

Обзор литературы

© ГУЛЕНКОВА Д.Г., ЗУЕВ В.М., 2016
УДК 618.15-002-022-092-07-08

Гуленкова Д.Г., Зуев В.М.

ЛАКТОФЕРРИН И РАМАН-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ТЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119045, г. Москва; Клиника акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, 119045, г. Москва

Для корреспонденции: Гуленкова Дарья Геннадьевна — аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 89152526987@yandex.ru

В обзоре отражен современный взгляд на внедрение в клиническую микробиологию новых методов диагностики (в частности, раман-флуоресцентных технологий), что дало возможность расширить микрoэкологические исследования. При этом установлено, что подавление нормальной микрофлоры влагалища вызывает разнообразную патологию как воспалительного, так и невоспалительного генеза. Показано, что железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферриновых лактоферрин приводит к снижению воспалительного ответа организма, что позволяет использовать его в комплексном лечении кандидозных вульвовагинитов и бактериальных вагинозов.

Ключевые слова: бактериальный и грибковый вагинозы; рецидивирующие вагинальные инфекции; лактоферрин; раман-флуоресцентные технологии.

Для цитирования: Гуленкова Д.Г., Зуев В.М. Лактоферрин и раман-флуоресцентные технологии: роль в патогенезе и течении воспалительных заболеваний органов женской половой системы. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева.* 2016; 3 (1): 11—17. DOI: 10.18821/2313-8726-2016-3-1-11-17

Gulenkova D.G., Zuev V.M.

LACTOFERRIN AND RAMAN/FLUORESCENT TECHNOLOGIES: THE ROLE IN PATHOGENESIS AND THE COURSE OF THE INFLAMMATORY DISEASES OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation

In the review there is reflected the new look at the introduction into clinical microbiology new methods of diagnosis (such as Raman/Fluorescence Technology), which made it possible to enlarge micro-ecological investigations. Suppression of the normal vaginal microflora was found to lead to a variety of causes of the pathology of both inflammatory and non-inflammatory genesis. Iron-binding glycoprotein from the family of transferrin (lactoferrin) gives rise to the decrease of the inflammatory response of the body, it can be used in treatment of vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis.

Keywords: bacterial and fungal vaginoses; recurrent vaginal infections; lactoferrin; Raman/Fluorescence Technology.

For citation: Gulenkova D. G., Zuev V.M. Lactoferrin and Raman/fluorescent technologies: the role in pathogenesis and the course of the inflammatory diseases of the female reproductive system. *Arkhiv Akusherstva I Ginekologii im. V.F. Snegiryova (V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal)* 2016;3(1): 11—17. (In Russ.). DOI: 10.18821/2313-8726-2016-3-1-11-17

For correspondence: Dariya G. Gulenkova, MD., postgraduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology. E-mail: 89152526987@yandex.ru

Information about authors:

Gulenkova Dariya G. — postgraduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University. E-mail: 89152526987@yandex.ru

Zuev Vladimir M. — Professor, Department of Obstetrics and Gynecology № 1 medical faculty I.M. Sechenov First Moscow State Medical University. E-mail: vlzuev@bk.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 12.02.2016

Accepted 15.03.2016

Лактоферрин (ЛФ) — это железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферриновых. Диапазон защитных свойств ЛФ варьирует от прямого противомикробного воздействия на микроорганизмы, включая бактерии, вирусы, грибы, паразиты, до противовоспалительного и противоракового воздействия. Столь широкий диапазон защитных свойств возможен благодаря

механизму соединения ЛФ с железом и взаимодействием с молекулярными и клеточными компонентами клеток организма-хозяина и патогенов [1].

Известно, что ЛФ также является компонентом вторичных гранул нейтрофилов и секретируется непосредственно в очаг инфекции при развитии воспалительного процесса. Дополнительно к антибакте-

риальным свойствам ЛФ выявлена его способность регулировать иммунный ответ организма и защищать его от септических процессов, что показано в многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Клеточные и молекулярные механизмы действия ЛФ при модуляции воспаления активно изучаются, а некоторые уже полностью расшифрованы. На клеточном уровне ЛФ активно влияет на миграцию, созревание и функциональную активность иммунных клеток, тогда как на молекулярном уровне ЛФ, помимо связывания с железом, взаимодействует с различными регуляторными факторами (как растворимыми, так и мембранными) и изменяет их активность [2].

Синтез и секреция ЛФ могут осуществляться конституционно (секреторными железами) или под гормональным контролем (в половых органах). Альтернативный его синтез происходит в клетках нейтрофилов на ранней стадии их дифференциации с последующим накоплением данного белка в цитозольных гранулах с секретированием под действием внешнего сигнала. Вероятно, тип секреции ЛФ зависит от того, какую активность он должен проявить. Так, ЛФ все время присутствует на поверхности слизистого эпителия, проявляя антимикробную активность, тогда как его секреция в кровь или ткани происходит в ответ на воспаление. Этот белок синтезируется в апоформе (без железа) и присутствует в большинстве биологических жидкостей. Данный гликопротеин содержится в секретах слизистой, включая слезную жидкость, слюну, влагалищные выделения, сперму, секрет носовой и бронхиальной пазух, желчь, секрет желудочно-кишечного тракта, мочу, достигая наибольшей концентрации в молоке и молозиве. Благодаря этому ЛФ является вторым по широте распространения белком в организме после казеинов. ЛФ может также выделяться и в физиологических жидкостях, таких как плазма крови и околоплодная жидкость [3].

Помимо этого, ЛФ синтезируется в миелоцитах на ранней стадии их созревания и в дальнейшем входит в состав вторичных гранул нейтрофилов. В процессе воспаления или в результате другой патологии уровень ЛФ в биологических жидкостях значительно возрастает и может использоваться как биохимический маркер воспаления. Особенно сильно изменяется концентрация ЛФ в плазме крови, где при нормальных условиях его содержание составляет 0,4—2 мг/л, а при воспалении и остром сепсисе может возрасти до 200 мг/л [4].

ЛФ попадает в кровь при дегранулировании клеток нейтрофилов и затем быстро связывается и поглощается паренхимными клетками печени. Фактически ЛФ, который определяется в плазме крови, не является абсолютным показателем концентрации этого белка, так как, во-первых, нейтрофилы доставляют ЛФ перед дегрануляцией непосредственно к месту воспаления, и, во-вторых, ЛФ может связываться с мембранными глюкозаминогликанами или протеогликанами [5], так что клетки могут создавать очень высокую локальную

концентрацию этого белка на своей поверхности. Интересно, что именно иммобилизованный клетками ЛФ, а не свободный белок активирует эозинофилы в дыхательном эпителии [6].

Защитные функции организма определяются врожденной и приобретенной особенностями иммунной системы, которые называют гуморальным и клеточным иммунитетом. ЛФ относится к системе врожденного иммунитета, или неспецифическому иммунитету. Тем не менее ряд исследований указывает, что этот белок опосредованно вовлечен в процессы клеточного иммунитета. Можно сказать, что организм обладает защитными противовоспалительными системами, где ЛФ является одним из ключевых факторов [7].

Наиболее изучен механизм антибактериальной активности ЛФ, который секретруется на слизистых организма и препятствует развитию и колонизации патогенной микрофлоры или просто лизирует бактерии. Антибактериальные свойства этого белка определяются его высоким сродством к железу и способностью разрушать мембраны микроорганизма при непосредственном контакте. Конститутивный синтез ЛФ и его секреция, а также транспорт этого белка нейтрофилами в очаг воспаления, несомненно, усиливают защитный эффект. Помимо антибактериальной активности, ЛФ отвечает за активацию или ингибирование функций иммунных клеток, участвующих в развитии процесса воспаления. Биохимически эти регуляторные функции ЛФ определяются его способностью связывать ионы железа и непосредственно взаимодействовать с рядом биомолекул и мембранами иммунных клеток [5].

В значительных количествах вырабатывают ЛФ вторичные гранулы нейтрофилов, где он играет значимую физиологическую роль. ЛФ является железосвязывающим трансферрином и единственным трансферрином, обладающим способностью к сохранению данного металла в значительном диапазоне кислотности pH [5]. ЛФ также имеет высокую устойчивость к расщеплению белков, воспроизводится в различных типах тканей, являясь многофункциональным протеином. К физиологическим свойствам ЛФ относятся регуляция процесса всасывания железа в кишечнике, участие в иммунологической реакции, ЛФ является антиоксидантом, обладает противораковыми и противовоспалительными свойствами, а также защищает от микробной инфекции. Противомикробные свойства ЛФ главным образом обеспечиваются возможностью изолирования железа, что лишает микроорганизмы питательных веществ. Положительно заряженный ЛФ взаимодействует с отрицательно заряженным инфекционным агентом бактериального, вирусного, грибкового, паразитарного характера, вызывая клеточный лизис. Кроме того, ЛФ является нутрицевтиком [8].

ЛФ относится к семейству белков с хорошо известными свойствами трансферрина. Человеческий лактоферрин (чЛФ) представляет собой полипептид из 692 аминокислотных остатков, его трехмерная структура

была определена с высоким разрешением. Оба белка, чЛФ и трансферрин, имеют чрезвычайно схожую структуру, но первичная гомология составляет только 60%. Особенно заметны различия в аминокислотных последовательностях, которые экстраполированы на поверхность белковой глобулы и отвечают за физиологическую активность этих биомолекул. Тогда как изоэлектрическая точка трансферрина соответствует рН 6,5, чЛФ является основным белком с рН 8,5—9,0. Наибольший вклад в положительный заряд этого белка вносит N-концевой участок, так называемый лактоферрицин (ЛФц), который, как установлено, отвечает за многие защитные функции. ЛФц был выделен из нативной молекулы ЛФ после ограниченного протеолиза пепсином (для чЛФ аминокислотные последовательности 1—19 и 20—37, для коровьего ЛФ — 19—36) и содержал основные аминокислоты, образующие β -слой и α -спиральную структуру, отвечающую за независимые от связывания железа функции ЛФ. Это относится не только к бактерицидной активности, но и к иммунорегуляторным и противовоспалительным свойствам ЛФ. В настоящее время установлен еще один основной пептид в структуре ЛФ, который назвали лактоферрампин, показана его бактерицидная активность против ряда патогенных микроорганизмов [9].

Интересен факт прочного связывания железа ЛФ даже при рН 3,0 и ниже, тогда как трансферрин теряет связанный ион металла уже при рН 5,5. Биохимически это определяется присутствием дополнительной водородной связи между двумя лизиновыми остатками в трансферрине, что ослабляет его взаимодействие с ионом металла, а в молекуле ЛФ две доли белка более плотно прилегают друг к другу. Высокая аффинность ЛФ к железу не только усиливает его антибактериальные функции, но и позволяет ему проявлять антиоксидантные свойства, которые подробно будут рассмотрены ниже [5].

Катионный характер молекулы ЛФ позволяет ей связываться со многими биомолекулами, которые отрицательно заряжены, что делает затруднительным изучение специфического взаимодействия ЛФ с лигандами, а это важно в проявлении его иммунорегуляторных свойств. Сульфатированные протеогликианы, присутствующие на поверхности клеток, на 80% определяют сорбцию ЛФ на клетках. Несмотря на низкую аффинность ($K_a \sim 10^6$ М) и ионный характер этого взаимодействия, считается общепринятым, что именно взаимодействие с протеогликианами определяет высокую плотность молекул ЛФ на поверхности клетки (несколько миллионов центров связывания для некоторых типов клеток). Взаимодействие ЛФ с глюкозаминогликианами очень важно при регуляции воспаления. Основные функциональные домены молекулы ЛФ, определяющие взаимодействие этого белка с глюкозаминогликианами и свободным гепарином, были определены как аминокислотные последовательности 1GRRRRS6 и 28RKVR31. Эти участки молекулы ЛФ образуют катионное «седло», которое связывает сульфатированную цепь лиганда [3].

Помимо протеогликианов, было открыто несколько клеточных рецепторов, которые модулируют сигнальные пути, влияют на эндоцитоз и проникновение ЛФ в ядро. Например, 105 кД специфический рецептор, который идентифицирован на поверхности лимфоцитов, тромбоцитов и клеток молочной железы, обеспечивает эндоцитоз ЛФ этими клетками. Относительно недавно было показано специфическое взаимодействие ЛФ с рецептором нуклеолином, который экспрессируется на поверхность делящихся клеток и так же, как и протеогликианы, отвечает за эндоцитоз и транспорт ЛФ в ядро. Еще до получения прямого экспериментального подтверждения такого взаимодействия было много данных, указывающих на то, что нуклеолин является рецептором ЛФ, причем домены связывания этого белка в молекуле ЛФ отличаются от известных центров связывания [2].

Другой важный рецептор ЛФ — рецепторподобный липопротеин, который не только обеспечивает эндоцитоз ЛФ, но и участвует в пролиферации остеобластов после контакта с ЛФ. Этот же рецептор найден на поверхности иммунных клеток, что указывает на его возможную роль в иммуномодуляторных процессах. Наконец, показано, что белок 34 кД, который локализован на мембранах клеток тонкой кишки, отвечает за интернализацию ЛФ в клеточный цитозоль [4].

Отдельно рассматриваются растворимые отрицательно заряженные биомолекулы, которые связываются с ЛФ, что наиболее важно при проявлении этим белком противовоспалительных свойств. Прежде всего это липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli*, который взаимодействует с ЛФ через свой липид А. В молекуле чЛФ обнаружено 2 центра связывания ЛПС *E. coli*, которые локализованы в разных долях белка и имеют различные константы диссоциации (K_i 3,6 и 390 нМ для N- и C-доли соответственно) [3].

Установлено, что обе последовательности, 1GRRRR5 и 28RKVRGPP34, которые отвечают за взаимодействие с 105-кД ЛФ рецептором, глюкозаминогликианами и ДНК, участвуют вместе или раздельно в связывании с молекулами ЛПС с высокой аффинностью. Показано, что такие провоспалительные факторы, как олигонуклеотиды с метилированными CpG, также нейтрализуются белком ЛФ. Наиболее важным считается взаимодействие с высокой биоспецифичностью ($K_d \sim 16$ нМ) между ЛФ и растворимым фактором CD14, который является рецептором для ЛПС (sCD14). Установлено, что ЛФ связывает не только свободный фактор sCD14, но и (через специальный механизм) комплексы sCD14 с ЛПС, или липид А — олигосахарид. Положительно заряженные домены ЛФ важны при взаимодействии с ЛПС, рецепторами и воспалительными факторами. Более того, сам лактоферрицин как отдельный пептид взаимодействует с ЛПС, но отмечается, что это взаимодействие происходит не с липидом А эндотоксина, а с другими отрицательно заряженными участками ЛПС молекулы [1].

Связывание ЛФ с поверхностью клеток позволяет предположить, что этот белок может активировать таким образом дифференциацию и/или пролиферацию клеток. Ряд данных, изложенных ниже, подтверждает это предположение, однако еще не изучен биохимический механизм, как именно ЛФ активирует клетку. В связи с этим интересно недавнее открытие, где показано, что клеточный рецептор на поверхности остеобластов проявляет митогенную активность после связывания с ЛФ через p42/44 MAP-киназный метаболический сигнал. Такой же сигнальный путь был показан для лимфобластоцитов Т, которые содержат 105-кД ЛФ рецептор. Высказывается предположение, что ЛФ может проникать в клеточное ядро и действовать как активатор транскрипции. Это подтверждается последними исследованиями, которые указывают на то, что рецептор нуклеолин является возможным переносчиком ЛФ с поверхности клетки в ядро [6].

Было установлено, что ЛФ снижает экспрессию ЛПС-индуцируемых цитокинов в Т_H-хелперах после интернализации в иммунную клетку и ингибирования действия ядерного транскрипционного фактора NF-κB. Механизм этого действия еще не полностью изучен, но известно, что именно фактор NF-κB играет критическую роль в процессе развития воспаления и иммунного ответа организма. Исследование S.M. Oh и соавт. (2004 г.) показывает сложную последовательность сигнальных реакций, в которых участвует ЛФ. Высокая концентрация этого белка работает как p53-трансактиватор генов, стимулируя действие ингибитора киназной активности белка, который в свою очередь регулирует фактор NF-κB и его связывание с ДНК. Эти же авторы предварительно установили трансаktivацию гена матричной металлопротеиназы-1 через активацию лактоферрином MAP-киназного сигнала, отвечающего за реакцию организма на стресс [3].

В экспериментах *in vitro* показано, что ЛФ может ускорять созревание клеток, выполняя функцию альтернативного источника железа для Т-клеток, но последние исследования *in vivo* установили, что ЛФ в основном работает как фактор связывания железа и защищает организм от избытка этого металла. Практически все механизмы активации ЛФ иммунной системы включают этап непосредственного контакта этой биомолекулы с мембранами клеток. Это предполагает наличие специфических рецепторов ЛФ, которые являются ключевыми эффекторами клеточного сигнала, эндоцитоза и (или) транспорта ЛФ в ядро клетки. К сожалению, некоторые результаты изучения этих эффекторов противоречат друг другу [4].

Установлено, что ЛФ регулирует созревание и активацию лимфоцитов, проявляет дифференцирующий эффект на изолированные тимоциты и В-клетки, а также, связываясь с Т-клетками, усиливает экспрессию CD4-антигена. Более того, показано, что у больных раком мочеполювых путей ЛФ регулирует экспрессию x-цепи рецептора Т-клеток. Усиление клеточной лити-

ческой активности — еще одна важная функция этого белка. ЛФ, экспрессируясь на поверхность зрелых нейтрофилов, может участвовать в связывании микроорганизмов. Массовое освобождение ЛФ из гранул происходит после индукции нейтрофилов TNFα-фактором, часть белка связывается с поверхностью нейтрофилов, но, как показано, и связанный, и свободный ЛФ усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов/макрофагов [2].

ЛФ является промотором подвижности клеток, образования супероксида и продукции таких провоспалительных молекул, как NO, TNFα и IL-8. В последних исследованиях установлено, что ЛФ усиливает фагоцитарную клеточную активность против возбудителя *S. aureus*. Молекулярный механизм этого действия ЛФ, по разным данным, крайне неоднозначный. Известно, что фагоцитарная активность нейтрофилов регулируется производными комплемента, в частности комплементарным фактором С3. Тогда непонятно, как ЛФ активирует нейтрофилы, потому что он ингибирует классическую и одновременно активирует альтернативную реакции комплемента. Последние работы показывают, что пептид ЛФц подавляет классическую реакцию комплемента, но не альтернативную реакцию и при связывании ЛФ с нейтрофилами также демонстрируется эта ингибирующая активность [5].

Ряд современных исследований указывает на иммунотропную активность молекулы ЛФ, когда этот белок проявляет «эффект усилителя» при генерации гиперчувствительности организма и пролиферирует действие вакцины БЦЖ на накопление Т-хелперных клеток у мышей. Этот эффект можно объяснить взаимодействием ЛФ с маннозным рецептором незрелых антигенузнающих эпителиальных клеток. Именно такое взаимодействие показано в эксперименте, где ЛФ, связываясь с дендритными клетками через поверхностный белок DC-SIGN, блокирует их взаимодействие с ВИЧ-гликопротеином gp120 и последующую вирусную трансмиссию.

Получение прямых экспериментальных доказательств регуляции иммунной системы белком ЛФ крайне затруднительно, хотя в настоящее время для этих целей в опытах используют лабораторных животных с дефицитом по гену ЛФ. Впервые предположение об участии этого белка в модуляции иммунного ответа было высказано в 1980 г. при наблюдении за пациентом с молекулярной мутацией, у которого белок ЛФ отсутствовал в нейтрофилах, но синтезировался внутренними железами, этот больной страдал хроническими инфекционными воспалениями [8].

В настоящее время в экспериментах с трансгенными мышами, несущими ген чЛФ, установлено, что эти животные более устойчивы к инфекционным заболеваниям. Такой же эффект наблюдался при прямом ингибировании ЛФ роста *S. aureus* и усилении активности Т_H-хелперных клеток при экспрессии и накоплении ЛФ в тканях животных. Более того, заражаемость туберкулезом мышей, несущих дефект по

Обзор литературы

белку 2b-микροглобулину, значительно снижалась после введения ЛФ. Пероральное применение ЛФ также защищает организм от ряда бактериальных инфекций, от летальной бактериемии животных и при острых оральных кандидозах. Например, оральное введение ЛФ полностью защищает поросят от сепсиса, вызываемого энтеротоксинами [6].

Экспериментально установлено, что на молекулярном уровне экзогенный ЛФ подавляет экспрессию определенных цитокинов, в основном провоспалительных (интерферон- γ , интерлейкин 1 β , 6, 5, 10, TNF α), и стимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов GM-CSF. ЛФ-зависимая активация экспрессии наблюдается для таких противовоспалительных факторов, как IL-4 и IL-10, при пероральном введении этого белка лабораторным крысам с острыми колитами. На клеточном уровне наблюдается увеличение титра нормальных клеток-киллеров (NK), усиливается фагоцитарный эффект, активируются нейтрофилы и модулируется процесс миелопоэза [2].

В последние годы появилось много публикаций по изучению противовоспалительных свойств ЛФ. Воспалительный процесс ЛФ в основном модулируется через ингибирование синтеза цитокинов, которые активируют иммунные клетки в очаге воспаления; чЛФ супрессирует TNF α , синтез IL-1 и IL-6 *in vitro* и *in vivo* в мононуклеарных клетках, реагирующих на присутствие энтеротоксина. ЛФ регулирует продуцирование цитокинов спленоцитами и дополнительно усиливает секрецию IL-10 и IL-4. Подавление экспрессии провоспалительных регуляторных молекул может определяться ЛПС-связывающей активностью ЛФ через участок ЛФц. Показано, что ЛФц самостоятельно нейтрализует ЛПС-активность. В этом процессе ЛФ является конкурентом специального ЛПС-связывающего белка крови, который переносит энтеротоксин на мембранный фактор mCD14, локализованный на клетках макрофагов [4].

ЛФ также ингибирует образование перекиси водорода, являясь промежуточным звеном при связывании ЛПС с L-селектином нейтрофилов. Более того, взаимодействие между ЛФ и растворимой формой фактора CD14 ингибирует экспрессию IL-8 — хемокина, который активируется комплексом CD14—ЛПС в эндотелии. Существуют и другие, описанные в литературе механизмы провоспалительной активности ЛФ, отличные от связывания ЛПС и CD14. Подавление синтеза IL-6, который индуцируется TNF α , является результатом ингибирования транскрипционного фактора NF- κ B в моноцитных клетках, который в свою очередь связываясь с TNF-промотором, активирует его синтез. Другой пример: ингибирование иммуностимулирующего эффекта эндотоксина на B-клетки может зависеть от связывания ЛФ неметилованных олигонуклеотидов. В коллагениндуцированных экспериментальных моделях воспалительного процесса и моделях сепсиса на лабораторных животных введение ЛФ в кровь приводило к усилению защиты организма и подавлению

воспаления. Это подтверждалось и в экспериментах, когда пероральное введение ЛФ подавляло экспрессию TNF α и секрецию IL-10 при артритах. Рекомбинантный и молочный белок ЛФ (человека и коровы) также защищает лабораторных животных от энтеротоксининдуцированного прерывания беременности, ингибируя синтез IL-6. Как отмечалось выше, ЛФ может регулировать процессы воспаления, вызываемые вирусными заболеваниями. Так, Sano и соавт. показали, что ЛФ снижал уровень инфицирования дыхательным синцитиальным вирусом (RSV), взаимодействуя с его поверхностным антигеном [3].

Ряд экспериментальных работ указывает на то, что ЛФ (при определенных условиях) активирует макрофаги и индуцирует уровень IL-8, TNF α и нитроксида (NO), являясь, таким образом, провоспалительным фактором. Комплекс ЛФ—ЛПС в этом случае является индуктором воспалительных медиаторов в макрофагах, действуя через Толл-подобный рецептор 4. Более того, после инкубации с комплексом ЛФ—ЛПС клетки становятся толерантными к действию энтеротоксина. ЛФ восстанавливает гуморальный иммунный ответ и увеличивает продукцию IL-6 альвеолярными и перитонеальными клетками при иммунодефицитном состоянии. В этой же экспериментальной модели показано, что ЛФ повышал титр CD3⁺ T-клеток, таким образом восстанавливая передаваемый этими клетками иммунный ответ при воспалении. Пероральное введение ЛФ защищает организм от потери массы тела и усиливает цитокиновый сигнал при инфицировании вирусом герпеса [5].

Введение препарата ЛФ больным хроническим гепатитом С в течение определенного времени приводит к смещению провоспалительного процесса в периферийной крови в сторону образования T_H1-хелперных цитокинов, которые существенно усиливают действие традиционной интерфероновой терапии гепатитов. Усиление экспрессии IFN- γ и TNF α лимфатическими клетками слизистой половых органов под действием ЛФ усиливает термоллабильность и гибель *Candida albicans* [3].

Взаимодействие ЛФ с ЛПС и растворимой формой фактора CD14 приводит не только к активации иммунных клеток, но и к синтезу специальных адгезирующих молекул на поверхности эндотелиальных клеток, которые мобилизуют и направляют лейкоциты в очаги воспаления. В частности, ЛФ индуцирует экспрессию эндотелиальными клетками человека белка E-селектина, межклеточного адгезирующего фактора 1 (ICAM-1) и IL-8. Указывается, что ЛФ конкурирует с хемокинами за их связывание с протеогликанами и последующее взаимодействие с лейкоцитами. Установлено, что пероральное введение ЛФ защищает слизистую кишечника при приеме нестероидных противовоспалительных препаратов за счет снижения миграции нейтрофилов в поражаемые ткани. С другой стороны, показано, что ЛФ мобилизует нейтрофилы к очагу воспаления при повышенной бактериемии. Содержащие ЛФ рецепторы млекопитающих предположительно играют важ-

ную роль в многофункциональном посредничестве в соединениях с ЛФ. В настоящем обзоре приведены исследования всех известных на сегодняшний день структур, содержащих ЛФ рецепторы, и их функций у млекопитающих, главным образом первичного рецептора, содержащего ЛФ и выделяющегося в большом количестве у младенцев не только в тонкой кишке, но и практически во всех других тканях. Содержащий ЛФ рецептор, выделенный из тонкой кишки, связывает избыток железа в клетках и предположительно исполняет другие физиологические функции. Другие содержащие ЛФ рецепторы различных тканей также могут принимать на себя некоторые функции ЛФ, например модуляции иммунной функции, ингибирование агрегации тромбоцитов, повышение сократительной прочности коллагенового геля [8].

Так, Takakura и соавт. установили, что снижение оральных кандидозов под действием ЛФ происходит за счет увеличения числа лейкоцитов и секретируемых ими цитокинов в очаге воспаления [3].

Разработано множество методов определения концентрации ЛФ в организме. Одним из них является тест-система с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Для обеспечения максимальной чувствительности, воспроизводимости и специфичности тест-системы разработан вариант «сэндвич»-ИФА.

Чувствительность тест-системы составляет 2 нг/мл при определении чЛФ в крови и 5 нг/мл — в молоке трансгенных крольчих. Диапазон измерений: от 0 до 800 нг/мл.

Кроме того, разработан метод раман-флуоресцентных технологий, суть его заключается в том, что через образец исследуемого вещества пропускают луч с определенной длиной волны, который при контакте с образцом рассеивается. Полученные лучи с помощью линзы собираются в 1 пучок и пропускаются через светофильтр, отделяющий слабые рамановские лучи от более интенсивных рэлеевских. «Чистые» рамановские лучи усиливаются и направляются на детектор, который фиксирует частоту их колебания.

Преимущества данного метода:

- уникальность спектра, как отпечатка пальца;
- возможность идентификации большого числа соединений, включая неорганические полиатомные соли (фосфаты, сульфаты, карбонаты и прочие), оксиды, кислоты и основания, органические растворители, полимеры, сахара и все биологические жидкости;
- высокая скорость по сравнению с рутинными методами анализа — анализ одной дозированной единицы занимает около 10 с и сразу позволяет сделать выводы.

В связи с тем что уровень ЛФ в биологических жидкостях может значительно возрастать во время септических состояний, возникает вопрос о возможности использовать параметры концентрации этого белка как биомаркер воспалительных процессов.

Например, при ревматоидных артритах уровень ЛФ возрастает в выделениях из мочеполовых органов, но не в крови. ЛФ считается достоверным маркером активации нейтрофилов при ревматоидных заболеваниях, но не является маркером активности и динамики воспалительного заболевания. Повышение концентрации ЛФ во время острого респираторного синдрома (SARS) является скорее всего показателем активности системы врожденного, а не специфического иммунитета. Показана 148-кратная активация экспрессии гена ЛФ периферийными мононуклеарными клетками во время SARS. Приведенные наблюдения открывают новые возможности в диагностике и лечении этого синдрома.

Достоверная диагностика острого кишечного воспаления у пациентов с диареей и желудочно-кишечной болью возможна по анализу концентрации фекального ЛФ. Уровень ЛФ резко возрастает в отобранных образцах, что коррелирует с активацией лейкоцитов в очаге воспаления. Показано, что ЛФ является высокочувствительным и специфическим биомаркером хронического желудочно-кишечного воспаления. Стабильность этого показателя делает количественный анализ ЛФ важным тестом в клинической лаборатории.

Buderus и соавт. идентифицировали ЛФ как маркер кишечного воспаления и терапевтического ответа у пациента с болезнью Крона. Таким образом, определение уровня ЛФ можно использовать в качестве клинического маркера при различных воспалительных заболеваниях [3].

Известно, что концентрация ЛФ в слюне и гингивальной жидкости значительно изменяется в ходе развития воспалительных процессов в ротовой полости.

В последнее десятилетие во многих странах мира отмечен рост частоты вагинальных инфекций, которые прочно занимают первое место в структуре акушерско-гинекологической заболеваемости.

Учитывая вышеизложенное, нельзя исключить перспективность изучения ЛФ в качестве маркера воспалительных заболеваний женской репродуктивной сферы, а также его роли в комплексном лечении данных состояний.

В эксперименте установлено, что ЛФ оказывает влияние на неспецифический иммунный ответ у ряда промысловых рыб, в то время как гуморальный иммунный ответ не зависит от введения ЛФ. Этот белок эффективно модулирует врожденную иммунную клеточную активность у рыб, в основном нормальную цитотоксичную активность, и воспалительные процессы в дыхательной системе. В настоящее время ЛФ используется как иммуномодулятор при разведении морских лещей (*gilthead seabream*) [8].

Показано усиление экспрессии IFN- α и активности нормальных клеток-киллеров у добровольцев при приеме липосомальной формы ЛФ. Пероральное введение ЛФ снижает концентрацию эндотоксина в кишечном тракте и, подобно бифидобактерии, увеличивает титр В- и Т-клеток и экспрессию цитокинов (IL-6, TNF α ,

IFN- γ) в межворсинчатом пространстве слизистой кишечника. Интересно, что ЛФ может переноситься из тонкой кишки в кровь через мезентеральную лимфатическую систему. Тем не менее пероральное введение ЛФ используется прежде всего для регуляции системного иммунного ответа слизистой пищеварительного тракта. Добавление ЛФ в питьевую воду не приводит к видимым изменениям в иммунном статусе организма, а постоянное введение этого белка в желудок или использование при длительной диете приводит к синтезу анти-ЛФ-иммуноглобулинов [4].

Все клинические модели использования ЛФ при пероральном введении показывают усиление системного клеточного ответа через T_2 -хелперные клетки, с одной стороны, и модуляции иммунной реакции слизистой через увеличение синтеза кишечных иммуноглобулинов А (IgA) — с другой. Однако при длительном использовании ЛФ также активируется гуморальный иммунный ответ с синтезом антител IgG2a в крови и возрастает уровень цитокинов, присущих T_1 -хелперным клеткам. Это должно учитываться при разработке перорального режима введения ЛФ [6].

Антигрибковая активность чЛФ проявляется против грибов кожных заболеваний (например, стригущего лишая, кандид, поражающих слизистую оболочку рта у здоровых людей). Основным антигрибковым препаратом против *Candida albicans* считается лекарственный препарат флуконазол. Однако длительное применение данного лекарственного препарата привело к появлению устойчивых к его воздействию штаммов грибка. ЛФ в сочетании с флуконазолом обладает антигрибковой активностью не только против штаммов *Candida albicans*, устойчивых к флуконазолу, но и других видов кандид (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*). Оральный прием ЛФ при ослабленном иммунитете и симптомах стоматита в эксперименте приводит к значительному уменьшению размеров повреждения языка и слизистой ротовой полости. Также экспериментальным путем обнаружено, что при приеме ЛФ через рот уменьшается количество патогенных организмов в желудочно-кишечном тракте. Более того, больные СПИДом, у которых обнаруживали грибок, полностью излечивались от грибка после приема ЛФ совместно с такими лекарствами, как лизоцим и итраконазол. Механизм противогрибкового действия ЛФ мало изучен. Обнаружено, что ЛФ разрушает стенку и закисляет цитоплазму клеток *Candida albicans*. Учитывая, что ЛФ позволяет уменьшить дозу лекарств при эффективном лечении грибковых инфекций, его можно с успехом применять вместе с противогрибковыми лекарствами при лечении устойчивых грибковых инфекций. Совместное применение ЛФ с антибиотиками, противогрибковыми и противовирусными препаратами очень эффективно [3].

Противогрибковая активность препарата неолактоферрин протестирована на трех клинических изолятах *Candida albicans*, 2 из которых были чувствительны к

действию ЛФ. Во всех случаях усиливалось действие нистатина [6].

Заключение

В последние годы произошел важный прорыв в изучении ЛФ, особенно в открытии механизма инактивации этим белком экзогенных провоспалительных факторов. ЛФ также связывает избыток железа и энтеротоксина, таким образом модулируя иммунные процессы, которые активируются этими компонентами. Дополнительно ЛФ взаимодействует с рядом клеточных рецепторов, таких как протеогликаны, аполипопротеин Е/липопротеин низкой плотности — рецептор, нуклеолин, рецепторы лимфоцитов и энтероцитов. Результатом этого взаимодействия является индукция определенных биологических процессов, на изучение которых требуется время.

Свойства ЛФ зависят от уровня его экспрессии и секреции. При нормальных условиях ЛФ синтезируется клетками желез и экспрессируется на поверхность слизистой, создавая мощный бактериостатический и бактерицидный барьер между окружающей средой и организмом. Нейродегенеративные заболевания или воспалительные процессы приводят к дегрануляции нейтрофилов в очаге воспаления, активации специальных нейронов и микроглиальных клеток, увеличивая уровень ЛФ в области воспаления.

Этот белок взаимодействует с рецепторами различных типов клеток с последующим его эндоцитозом. В основном ЛФ модулирует связывание железа, ЛПС и CD14; действие иммунных факторов ЛФ приводит к снижению воспалительного ответа организма, что показано во многих исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S. Preparation et proprietes de la lactosiderophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1960; 45: 413–421.
2. Houghton M.R., Gracey M., Burke V., Bottrell C., Spargo R.M. Breast milk lactoferrin levels in relation to maternal nutritional status. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1985. 4: 230–3.
3. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurie J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62 (22): 2549–59.
4. Teng C.T., Beard C., Gladwell W. Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1439–49.
5. Atsushi Yanaihara, Kaori Mitsukawa, B. Agr, Shinji Iwasaki, Katsufumi Otsuki, Toshihiro Kawamura, Takashi Okai. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil. and Steril.* 2007; 87 (2): 279–82.
6. Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009; 33 (4): 301.e1–8.
7. Qiao Yuan, Chen Zhuo, Ma Yonggui, Lu Fuer, Chen Suhua, Huang Guangying. Nonoxynol-9 berberine plural gel has little effect on expression of SLPI, SP-D and lactoferrin in mice's vagina. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11 (7): 565–76.
8. Masson P.L., Heremans J.F., Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 1969; 130: 643–58.
9. Metz-Boutigue M.H., Jolles J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G. et al. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 1984. 145 (3): 659–76.