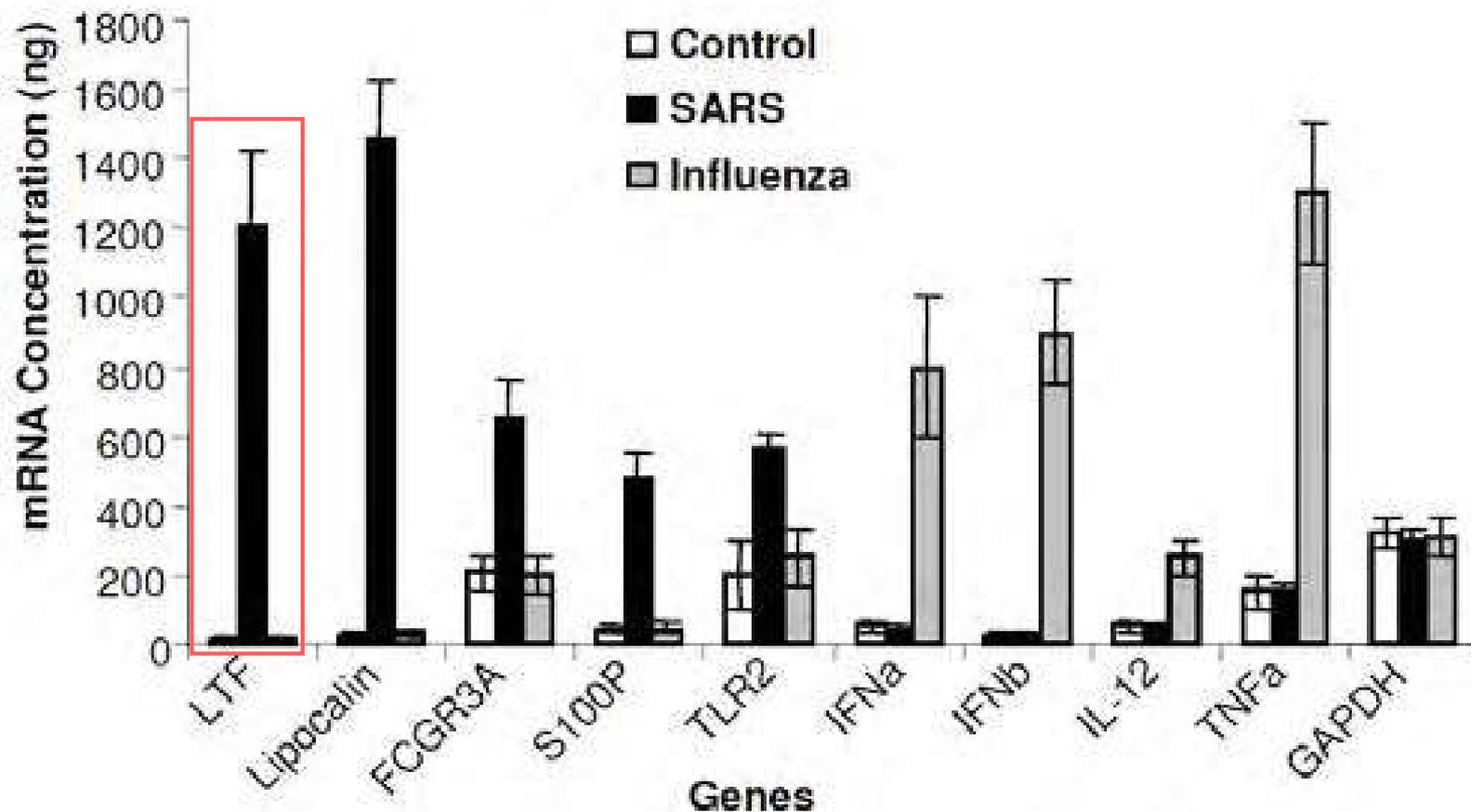
ЛФ имеет установленную *in vitro* эффективность против коронавируса **SARS CoV** (severe acute respiratory syndrome - тяжелый острый респираторный синдром), тесно связанного с SARS-CoV-2 (вирус, вызывающий COVID-19).

В 2003 году в мире была первая вспышка атипичной пневмонии: в процессе размножения вирус разрушал клетки лёгочных альвеол (сходство с COVID-19). Исследование на 10 людях, инфицированных SARS-CoV-1, показало, что инфекция увеличивала выработку ЛФ в 150 раз. **ЛФ человека способен ингибировать тяжелый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом.**

Гены, связанные с иммунным ответом, экспрессия которых была значительно повышена в моноядерных клетках периферической крови пациентов с атипичной пневмонией.

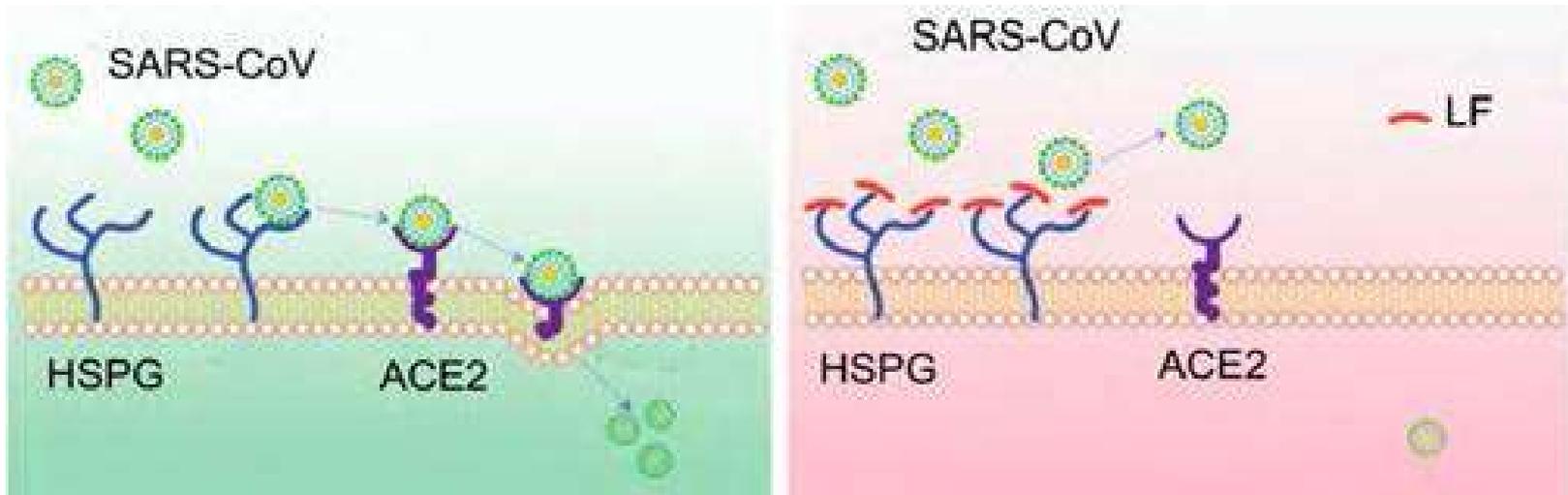
Уровень развития экспрессия выражается кратно по сравнению с контрольными образцами здоровых людей. (Фрагмент таблицы).

Gen Bank ID	Description	Gene name	Fold change (S1-S10)
NM_002343.1	Lactotransferrin	LTF	149.63
M33326.1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	CEACAM8	97.39
NM_005564.1	Lipocalin 2	LCN2	80.40
NM_004660.2	S100 calcium binding protein A9	S100A9	65.39
NM_001725.1	Bactericidal permeability-increasing protein	BPI	49.94
NM_005091.1	Peptidoglycan recognition protein	PGLYRP	47.86
NM_001925.1	Defensin alpha 4	DEFA4	46.88
U19970.1	Antimicrobial LPS-binding protein CAP18	CAMP	43.36



ПЦР в реальном времени некоторых выбранных генов. Образцы геномной ДНК выделены от здоровых добровольцев (контроль), инфицированных SARS больных, от инфицированных вирусом гриппа больных. Была выделена тотальная РНК и проведена ПЦР-РВ. Лактоферрин - ЛТФ;

2011 год, исследования на клеточной культуре:



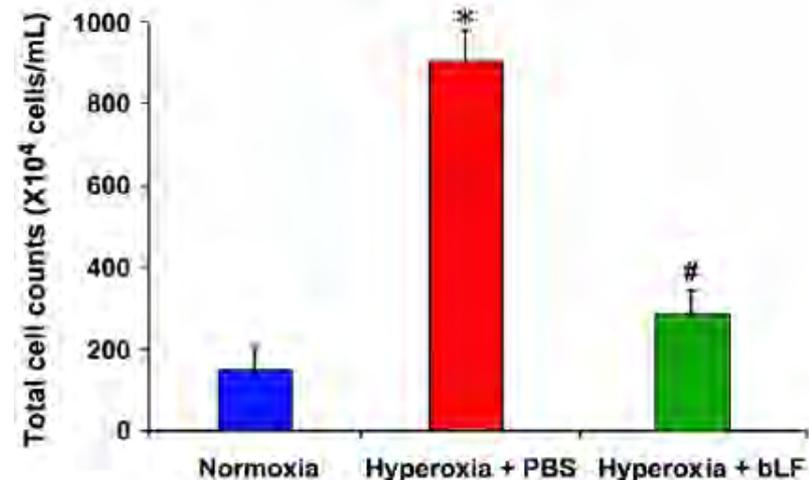
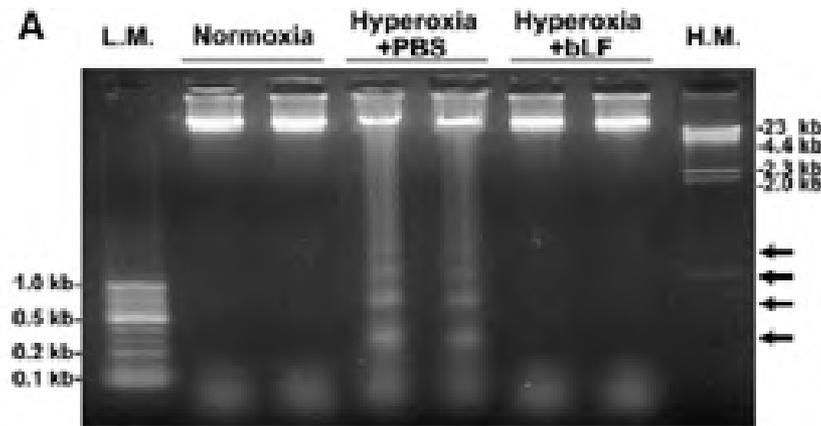
Модель проникновения SARS-CoV (слева) и защитная роль ЛФ при инфекции SARS-CoV (справа).

Сайты HSPG обеспечивают контакт между SARS-CoV и клетками-хозяевами, концентрируют вирусы на поверхности клеток. SARS-CoV «скатывается» на клеточную мембрану и сканирует ее на наличие специфических рецепторов входа (ACE2 - angiotensin-converting enzyme 2), что приводит к проникновению в клетку.

ЛФ связывается с HSPG. Экспрессия ЛФ может быть повышена при заражении человека атипичной пневмонией. LF локализуется на клеточной поверхности HSPG и предотвращает предварительное взаимодействие между вирусом и клетками-хозяевами, последующий процесс инвазии.

В связи с пандемией COVID-19 идет активный поиск лекарственных препаратов, эффективных против SARS-CoV-2.

В модели гипероксии (80% O₂, неделя) выживаемость контрольных мышей была **20%**. Выживаемость ЛФ-мышей - **66,7%**. **Аэрозольный БЛФ** (0.0514 мг/мл, распыление 10 ч каждый день), способен защищать легкие от хронической гипероксии (как модель повреждения легких): он уменьшал отек легких, общее количество клеток в бронхоальвеолярном смыве, уровень воспалительных цитокинов (IL-1b и IL-6), легочный фиброз и апоптотическую фрагментацию ДНК.



Слева: апоптотическая фрагментация ДНК (электрофорез в агарозном геле). Справа: легочная лейкоцитарная инфильтрация (общее количество клеток в бронхоальвеолярной лаважной жидкости)

Испания, начало 2020 г.

Опытная группа: Исследование влияния пищевой добавки **липосомального БЛФ*** у 75 пациентов с типичными симптомами COVID-19 и положительным результатом на экспресс-тест IgM/IgG.

Получали: ЛЛФ питьевой (Lactyferrin™ Forte, содержит ЛФ (32 мг/10 мл) и витамин С (12 мг/10 мл), а также липосомальный цинк (ЛЦ, 1 мг/мл) в форме сиропа.

Получали: БЛФ (32 мг) плюс витамин С (12 мг) перорально, 4-6 доз в сутки в течение 10 дней. Дополнительно принимали раствор липосомального цинка в дозе 10 мг/10 мл два-три раза в сутки.

Контрольная группа: 12 пациентов принимали только ЛЛФ.

Контактировавшие с ними 256 человек получали половину дозы.

Суммарная доза неинкапсулированного ЛФ для взрослых 1,4-3,4 г

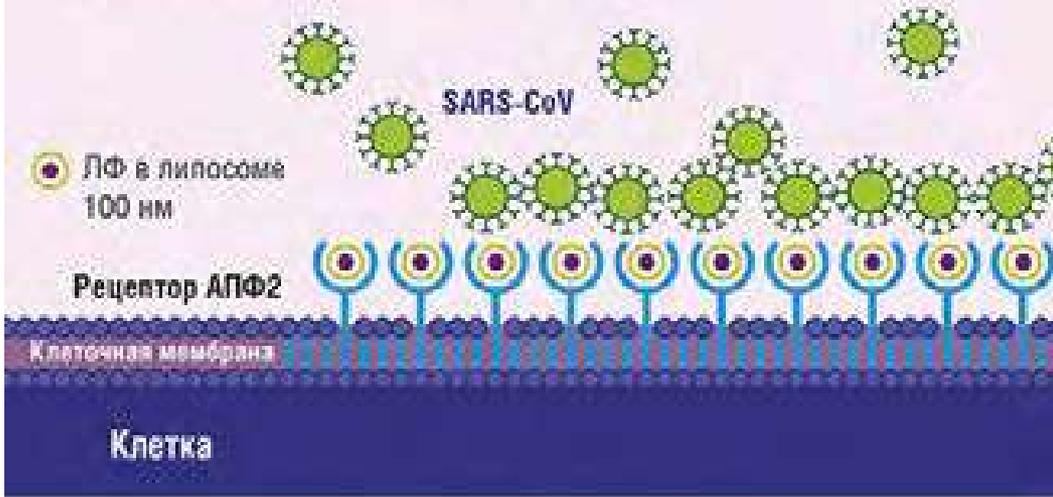
Все пациенты выздоровели в течение первых 4-5 дней. Более низкие дозы предотвращали развитие заболевания у контактирующих лиц. Исследование показало, что ЛФ потенциально предотвращает и лечит инфекцию COVID 19.

**Липосомы на основе фосфатидилхолина: ЛФ и витамин С инкапсулированы в липидную сферу размером 100 нм или нанолипосому, изготовленную из соевого ФХ.*



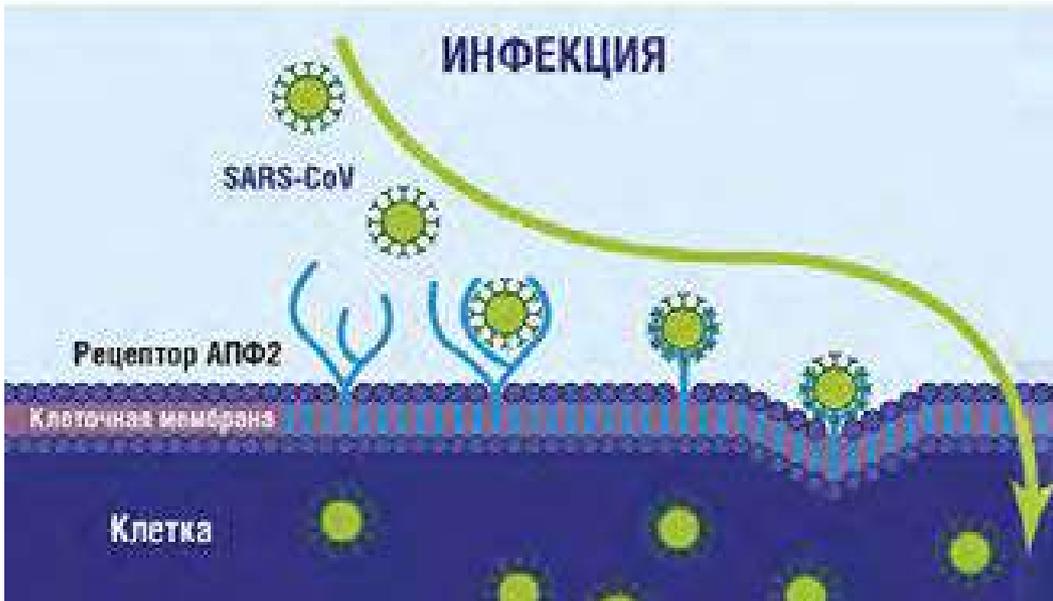
Схема действия липосомального ЛФ

Липосомальный ЛФ оседает на клеточном рецепторе АПФ2, блокируя слияние вируса с клеточной мембраной



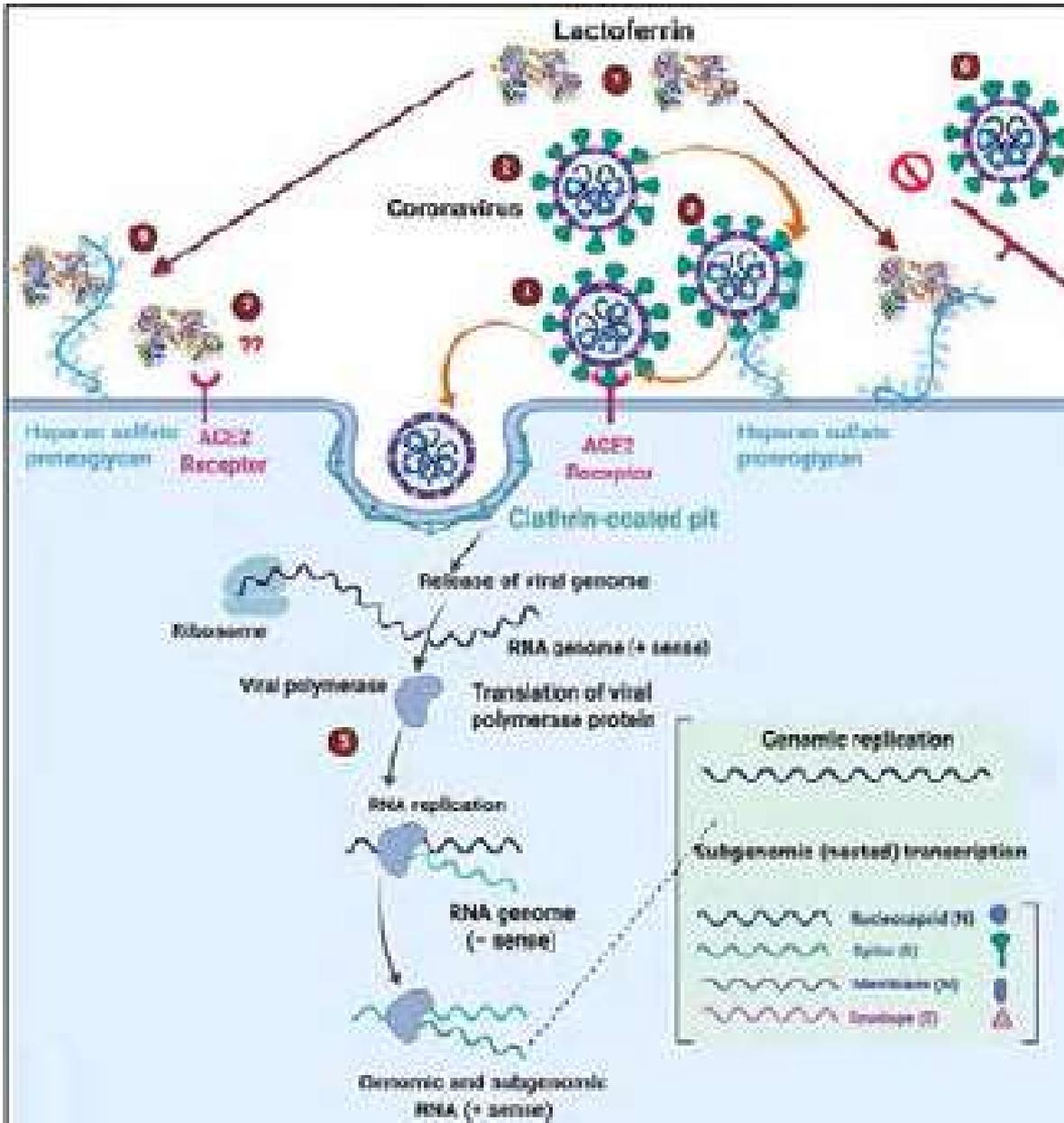
COVID-19 блокируется липосомальным лактоферрином (вверху);

средство вируса к рецептору АПФ 2 без вмешательства лактоферрина позволяет проникать вирусу внутрь клетки (внизу).



[Serrano et al. *Int. J. Res. Health. Sci.* 2020. Vol.8. No.1. P.8-15.]

Возможное действие ЛФ путем захвата сайтов связывания SARS-CoV-2



SARS-CoV-2 (2) присоединяется к HSPGs (3): вирус концентрируется на поверхности клетки.

Вирус прикрепляется к рецептору хозяина (ACE2) (4), после чего входит через покрытые клатрином ямки (5): репликация вируса происходит внутри клетки.

ЛФ (1) присоединяется к HSPGs (6). Возможно, ACE2 способен быть рецептором и для ЛФ (7).

ЛФ блокирует проникновение SARS-CoV-2 в клетку хозяина, занимая HSPGs(8), тем самым предотвращая первоначальное прикрепление SARS-CoV-2 и накопление на мембране клетки-хозяина.

[Kell et al. *Front Immunol* 2020 May 28;11:1221.]

Предлагается схема использования ЛФ как терапевтического агента для клинического испытания с двойным введением пациентам: в виде интраназального спрея и пероральной формы приема. ЛФ способен противодействовать проникновению коронавируса и воспалению, играя роль естественного барьера и в слизистом слое дыхательных путей, и кишечника, а также нейтрализовать нарушения гомеостаза железа, вызываемое колонизацией вируса.

Обзор: Campione et al. Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation [*Int J Mol Sci.* 2020 Jul; 21\(14\): 4903.](#)

Уникальные иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства ЛФ могут быть особенно актуальны для патофизиологии тяжелых случаев COVID-19, его можно рассматривать в качестве профилактического и дополнительного лечения.

Chang et al. Lactoferrin as potential preventative and treatment for COVID-19 // Preprint April 2020.

Антимикробные пептиды (АМП) - эффективные биомолекулы для подавления болезнетворных микроорганизмов - продуцируются различными организмами и являются важными компонентами врожденного иммунитета против различных патогенов. ЛФ, один из АМП, проявляет противовирусную активность.... ЛФ обладает противовирусной активностью против коронавируса SARS-CoV. Эти результаты позволяют использовать ЛФ при вирусном заражении, или как компонент лекарственного противовирусного препарата. Безопасность и эффективность ЛФ делает его предпочтительным кандидатом в развитии стратегии противовирусного лечения.

Elnagdy S, AlKhazindar M. The Potential of Antimicrobial Peptides as an Antiviral Therapy against COVID-19. ACS Pharmacol Transl Sci. 2020 Jun 16;3(4):780-782.

Из-за дефицитности традиционного источника получения чЛФ (женское молоко в ранние сроки лактации) он практически не используется.

Безопасность рчЛФ из молока трансгенных коз и коров, эффективность применения при различных заболеваниях проверена в многочисленных исследованиях. Однако, рчЛФ из молока трансгенных коз по ряду ограничительных законов до сих пор малодоступен.

Рекомбинантный лактоферрин из различных источников.

Invitria (США) <https://invitria.com> Источник-кишечная палочка, цена 250\$-1г.

Oryzogen (Китай) <http://oryzogen.58zhanhui.com/pod2/641/1728598/recombinant-human-lactoferrin-osrlf.htm> Источник рис, цена 350\$-10г

Белорусский ГУ (Белоруссия) <https://www.bsu.by> Источник- коза, цена 150\$-1г.

<https://human-lactoferrin.info> - информационный портал по ЛФ. Продвижение рчЛФ (источник – коза, ранее - совместный российско-белорусский проект с участием Института Биологии Гена).

Российский «Неолактоферрин» (90% биоаналога чЛФ и 10% ЛФ козы) – в растворе и в капсулах, предполагается использовать для лечения Covid

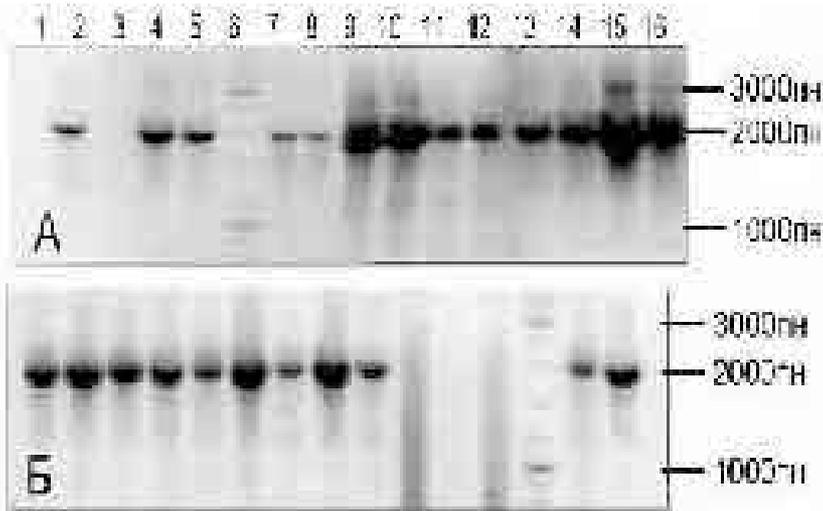
<https://human-lactoferrin.info/novosti/gotovye-produkty/uchyonye-ran-sozdali-preparaty-kotorye-mogut-spasti-lyudej-ot-koronavirusa-dejstvuyushhee-veshhestvo-lekarstvennyh-sredstv-uzhe-pokazalo-svoyu-effektivnost/>

В лаборатории клеточной и геной инженерии ВНИИФБиП животных на протяжении нескольких лет проводились работы по получению трансгенных кроликов-продуцентов биологически активных белков, в частности, чЛФ, в составе молока.



Были созданы генетические конструкции, содержащие кДНК чЛФ под регуляторными последовательностями генов белков молока КРС: альфа-S1-казеина и бета-лактоглобулина. С использованием конструкции, содержащей альфа-S1-казеиновый промотор и терминирующую последовательность полиА гормона роста быка, методом микроинъекции зигот была получена крольчиха, ставшая основательницей линии трансгенных кроликов с геном чЛФ

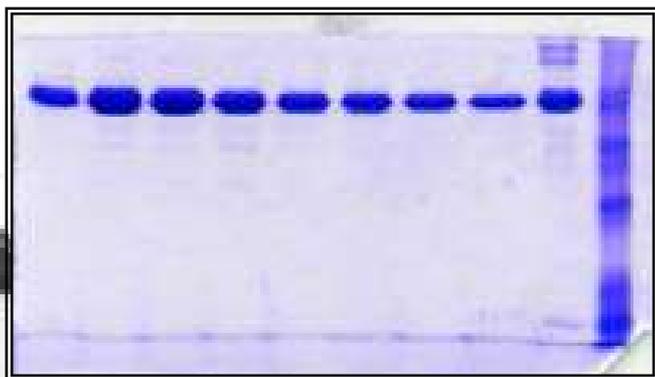
Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК кроликов. Проверка на содержание трансгена $\alpha s1Lf$



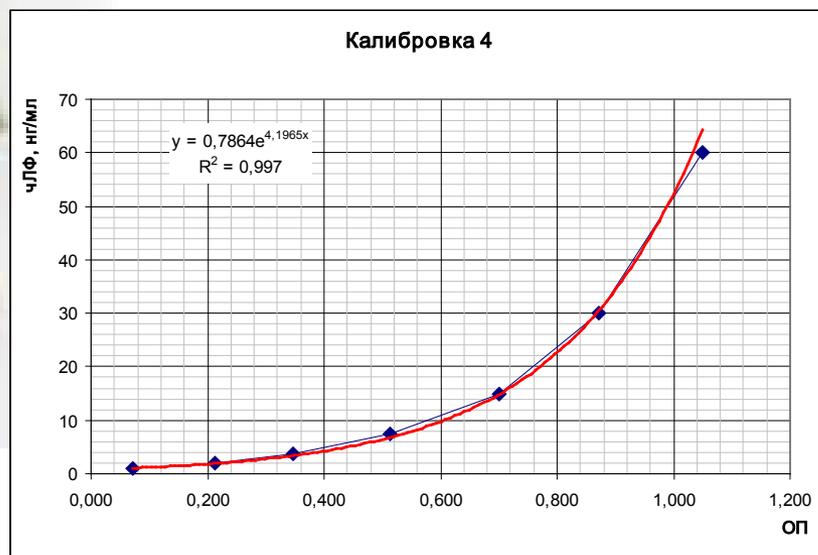
Амплификат ограничен праймерами 377-Lf5 (содержит последовательности промотора гена $\alpha s1$ -казеина КРС и гена лактоферрина человека, общий размер амплификата 2000 п.н.). 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Фото А			Фото Б		
Дор.	№ пробы – номер кролика	Родители	Дор.	№ пробы	Родители
1	95 19/1♂	♀19х ♂372/9	1	105 ♀	♀37/2х ♂372/9 Р.29.05.15 Погибли
2	96 19/2♀		2	106 ♀	
3	97 19/3♀		3	107 ♂	
4	98 372/12♀	♀37/2х ♂372/9	4	108 ♀	
5	99 372/13♀		5	109 ♂	
6	Маркер размеров ДНК		6	110 ♀	
7	К+		7	111 ♀	
8	Ки		8	112 ♀	
9	18	♀37/2х ♂372/9 Р.03.02.15 Труппы	9	120 ♀	♀5312/2 (Lf)х ♂5423/5 (GCSF/GFP) Труппы
10	20		10	121 ♀	
11	22		12	122 ♂	
12	24		11	H ₂ O	
13	26		13	Маркер размеров ДНК	
14	28		14	К+	
15	30	15	Ки		
16	32				

Для оценки содержания чЛФ в молоке кроликов была создана **ИФА тест-система**: из женского молока был выделен высокоочищенный чЛФ, из сыворотки крови иммунизированных им кроликов с использованием метода аффинной хроматографии получены поликлональные антитела. Концентрация чЛФ в молоке трансгенных крольчих достигала 1,2 мкг/мл [13].



Электрофорез в 12, 5% ПААГ в денатурирующих условиях: фракции, собранные в процессе Гель-хроматографии на ультрагеле АсА34



Типичная калибровочная кривая разработанной тест-системы для количественного определения чЛФ в молоке трансгенных кроликов.

Было проанализировано более 50 образцов молока трансгенных кроликов, содержание чЛФ в которых варьировало от 40 до 800 нг/мл

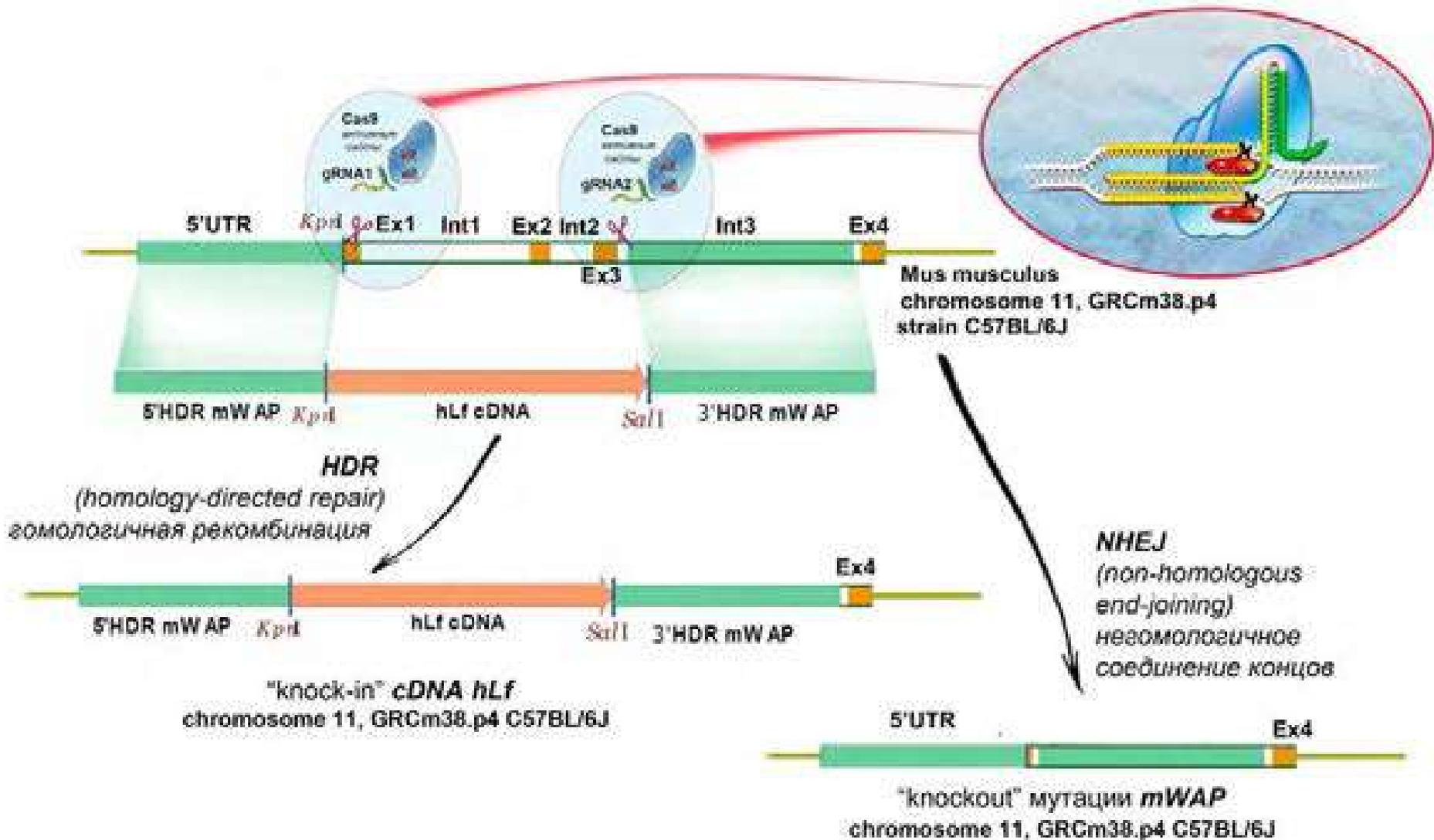
[Езерский с соавт. Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 4. С.108-115.]

С использованием новых технологий редактирования генома появилась возможность получения животных с сайт-специфичной интеграцией трансгена. Были созданы генетические конструкции для замещения гена кислого сывороточного протеина мыши и кролика геном биологически активного белка, в частности, чЛФ, при использовании CRISPR/Cas9 метода.

Цель работы: В геноме мыши и кролика, как модельного животного, нокаутировать ген кислого сывороточного белка (*mWAP*, *rbWAP*) и заменить его на кДНК чЛФ. Получить трансгенное животное с экспрессией в молоко чужеродного белка вместо эндогенного.

- Создать генно-инженерные конструкции, в которых кДНК чЛФ будет фланкирована фрагментами 5'- и 3'-регуляторных областей *mWAP* (*rbWAP*).
- Подобрать сайты-мишени для образования двухцепочечных разрезов в локусе *WAP*. На основе рХ330 получить плазмиды-векторы, экспрессирующие Cas9 и направляющие РНК к выбранным мишеням.
- Разработать стратегию анализа возможных модификаций локуса *WAP*.

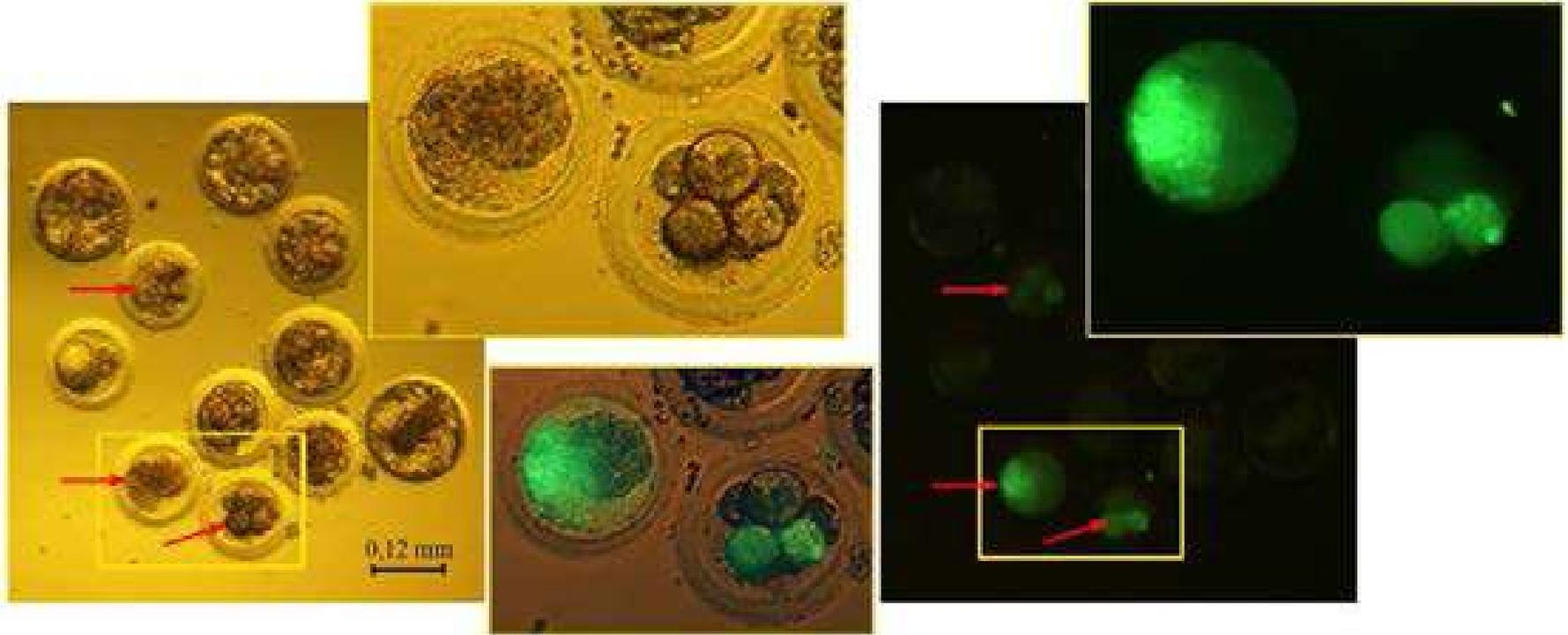
Полученные конструкции предназначены для использования в качестве матрицы при замещении кодирующей последовательности гена *mWAP* (*rbWAP*) на последовательность **кДНК чЛФ** посредством механизма гомологичной рекомбинации (**HDR**) в процессе репарации геномной ДНК мышинового (кроличьего) эмбриона, разрезанной эндонуклеазой Cas9 в сайтах гена *mWAP*, узнанных gRNA(s) (компонентов **CRISPR/Cas9** системы).



**Развитие *in vitro* кроличьих эмбрионов,
микроинъецированных разными составами ДНК-компонентов**

Группы эмбрионов, Суммарная ДНК нг/мкл			К 0	№1 10	№2 20	№3 20	№4 10
Компоненты	I-WAPcmvEGFP		-	-	-	10	10
	pX330-51-		-	2,5	5	2,5	-
	pX330-511		-	2,5	5	2,5	-
	pX330-31		-	2,5	5	2,5	-
	pX330-33		-	2,5	5	2,5	-
Инъецировано зигот		n	-	52	33	105	137
Культивировано зигот*		n	70	43	32	100	133
Развилось до стадии	2-16 клеток	n	2	5	5	22	45
		% ¹	3	12	16	22	34
	Бластоцисты - морулы	n	67	38	27	58	83
		% ¹	96	88	84	58	62
Светились в УФ	2-16 клеток	n	-	-	-	14	24
		% ²	-	-	-	63	53
	Бластоцисты- морулы	n	-	-	-	4	15
		% ²	-	-	-	7	18

*Общее время культивирования около 96 часов; %¹ - от количества культивированных зигот; %² – от количества развившихся до соответствующей стадии эмбрионов.



Эмбрионы кролика, культивированные 5 суток после микроинъекции в пронуклеус компонентов CRISPR/Cas9 системы – плазмид рХ330 и генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену WAP кролика и ген зеленого флуоресцентного белка, при использовании CRISPR/Cas9 технологии. Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа). По центру – выделенный фрагмент в смешанном свете. Стрелками отмечены флуоресцирующие эмбрионы.

Некоторые другие конструкции, содержащие кДНК чЛФ



Генная конструкция, содержащая репортерный ген (ген красного флуоресцентного белка (RFP) под цитомегаловирусным промотором) и селективный ген устойчивости к неомицину (неомицинофосфотрансферазы) под ранним промотором sv40 (Neo). Обеспечивает устойчивость трансфицированных конструкцией клеток эукариот к антибиотику неомицин (G418) посредством продуцирования неомицинофосфотрансферазы



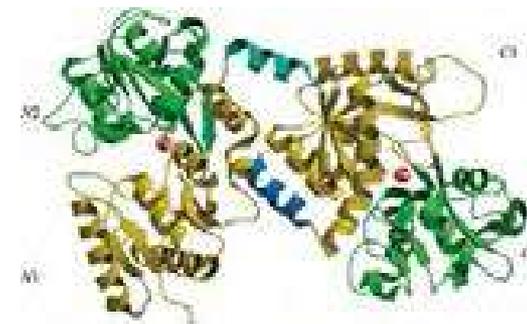
Генная конструкция, содержащая кДНК чЛФ, соединенную последовательностью, кодирующей гидролизуемый IgA-протеазой аминокислотный фрагмент, слитую с геном ГКСФ.



Лактоферрин,

биологически активный белок широкого спектра действия, имеет огромный потенциал использования в профилактике и лечении заболеваний, в том числе возникших в результате радиационного и вирусного поражения.

Безопасность и эффективность рекомбинантного лактоферрина, выделенного из молока трансгенных домашних животных, подтверждена в многочисленных экспериментах. Остается надеяться, что этот уникальный белок сможет занять достойную нишу на рынке биологически активных добавок и лекарственных препаратов, безусловно, нуждающемся в нем.



1. Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В., Белова Н.В., Кутьин И.В., Рябых В.П. Проблемы и перспективы использования рекомбинантного лактоферрина человека и его производных // Проблемы биологии продуктивных животных 2018, №4, С.5-26.
2. Иванов А.А., Уланова А.М., Ставракова Н.М., Дешевой Ю.Б., Насонова Т.А. Противолучевая эффективность лактоферрина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т.49. №4. С.456-461.
3. [Nishimura](#) Y., Homma-Takeda S., Kim H.S., Kakuta I. Radioprotection of Mice by Lactoferrin Against Irradiation With Sublethal X-rays // J. Radiat. Res. 2014. Vol.55. No.2. P.277-82.
4. [Wei](#) Y.L., [Xu](#) J.Y., [Zhang](#) R., [Zhang](#) Z., [Zhao](#) L., [Qin](#) L.Q. Effects of Lactoferrin on X-ray-induced Intestinal Injury in Balb/C Mice // Appl. Radiat. Isot. 2019. Vol.146. P.72-77.
5. Berlutti F., Pantanella F., [Natalizi](#) T., Frion A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P. Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity // Molecules. 2011. Vol.16. No.8. P.6992–7018.
6. [Reghunathan](#) R., [Jayapal](#) M., Hsu L.Y., [Chng](#) H., Tai D., Leung B.P., Melendez A.J. Expression Profile of Immune Response Genes in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome // BMC Immunol. 2005. Vol.8. No.6. P.2.
7. Lang J., Yang N., Deng J., Liu K., Yang P., Zhang G., Jiang C. Inhibition of SARS Pseudovirus Cell Entry by Lactoferrin Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans // PLoSOne. 2011. Vol.6. No.8:e23710.
8. Chen H.L., Yen C.C., Wang S.M., Tsai T.C., Lai Z.L., Sun J.Y., Lin W., Hsu W.H., Chen C.M. Aerosolized bovine lactoferrin reduces lung injury and fibrosis in mice exposed to hyperoxia // Biometals. 2014. Vol.27. P.1057–1068.
9. Serrano G., Kochergina I., Albors A., Diaz E., Oroval M., Hueso G., Serrano J.M.. Liposomal Lactoferrin as Potential Preventative and Cure for COVID-19 // Int. J. Res. Health. Sci. 2020. Vol.8. No.1. P.8-15.
10. Chang R., Sun W.-Z., Ng T.B. Lactoferrin as potential preventative and treatment for COVID-19 // Preprint April 2020.
11. Kell D B, Heyden E L, Pretorius E The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria Front Immunol 2020 May 28;11:1221. doi: 10.3389/fimmu.2020.01221
12. Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А., Якубовская Р.И., Максименко С.В., Рябых В.П. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов. // Проблемы биологии продуктивных животных. Боровск. 2013. Т.4. С.33-52.
13. Езерский В.А., Колоскова Е.М., Трубицина Т.П., Шевченко В.Г., Рябых В.П. Тест-система для определения лактоферрина человека в молоке кроликов с интегрированной в геном конструкцией as1-cn-hLf // Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 4. С.108-115.
14. Езерский В.А., Колоскова Е.М. Генетическая конструкция для замещения гена кислого сывороточного протеина кролика при использовании CRISPR/Cas9 метода. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2019. №4. С.23-35.

Спасибо
за внимание!