

УДК 616.153.96+612.018:537.363

## КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ИНГИБИНА-А С ЛАКТОФЕРРИНОМ ЧЕЛОВЕКА

**Николаев А.А.**

*ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет  
Минздрава России», Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

Проведен анализ возможности образования комплексов Ингибина-А с одним из острофазовых белков – лактоферрином. Методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноэлектрофореза показано образование комплексов ингибин-А-лактоферрин на основании изменения электрофоретической подвижности ЛФ и ингибина-А. Предполагается, что фракции с большей электрофоретической подвижностью содержат преимущественно молекулы ингибина-А (имеющего больший отрицательный заряд), а в более медленной фракции преобладает положительный заряд лактоферрина. Обсуждаются возможные механизмы образования интерполимерных комплексов ингибин-А-лактоферрин.

**Ключевые слова:** ингибин-А, лактоферрин человека, интерполимерное взаимодействие, снижение овариального запаса

## COMPLEXATION OF INHIBIN-AND HUMAN LACTOFERRIN

**Nikolaev A.A.**

*Astrakhan State medical University, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru*

The analysis of the possibility of the formation of complexes of Inhibin-A and with one of the acute-phase proteins – lactoferrin. Methods of polyacrylamide gel electrophoresis and immunoelectrophoresis shows the formation of complexes inhibin-a-lactoferrin on the basis of changes in electrophoretic mobility LF and inhibin-A. It is assumed that the fractions with higher electrophoretic mobility contain predominantly molecules inhibin (with a higher negative charge), and a slower fraction dominates the positive charge of lactoferrin. Discusses possible mechanisms for the formation of interpolymer complexes inhibin-a-lactoferrin.

**Keywords:** inhibin-A, lactoferrin human, interpolymer interaction, reduced ovarian reserve

Уменьшение овариального запаса может быть важным фактором, когда никакое другое очевидное объяснение происхождения бесплодия не найдено [9]. Установлено, что высокой точностью определения овариального резерва обладают методы, основанные на определении уровня различных пептидов, вырабатываемых в яичнике (ингибин-А и ингибин-В, активин-А, антимюллеровый гормон). Прикладные методы оценки овариального резерва, применяемые для установления риска развития бесплодия, не имеют до настоящего времени объяснения причин этого явления и роли в его патогенезе ингибинов, в частности, ингибина-А. В настоящее время ряд исследователей [8.] пришли к выводу, что даже наличие достаточных уровней ингибина-А в крови не всегда гарант успеха при лечении бесплодия. Вероятно, это связано с наличием у пациентов биохимических факторов воспаления (цитокинов, острофазовых белков), вызывающих снижение биологической активности ингибина-А.

Известно [8], что ингибин-А и активин способны образовывать стабильные комплексы с некоторыми растворимыми белка-

ми, и эти комплексы снижают способность ингибина-А взаимодействовать с рецепторным аппаратом. Среди маркеров воспаления один из наиболее распространенных – лактоферрин [7], который обладает, многократно доказанной способностью к интерполимерным взаимодействиям [3, 10].

Целью нашей работы стало выявление возможности образования комплексов Ингибина-А с одним из острофазовых белков – лактоферрином.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали препарат ЛФ, полученный в нашей лаборатории и полученный нами по описанному ранее способу ингибин-А[1]. Для выяснения возможности образования межмолекулярных комплексов ингибина-А и ЛФ использованы применявшиеся для изучения межмолекулярных взаимодействий, методы электрофореза, гель-фильтрации [4], иммуноэлектрофореза и иммунодиффузионного анализа в агаре (ИДА) [2].

Были приготовлены маточные растворы ЛФ и ингибина-А на 0,85% растворе хлорида натрия с концентрацией 1,0 мг/мл.

Далее было приготовлено два ряда смесей, как указано в табл. 1.

Таблица 1

Разведения ингибина-А и ЛФ

№	Тип смеси и концентрации в мкг/мл			
	ЛФ	ингибин-А	ингибин-А	ЛФ
1-1	500	250		
2-1			500	250
1-2	500	125		
2-2			500	125
1-3	500	62,5		
2-3			500	62,5
1-4	500	31,25		
2-4			500	31,25
1-5	500	15,6		
2-5			500	15,6

### Результаты исследования и их обсуждение

Все образцы были подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле и, как видно на рис. 1, отмечено изменение электрофоретической подвижности ЛФ и ингибина-А по сравнению с чистыми препаратами этих белков, а также появление дополнительных фракций. Разведения ЛФ на ингибине-А и разведения ингибина-А на ЛФ охватывают молярное соотношение ингибина-А к ЛФ от 1:6 до 65:1. При малых концентрациях ингибина-А относительно ЛФ (№ 1-5, 1-4,

1-3) характерная полоса ингибина-А, имеющего высокую катодную подвижность, вообще не наблюдается, а отмечается мощная фракция ЛФ, электрофоретическая подвижность которой практически не отличается от электрофоретической подвижности контрольного препарата ЛФ. При низких концентрациях ЛФ (№ 2-5; 2-4), отмечается наличие фракций ЛФ и ингибина-А, практически идентичных по электрофоретической подвижности контрольным препаратам. Более наглядные результаты наблюдаются (рис 1.) при электрофорезе разведений № 2-3 и № 2-2.

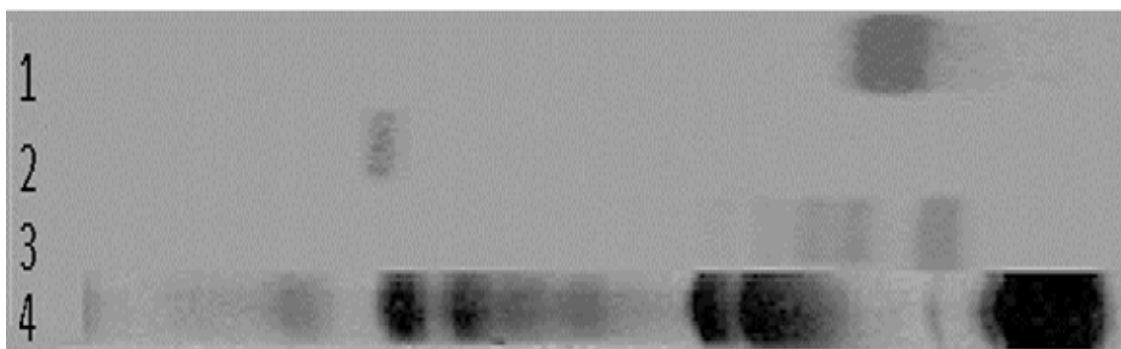


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле:  
1 – препарат ЛФ; 2 – препарат ингибина-А; 3 – смесь ингибина-А и ЛФ № 2-3; 4 – сыворотка крови человека. Окраска Coomasi blue

При выбранном в этих разведениях молярном соотношении ингибин-А – ЛФ (14/1 и 7/1 соответственно), визуально наиболее ярко проявляется изменение электрофоретической подвижности ЛФ и появление гетерогенности в области зоны его миграции от 2 до 4 фракций. На следующем этапе мы исследовали возможность образования комплекса ингибин-А – ЛФ методом иммуноэлектрофореза.

Этот метод оказался более информативным и менее трудоемким в оценке возможности образования межмолекулярных комплексов т.к. позволяет не только оценить сам факт образования комплекса в результате изменения электрофоретической подвижности, но и предоставляет значительно больше возможностей в количественной оценке данного феномена. На рис. 2. хорошо видно изменение электрофоретической подвижности как ингибина-А, так и ЛФ, находящихся в смеси друг с другом, в данном случае, в молярном соотношении ЛФ/ингибин-А примерно 1/14.

ингибина-А и ЛФ № 2-3, относительная электрофоретическая подвижность фракции выявляемой антисывороткой к ингибину-А составляет  $0,6 \pm 0,005$ , а относительная электрофоретическая подвижность фракции, выявляемой антисывороткой к ЛФ, составляет  $0,58 \pm 0,004$ . Эти различия электрофоретической подвижности чистых препаратов ЛФ и ингибина-А и их смеси статистически достоверны ( $P < 0,001$ ).

В смеси ингибина-А и ЛФ № 2-2, относительная электрофоретическая подвижность фракции, выявляемой антисывороткой к ингибину-А, составляет  $0,61 \pm 0,005$ , а относительная электрофоретическая подвижность фракции, выявляемой антисывороткой к ЛФ, составляет  $0,57 \pm 0,007$ , и выявленные различия также достоверны ( $P < 0,001$ ).

Эти данные подтверждают и полученные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле результаты о гетерогенности образующихся комплексов ингибин-А – ЛФ. Как видно из табл. 2, в смеси ЛФ и ингибина-А как

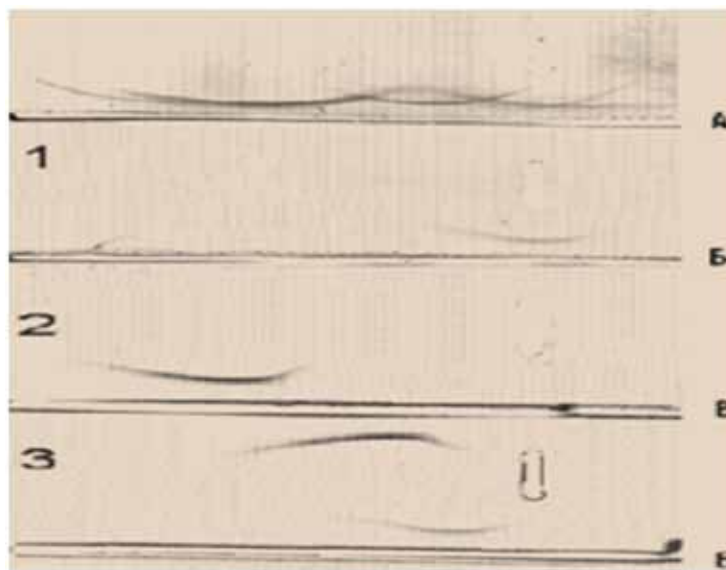


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез препаратов ЛФ и ингибина-А:  
1 – препарат ЛФ; 2 – препарат ингибина-А; 3 – смесь ингибина-А и ЛФ № 2-3;  
А – антисыворотка к белкам сыворотки крови человека; Б – антисыворотка к ЛФ;  
В – антисыворотка к ингибину-А

Количественная оценка результатов иммуноэлектрофореза смесей ЛФ – ингибин-А подтвердила вероятность образования межмолекулярных комплексов этих белков.

Как показано в табл. 2, электрофоретическая подвижность препарата ингибина-А относительно альбумина человека составляет  $1,08 \pm 0,004$ ; электрофоретическая подвижность препарата ЛФ относительно альбумина человека составляет  $0,48 \pm 0,006$ . В смеси

в № 2-3 так и в № 2-2, антисыворотки к этим белкам выявляют различные фракции комплексов ингибин-А – ЛФ, обладающие различной электрофоретической подвижностью.

В табл. 2. литерой Р<sub>1</sub> обозначены достоверности различий относительной электрофоретической подвижности фракций, выявляемых антисыворотками к ингибину-А и лактоферрину, находящихся в межмолекулярных комплексах.

Таблица 2

Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) ингибина-А и ЛФ в чистых препаратах и их смесях (объяснения в тексте)

№ опыта	ОЭП Препарат ингибина-А	ОЭП Препарат ЛФ	Смесь ингибина-А и ЛФ № 2-3		Смесь ингибина-А и ЛФ № 2-2	
			ЛФ	Ингибин-А	ЛФ	Ингибин-А
1	1,09	0,48	0,57	0,59	0,55	0,61
2	1,08	0,47	0,59	0,61	0,59	0,61
3	1,07	0,49	0,57	0,6	0,57	0,59
4	1,06	0,47	0,58	0,6	0,58	0,6
5	1,08	0,46	0,6	0,62	0,59	0,62
6	1,10	0,51	0,57	0,58	0,54	0,59
7	1,08	0,49	0,58	0,6	0,56	0,6
8	1,08	0,48	0,57	0,59	0,56	0,63
M±m	1,08± 0,004	0,48± 0,006	0,58± 0,004	0,60± 0,005	0,57± 0,007	0,61± 0,005
P			P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
P <sub>1</sub>				P <sub>1</sub> <0,02		P <sub>1</sub> <0,005

Статистический анализ показал, что эти различия значимы, и для смеси № 2-3 составляют  $P_1 < 0,02$ , а для смеси № 2-2 составляют  $P_1 < 0,005$ . Можно предположить, что фракции с большей электрофоретической подвижностью содержат преимущественно молекулы ингибина-А (имеющего больший отрицательный заряд), а в более медленной фракции преобладает положительный заряд ЛФ. Выявление различных фракций комплекса ингибин-А – ЛФ с помощью различных антисывороток, позволяет предположить, что образование этих комплексов происходит, как минимум, двумя путями. Во-первых, в исследованных смесях наблюдается более чем 10-кратное преобладание ингибина-А над ЛФ в молярном соотношении, и наиболее вероятный механизм образования комплекса – это электростатическое взаимодействие нескольких молекул ингибина-А, несущих достаточно высокий отрицательный заряд, с поликатионом ЛФ. При этом взаимодействии, тем или иным образом, экранируются антигенные детерминанты ЛФ, и быстрая фракция комплекса не выявляется антисывороткой к ЛФ. Во-вторых, возможен механизм преимущественно гидрофобного взаимодействия молекул ЛФ и ингибина-А. При этом более крупная молекула ЛФ сохраняет доступными свои антигенные детерминанты, а молекулы ингибина-А «укрываются» гидрофобными участками ЛФ и теряют возможность взаимодействовать с антителами.

Способность ЛФ к перекрестной реакции с полимерными соединениями (ДНК,

РНК, белками, полисахаридами, различными полианионами), в совокупности с конформационной активностью белка создает дополнительные возможности изменения его биологических свойств и свойств взаимодействующих с ним молекул. Особого внимания заслуживает тот факт, что в присутствии АТФ происходит полная диссоциация мажорной тетрамерной формы ЛФ [5]. При этом происходит разнонаправленное изменение эффективности взаимодействия белка с нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и белками. Так, мономерная форма ЛФ проявляет меньшее сродство к полисахаридам и казеину, а эффективность взаимодействия с гепарином изменяется слабо. В то же время АТФ ускоряет ЛФ-зависимый гидролиз ДНК. Есть данные [6] о регуляторной роли изменения олигомерного состояния ЛФ под действием биомолекул, как одного из путей увеличения их функциональных состояний и числа биологических функций. Изменение биологических функций молекул вступающих с ЛФ в интерполимерное взаимодействие, как, в частности, ингибин-А, в высшей степени вероятно, т.к. при интерполимерном взаимодействии обе молекулы подвергаются конформационной модификации.

Таким образом, следует полагать, что в регуляции свойств ингибина человека может участвовать несколько совершенно различных механизмов, которые включают изменение олигомерного состояния белка под действием различных индукторов [8], аллостерическое изменение конформации

белка под действием нормальных и патологических метаболитов, например, высоких концентраций эстрогенов, конкурентные концентрации андрогенов и эстрогенов [10], а также образование олигомерных комплексов с ЛФ и , возможно, другими медиаторами и маркерами воспалительной реакции, может быть одной из причин изменения его функционального состояния и снижения биологической активности. Полученные данные являются примером регуляции биологической активности посредством межмолекулярных взаимодействий.

#### Список литературы

1. Гудинская Н.И., Николаев А.А., Способ получения и очистки ингибина-А человека / Патент России № 2 434 018, 2011. Бюлл. № 36.
2. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. – М.: Мир. – 1976. – 368 с.
3. Николаев А.А., Алтухов С.А., Аншакова Н.И. Образование интерполимерных комплексов белками семенной плазмы // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 4. – С. 234–238.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 2006.
5. Соколов А.В. Обнаружение и выделение из грудного молока комплекса церуллоплазмينا и лактоферрина // Биохимия. – 2006. – Т.71., № 2. – С. 208-215.
6. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – v.1820 – p.226–236.
7. Miyauchi S., Umekita K., Hidaka T., Umeki K., Aratake Y., Takahashi N., Sawaguchi A., Nakatake A., Morinaga I., Morishita K., Okayama A. Increased plasma lactoferrin levels in leucocytapheresis therapy in patients with rheumatoid arthritis // Rheumatology (Oxford). 2014. – V.53. – № 11. – P. 1966–1972.
8. Nicks K.M., Fowler T.W., Akel N.S., Perrien D.S., Suva L.J., Gaddy D. The role of gonadal inhibins // Ann N Y Acad Sci. 2010 – v.1192. – № 3. – p. 133–160.
9. Pouresmaeili F., Fazeli Z. Premature Ovarian Failure: A Critical Condition in The Reproductive Potential with Various Genetic Causes // Int J Fertil Steril. – 2014. – v. 8-№ 1. – p. 1–12.
10. Skelte G. Anema A, C.G. (Kees) de Kruif Complex coacervates of lactotransferrin and b-lactoglobulin // Journal of Colloid and Interface Science V. – 2014. – v.430. – № 15. – P. 214–220.