

УДК 577.169:616.153.96

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИНГИБИНА-А С ЛАКТОФЕРРИНОМ****Николаев А.А., Николаева Н.Н.***ГБОУ ВПО «Астраханский Государственный медицинский университет России», Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

Проведен анализ механизмов образования комплексов Ингибина-А с одним из острофазовых белков лактоферрином (ЛФ). Методами гель-проникающей хроматографии показано, что молекулы ингибина-А служат инициаторами процесса олигомеризации ЛФ, более крупная молекула ЛФ сохраняет доступными свои антигенные детерминанты, а молекулы ингибина-А «укрываются» гидрофобными участками ЛФ и теряют возможность взаимодействовать с антителами. В присутствии 0,2 М гепарина, ингибин-негативный белковый комплекс с молекулярной массой 275-285 КД разделяется на два крупных компонента с молекулярной массой 82 КД и 44 КД, что соответствует данным о молекулярной массе ЛФ и ингибина-А, соответственно. Происходит диссоциация комплекса, и в пике 1 содержится ЛФ, а в пике 2 ингибин-А. Есть основания полагать, что в организации межмолекулярных комплексов ЛФ – ингибин участвуют слабые, преимущественно гидрофобные и электростатические взаимодействия аминокислотных и, возможно, гликозидных остатков

**Ключевые слова:** ингибин-А, лактоферрин человека, интерполимерное взаимодействие, хроматография, гепарин

**CHROMATOGRAPHIC STUDY OF INTERMOLECULAR COMPLEXES OF INHIBIN-A AND LACTOFERRIN****Nikolaev A.A., Nikolaeva N.N.***Astrakhan State medical University Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru*

The analysis of mechanisms of complex formation of Inhibin-A with one of the acute-phase proteins lactoferrin (LF). Methods gel permeation chromatography shows that the molecules of the inhibin a-And serve as initiators of the process of oligomerization LF, larger molecule LF stores available their antigenic determinants and molecules inhibin-A «refuge» hydrophobic patches of LF and lose the ability to interact with antibodies. In the presence of 0.2 M of heparin, ingeminating protein complex with a molecular weight of 275-285 CD is divided into two major component with a molecular weight of 82 KD and 44 KD, which corresponds to molecular weight LF and inhibin-A, respectively. Involves dissociation of the complex, and in peak 1 contains LF, and peak 2 inhibin-A. There is reason to believe that the organization of intermolecular complexes LF – inhibin involved weak, mainly hydrophobic and electrostatic interaction of amino acid and, possibly, the glycosidic residues

**Keywords:** inhibin A, human lactoferrin, interpolymer interaction chromatography, heparin

При бесплодии неясного генеза важным фактором может служить уменьшение овариального запаса, когда никакое другое очевидное объяснение происхождения не найдено [7] Методы, основанные на определении уровня различных пептидов, вырабатываемых в яичнике (ингибин-А и ингибин-В, активин-А, антимюллеровый гормон), обладают высокой точностью определения овариального резерва. 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 [14] пришли к выводу, что даже наличие достаточных уровней ингибина-А в крови не гарантирует успех при лечении бесплодия. Это связано, вероятно, с наличием у пациентов биохимических факторов воспаления (цитокинов, острофазовых белков), вызывающих снижение биологической активности ингибина-А. Выяснить этот механизм мы и попытались в нашем исследова-

нии. Известно [5], что ингибин-А и активин способны образовывать стабильные комплексы с некоторыми растворимыми белками, и эти комплексы снижают способность ингибина-А взаимодействовать с рецепторным аппаратом. Среди маркеров воспаления один из наиболее распространенных – лактоферрин, который обладает, многократно доказанной способностью к интерполимерным взаимодействиям [2, 13].

Ранее мы исследовали способность ингибина-А образовывать комплексы с лактоферрином [3]. Проведенный анализ возможности образования комплексов Ингибина-А с лактоферрином методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноэлектрофореза показал 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. В настоящей работе приводятся данные хроматографического исследования комплексов ингибин-лактоферрин и оцениваются возможные механизмы образования этих интерполимерных комплексов.

### 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 метод гель-фильтрации на сефадекс G-200 («Pharmacia», Швеция) категории «Fine», а также Тоуорепл (Тоуо-Сода, Япония). Исходный препарат (объем которого составлял 0,5–1 % от рабочего объема колонки), предварительно смешанный с рабочим буфером (0,1 М натрий-фосфатный буферный раствор pH = 7,3). В объемном соотношении 1:1 и голубым декстраном-2000 (до 0,2% концентрации), вносили в колонку при помощи пипетки, осторожно наслаивая его на открытый (но не высушенный) слой сорбента. Элюция проводилась со скоростью 10 мл/см<sup>2</sup>,ч. Максимальный гидравлический напор не превышал 1/2. Сбор белковых фракций начинали в тот момент, когда окрашенная голубая зона приближалась к концу колонки. Сбор фракций осуществляли на программируемом коллекторе фракций BioFrac с ультрафиолетовым детектором фракций (BioRad). Идентификацию лактоферрина и ингибина во фракциях осуществляли методом иммунодиффузии. Регенерацию колонки проводили промыванием геля 1 М раствором NaCl и 2-3-мя объемами рабочего буфера.

Ввиду того, что синтетический гель Тоуорепл резистентен к давлению, хроматографический процесс проводили при высоком давлении гидравлического

столба, что значительно ускоряло процесс разделения белковых фракций. Во всем остальном основные принципы процесса гель-проникающей хроматографии на Тоуорепл и на сефадексе G-200 были сходны.

### Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из рис. 1, смесь лактоферрина и ингибина-А образует три крупных хроматографических пика, причем пик 2 и пик 3 разделяются не полностью. Расчет молекулярной массы белков, содержащихся в пике 1, показал молекулярную массу 275-285 КД. Вершина пика 2 соответствует молекулярной массе 110-115 КД. Молекулярная масса белков, входящих в пик 3, не превышает 45 КД.

Нами проведен иммунохимический анализ фракций, входящих в пик 1, пик 2 и пик 3. Пик 1 собирали с 23 по 30 пробирку, пик 2 собирали с 40 по 45 пробирку, пик 3 собирали с 48 по 52 пробирку. Полученные фракции диализовали и концентрировали до исходного объема.

Анализ показал, что пик 1, имеющий молекулярную массу около 280 КД, содержит лактоферрин, а антитела к ингибину-А в этой хроматографической фракции его не выявляют. Но молекулярная масса хроматографической фракции пик 1 более чем в 3 раза превышает молекулярную массу ЛФ, которая по разным данным колеблется от 76 до 80 КД [20]. На рис. 2 представлен иммуноэлектрофоретический анализ полученных фракций.

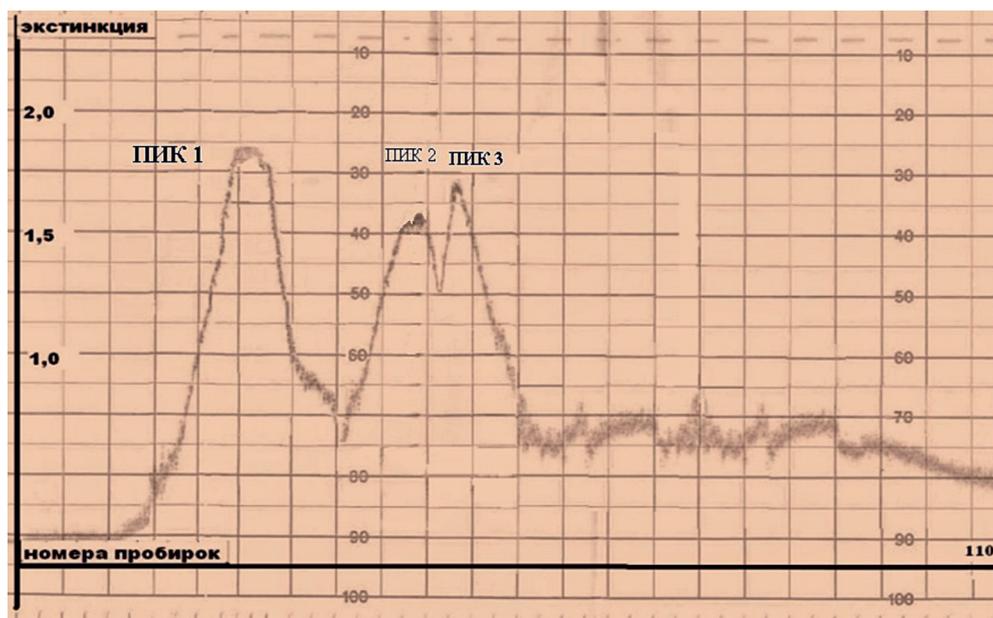


Рис. 1. Гель-фильтрация смеси ингибина-А и лактоферрина № 2–3 через сефадекс G-200. Колонка 1,7х85 см, фракции по 5 мл

В данном случае, можно предположить, что молекулы ингибина-А служат инициаторами процесса олигомеризации ЛФ, а отсутствие иммунохимической реакции на ингибин-А в составе межмолекулярного комплекса ЛФ – ингибин-А может быть результатом 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.

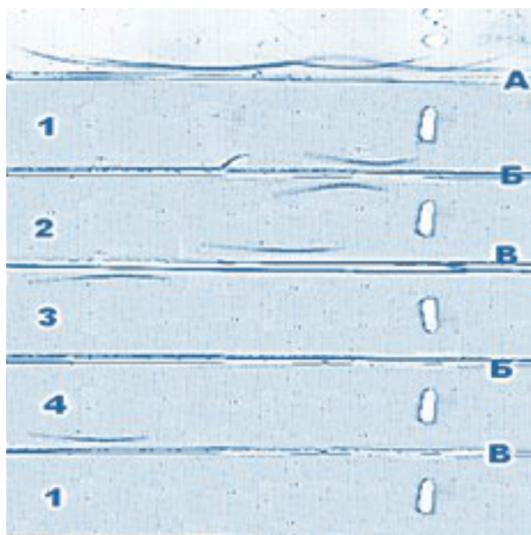


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез хроматографических фракций смеси ингибина-А и ЛФ. пик 1 (№№ пробирок 23-30); 2. пик 2 (№№ пробирок 40-45); 3. пик 3 (№№ пробирок 48-52); 4. препарат ингибина-А (контроль) А – антисыворотка к белкам сыворотки крови человека; Б – антисыворотка к ЛФ; В – антисыворотка к ингибину-А

Способность к образованию олигомерных форм ЛФ показана группой исследователей под руководством E.Zelass-Rochard [16]. Было обнаружено, что ЛФ может образовывать димеры и тетрамеры.

По нашим данным белок, входящий в состав пика 1, не может быть тетрамером ЛФ, т.к. молекулярная масса тетрамера не менее 310 КД, а для димера молекулярная масса пика 1 слишком велика. На этом основании мы считаем наиболее вероятным объяснением существование межмолекулярного комплекса из двух молекул ЛФ и нескольких молекул ингибина, связывающих молекулы ЛФ на основе гидрофобного взаимодействия. Этот тип взаимодействия, наряду с электростатическим, рассматривается многими авторами как наиболее вероятный. Эти функции

выполняют аминокислотные и, возможно, гликозидные остатки ЛФ.

Кроме того, известно, что во многих биологических жидкостях (например, молоке) ЛФ находится в комплексе с другими белками, включая иммуноглобулины, церулоплазмин, растворимый фактор CD14, интерлейкин-7 [4, 6]. Эти авторы предполагают, что способность ЛФ к комплексообразованию определяется концентрацией данного белка в среде. Они наблюдали активное образование комплексов ЛФ с иммуноглобулинами и церулоплазмином при концентрациях ЛФ более 0,1–1 нМ. Интересно, что концентрация ЛФ в крови чаще всего соответствует примерно этой величине и, таким образом, ЛФ в крови может быть смесью свободного ЛФ и его комплексов с другими белками, что отражается на функции этих белков [15].

Мы собрали ингибин-негативные хроматографические фракции, входящие в пик 1 (рис. 1) и провели рехроматографию, но уже в присутствии 0,2 М гепарина, известного наибольшим сродством к лактоферрину и способного вызывать диссоциацию любых межмолекулярных комплексов, содержащих этот белок [8, 11].

Как видно из рис. 3, в присутствии гепарина белковый комплекс с молекулярной массой 275–285 КД разделяется на два крупных компонента с молекулярной массой пик 1 равной 82 КД и пик 2 равной 44 КД, что соответствует литературным данным о молекулярной массе ЛФ и ингибина-А, соответственно. Учитывая данные иммуноэлектрофоретического анализа хроматографических фракций происходит диссоциация комплекса, и в пике 1 содержится ЛФ, а в пике 2 ингибин-А.

Природа межмолекулярных связей ЛФ до настоящего времени не выяснена. Есть основания полагать, что в организации межмолекулярных комплексов белка участвуют слабые, преимущественно гидрофобные и электростатические взаимодействия аминокислотных и, возможно, гликозидных остатков ЛФ [9, 10]. Полученные нами данные подтверждают это предположение

Полученные нами данные подтверждают предположение, что в организации межмолекулярных комплексов белка участвуют слабые, преимущественно гидрофобные и электростатические взаимодействия. Принимая во внимание небольшой размер мономерной молекулы ЛФ (76–80 КД) и его исключительную полифункциональность, мы предположили, что различные функции белка могут реализоваться на уровне его моно-, ди-, три- и тетрамерных форм, а переход между этими формами может быть под контролем таких лигандов, как ингибин.

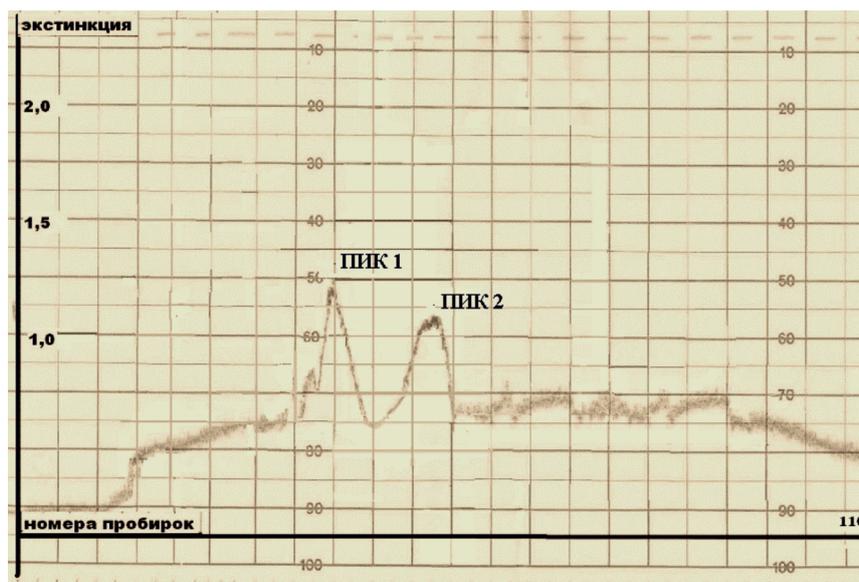


Рис. 3. Гель-фильтрация межмолекулярного комплекса ингибина-А и ЛФ через сефадек G-200 в присутствии 0,2 М гепарина. Колонка 1,7x85 см, фракции по 5 мл

#### Список литературы

1. Гудинская Н.И., Николаев А.А. Способ получения и очистки ингибина-А человека / Патент на изобретение от 17.06 2011. № 2 434 018 С2.
2. Николаев А., Алтухов С., Аншакова Н. Образование интерполимерных комплексов белками семенной плазмы // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 4. – С. 234–238.
3. Николаев А.А. Комплексообразование ингибина-А с лактоферрином человека // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1 (часть 3). – С. 401–405.
4. Соколов А.В. Обнаружение и выделение из грудного молока комплекса церуллоплазмينا и лактоферрина // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 2. – С. 208–215.
5. Akande A.V., Asselin J., Keay S.D., Cahill D.J., Mutukrishna S., Groome N.P., Wardle P.G. Inhibin A, inhibin B and activin A in follicular fluid of infertile women with tubal damage, explained infertility and endometriosis // Am.J. of Reprod. Immunol. – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 61–69.
6. Baveye S., Ellass E., Fernig D.G., Blanquart C., Mazurier J. and Legrand D. Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex // Infect.Immun. – 2007. – № 72. – P. 6519–6525.
7. Chen L., Tunnell C.D., De Petris G. Sertoli-Leydig cell tumor with heterologous element: a case report and a review of the literature. // Int J Clin Exp Pathol. – 2014. – V. 7, № 3. – P. 1176–1181.
8. Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Ellass-Rochard E., Duthille I., Spik G. et al. Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line // Eur. J. Cell. Biol. – 1998. – № 77. – P. 344–351.
9. Ellass-Rochard E., Legrand D., Salmon V., Roseanu A., Trif M., Tobias P. S. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein // Infect. Immun. – 2006. – V. 66. – P. 486–491.
10. Ellass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Trif M., Salmon V., Motas C. et al. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to E. coli 055B5 lipopolysaccharide // Biochem. J. – 1995. – № 312. – P. 839–845.
11. Legrand D., van Berkel P.H., Salmon V., van Veen H.A., Slomianny M.C., Nuijens J.H. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells // Biochem.J. – 2004. – № 329. – P. 841–846.
12. Pouresmaeli 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.
13. Skelte G. Anema C.G. Kees de Kruij Complex coacervates of lactotransferrin and b-lactoglobulin // Journal of Colloid and Interface Science. – 2014. – V. 430. – № 15. – P. 214–220.
14. Veltman-Verhulst SM, Cohlen BJ, Hughes E, Heineman MJ. Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. // Cochrane Database SystRev. – 2012. – v. 12, № 9. – P. 1838–1857.
15. Ellass-Rochard E., Legrand D., Salmon V., Roseanu A., Trif M., Tobias P. S. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein // Infect. Immun. – 2008. – № 76. – P. 686–691.
16. Ellass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Trif M., Salmon V., Motas C. et al. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to E. coli 055B5 lipopolysaccharide // Biochem. J. – 2005. – № 323. – P. 839–845.